



ELOÍSA PINHEIRO GIARETA

**O CAMARÃO DE ÁGUA DOCE *Macrobrachium acanthurus* WIEGMANN,
1836 (CRUSTACEA: DECAPODA: PALAEMONIDAE) E O DESAFIO HIPER-
SALINO: EXPRESSÃO MUSCULAR DE HSP70 E ATIVIDADE DA ENZIMA
BRANQUIAL ANIDRASE CARBÔNICA**

CURITIBA

2017

ELOÍSA PINHEIRO GIARETA

**O CAMARÃO DE ÁGUA DOCE *Macrobrachium acanthurus* WIEGMANN,
1836 (CRUSTACEA: DECAPODA: PALAEMONIDAE) E O DESAFIO HIPER-
SALINO: EXPRESSÃO MUSCULAR DE HSP70 E ATIVIDADE DA ENZIMA
BRANQUIAL ANIDRASE CARBÔNICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zoologia, Departamento de Zoologia da Universidade Federal do Paraná como requisito à obtenção do título de Mestre em Zoologia.

Orientadora: Dra.Carolina Arruda de Oliveira Freire

CURITIBA

2017

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas

Giaretta, Eloisa Pinheiro

O camarão de água doce *Macrobrachium acanthurus* Wiegmann, 1836 (Crustacea: Decapoda: Palaemonidae) e o desafio hiper-salino : expressão muscular de HSP70 e atividade da enzima branquial anidrase carbônica. / Eloisa Pinheiro Giaretta. – Curitiba, 2017.
73 f., il. ; 30cm.

Orientador: Carolina Arruda de Oliveira Freire

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Zoologia

1. Camarão de água doce 2. Regulação osmótica 3. Metabolismo 4. Crustáceo 5. Anidrase carbônica I. Título II. Freire, Carolina Arruda de Oliveira III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Zoologia

CDD (20. ed.) 595.384



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
Setor CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
Programa de Pós-Graduação ZOOLOGIA

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em ZOOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **ELÓISA PINHEIRO GIARETA** intitulada: **O CAMARÃO DE ÁGUA DOCE EURIHALINO DIÁDROMO *Macrobrachium acanthurus* WIEGMANN, 1836 (CRUSTACEA: DECAPODA: PALAEMONIDAE) E O DESAFIO HIPER-SALINO: EXPRESSÃO MUSCULAR DE HSP70 E ATIVIDADE DA ENZIMA BRANQUIAL ANIDRASE CARBÔNICA**, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO.

Curitiba, 20 de Fevereiro de 2017.


CAROLINA ARRUDA DE OLIVEIRA FREIRE

Presidente da Banca Examinadora (UFPR)


MARTA MARQUES DE SOUZA

Avaliador Externo (FURG)


ENELISE MARCELLE AMADO

Avaliador Externo (UFPB)

Agradecimentos

À minha orientadora Prof^a Carolina Arruda Freire, por ter aceitado me orientar sem mesmo me conhecer, por todos os ensinamentos e oportunidades que jamais imaginei que teria. Pelo exemplo de profissional a ser seguido.

À Prof^a Viviane Prodócimo por todo auxílio e ensinamentos no protocolo de *Western Blotting*.

À CAPES pela bolsa a mim concedida no Programa de Pós-Graduação de Zoologia.

À Universidade Federal do Paraná e ao Programa de Pós-Graduação em Zoologia pela oportunidade e por toda a infraestrutura disponibilizada para a execução deste trabalho.

Aos professores por todo o conhecimento transmitido durante o mestrado.

À Vanessa, secretária do Programa de Pós-Graduação de Zoologia, pela eficiência e paciência em todos os pedidos.

A todos os colegas do LFCO, Leonardo, Isis, Guilherme, Gustavo, Thiago, Deivyson, Juliane, Felipe, Giovana, Natascha, obrigada por me receberem tão bem. Por todo auxílio no laboratório e em coletas. Pela amizade construída ao longo desses anos.

Ao Seu Laurival, sempre muito simpático ao vender os camarões.

À Silvia e Aniele, que convivi pouco, mas que tiveram fundamental importância, me auxiliando e socorrendo nos momentos em que o tal Western não estava dando certo. Vocês salvaram o dia, muitas vezes. Obrigada!

À Gi e Marcos, por terem me acolhido em sua casa sem mesmo me conhecer. Pelos ensinamentos, paciência e chutes (em especial do Marcos) quando necessários. Que se tornaram grandes amigos que levarei para a vida. Serei eternamente grata por tudo que vocês fizeram por mim, aos horizontes mostrados além do que víamos.

Em especial, novamente, a Gi, Nata, Marcos e Re por terem revisado e me auxiliado na escrita da dissertação. Aprendi muito com vocês.

Aos moradores da “Casa da Mãe Geovanna”, aos que estão e que passaram, Carol, Rafael, Mateus, Bruno, Thiago, China e Ro, pelos momentos de paz e distração.

A todos os amiguinhos queridos, Pedro, Amanda, Jéssica, Murilo, Salise, Ariane pela amizade e pelas distrações, festas, brincadeiras, a amizade e companhia de vocês deixa o dia mais leve e alegre.

Foi graças ao mestrado, que pude encontrar vocês, Baiana, Dai, Todos delícia (Mad e Re). As melhores pessoas que eu podia ter ao meu lado desde que cheguei aqui. Não vou nem falar o quão importante são para mim. Amo vocês!

Aos meus pais e minha irmã, Poli, por estarem sempre ao meu lado e apoiarem em todas as decisões. Tudo que sou hoje devo a vocês. Amo vocês!

E por fim, a pessoa que esteve comigo o tempo todo, apoiando, suportando minhas crises, incentivando e não me deixando desistir. Sempre dizendo que tudo ficará bem, não importa como. Renata, sem você ao meu lado nada disso seria possível.

À todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para a elaboração deste trabalho. Obrigada!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	6
RESUMO GERAL	8
GENERAL ABSTRACT	9
1. INTRODUÇÃO GERAL	10
2. OBJETIVOS	17
REFERÊNCIAS.....	17
CAPÍTULO I: PADRÃO DE EXPRESSÃO DA PROTEÍNAS DE ESTRESSE (HSP70) NO MÚSCULO DO CAMARÃO <i>MACROBRACHIUM ACANTHURUS</i> WIEGMANN, 1836 (CRUSTACEA: DECAPODA: PALAEMONIDAE) DIANTE DE DESAFIO HIPER-SALINO	21
RESUMO.....	22
ABSTRACT.....	23
3. INTRODUÇÃO	24
4. OBJETIVO.....	27
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	28
6. DISCUSSÃO	35
REFERÊNCIAS.....	41
CAPÍTULO II: CURSO TEMPORAL DAS CONCENTRAÇÕES DA HEMOLINFA E ANIDRASE CARBÔNICA BRANQUIAL NO CAMARÃO DE ÁGUA DOCE EURIHALINO, <i>MACROBRACHIUM ACANTHURUS</i> WIEGMANN, 1836 SUBMETIDO A AUMENTO DE SALINIDADE	46
RESUMO.....	47
ABSTRACT.....	48
1. INTRODUÇÃO	49
2. OBJETIVOS	50
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	51
4. RESULTADOS	53
5. DISCUSSÃO	57
REFERÊNCIAS.....	61
6. CONCLUSÃO GERAL	64
REFERÊNCIAS GERAIS.....	65

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO GERAL

- Figura 1.** Representação de transportadores de membrana branquiais em decápodes. V- ATPase localizada apicalmente, que excreta H^+ para fora da célula, Na^+/K^+ -ATPase localizada basolateralmente. O modelo mostra a conversão de CO_2 em HCO_3^- pela anidrase carbônica citosólica. Modificado de Morris (2001)..... 13
- Figura 2.** *Macrobrachium acanthurus*. Escala: 2 cm..... 15

CAPÍTULO I

- Figura 3.** Osmolalidade da hemolinfa de *M. acanthurus* exposto às salinidades 0, 15, 25 e 35 psu por 2 (A), 12 (B), 24 (C), 48 (D) e 120 (E) h. A linha isosmótica está representada em todos os gráficos de forma pontilhada. A seta no eixo x, representa a correspondência entre salinidade e osmolalidade da água. Letras minúsculas representam diferenças entre salinidades dentro de cada tempo. n=6 por condição..... 32
- Figura 4.** Conteúdo de água muscular de *Macrobrachium acanthurus* exposto às salinidades 0, 15, 25 e 35 psu por 2 (A), 12 (B), 24 (C), 48 (D) e 120 (E) h. Letras minúsculas representam diferenças entre salinidades dentro de cada tempo. n=6 por condição..... 33
- Figura 5.** Expressão de bandas de HSP70 em *Macrobrachium acanthurus*. .. 34
- Figura 6.** Densidade de bandas de HSP70 expressa no tecido muscular abdominal de *Macrobrachium acanthurus* submetido às salinidades 0, 15, 25 e 35 psu por 2 (A), 12 (B), 24 (C), 48 (D) e 120 (E) h. Os valores representados são da média da densidade das bandas em unidades arbitrárias \pm erro padrão da média (n=5-6). Acima de cada média estão representadas as bandas dos resultados do *Western Blotting*..... 35

CAPÍTULO II

- Figura 7.** Osmolalidade e teor hídrico muscular de *Macrobrachium acanthurus* em condição controle e após exposição por diferentes tempos à salinidade 20 psu. A linha pontilhada representa a osmolalidade da água em salinidade 20 psu. Letras minúsculas representam diferenças entre tempos dentro de cada condição. # indicam diferenças com o controle. n=6 para cada condição..... 54
- Figura 8.** Concentrações de íons Cloreto e Magnésio na hemolinfa de *Macrobrachium acanthurus* ao longo da exposição em salinidade 20 psu por

diferentes tempos. # indicam diferenças com o controle. n=6 para cada condição.

..... 55

Figura 9. Concentração de lactato na hemolinfa de *Macrobrachium acanthurus* submetido a condição controle e salinidade 20 psu por diferentes tempos. Letras minúsculas representam diferenças entre tempos dentro de cada condição. # indicam diferenças com o controle. n=6 para cada condição..... 56

Figura 10. Atividade específica da Anidrase Carbônica branquial de *Macrobrachium acanthurus*, após exposição a condição controle e salinidade 20 psu por diferentes tempos. Letras minúsculas representam diferenças entre tempos dentro de cada condição. # indicam diferenças com o controle. 57

RESUMO GERAL

A capacidade de sobreviver frente a variações ambientais, como pH, oxigênio, salinidade etc., está diretamente relacionada à ativação de mecanismos regulatórios. Estes garantem o equilíbrio osmótico e iônico, e mantêm desta forma a homeostase do meio interno. A diversidade de estratégias apresentadas pelos crustáceos reflete na diversidade de ambientes onde estão inseridos. Neste contexto o objetivo do trabalho foi avaliar o papel dos mecanismos osmorregulatórios e de reparação celular em *Macrobrachium acanthurus* frente a exposições salinas de curta e longa duração. No capítulo I, indivíduos foram submetidos a alterações de salinidade em diferentes tempos de exposição a fim de avaliar o efeito de diferentes intervalos de exposição ao estresse salino *in vivo* na expressão da proteína de choque térmico (HSP70) muscular. No capítulo II, os animais foram expostos a salinidade 20 psu em diferentes tempos de exposição de forma a avaliar a atividade branquial da anidrase carbônica e mecanismos osmorregulatórios diante desafio hipersalino por um curso temporal. Em ambos os estudos o camarão apresentou estratégia hiperreguladora frente a salinidades baixas. No capítulo I, os animais apresentaram estratégia hiporregulatória após seu ponto isosmótico devido, provavelmente, a alguma capacidade de secreção ativa de sal pelas brânquias, aliada a um controle de permeabilidade para reduzir a entrada de sal. Mecanismos de regulação de volume celular e a ativa secreção de sal foram responsáveis pela manutenção da homeostase do meio interno nas condições 15 e 25 psu. Na condição de 35 psu os animais hipoconformaram, e expressão da HSP70 foi observada de forma variada. Apesar disso, é possível que a diferença energética entre a osmorregulação e a síntese de proteínas de estresse tenha influenciado a expressão de proteínas. No capítulo II, a exposição abrupta à salinidade de 20 psu levou à redução nas trocas iônicas branquiais, causando diminuição da captação iônica e perda de água. Como resultado, houve aumento na atividade da anidrase carbônica, levando à aumento da concentração de Cl⁻. Desta forma fica clara a ligação entre os mecanismos de respostas e os estressores aqui utilizados, bem como a influência do tempo de exposição e grau de salinidade na expressão da HSP70 e na atividade da anidrase carbônica. Os resultados obtidos no presente estudo são frente ao estresse abrupto, sendo possível que a resposta adaptativa frente ao aumento salino gradual, seja diferenciada.

Palavras chave: hipoconformador; metabolismo; crustáceo; osmorregulação; HSP70.

GENERAL ABSTRACT

The ability to survive in the face of environmental changes, such as pH, oxygen, salinity, etc., is directly related to the activation of regulatory mechanisms. These ensure the osmotic and ionic balance and keep the homeostasis of the internal medium. The diversity of strategies presented by crustaceans reflects the diversity of environments where they are inserted. In this context the aim of this work was to evaluate the osmoregulatory role and cell repair mechanisms in *Macrobrachium acanthurus* front exhibitions short and long-term salt exposure. In chapter I, individuals were subjected to different salinity changes under different exposure times in order to assess the effect of different ranges of salinity exposure on stress *in vivo* in the expression of heat shock protein (HSP70). In chapter II, the animals were exposed to 20 psu salinity at different exposure times in order to evaluate the activity of Gill carbonic anhydrase and osmoregulatory mechanisms on hypersaline challenge by a temporal course. In both studies the shrimp keeps an hyperregulatory strategy presented front to low salinity. In chapter I, the animals showed an hiporegulatory strategy after your isosmotic point due probably to some active salt secretion capacity by gills, combined with a control of permeability to reduce salt uptake. Regulatory mechanisms of cell volume and active salt secretion has been responsible for the maintenance of the homeostasis of internal conditions 15 and medium 25 psu. Provided 35 psu animals hypoconforming, and HSP70 expression was observed in varied form. Nevertheless, it is possible that the energy difference between the osmoregulação and the synthesis of stress proteins have influenced the expression of proteins. In chapter II, the abrupt exposure to salinity of 20 psu led to a reduction in branchial ion exchanges, causing decreased ion uptake and loss of water. As a result, there was an increase in the carbonic anhydrase activity, leading to an increase in the concentration of Cl⁻. This way is a clear link between the answers and the stress here used, as well as the influence of exposure time and the degree of salinity on expression of HSP70 and carbonic anhydrase activity. The results obtained in this study are front of the abrupt and may stress the adaptive response in the face of the increasing gradual saline, is distinguished.

Key words: hypoconformer; metabolismo; crustacean; osmoregulation; HSP70.

1. INTRODUÇÃO GERAL

Crustacea é um subfilo do filo Arthropoda, composto por um numeroso e diversificado conjunto de invertebrados. Estima-se que cerca de 50.000 espécies são conhecidas, entretanto estima-se que o real número de espécies viventes seja duas ou três vezes maior (Ruppert e Barnes, 1996). A maioria dos crustáceos descritos são marinhos, com hábitos de vida extremamente variados (Ruppert e Barnes, 1996). Espécies dulcícolas, semiterrestres e terrestres também são conhecidas, que diferem em uma série de modificações morfológicas, fisiológicas e comportamentais moldadas por milhões de anos de evolução (Hickman *et al.*, 2004). A diversidade de crustáceos é muito ampla podendo habitar praticamente todos os ambientes do mundo, desde fossas abissais até lagoas temporárias em desertos (Hill *et al.*, 2009).

A capacidade adaptativa do grupo está diretamente relacionada com a plasticidade adaptativa do meio interno, com resposta às alterações externas através de mecanismos osmorregulatórios (Péqueux, 1995), sendo a manutenção da homeostase interna essencial para o funcionamento correto e integrado das funções orgânicas (Schmidt-Nielsen, 2002; Hill *et al.*, 2009). Os desafios impostos resultante das variações ambientais, exigem rápida resposta fisiológica de manutenção das condições internas dentro das faixas ótimas de regulação (Freire e Prodocimo, 2007). O ambiente marinho é relativamente estável, caracterizado pela ausência de drásticas alterações espaço-temporais. Por outro lado, o ambiente dulcícola é caracterizado por sua variabilidade química e flutuabilidade de variações abiótica (Willmer, 2004).

Dois estratégias de manutenção da homeostase osmótica e iônica são observadas em organismos aquáticos: a osmoconformação e a osmorregulação (Willmer *et al.*, 2005). A osmoconformação é caracterizada pela incapacidade de manter o meio interno constante frente a alterações ambientais. Por outro lado, a estratégia osmorregulatória é caracterizada pela capacidade do organismo em manter a concentração dos fluidos internos dentro de uma faixa constante, independente da variação ambiental observada (Willmer *et al.*, 2005). Evolutivamente, ambas as estratégias apresentam vantagens e desvantagens. A conformação apresenta baixo custo metabólico (Hill *et al.* 2009), entretanto

expõe células a alterações constantes. Por outro lado, a estratégia regulatória oferece maior estabilidade em nível tecidual e celular, porém a um alto custo metabólico (Hill *et al.*, 2009).

Dentre as estratégias citadas acima, os animais ainda podem ser classificados de acordo com sua tolerância frente à exposição a variações salinas. Animais ditos estenoalinos são capazes de tolerar uma faixa pequena de variações salinas ambientais, enquanto que animais classificados como eurihalinos apresentam uma faixa maior de tolerância frente a variações salinas (Marshall e Grosell, 2005; Larsen *et al.*, 2014). Em resumo, (1) organismos osmoconformadores estenoalinos apresentam grandes limitações quanto à faixa de variação ambiental a que são expostas. Além disso a concentração dos fluidos internos de varia em uma estreita faixa de tolerância; (2) organismos osmoconformadores eurihalinos alteram a concentração osmótica e iônica interna dentro de uma extensa faixa de salinidade no meio onde estão inseridos; (3) organismos osmorreguladores estenoalinos são capazes de manter as concentrações dos fluidos internos constantes apenas em uma faixa limitada de alteração na salinidade ambiental enquanto que (4) organismos osmorreguladores eurihalinos são capazes de manter concentração interna constante, mesmo frente à grandes alterações na salinidade do meio onde estão inseridos.

Invertebrados marinhos são em sua maioria conformadores, apresentando um perfil iônico de hemolinfa semelhante ao ambiente (Ruppert e Barnes, 1996). Desta forma, a conquista de ambientes mais diluídos e semiterrestres por crustáceos de origem marinha (Augusto *et al.*, 2009; Schubart *et al.*, 1998) foi possível graças aos eficientes mecanismos de hiperregulação observados no grupo, caracterizados pela reabsorção/retenção iônica e secreção ativa de íons em meio mais diluído (Péqueux 1995; Lucu e Towle, 2003). Espécies de ambientes mais diluídos tendem a apresentar concentrações iônicas mais elevadas quando comparados ao meio. Dentre os crustáceos marinhos, a estratégia comumente utilizada é a osmoconformação. Entretanto, osmoconformadores estuarinos podem apresentar comportamento osmorregulador fraco (Willmer *et al.*, 2005; Freire *et al.*, 2008a).

Quando em situações adversas, organismos são confrontados por agentes estressantes que normalmente causam alterações fisiológicas. Três estratégias primárias são utilizadas por organismos em situações desfavoráveis: (1) Mudanças comportamentais e alteração nos padrões de movimentação, como fechamento de concha ou retirada para ambiente mais favorável (observado em moluscos); (2) Ativação de mecanismos de resistência fisiológicos e fenotípicos ou (3) Reparação direta de danos causados pela exposição a um estressor ambiental (Willmer *et al.*, 2005; Evans, 2008).

Dentre as estratégias fisiológicas de resistência, mecanismos de regulação osmótica e iônica são normalmente ativados em ambientes com grandes flutuações salinas (Grosell, 2006). De forma geral, o principal desafio frente a uma alteração no ambiente é a manutenção da integridade celular. Frente ao desafio osmótico, o volume celular é regulado pela perda ou ganho de solutos, em especial íons sódio (Na^+), potássio (K^+) e cloreto (Cl^-). Por outro lado, a secreção ou reabsorção iônica também podem ser mediados por transportadores de membrana, como a Na^+/K^+ -ATPase e cotransportadores de Na, K e Cl ou NKCC (Jorgensen *et al.*, 2003; Weihrauch *et al.*, 2004; Evans, 2008).

Concomitante à atividade da Na^+/K^+ -ATPase, a anidrase carbônica (AC) também está associada ao processo de osmorregulação. A AC é uma metaloenzima responsável pelo fornecimento de substrato necessário na atividade de proteínas apicais. Esta enzima catalisa a hidratação reversível do CO_2 , produzindo íons H^+ e HCO_3^- , que são expelidos da célula por meio de trocadores iônicos como Na^+/H^+ e $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ (*Figura 1*) (Henry *et al.*, 1996; Lionetto *et al.*, 2001; Weihrauch *et al.*, 2004). Estes transportadores estão inseridos em grande quantidade nas brânquias, principal estrutura de interface entre o ambiente e o fluido extracelular em animais aquáticos, de forma a regular ativamente a entrada e saída de íons, controlando assim a homeostase osmótica e iônica (Evans, 2008; Freire *et al.*, 2008).

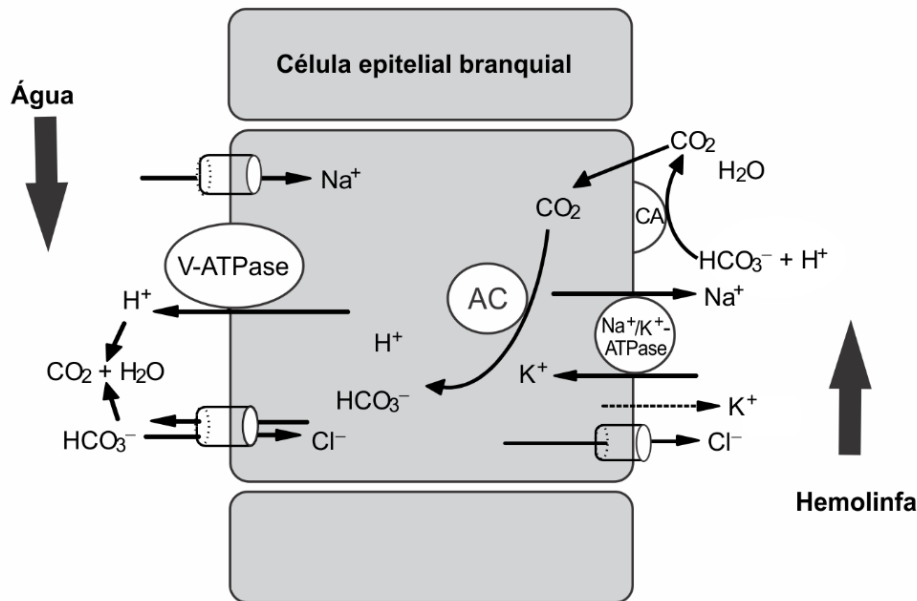


Figura 1. Representação de transportadores de membrana branquiais em decápodes. V-ATPase localizada apicalmente, que excreta H^+ para fora da célula, Na^+/K^+ -ATPase localizada basolateralmente. O modelo mostra a conversão de CO_2 em HCO_3^- pela anidrase carbônica citosólica. Modificado de Morris (2001).

A exposição a uma situação desfavorável pode causar estresse quando o organismo é incapaz de executar uma ou mais das estratégias citadas acima. De fato, organismos expostos a alterações ambientais normalmente combinam todas as estratégias visto que estressores são em geral complexos e ativam uma cascata de modificações em diferentes níveis de organização (celular, tecidual e sistêmica), sendo assim necessária uma resposta integrada por parte do organismo. Por exemplo, a exposição a um estressor de forma aguda exige mecanismos de reparação em quantidades significativas e muitas vezes por longos períodos de tempo, implicando em uma maior relocação de energia metabólica, reduzindo assim taxas de crescimento, fecundidade e distribuição da espécie (Denny e Gaines, 2007; Morris *et al.*, 2013).

Dentre os mecanismos de reparação conhecidos, a atuação das proteínas de choque (HSPs) são bastante estudadas. Estas proteínas são amplamente conservadas em todo reino animal (Feder e Hofmann, 1999). As proteínas de choque térmico são ativadas frente a alterações deletérias de temperatura. Entretanto, estudos demonstram sua ativação e atuação frente a outros estressores que não o aumento ou diminuição de temperatura (De Maio, 1999). Alterações significativas de salinidade, pH, concentração de oxigênio

dissolvido e contaminantes também ativam os mecanismos reparadores destas proteínas (De Maio, 1999).

Um agente estressor pode causar o desdobramento ou dobramento incorreto de proteínas, levando a uma conformação não funcional da mesma (Denny e Gaines, 2007; Moyes e Schulte, 2009). Tal alteração estrutural pode levar a duas respostas de restauração pelo organismo: a reestruturação da proteína danificada ou a degradação da mesma pelo processo de proteólise, impedindo assim a morte celular (De Maio, 1999; Tomanek, 2008). Frente a um estressor, a atividade das chaperonas celulares pode causar aceleração nas taxas metabólicas a níveis insustentáveis relacionados principalmente a limitações no aporte de oxigênio para as células ou no fornecimento de substratos metabólicos (por exemplo a glicose) (Denny e Gaines, 2007; Moyes e Schulte, 2009).

As proteínas de choque são classificadas de acordo com seu peso molecular (kDa). As proteínas de peso 70 são abundantes e as mais estudadas (Sorensen *et al.*, 2003). Dentre a imensa variedade de proteínas de estresse, as HSP70 são ativadas frente a estresse fisiológico. Quando o organismo se encontra em situação adversa, as HSPs contribuem para a manutenção da integridade celular, auxiliando na correta conformação, impedindo a desnaturação de proteínas (Yenari *et al.*, 1999; Sorensen *et al.*, 2003; Werner *et al.*, 2005). Com base na manutenção da homeostase celular, as HSPs estão envolvidas em vários outros processos celulares como a otimização do metabolismo energético, regeneração muscular, regulação hipertrófica e adaptação ao ambiente (Liu e Steinacker, 2001).

A atividade da enzima AC e das proteínas HSP's, estão estritamente ligadas aos mecanismos osmorregulatórios e de proteção frente a estressores, garantindo o funcionamento sistêmico e metabólico do animal. Desta forma, o entendimento da dinâmica destas enzimas e proteínas, e a avaliação dos mecanismos adaptativos a eles relacionados são de fundamental importância no entendimento fisiológico do animal. Contribuirão para a elucidação da capacidade adaptativa e mecanismos osmorregulatórios utilizados por estes organismos frente a condições desafiadoras (Péqueux 1995; Marshall e Grosell 2005; Evans, 2008).

1.1. Caracterização da espécie em estudo

Os crustáceos são os artrópodes mais diversos e abundantes em ambientes aquáticos, mas são em sua maioria, marinhos. Entretanto, vários grupos adaptaram-se com sucesso à redução salina, sendo hoje encontrados em ambientes estuarinos, dulcícolas, semiterrestres e terrestres (Hendrickx, 1995; Ruppert e Barnes, 1996, Evans, 2008).

Dentre os crustáceos decápodes encontram-se os camarões da infraordem Caridea, composta por 22 famílias, dentre estas a Palaemonidae. Os Palemonídeos popularmente conhecidos “pítus”, possuem uma ampla distribuição geográfica em regiões temperadas e tropicais (Melo, 2003; Pinheiro e Hebling, 1998). São subdivididos em três subfamílias, Euryrhynchinae, Pontoniinae e Palaemoninae, esta última composta por dezoito gêneros, incluindo o gênero *Macrobrachium* (De Grave *et al.*, 2009). *Macrobrachium* são dulcícolas e possuem ampla distribuição no Atlântico Oeste e Indo-Pacífico. Dentre as espécies deste gênero, *Macrobrachium acanthurus* (Wiegmann, 1836) (Figura 2) apresenta ocorrência em rios desde a Carolina do Norte (EUA) até o Rio Grande do Sul (Brasil), sendo normalmente encontrados escondidos sob pedras e troncos caídos (Melo, 2003; Pinheiro e Hebling, 1998).



Figura 2. *Macrobrachium acanthurus*. Escala: 2 cm.

O ciclo reprodutivo em *Macrobrachium* spp. acontece o ao longo do ano todo, sem uma época específica (Coelho, 1963; Tamburus *et al.*, 2012). Por apresentarem alta fecundidade em relação às outras espécies e atingirem grande porte são amplamente utilizados para fins comerciais (Bond-Buckup e Buckup, 1989; Valenti *et al.*, 1989).

Indivíduos deste gênero passam maior parte de seu ciclo de vida em ambiente dulcícola, mas as larvas precisam completar o desenvolvimento em regiões estuarinas (Moreira *et al.*, 1983; Pinheiro e Hebling, 1998). Palemonídeos realizam a migração para estuário de duas formas. (1) A fêmea ovígera migra para regiões estuarinas (migração anfídroma) ou (2) as larvas já eclodidas migram para regiões de maior concentração salina (Anger, 2013). Em ambas as estratégias, as larvas desenvolvem-se no estuário a fim de evitar o desafio hiposmótico imposto pelo ambiente dulcícola (Carvalho *et al.*, 1979; Anger, 2013). Portanto, a permanência em regiões estuarinas na fase larval, reflete em uma dependência inicial da hiperregulação, com reaparecimento na fase adulta (Carvalho *et al.*, 1979; Anger, 2003).

Quanto ao processo de manutenção osmótica e iônica, *Macrobrachium acanthurus* apresenta uma alta capacidade osmorregulatória em salinidades elevadas (Foster *et al.*, 2010), apresentando comportamento hiperregulatório eurihalino (Maraschi *et al.*, 2015; Freire *et al.*, 2013; Faleiros *et al.*, 2010). A avaliação de respostas celulares, de enzimas (e.g. anidrase carbônica) e de proteínas (e.g. HSP70), que possuem papel fundamental nas respostas frente a estressores ambientais, podem contribuir de forma significativa na elucidação dos mecanismos de tolerância e manutenção iônica do animal, garantindo assim o entendimento dos processos ecofisiológicos moldados evolutivamente na espécie. Desta forma, o trabalho tem como objetivo avaliar as respostas osmorregulatórias do camarão *Macrobrachium acanthurus*, bem como quantificar a atividade enzimática e proteica frente a alterações de salinidade em diferentes intervalos de tempo.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

- Avaliar a influência da exposição salina de curta e longa duração, nos mecanismos osmorregulatórios e de reparação de *Macrobrachium acanthurus*.

2.2. Objetivos Específicos

- Saber como é a atividade da enzima branquial Anidrase Carbônica em camarões submetido a exposição prolongada a salinidade 20 psu.
- Estabelecer o padrão de expressão da proteína HSP70 em camarões frente a exposição em diferentes salinidades e tempos experimentais.

REFERÊNCIAS

- Anger, K. 2013. Neotropical *Macrobrachium* (Caridea: Palaemonidae): on the biology, origin, and radiation of freshwater-invading shrimp. *Journal of Crustacean Biology* **33(2)**: 151-183.
- Augusto, A., Pinheiro, A. S., Greene, L. J., Laure, H. J., e McNamara, J. C. 2009. Evolutionary transition to freshwater by ancestral marine palaemonids: evidence from osmoregulation in a tide pool shrimp. *Aquatic Biology* **7(1-2)**: 113-122.
- Bond-Buckup, Georgina, e Buckup, Ludwing G. 1989. Os Palaemonidae de águas continentais do Brasil meridional (Crustacea, Decapoda). *Revista Brasileira de Biologia* **49(4)**: 883-896.
- Carvalho, H A., Gomes, M D G S., Gondim, A Q, e Pereira, M C G. 1979. Sobre a Biologia do Pitú *Macrobrachium acanthurus* (Wiegmann, 1836) em populações naturais da Ilha de Itaparica. *Universitas* (24), 25.
- Charmantier, G U Y. 1998. Ontogeny of osmoregulation in crustaceans: a review. *Invertebrate reproduction e development* **33(2-3)**: 177-190.
- Coelho, P. A. 1963. Observações Preliminares Sobre a Biologia e a Pesca dos Camarões do Gênero *Macrobrachium* Bate, 1868 (Decapoda Palaemonidae) no Estado de Pernambuco. *Tropical Oceanography* **3(1)**.
- De Maio, A. 1999. Heat shock proteins: facts, thoughts, and dreams. *Shock* **11(1)**: 1-12.

- Denny, M. W., e Gaines, S. D. 2007. *Encyclopedia of tidepools and rocky shores* (No. 1). University of California Press.
- Evans, D. H. (Ed.). 2008. *Osmotic and ionic regulation: cells and animals*. CRC Press.
- Freire, C. A., e Prodocimo, V. 2007. Special challenges to teleost fish osmoregulation in environmentally extreme or unstable habitats. *Fish osmoregulation* **1**: 249-276.
- Freire, C. A., Amado, E. M., Souza, L. R., Veiga, M. P., Vitule, J. R., Souza, M. M., e Prodocimo, V. 2008. Muscle water control in crustaceans and fishes as a function of habitat, osmoregulatory capacity, and degree of euryhalinity. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular e Integrative Physiology* **149(4)**: 435-446.
- Freire, C. A., Onken, H., e McNamara, J. C. 2008a. A structure–function analysis of ion transport in crustacean gills and excretory organs. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular e Integrative Physiology* **151(3)**: 272-304.
- Grosell, M. 2006. Intestinal anion exchange in marine fish osmoregulation. *Journal of Experimental Biology* **209(15)**: 2813-2827.
- Hendrickx, M. E. 1995. Checklist of brachyuran crabs (Crustacea: Decapoda) from the eastern tropical Pacific. *Bulletin de l'Institut royal des Sciences naturelles de Belgique, Biologie* **65**: 125-150.
- Henry, R. P. 1996. Multiple roles of carbonic anhydrase in cellular transport and metabolism. *Annual Review of Physiology* **58(1)**: 523-538.
- Hickman Jr, C. P., Roberts, L. S., e Larson, A. L. 2004. **Princípios integrados de Zoologia**. Guanabara Koogan.
- Hill RW, Wyse GA, Anderson M. 2009. **Animal Physiology** (Vol. 3) Massachusetts Sinauer Associates.
- Huey, R. B., Kearney, M. R., Krockenberger, A., Holtum, J. A., Jess, M., e Williams, S. E. 2012. Predicting organismal vulnerability to climate warming: roles of behavior, physiology and adaptation. *Phil. Trans. R. Soc. B* **367(1596)**: 1665-1679.
- Jorgensen, P. L., Håkansson, K. O., e Karlsh, S. J. 2003. Structure and mechanism of Na, K-ATPase: functional sites and their interactions. *Annual review of physiology* **65(1)**: 817-849.
- Larsen, P. F., Nielsen, E. E., Koed, A., Thomsen, D. S., Olsvik, P. A., e Loeschcke, V. 2008. Interpopulation differences in expression of candidate genes for salinity tolerance in winter migrating anadromous brown trout (*Salmo trutta* L.). *BMC genetics* **9(1)**: 1.

- Lionetto, M. G., Giordona, M. E., Nicolardi, G., e Schettino, T. 2001. Hypertonicity Stimulates Cl-Transport in the Intestine of Fresh Water Acclimated EEL, *Anguilla Anguilla*. *Cellular Physiology and Biochemistry* **11(1)**: 41-54.
- Liu, Y., e Steinacker, J. M. 2001. Changes in skeletal muscle heat shock proteins: pathological significance. *Front Biosci*, 6(D12-25), D12-D25.
- Lucu, Č., e Towle, D. W. 2003. Na⁺/K⁺-ATPase in gills of aquatic crustacea. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular e Integrative Physiology*, 135(2), 195-214.
- Magalhães, C. 2003. **Manual de identificação dos Crustacea Decapoda de água doce do Brasil**. G. A. S. de Melo (Ed.). Edições Loyola.
- Marshall, W.S. and M. Grosell. 2005. Ion transport, osmoregulation and acid-base balance. In: *Physiology of Fishes*, D.H. Evans and J.B. Claiborne (eds.). 3rd Edition. CRC Press, Boca Raton, pp. 177–230
- Moreira, G. S., McNamara, J. C., Shumway, S. E., e Moreira, P. S. 1983. Osmoregulation and respiratory metabolism in brazilian *Macrobrachium* (Decapoda, Palaemonidae). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology* **74(1)**: 57-62
- Morris, J. P., Thatje, S., e Hauton, C. 2013. The use of stress-70 proteins in physiology: a re-appraisal. *Molecular ecology* **22(6)**: 1494-1502.
- Moyes, C. D., e Schulte, P. M. 2009. **Princípios de Fisiologia Animal**. Artmed Editora.
- Pequeux, A. (1995). Osmotic regulation in crustaceans. *Journal of Crustacean Biology*, 15(1), 1-60.
- Pinheiro, M. A. A., e Hebling, N. J. 1998. Biologia de *Macrobrachium rosenbergii* (De Man, 1879). *Carcinicultura de água doce. Tecnologia para produção de camarões* 21-46.
- Ruppert, E. E., e Barnés, R. D. 1996. **Zoologia dos Invertebrados**. 6a. Edição. Roca, São Paulo, 1029p.
- Sammy De Grave, N., Pentcheff, D., e Ahyong, S. T. 2009. A classification of living and fossil genera of decapod crustaceans. *Raffles Bulletin of Zoology* 1-109.
- Schmidt-Nielsen, K. 1997. **Animal physiology: adaptation and environment**. Cambridge University Press.
- Schubart, C. D., Reimer, J., e Diesel, R. 1998. Morphological and molecular evidence for a new endemic freshwater crab, *Sesarma ayatum* sp. n., (Grapsidae, Sesarminae) from eastern Jamaica. *Zoologica Scripta* **27(4)**: 373-380.

- Sørensen, J. G., Kristensen, T. N., e Loeschcke, V. 2003. The evolutionary and ecological role of heat shock proteins. *Ecology Letters* **6(11)**: 1025-1037.
- Tamburus, A. F., Mossolin, E. C., e Mantelatto, F. L. 2012. Populational and reproductive aspects of *Macrobrachium acanthurus* (Wiegmann, 1836) (Crustacea: Palaemonidae) from north coast of São Paulo State, Brazil. *Brazilian Journal of Aquatic Science and Technology* **16(1)**: 9-18.
- Tomanek, L. 2008. The importance of physiological limits in determining biogeographical range shifts due to global climate change: the heat-shock response. *Physiological and Biochemical Zoology* **81(6)**: 709-717.
- Valenti, W. C., Mello, J. D. T., e Lobão, V. L. 1989. Fecundidade em *Macrobrachium acanthurus* (Wiegmann, 1836) do Rio Ribeira de Iguape (Crustacea, Decapoda, Palaemonidae). *Revista brasileira de Zoologia* **6(1)**: 9-15.
- Weihrauch, D., McNamara, J. C., Towle, D. W., e Onken, H. 2004. Ion-motive ATPases and active, transbranchial NaCl uptake in the red freshwater crab, *Dilocarcinus pagei* (Decapoda, Trichodactylidae). *Journal of experimental biology* **207(26)**: 4623-4631.
- Werner, I., Smith, T. B., Feliciano, J., e Johnson, M. L. 2005. Heat shock proteins in juvenile steelhead reflect thermal conditions in the Navarro River watershed, California. *Transactions of the American Fisheries Society* **134(2)**: 399-410.
- Willmer, P., Stone, G., e Johnston, I. 2005. **Environmental Physiology of Animals**. John Wiley e Sons.
- Yenari, M. A., Giffard, R. G., Sapolsky, R. M., e Steinberg, G. K. 1999. The neuroprotective potential of heat shock protein 70 (HSP70). *Molecular medicine today* **5(12)**: 525-531.

CAPÍTULO I

**PADRÃO DE EXPRESSÃO DA PROTEÍNAS DE ESTRESSE (HSP70) NO
MÚSCULO DO CAMARÃO *Macrobrachium acanthurus* WIEGMANN,
1836 (CRUSTACEA: DECAPODA: PALAEMONIDAE) DIANTE DE
DESAFIO HIPER-SALINO**

RESUMO

A relação entre as variações ambientais e a expressão de proteínas de estresse, contribui para o conhecimento das respostas fisiológicas dos organismos em resposta ao aumento de salinidade. A espécie utilizada no presente estudo, *Macrobrachium acanthurus* é um forte hiperregulador em ambiente dulcícola. Os animais foram submetidos a salinidades de 0, 15, 25 e 35 psu durante 2, 12, 24, 48 e 120 h de exposição, totalizando 20 grupos experimentais com o intuito de avaliar o efeito da exposição abrupta a diferentes níveis de salinidade na expressão da proteína de choque térmico muscular (HSP70). A osmolalidade e o conteúdo de água tecidual observados apontam para um comportamento hiporregulador. Este iniciou-se logo após o ponto isosmótico somente em 12 h de exposição, mas passando a ser hipoconformador nos tempos seguintes de 24, 48 e 120 h. O que parece não estar relacionado com a secreção ativa de sal pelas brânquias, mas sim pelo controle direto da permeabilidade. A expressão de HSP70 apresentou pequenas variações ao longo do tempo de exposição, mantendo valores próximos ao controle. Por apresentar uma invasão recente e ter mecanismos osmorregulatórios eficientes que lhe permitam transitar entre ambientes variáveis. Assim, é possível que as células tenham iniciado rápidos mecanismos compensatórios, como regulação de volume celular e excreção de sal contínua. Sendo assim, levando ao reestabelecimento da homeostase do meio interno e não necessitando a ativação da expressão de HSP70. Ainda assim, é possível a diferença energética entre a osmorregulação e a síntese de proteínas de estresse tenha influenciado a expressão de proteínas.

Palavras chave: salinidade; hipoconformação; osmorregulação; proteínas de choque térmico; homeostase.

ABSTRACT

The relationship between environmental changes and the expression of stress proteins, contribute to the knowledge of the organism physiology in response to increased salinity. The specie of the work, *Macrobrachium acanthurus*, is a strong hyperregulator in freshwater environments. The shrimp was submitted to salinity 0, 15, 25 and 35 psu for 2, 12, 24, 48 and 120 h of exposure, in order to evaluate the effect of abrupt exposure to different levels of salinity, about the heat shock protein expression (HSP70) of *M. acanthurus*. The osmolality and the tissue water content showed a hyporregulator behavior. These began after the isosmotic point, only in 12 h exposure, but being hypoconforming on the following timing of 24, 48 and 120 h. What does not seem to be related to the activated salt secretion in the gills, but by the direct control of the permeability? The HSP70 expression showed small variations over time of exposure, keeping close values of the control. Due to a recent invasion and have efficient osmorregulatory mechanisms, which allowed to transit among variable environments. Thus, it is possible that the cells had started quickly compensatory mecanisms, like cell volume regulation and active salt secretion. Thus, leading to the re-establishment of the t require the activation of HSP70 expression. Thus, it is possible that the energetic difference between the osmorregulation and the stress protein synthesis has influenced the expression of these proteins.

Key words: salinity; hypoconforming; osmorregulation; heat shock protein; homeostasis.

3. INTRODUÇÃO

Crustáceos marinhos são frequentemente osmoconformadores, apresentando a concentração interna do animal semelhante às concentrações iônicas do ambiente onde estão inseridos. Em contraste, crustáceos dulcícolas mantêm suas concentrações do fluido extracelular acima e independentemente das variações do ambiente externo sendo obrigatoriamente osmorreguladores (Faleiros, 2011; Larsen *et al.*, 2014; Evans, 2008; Willmer *et al.*, 2005).

Entretanto, as variações de salinidade no ambiente podem influenciar as composições iônicas e osmótica dos fluidos corporais, bem como influenciam processos biológicos, como o crescimento de palemonídeos (Coelho *et al.*, 1963; Péqueux, 1995; Anger, 2003; Cieluch *et al.*, 2004; Maraschi *et al.*, 2015). Visto que camarões são encontrados nos mais diversos ambientes, é esperado que estes animais apresentem mecanismos de manutenção homeostática diante de concentrações iônicas distintas (Willmer *et al.*, 2005). Espécies diádromas, como *Macrobrachium acanthurus*, possivelmente serão confrontados por mudanças do ambiente, como a alteração de salinidade (Maraschi *et al.*, 2015; Péqueux, 1995).

Em relação à tolerância frente a flutuações na salinidade, camarões podem ser classificados em duas categorias. (1) estenoalinos – caracterizados pela tolerância de uma estreita faixa de variações salinas e (2) eurihalinos, caracterizados pela alta tolerância frente a uma ampla faixa de variações salinas (Péqueux, 1995; Willmer, *et al.*, 2005). Perturbações salinas podem resultar no aumento ou redução da concentração osmótica extracelular, levando a alterações na condição isosmótica celular. Flutuações externas provocam perturbações celulares, as quais respondem ativando mecanismos de regulação de volume. Estes mecanismos consistem basicamente no equilíbrio entre o transporte ativo de soluto (como Na⁺/K⁺ ATPase) e transporte passivo através de canais iônicos (principalmente K⁺ e Cl⁻) (Evans, 2008; Willmer *et al.*, 2005).

A redução de salinidade do ambiente leva ao aumento do volume celular, causado pela entrada excessiva de água nas células. Esta situação ativa o funcionamento de transportadores, estes responsáveis pela secreção da água e

íons em excesso, em um processo denominado Redução Regulatória de Volume (*regulatory volume decrease* - RVD). Em contrapartida, se a célula for afetada por uma condição hiperosmótica (aumento da osmolalidade do líquido extracelular - LEC), as células irão murchar, devido à saída excessiva de água. Esta situação ativa o funcionamento de outros transportadores, estes responsáveis pela reabsorção de água e íons, em um processo denominado Aumento Regulatório de Volume (*regulatory volume increase* - RVI) (Evans, 2008; Willmer *et al.*, 2005).

A permanência dos crustáceos em ambiente dulcícola é amparada por uma forte capacidade hiperregulatória e redução da permeabilidade tegumentar. Tais características permitiram a ocupação de ambientes diluídos por paleomonídeos marinhos (Péqueux, 1995; Augusto *et al.*, 2009). No entanto, a dependência larval de regiões estuarinas durante o desenvolvimento representa uma adaptação incompleta ao ambiente dulcícola, o que pode refletir em uma origem evolutiva marinha. Trajetória diferente de espécies hololimnéticas, como *Macrobrachium potiuna*, que possuem a capacidade de crescimento e desenvolvimento somente em ambiente dulcícola (Anger, 2013).

3.1. Proteínas de estresse térmico - *Heat shock proteins* (HSPs)

Todos os organismos estão sujeitos a alterações ambientais. Estas perturbações podem resultar em situações estressantes que levam a alterações fisiológicas, sistêmicas e comportamentais (Morris *et al.*, 2013). Estressores podem apresentar-se como altas temperaturas, hipóxia, contaminação por metais pesados e alterações de salinidade. O animal pode apresentar resistência fisiológica, plasticidade fenotípica, alterações comportamentais, ou ainda ativar respostas intracelulares de reparo a danos celulares, de forma a manter o correto funcionamento celular (Robert, 2003; Sorensen *et al.*, 2003; Morris *et al.*, 2013). Em meio a inúmeras respostas, o aumento da produção de proteínas de choque térmico (HSPs) é uma delas. Estas proteínas estão presentes em todos os compartimentos celulares (e.g. Núcleo, mitocôndrias, cloroplasto, retículo endoplasmático, citosol) tanto em procaríotos quanto eucaríotos (Robert, 2003), sendo altamente conservadas evolutivamente (Lindquist e Craig, 1988).

As proteínas pertencentes às famílias das HSPs exercem funções biológicas essenciais, contribuindo para a manutenção da integridade e viabilidade celular. Além disso, no deslocamento, no equilíbrio, na direção de proteínas potencialmente funcionais ou na degradação de proteínas danificadas (Yenari *et al.*, 1999; Sorensen *et al.*, 2003). Quando expressas, estas proteínas podem exercer a função de chaperonas moleculares. Ou seja, elas podem interagir com outras proteínas minimizando a probabilidade de que estas interajam de forma inadequada (Feder e Hofmann, 1999). Desta forma, impedem a desnaturação de proteínas e auxiliam no correto dobramento das mesmas, aumentando a sobrevivência celular (Yenari *et al.*, 1999; Werner *et al.*, 2005).

Os genes que codificam as HSPs destacam-se pelo fato de serem induzidos quando o animal é exposto a estressores. Alterações causadas por variações na temperatura, são as mais conhecidas. Entretanto, HSPs também são expressas quando expostas a desafios osmóticos (Larsen *et al.*, 2008). São classificadas de acordo com seu peso molecular (10, 40, 60, 70, 90 e 110kDa). Dentre estas estão as HSP70, que são responsáveis por respostas a estresses fisiológicos (Feder *et al.*, 1999; Yenari *et al.*, 1999; Sorensen *et al.*, 2003). Entretanto o padrão de expressão dessas proteínas varia com a intensidade de estresse que acomete o animal (Feder *et al.*, 1999; Yenari *et al.*, 1999; Gutierrez *et al.*, 2014).

Alterações iônicas no ambiente circundante, podem refletir diretamente em alterações no movimento de água e osmólitos de células, podendo alterar o volume celular, levando a várias modificações de funções metabólicas (Freire *et al.*, 2013; Häussinger *et al.*, 2004). No trabalho de Fernandes (2010) o caranguejo estuarino *Neohelice granulata* Dana, 1851 submetido a aumento e redução de salinidade, apresentou aumento na expressão de HSP70 no tecido branquial e muscular. Comumente os trabalhos analisam a expressão de HSP70 frente a exposição a altas e baixas temperaturas (Selvakumar *et al.*, 2005a; Werner *et al.*, 2005), exposição a pesticidas (Yamuna *et al.*, 2000; Selvakumar *et al.*, 2005) ou durante o período de muda (Cesar e Yang, 2007). Devido à diversidade de estressores que inferem na expressão destas proteínas, estas são consideradas importantes biomarcadores de estresse ambiental (Yenari *et al.*, 1999).

Gutierre *et al.*, (2014) expuseram peixes dulcícolas ao aumento de salinidade (15 psu) por 6 h, de forma a avaliar o estresse causado pelo choque osmótico. Tal condição foi suficiente para induzir a expressão de HSP70 nos Siluriformes *Rhamdia quelen* Quoy e Gaimard, 1824, e *Clarias gariepinus* Burchell, 1822. A expressão de HSP70 no tecido muscular ocorreu concomitante à redução do teor hídrico muscular e ao aumento da osmolalidade. Com base nisso, os autores concluem que de fato o estresse salino causa ativação da proteína e que o nível e duração do estresse interferem na intensidade da expressão de HSP70.

Como hipótese, o aumento da salinidade poderá levar a um aumento na osmolalidade da hemolinfa, conseqüentemente causando desidratação muscular. Tais alterações osmóticas expõem as células a um choque osmótico, aumentando assim a expressão de proteínas de estresse. Assim, animais que estão inseridos em ambientes com características abióticas variáveis ou por transitarem entre ambientes com diferentes fatores abióticos, como *Macrobrachium acanthurus*, podem apresentar uma maior resistência ao estresse, possivelmente expressando um nível elevado de proteínas de estresse (Feder e Hofmann 1999). Desta forma, o presente estudo tem como objetivo identificar o curso temporal da indução de expressão da HSP70, concomitantemente às alterações da concentração iônica e do teor hídrico muscular. Através dos resultados obtidos, será possível inferir a respeito dos mecanismos intracelulares que estes organismos utilizam para sobreviver, quando em condições estressantes causadas por mudanças ambientais.

4. OBJETIVO

4.1. Objetivo Geral

- Estabelecer o padrão de expressão da proteína de choque térmico (HSP70) muscular sob o efeito de diferentes tempos de choque osmótico *in vivo* no camarão diádromo *Macrobrachium acanthurus*.

4.2. Objetivos Específicos

- Mensurar a expressão da proteína de choque térmico na musculatura abdominal de acordo com a exposição abrupta á salinidade em diferentes tempos de exposição;
- Determinar o comportamento osmorregulatório através da osmolalidade da hemolinfa juntamente com o teor hídrico do tecido muscular, diante do estresse salino, em diferentes tempos de exposição.

3. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Obtenção de animais e aclimação

Neste estudo foram utilizados adultos e juvenis de ambos os sexos, de *Macrobrachium acanthurus*. Coletados no Rio dos Barrancos (25°36'32.0"S 48°24'02.5"W) e revendidos como isca-viva em Pontal do Paraná. Após a aquisição, os animais foram transportados em caixas plásticas com aeração constante até o Laboratório de Fisiologia Comparativa da Osmorregulação da Universidade Federal do Paraná. Em laboratório, foram aclimatados por cinco dias em aquário com água doce (salinidade 0 psu). A temperatura foi mantida a 20°C, com aeração constante e foto período natural (~12h claro e 12h escuro). Os animais foram alimentados a cada 48 h com fragmentos de filé de peixe.

5.2. Condições Experimentais

Após o período de aclimação, os animais foram submetidos a processo experimental. Mantidos individualmente em aquários de 1 L totalizando 6 espécimes por condição. As condições experimentais foram salinidades de 15, 25 e 35 psu, com exposição por 2, 12, 24, 48 e 120 h, e cada condição tendo sua réplica controle.

5.3. Obtenção de amostras e determinação de osmolalidade

Após o término dos experimentos, os animais foram anestesiados em recipiente com gelo por ~5 min até estarem completamente imóveis. A hemolinfa foi retirada com o auxílio de micropipeta (10 ul) inserida na região pericárdica dos camarões. Posteriormente, os animais foram sacrificados e sua carapaça

removida para a retirada de amostra do tecido muscular da região abdominal (teor hídrico). A osmolalidade da hemolinfa foi medida com o micro-osmômetro de pressão de vapor Wescor VAPRO modelo 5520, em amostras de hemolinfa não diluídas. As amostras para dosagem de hemolinfa e parte das amostras do tecido muscular foram mantidas em Freezer -20°C. As amostras para protocolo de *Western Blotting* foram mantidas em Freezer -80°C.

5.4. Determinação de Teor Hídrico.

As amostras de tecido muscular foram pesadas (peso úmido, balança analítica Bioprecisa FA2104N, Brasil, precisão de 0,1mg), logo após a dissecação, obtendo-se assim o peso úmido do fragmento (Pu). Posteriormente as amostras foram levadas à estufa a 60° C, por 24 h, sendo novamente pesadas para a obtenção do peso seco (Ps). Por fim, o teor de hidratação do tecido foi calculado através da diferença entre o peso úmido e seco e o resultado apresentado como porcentagem.

5.5. Preparação das amostras para *Western Blotting*

Posteriormente à obtenção das amostras do tecido muscular, as mesmas foram preparadas para o protocolo de expressão de HSP70. As mesmas foram homogeneizadas com diluição 1:2 (mini homogeneizador TECNAL – TE-103) em tampão de lise, contendo HEPES (20 Mm), NaCl (15 Mm), MgCl₂ (1,5 Mm), EDTA (1 Mm), glicerol (10%), NP40 (10%), Triton X100 (1%) e os inibidores de protease: 2-fenantrolina (1-10 Mm), iodoacetamida (1-10 Mm), fluoreto de sulfonil fenilmetano (0,1-1 Mm), N-ethyl maleimida (1Mm), benzamidina (10 Mm). O homogeneizado foi então centrifugado a 12.000 giros por 10 min, em 4°C e o sobrenadante retirado e separado em alíquotas. Estas alíquotas foram utilizadas no protocolo de determinação de proteínas totais através do método descrito por BRADFORD (1976) adaptado para leitura em espectrofotômetro de microplaca em leitor de ELISA a 595 nm. Posteriormente as amostras seguiram para a preparação para o processo de eletroforese.

5.6. Eletroforese em gel (SDS-PAGE)

Neste processo os tecidos foram analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes com sulfato de sódio-dodecil (SDS-

PAGE). As alíquotas do extrato de proteínas (contendo 100 µg de proteína total) foram diluídas em tampão de amostra (2 partes de tampão e 1 de amostra) e em seguida submetidos ao gel de empilhamento (acrilamida 5%) em tampão Tris contendo SDS (pH 6,8 ajustado com solução concentrada de Glicina) seguido do gel de separação (acrilamida 10%) também em tampão Tris contendo SDS (pH 8,8 ajustado com solução concentrada de Glicina). Nesta corrida foi utilizado o tampão de corrida Tris-Glicina (pH 8,3) contendo SDS. O tempo de duração da corrida de eletroforese foi de aproximadamente 4 h com corrente constante de 30 Ma (Amersham Pharmacia Biotech EPS 300).

5.7. Western Blotting

A expressão de HSP70 nas amostras foi determinada pelo protocolo de *Western Blotting*. Logo após o processo de eletroforese, os peptídeos do gel foram transferidos para membrana de nitrocelulose em câmara de *Western Blotting* contendo tampão de transferência (Tris-Base 25Mm, Glicina 192Mm, SDS 10%, metanol 20%), com 145 Ma de corrente, 25-30 V, por aproximadamente 16 h. A membrana contendo as proteínas foi incubada com tampão TBST com leite Molico Nestlé® (com baixo teor de gordura) por 45-60 min para bloqueio de sítios não específicos. Posteriormente o material foi incubado por 1 h na presença do anticorpo primário anti-HSP70 (BD Biosciences) a 20°C. Em seguida o material foi retirado e incubado com anticorpo secundário conjugado com fosfatase alcalina em tampão TBST contendo leite Molico Nestlé® por 1 h em temperatura ambiente. A membrana foi então lavada 3 vezes com tampão TBST por 5-10 min cada. Na sequência o material foi transferido para o tampão ótimo para fosfatase alcalina contendo substratos para a fosfatase alcalina (cromógenos) BCIP e NBT, permanecendo nesta solução até o aparecimento das bandas das proteínas. Após o aparecimento das bandas, a membrana de nitrocelulose foi mergulhada em água destilada para parar a reação. A intensidade das bandas foi quantificada pelo programa *ImageJ*.

5.8. Análises estatísticas

Os dados de teor hídrico muscular, osmolalidade e expressão HSP70 foram analisados através da Análise de Variância (ANOVA) de duas vias (salinidade e tempo). O teste *post hoc* utilizado foi Holm-Sidak para localizar

diferenças dentro dos grupos submetidos a diferentes salinidades. Sempre com limites de significância entre os grupos de 0,05. O programa utilizado foi o *Software Sigma Plot* versão 11.0.

RESULTADOS

5.9. Osmolalidade e Teor Hídrico Muscular

A osmolalidade da hemolinfa de *M. acanthurus* aumentou em todas as condições experimentais, exceto em 2 horas onde não houveram diferenças conforme o aumento de salinidade, quando comparadas com o controle (Figura 3A). Nas condições controle e salinidade 15 psu, a osmolalidade manteve-se entre 400 e 500 mOsm/kg H₂O.

A partir de 12 h de exposição a concentração iônica apresentou aumento gradual de acordo com o aumento de salinidade (Figura 3B). Esse padrão ocorre observando-se as alterações de salinidade dentro de cada tempo, entretanto, as alterações de tempo dentro de cada salinidade não apresentam alterações. Na exposição de 35 psu, a osmolalidade em 2 h foi de 490 mOsm/kg H₂O, seguindo para 769 mOsm/kg H₂O em 12 h. A partir de 24 h, a osmolalidade manteve-se sem alterações, ~890 mOsm/kg H₂O, ~882 mOsm/kg H₂O (48 h) e ~879 mOsm/kg H₂O (120 h).

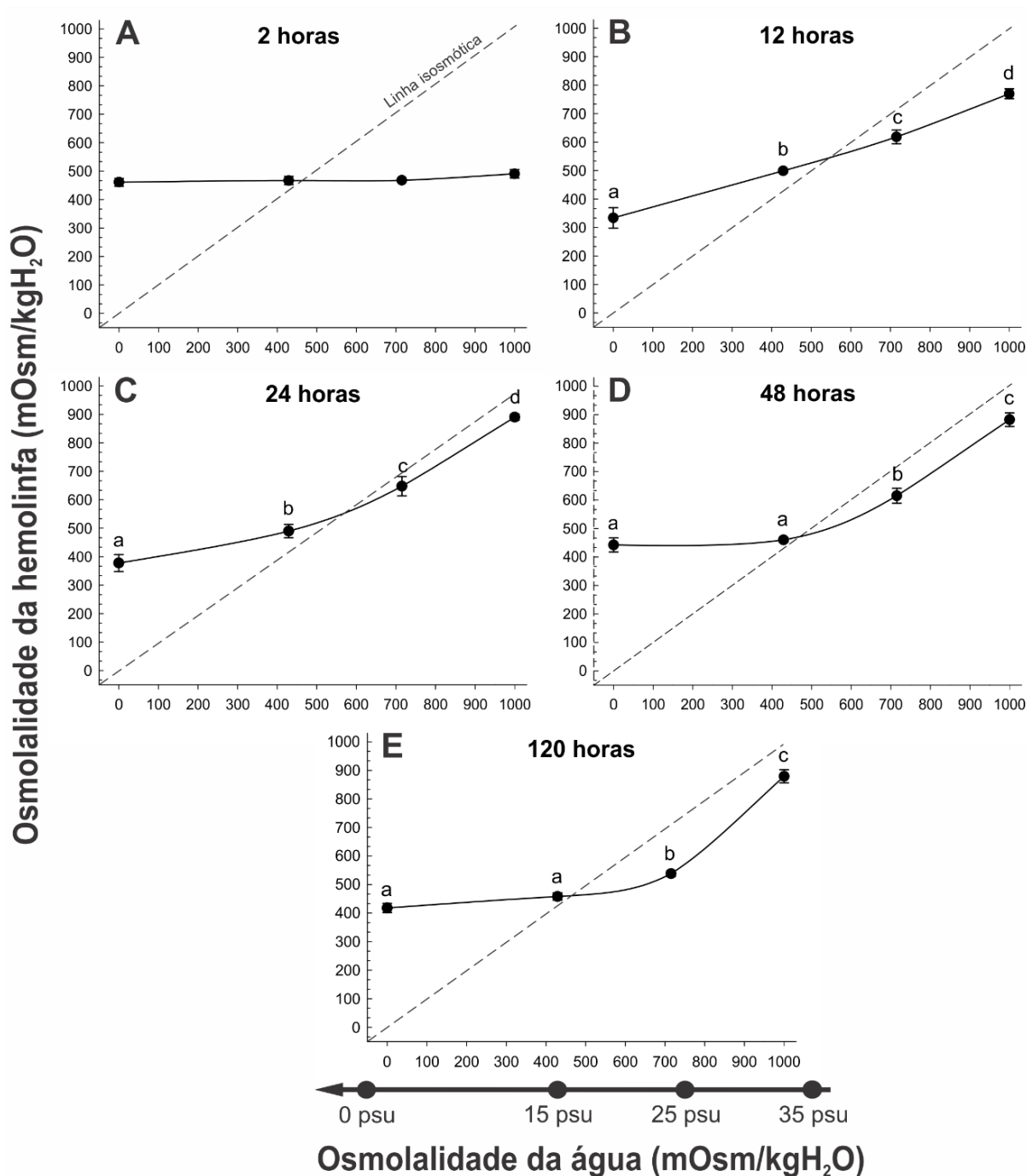


Figura 3. Osmolalidade da hemolinfa de *M. acanthurus* exposto às salinidades 0, 15, 25 e 35 psu por 2 (A), 12 (B), 24 (C), 48 (D) e 120 (E) h. A linha isosmótica está representada em todos os gráficos de forma pontilhada. A seta no eixo x, representa a correspondência entre salinidade e osmolalidade da água. Letras minúsculas representam diferenças entre salinidades dentro de cada tempo. n=6 por condição.

Este aumento na osmolalidade da hemolinfa é espelhado pelo padrão inverso do teor hídrico muscular (Figura 4). Assim como na osmolalidade, a porcentagem de água muscular de *M. acanthurus* manteve-se estável na condição controle (0), em torno de $78 \pm 0,71\%$ ao longo de todos os tempos. A partir de 12 h de exposição ocorreu um decréscimo gradual, concomitante ao

aumento de salinidade (Figura 4B). Nas variações de tempo dentro de cada salinidade, não foram observadas alterações. Em salinidade 35 psu, a porcentagem de água em 2 h era 76%, decaindo para 72% em 12 h, seguindo para 70, 72 e 73% em 24, 48 e 120 h, respectivamente.

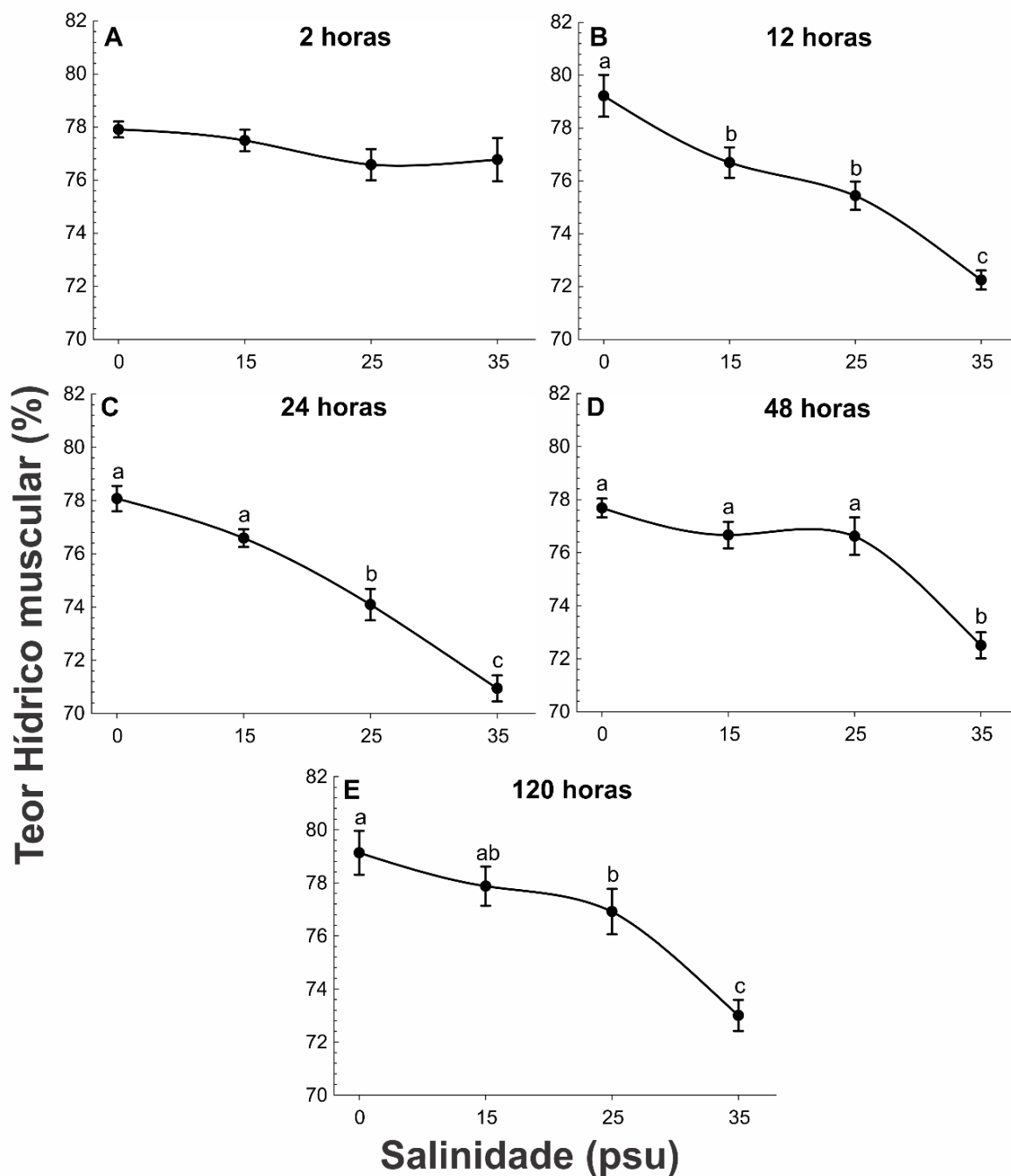


Figura 4. Conteúdo de água muscular de *Macrobrachium acanthurus* exposto às salinidades 0, 15, 25 e 35 psu por 2 (A), 12 (B), 24 (C), 48 (D) e 120 (E) h. Letras minúsculas representam diferenças entre salinidades dentro de cada tempo. n=6 por condição.

5.10. Proteínas de estresse – HSP70

As análises por meio da técnica de *Western Blotting* revelaram bandas de proteínas HSP70 (Figura 5). Estas regiões contêm isoformas tanto constitutivas, quanto induzíveis, resultando em uma expressão total de proteínas (Figura 6). Na condição controle a média da intensidade das bandas foi de $18 \pm 1,59$ ua (unidade arbitrária). No tempo de 12 h em salinidade 15 psu observou-se uma redução da intensidade (8,67ua) quando comparado com as demais condições neste mesmo tempo ($18,95 \pm 1,15$ ua) (Figura 6B). Logo, os tempos seguintes, de 24 e 48 h, não apresentaram alterações na expressão da proteína (Figura 6C e D). No tempo de 120 h (Figura 6E), as intensidades das bandas apresentaram diferenças de expressão apenas em salinidade 25 psu (11,72ua) e 35 psu (23,49ua).

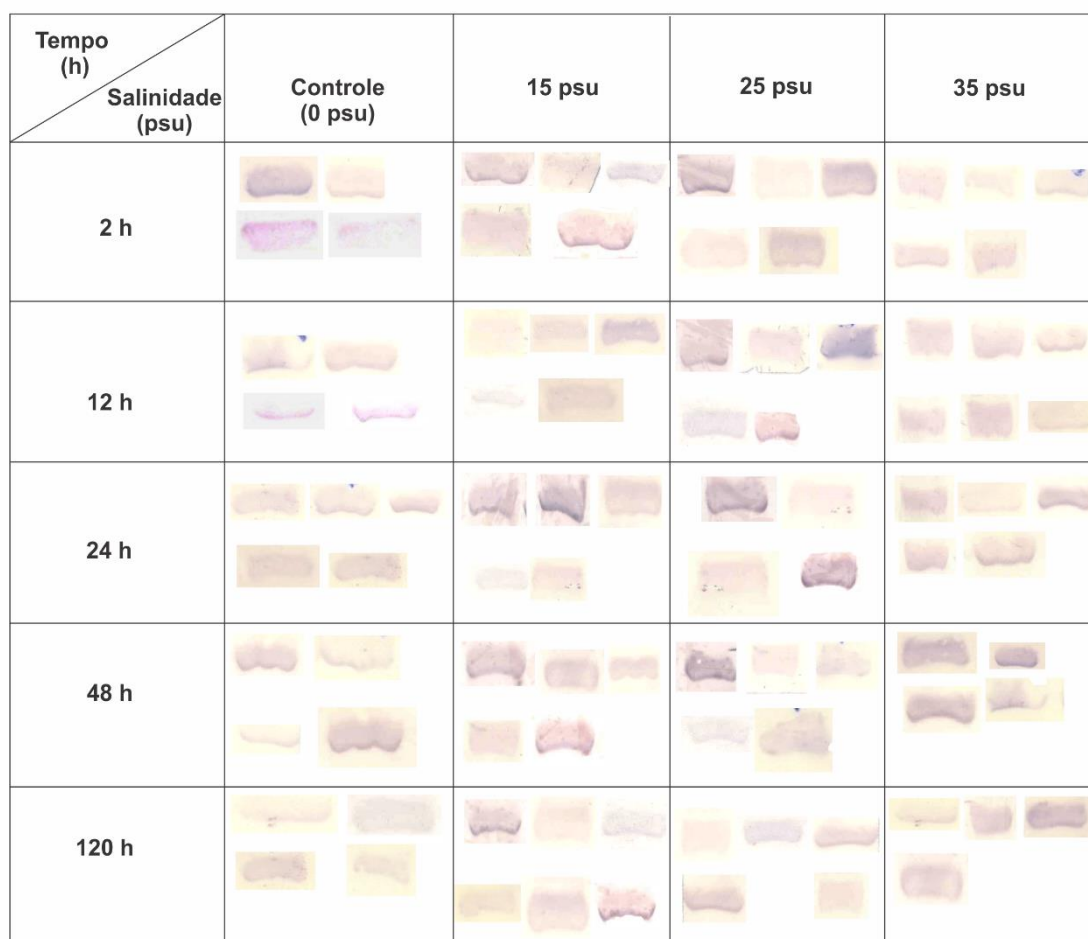


Figura 5. Expressão de bandas de HSP70 em *Macrobrachium acanthurus*.

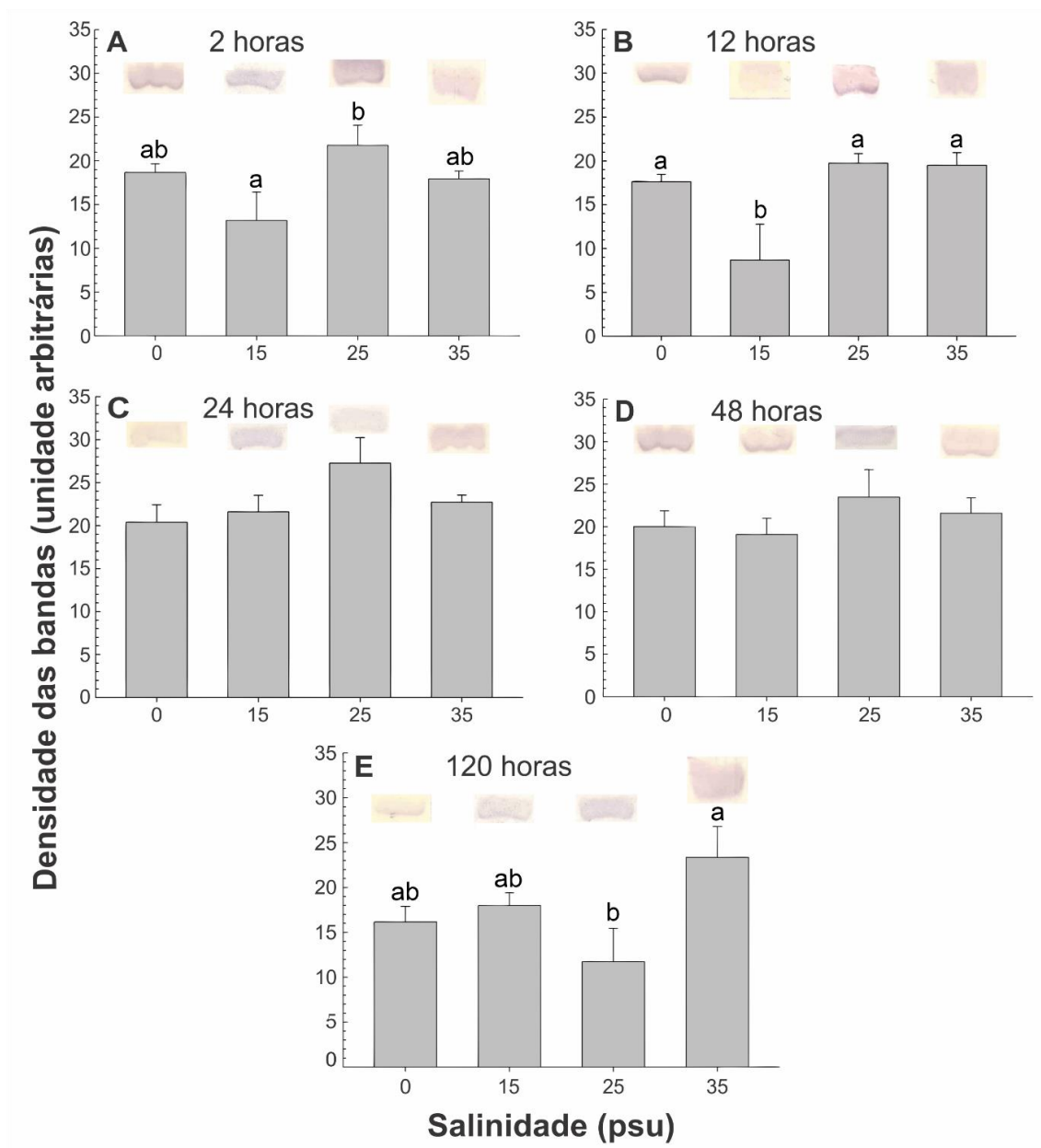


Figura 6. Densidade de bandas de HSP70 expressa no tecido muscular abdominal de *Macrobrachium acanthurus* submetido às salinidades 0, 15, 25 e 35 psu por 2 (A), 12 (B), 24 (C), 48 (D) e 120 (E) h. Os valores representados são da média da densidade das bandas em unidades arbitrárias \pm erro padrão da média (n=5-6). Acima de cada média estão representadas as bandas dos resultados do *Western Blotting*.

6. DISCUSSÃO

6.1. Osmolalidade e Teor Hídrico Muscular

Com base nos resultados obtidos no presente estudo, quando em condição controle (0 psu), *M. acanthurus* apresentou comportamento hiperregulatório. Tal característica já foi relatada para os seus congêneres, *Macrobrachium rosenbergii* Man, 1879, (Wilder *et al.*, 2000) que apresenta hiperregulação frente à redução de salinidade. Maraschi *et al.*, (2015) verificaram

que a osmolalidade da hemolinfa do *M. acanthurus* em ambiente dulcícola é mantida em torno de 410 mOsm/kg, corroborando os dados obtidos no presente estudo. A hiperregulação pode configurar um padrão característico de crustáceos que vivem em ambientes dulcícolas, os quais mantêm sua osmolalidade acima dos valores do ambiente (Moreira *et al.*, 1983; Péqueux, 1995).

Quando submetido à salinidade 15 psu, o *M. acanthurus* mostrou-se isosmótico ou próximo à linha isosmótica. Esse comportamento também foi verificado *Macrobrachium olfersi* Wiegman, 1836, que apresentou o seu ponto isosmótico em salidade 14 psu (Faleiros, 2011). Manter esse comportamento isosmótico (~474 mOsm/kg) nessa salinidade (~430 mOsm/kg) pode ocorrer devido ao fato de que, nesta faixa salina a quantidade de energia dedicada à osmorregulação é menor (Pérez-Pizón e Lutz, 1991). Tais resultados demonstram que a salinidade ~15 psu pode ser uma faixa ótima para a homeostase do animal.

No presente estudo, em salinidade 25 psu, os camarões apresentaram a osmolalidade de 647 mOsm/kg em 24 h, 615 mOsm/kg em 48 h e 500 mOsm/kg em 120 h. Maraschi *et al.*, (2015) verificaram que *M. acanthurus* quando submetido a 25 psu por 24 h, apresentou osmolalidade da hemolinfa de 629 mOsm/kg. Apesar de em 24 h os valores apresentados aqui serem maiores do que os valores verificados por Maraschi *et al.*, (2015), houve redução nos valores da osmolalidade da hemolinfa nos tempos subsequentes (48h e 120h). Faleiros (2011), ainda em *M. acanthurus*, constatou a hiporregulação da osmolalidade da hemolinfa e Cl⁻ em meio salino. Entretanto, *M. acanthurus* demonstrou esse comportamento de hiporregulação apenas em 12 horas nas salinidades 25 e 35 psu. Comportamento este, que não permaneceu nos tempos subsequentes, portanto hiporregulando apenas após seu ponto isosmótico em 12 horas.

Nos tempos seguintes de 24, 48 e 120 h, nas salinidades 25 e 35 psu o comportamento passou a ser hipoconformador. Foster *et al.*, (2010) verificaram que quando submetido a 30 psu por 24 h, *M. acanthurus*, já em 16 h não conseguiu manter o gradiente, sendo incapaz de hiporregular e osmoconformando após esse período. *M. olfersi* também apresentou

comportamento hipoconformador logo após seu ponto isosmótico (428 mOsm/kg) (Freire *et al.*, 2003). Segundo os mesmos autores, esta capacidade de hipoconformar sugere uma alta permeabilidade em salinidades elevadas. No presente trabalho na condição de 35 psu por 120 h os camarões já estavam lentos e não respondiam a estímulos, demonstrando que tal condição pode ser um desafio considerável.

M. acanthurus demonstrou comportamento hiporregulador em 12 h após seu ponto isosmótico (~474 mOsm/kg). Entretanto, nos tempos seguintes em salinidade 25 e 35 psu, o comportamento passou a ser hipoconformador. Isso demonstra que em salinidade maior por um maior tempo de exposição, a espécie não consegue manter a regulação de volume celular. A exposição à alta salinidade pode levar à redução de mecanismos de absorção de sal como a redução na atividades de bombas como Na⁺/K⁺-ATPase e V(H⁺)-ATPase (Faleiros, 2011; Maraschi *et al.*, 2015). Entretanto, a manutenção do gradiente não depende unicamente da capacidade das brânquias de secretar sal, mas depende também, da eficiência do controle de permeabilidade (Freire *et al.*, 2003; Foster *et al.*, 2010).

McNamara e Faria (2012) sugerem a paleomonídeos um ancestral comum de regiões estuarinas, ~17 psu, sendo considerado um hiperregulador fraco. A invasão de meios diluídos pelo gênero *Macrobrachium*, é sustentada por mecanismos osmorreguladores que possibilitaram o aumento do gradiente mantido entre a hemolinfa e a baixa osmolalidade ambiental (McNamara *et al.*, 2015). Dentro do gênero existem diferentes níveis de tolerância à variação de salinidade. O camarão diádromo *M. olfersi*, mesmo tendo sucesso ao ocupar o ambiente dulcícola, ainda é capaz de explorar ambientes salinos (Freire *et al.*, 2003). Por outro lado, *M. amazonicum* habita nichos com baixa variação de salinidade o que resultou na perda da hiporregulação (Faleiros *et al.*, 2010). Segundo Charmantier e Anger (2010) a perda da hiporregulação em *M. amazonicum* deve-se ao fato de suas populações serem confinadas ao continente. Diferentemente de populações de *M. acanthurus*, as quais podem ser encontradas em lugares com maiores flutuações de salinidade (Faleiros *et al.*, 2010; Faleiros, 2011).

Devido à invasão recente no ambiente de água doce, *M. acanthurus* apresenta mecanismos regulatórios de genes que lhes permitem um alto grau de plasticidade. No entanto uma invasão de forma incompleta, dada necessidade de retorno a águas salobras quando em forma larval (Maraschi *et al.*, 2015; Freire *et al.*, 2003). O êxito na invasão ao ambiente dulcícola é decorrência de eficientes mecanismos de hiperregulação e redução da permeabilidade (Péqueux, 1995), sendo a flexibilidade de comportamentos osmorregulatórios de *M. acanthurus*, relevante na ocupação de ambientes com salinidades variadas (Faleiros, 2011). Sendo a ampla sobrevivência em locais de salinidade flutuante, uma provável característica fisiológica compartilhada pelos camarões palemonídeos (Freire *et al.*, 2003).

6.2. Proteína de Estresse HSP70

Os resultados obtidos no presente estudo demonstram que *M. acanthurus* a expressão de proteínas HSP70 foi variável, sem um padrão distinto. Também sem diferenças entre a condição experimental e controle, exceto em 12 h. A maior variação foi uma queda de expressão em salinidade 15 psu em 12 h com posterior retorno a valores próximos ao controle em 48 h e tempos subsequentes. Esta queda pode ser explicada pelo animal apresentar um comportamento isosmótico que demanda custo energético menor (Pérez-Pizón e Lutz, 1991) e conseqüentemente menor estresse ao animal. As induções da expressão de proteínas de estresse são bem documentadas em resposta a contaminantes e variações de temperatura (Morris, 2015; Roberts *et al.*, 2010; Selvakumar 2005; Werner *et al.*, 2005) porém, pouco se sabe sobre a indução pela salinidade (Smith *et al.*, 1999; Dong *et al.*, 2008; Tine *et al.*, 2010). Entretanto é possível que no presente estudo a salinidade possa não ser o agente extressor diretamente relacionado a esta expressão

A variabilidade na expressão de proteínas HSP70 no tecido muscular verificadas no presente estudo, podem ser um indício de respostas distintas de diferentes tecidos. Como já verificado por Selvakumar *et al.*, (2005) na exposição do camarão dulcícola *Macrobrachium malcolmsonii* Milne-Edwards, 1844 à pesticidas, evidenciando a expressão da proteína HSP70 apenas nas brânquias e não nos outros tecidos analisados (músculo esquelético e

hepatopâncreas). O autor explica tal indução diferenciada devido ao fato de as brânquias estarem enfrentando a exposição máxima e direta aos pesticidas. Em outro estudo *M. malcolmsonii*, foi submetido a aclimação por 30 dias em temperatura de 20 e 30°C. Novamente, a expressão de HSP70 foi maior nas brânquias e coração quando comparados ao tecido muscular e hepatopâncreas (Selvakumar *et al.*, 2005a).

O estresse osmótico pode desnaturar proteínas, afetando a atividade celular e provavelmente a conformação de proteínas intracelulares (Sun *et al.*, 2012). Na condição experimental de 120 h em salinidade 25 psu houve redução em relação a condição 35 psu. Tais resultados demonstram que, como verificado nas análises de osmolalidade e teor hídrico muscular, o longo período de exposição à salinidade 35 psu é de fato uma condição estressante para *M. acanthurus*. Entretanto o o comportamento encontrado na osmolalidade não foi retratado na expressão de HSP70. Ainda, com base nos resultados obtidos, a exposição a salinidade 25 psu em 24 h pode aparentar uma condição desafiadora. Nesta condição, *M. acanthurus* apresentou os maiores valores de expressão de HSP70 (no geral) e osmolalidade, quando comparados com as demais condições. Possivelmente, frente a alterações salinas, são ativadas respostas celulares rápidas, concomitantemente a ação de mecanismos compensatórios, como regulação de volume celular e excreção de sal contínua, reestabelecendo assim a homeostase do meio interno (Freire *et al.*, 2008b; Sun *et al.*, 2012). Entretanto, é possível que as brânquias tenham recebido o maior impacto pelas alterações de salinidade explicando desta forma a possível ausência de padrão na expressão de proteínas HSP70 no músculo esquelético de *Macrobrachium acanthurus*.

A família da HSP70 apresenta formas de expressão distintas. HSC70 que é expressa como forma constitutiva em condições normais e a HSP70 expressa de forma induzida quando sob estresse (Lindquist e Craig, 1988). Ao longo do seu ciclo de vida é possível que *M. acanthurus* encontre situações semelhante às impostas no presente estudo. Duas explicações podem ser atribuídas aos resultados deste estudo. Uma, em que os tratamentos salinos impostos aqui não sejam suficientes para causar a desnaturação de proteínas; ou ainda é possível que a espécie já possua naturalmente uma elevada expressão constitutiva de

HSP70 (Selvakumar *et al.*, 2005a). Madeira *et al.*, 2012, verificou que espécies que vivem em ambientes mais variáveis (estuários e entre marés), mantiveram valores médios altos de expressão de HSP70, quando comparados com animais de ambientes mais estáveis.

No trabalho de Maraschi, 2014 (dados não publicados), com *M. acanthurus*, os animais foram submetidos estresse térmico de 20 e 30°C. Nas primeiras 3 h houve aumento na expressão de HSP70 no tecido muscular, com retorno aos valores próximos do controle após 24 e 120 h. A autora discute que esta resposta pode ser resultado de mecanismos de transcrição e padrões de ativação e desativação gênicas eficazes que permitem que a espécie enfrente desafios térmicos sem grandes prejuízos. A variação na expressão da HSP70 de *M. acanthurus* em resposta as diferentes variáveis abióticas, como a salinidade, por exemplo, podem ser explicadas pela diferença de custo metabólico exigido para a síntese de HSP e osmorregulação (Hofmann e Somero, 1995; Madeira *et al.*, 2014). Bem como, pela intensidade do agente estressor, e a adaptação do animal a essas variações no seu habitat (Yenari *et al.*, 1999; Gutierre *et al.*, 2014).

6.3. Conclusão

O camarão diádromo *Macrobrachium acanthurus*, é um forte hiperregulador em água doce. No presente trabalho foi registrado o seu comportamento ligeiramente hiporregulador logo após seu ponto isosmótico em 12 h de exposição. Nos tempos seguintes de 24, 48 e 120 h o camarão passou a ter comportamento mais caracterizável como hipoconformador logo após seu ponto isosmótico. Visto que a ocupação do ambiente dulcícola pela espécie é recente e “incompleta”, estes animais ainda apresentam mecanismos eficientes de osmorregulação que lhes conferem alta plasticidade fisiológica. Quanto à expressão de HSP70, é possível que as células tenham iniciado mecanismos compensatórios, como regulação de volume celular e excreção de sal contínua. Assim, reestabelecendo a homeostase do meio interno, desta forma, não necessitando a ativação da expressão da proteína do estresse. Por, em parte de sua vida, permanecerem em ambientes variáveis, é possível que *Macrobrachium acanthurus* seja adaptado à estas condições. Mas que o aumento do tempo e

intensidade do extressor influenciam nas suas respostas fisiológicas. Além disso, a expressão dessas proteínas, diante desafio salino, pode ser influenciada pelo gasto energético diferenciado entre a osmorregulação e a síntese de proteínas de estresse.

REFERÊNCIAS

- Anger, K. 2013. Neotropical *Macrobrachium* (Caridea: Palaemonidae): on the biology, origin, and radiation of freshwater-invading shrimp. *Journal of Crustacean Biology* **33(2)**: 151-183.
- Augusto, A., Pinheiro, A. S., Greene, L. J., Laure, H. J., e McNamara, J. C. 2009. Evolutionary transition to freshwater by ancestral marine palaemonids: evidence from osmoregulation in a tide pool shrimp. *Aquatic Biology* **7(1-2)**: 113-122.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* **72(1-2)**: 248-254.
- Cesar, J. R. O., e Yang, J. 2007. Expression patterns of ubiquitin, heat shock protein 70, α -actin and β -actin over the molt cycle in the abdominal muscle of marine shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Molecular reproduction and development* **74(5)**: 554-559.
- Charmantier, G., e Anger, K. 2010. Ontogeny of osmoregulatory patterns in the South American shrimp *Macrobrachium amazonicum*: loss of hypo-regulation in a land-locked population indicates phylogenetic separation from estuarine ancestors. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **396(2)**: 89-98.
- Cieluch, U., Anger, K., Aujoulat, F., Buchholz, F., Charmantier-Daures, M., e Charmantier, G. 2004. Ontogeny of osmoregulatory structures and functions in the green crab *Carcinus maenas* (Crustacea, Decapoda). *Journal of experimental biology* **207(2)**: 325-336.
- Coelho, P. A. 1963. Observações Preliminares Sobre a Biologia e a Pesca dos Camarões do Gênero *Macrobrachium* Bate, 1868 (Decapoda Palaemonidae) no Estado de Pernambuco. *Tropical oceanography* **3(1)**.
- Dong, Y., e Dong, S. 2008. Induced thermotolerance and expression of heat shock protein 70 in sea cucumber *Apostichopus japonicus*. *Fisheries Science* **74(3)**, 573-578.
- Dyer, S. D., Dickson, K. L., Zimmerman, E. G., e Sanders, B. M. 1991. Tissue-specific patterns of synthesis of heat-shock proteins and thermal tolerance of the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Canadian Journal of Zoology* **69(8)**: 2021-2027.

- Evans, D. H. (Ed.). 2008. **Osmotic and ionic regulation: cells and animals**. CRC Press.
- Faleiros, R. O. 2011. *Osmorregulação em camarões Palaemonidae (Decapoda, Caridea): uma abordagem molecular e bioquímica* (Dissertação de Doutorado, Universidade de São Paulo).
- Faleiros, R. O., Goldman, M. H. S., Furriel, R. P., e McNamara, J. C. 2010. Differential adjustment in gill Na⁺/K⁺-and V-ATPase activities and transporter mRNA expression during osmoregulatory acclimation in the cinnamon shrimp *Macrobrachium amazonicum* (Decapoda, Palaemonidae). *Journal of Experimental Biology* **213(22)**: 3894-3905.
- Feder, M. E., e Hofmann, G. E. 1999. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. *Annual review of physiology* **61(1)**: 243-282.
- Fernandes, F. A. 2010. Estresse osmótico: proteínas de estresse e balanço oxidativo em *Neohelice granulata* (Crustacea, Decapoda, Veronidae). (Dissertação de Doutorado, Universidade de São Paulo).
- Foster, C., Amado, E. M., Souza, M. M., e Freire, C. A. 2010. Do osmoregulators have lower capacity of muscle water regulation than osmoconformers? A study on decapod crustaceans. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology* **313(2)**: 80-94.
- Freire, C. A., Amado, E. M., Souza, L. R., Veiga, M. P., Vitule, J. R., Souza, M. M., e Prodocimo, V. 2008. Muscle water control in crustaceans and fishes as a function of habitat, osmoregulatory capacity, and degree of euryhalinity. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular e Integrative Physiology* **149(4)**: 435-446.
- Freire, C. A., Cavassin, F., Rodrigues, E. N., Torres, A. H., e McNamara, J. C. 2003. Adaptive patterns of osmotic and ionic regulation, and the invasion of fresh water by the palaemonid shrimps. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular e Integrative Physiology* **136(3)**: 771-778.
- Freire, C. A., Souza-Bastos, L. R., Amado, E. M., Prodocimo, V., e Souza, M. M. 2013. Regulation of muscle hydration upon hypo-or hyper-osmotic shocks: differences related to invasion of the freshwater habitat by decapod crustaceans. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology* **319(6)**: 297-309.
- Gutierrez, S. M. M., Vitule, J. R. S., Freire, C. A., e Prodocimo, V. 2014. Physiological tools to predict invasiveness and spread via estuarine bridges: tolerance of Brazilian native and worldwide introduced freshwater fishes to increased salinity. *Marine and Freshwater Research* **65(5)**: 425-436.

- Häussinger, D., Kubitz, R., Reinehr, R., Bode, J. G., e Schliess, F. 2004. Molecular aspects of medicine: from experimental to clinical hepatology. *Molecular aspects of medicine* **25(3)**: 221-360.
- Larsen, P. F., Nielsen, E. E., Koed, A., Thomsen, D. S., Olsvik, P. A., e Loeschcke, V. 2008. Interpopulation differences in expression of candidate genes for salinity tolerance in winter migrating anadromous brown trout (*Salmo trutta* L.). *BMC genetics* **9(1)**: 1.
- Lindquist, S., e Craig, E. A. 1988. The heat-shock proteins. *Annual review of genetics* **22(1)**: 631-677.
- Madeira, D., Narciso, L., Cabral, H. N., Vinagre, C., e Diniz, M. S. 2012. HSP70 production patterns in coastal and estuarine organisms facing increasing temperatures. *Journal of Sea Research* **73**: 137-147.
- Maraschi, A. C., Freire, C. A., e Prodocimo, V. 2015. Immunocytochemical localization of V-H⁺-ATPase, Na⁺/K⁺-ATPase, and carbonic anhydrase in gill lamellae of adult freshwater euryhaline shrimp *Macrobrachium acanthurus* (Decapoda, Palaemonidae). *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology* **323(7)**: 414-421.
- McNamara, J. C., e Faria, S. C. 2012. Evolution of osmoregulatory patterns and gill ion transport mechanisms in the decapod Crustacea: a review. *Journal of Comparative Physiology B* **182(8)**: 997-1014.
- McNamara, J. C., Freire, C. A., Torres, A. H., e Faria, S. C. 2015. The conquest of fresh water by the palaemonid shrimps: an evolutionary history scripted in the osmoregulatory epithelia of the gills and antennal glands. *Biological Journal of the Linnean Society* **114(3)**: 673-688.
- Moreira, G. S., McNamara, J. C., Shumway, S. E., e Moreira, P. S. 1983. Osmoregulation and respiratory metabolism in brazilian *Macrobrachium* (Decapoda, Palaemonidae). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology* **74(1)**: 57-62.
- Morris, J. P. 2015. *The physiological viability of bathymetric range shifts in marine ectotherms* (Doctoral dissertation, University of Southampton).
- Morris, J. P., Thatje, S., e Hauton, C. 2013. The use of stress-70 proteins in physiology: a re-appraisal. *Molecular ecology* **22(6)**: 1494-1502.
- Pequeux, A. 1995. Osmotic regulation in crustaceans. *Journal of Crustacean Biology* **15(1)**: 1-60.
- Perez-Pinzon, M. A., e Lutz, P. L. 1991. Activity related cost of osmoregulation in the juvenile snook (*Centropomus undecimalis*). *Bulletin of Marine Science* **48(1)**: 58-66.

- Robert, J. 2003. Evolution of heat shock protein and immunity. *Developmental e Comparative Immunology* **27(6)**: 449-464.
- Roberts, R. J., Agius, C., Saliba, C., Bossier, P., e Sung, Y. Y. 2010. Heat shock proteins (chaperones) in fish and shellfish and their potential role in relation to fish health: a review. *Journal of fish diseases* **33(10)**: 789-801.
- Sanders, B. M., Martin, L. S., Howe, S. R., Nelson, W. G., Hegre, E. S., e Phelps, D. K. 1994. Tissue-specific differences in accumulation of stress proteins in *Mytilus edulis* exposed to a range of copper concentrations. *Toxicology and applied pharmacology* **125(2)**: 206-213.
- Selvakumar, S., e Geraldine, P. 2005. Heat shock protein induction in the freshwater prawn *Macrobrachium malcolmsonii*: acclimation-influenced variations in the induction temperatures for Hsp70. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular e Integrative Physiology* **140(2)**: 209-215.
- Selvakumar, S., Geraldine, P., Shanju, S., e Jayakumar, T. 2005. Stressor-specific induction of heat shock protein 70 in the freshwater prawn *Macrobrachium malcolmsonii* (H. Milne Edwards) exposed to the pesticides endosulfan and carbaryl. *Pesticide biochemistry and physiology* **82(2)**: 125-132.
- Smith, T. R., Tremblay, G. C., e Bradley, T. M. 1999. Hsp70 and a 54 kDa protein (Osp54) are induced in salmon (*Salmo salar*) in response to hyperosmotic stress. *Journal of Experimental Zoology* **284(3)**: 286-298.
- Sørensen, J. G., Kristensen, T. N., e Loeschcke, V. 2003. The evolutionary and ecological role of heat shock proteins. *Ecology Letters* **6(11)**: 1025-1037.
- Sun, M., Jiang, K., Zhang, F., Zhang, D., Shen, A., Jiang, M., ... e Ma, L. 2012. Effects of various salinities on Na⁺-K⁺-ATPase, Hsp70 and Hsp90 expression profiles in juvenile mitten crabs, *Eriocheir sinensis*. *Genetics and Molecular Research* **11(2)**: 978-986.
- Tine, M., Bonhomme, F., McKenzie, D. J., e Durand, J. D. 2010. Differential expression of the heat shock protein Hsp70 in natural populations of the tilapia, *Sarotherodon melanotheron*, acclimated to a range of environmental salinities. *BMC ecology* **10(1)**: 1.
- Werner, I., Smith, T. B., Feliciano, J., e Johnson, M. L. 2005. Heat shock proteins in juvenile steelhead reflect thermal conditions in the Navarro River watershed, California. *Transactions of the American Fisheries Society* **134(2)**: 399-410.
- Wilder, M. N., Atmomarsono, M., Hien, T. T. T., Phu, T. Q., e Yang, W. J. 2000. Characterization of Na/K-ATPase in *Macrobrachium rosenbergii* and the effects of changing salinity on enzymatic activity. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular e Integrative Physiology* **125(3)**: 377-388.

- Willmer, P., Stone, G., e Johnston, I. 2005. *Environmental physiology of animals*. John Wiley e Sons.
- Yamuna, A., Kabila, V., e Geraldine, P. 2000. Expression of heat shock protein 70 in freshwater prawn *Macrobrachium malcolmsonii* (H. Milne Edwards) following exposure to Hg and Cu. *Indian journal of experimental biology* **38(9)**: 921-925.
- Yancey, P. H., Clark, M. E., Hand, S. C., Bowlus, R. D., e Somero, G. N. 1982. Living with water stress: evolution of osmolyte systems. *Science* **217(4566)**: 1214-1222.
- Yenari, M. A., Giffard, R. G., Sapolsky, R. M., e Steinberg, G. K. 1999. The neuroprotective potential of heat shock protein 70 (HSP70). *Molecular medicine today* **5(12)**: 525-531.

CAPÍTULO II

**CURSO TEMPORAL DAS CONCENTRAÇÕES DA HEMOLINFA E
ANIDRASE CARBÔNICA BRANQUIAL NO CAMARÃO DE ÁGUA DOCE
EURIHALINO, *Macrobrachium acanthurus* WIEGMANN, 1836
SUBMETIDO A AUMENTO DE SALINIDADE**

RESUMO

O camarão *Macrobrachium acanthurus* tem comportamento de hiperregulação em ambiente dulcícola. Entretanto quando em sob aumento de salinidade em poucas horas apresenta comportamento de hiporregulação. Com base nisso, o camarão diádromo, eurihalino *Macrobrachium acanthurus* foi exposto a salinidade 20 psu por 3, 6, 24, 48, 120, 144, 160 h de exposição. O objetivo do estudo foi avaliar a atividade da anidrase carbônica branquial e os mecanismos osmorregulatórios de *Macrobrachium acanthurus*, após curso temporal em exposição em desafio salino. Os parâmetros avaliados foram osmolalidade, teor hídrico tecidual, íons Cl⁻ e Mg²⁺, produção de lactato e atividade da anidrase carbônica. Os resultados de osmolalidade aumentaram quando comparados com o controle. O teor hídrico muscular também espelhou este padrão e reduziu. Entretanto ao longo de todo tempo de exposição, *M. acanthurus* manteve uma resposta hiposmótica em relação ao meio. No tempo de 48 h houve um pico na produção de lactato, na tentativa de reduzir o consumo de O₂, afim de estabelecer o gasto energético com seu metabolismo. Houve um aumento da atividade da AC, o que também refletiu no aumento na concentração de Cl⁻. Isto pode estar relacionado com a absorção de sal e regulação iônica. Assim, este aumento de sal pode dificultar a regulação iônica, respiração e a regulação ácido-base, de forma integrada, sobrecarregando a atividade da AC.

Palavras chave: osmorregulação; metabolismo; hiporregulação; lactato; anidrase carbônica.

ABSTRACT

The shrimp *Macrobrachium acanthurus* has hyperregulation behavior in freshwater environments. However, when under salinity increased in a few hour presents hyporegulation behavior. Based on this the diadromous shrimp *M. acanthurus*, was exposed to salinity 20 psu for 3, 6, 24, 48, 120, 144, 160 h of exposure. The aim of this study was to evaluate the activity of gill carbonic anhydrase and osmorregulatory mechanisms of *M. acanthurus*, after temporal course displays in saline challenge. The parameters evaluated were osmolality, tissue water content, Cl⁻ and Mg²⁺ ions, lactate production and carbonic anhydrase activity. The osmolality results increased when compared with control. Muscle water content also mirrored this pattern and reduced. However, throughout exposure time, *M. acanthurus* maintained a hyposmotic response to the medium. At the time of 48 h there was a peak in lactate production, in an attempt to reduce the O₂ consumption in order to establish the expended energy with your metabolism. There was an increased activity of the AC, which also reflected in the increase in Cl⁻ concentration. This may be related to the salt absorption and ion regulation. So, this salt increase can make Ionic regulation, respiration and acid-base regulation in an integrated manner, overloading the AC activity.

Key words: osmorregulation; metabolism; hiporegulation, lactate; carbonic anhydrase.

1. INTRODUÇÃO

Crustáceos ocupam os mais diversos ambientes, com espécies marinhas, dulcícolas, terrestres e semiterrestres (Péqueux, 1995). Dentre as estratégias de manutenção da homeostase osmótica e iônica, os organismos podem ser reguladores ou conformadores. A estratégia de cada espécie é moldada pela capacidade de tolerar diferentes escalas abióticas, separando espécies em eurihalinas, que toleram uma grande faixa de salinidade, ou estenoalinas, que toleram uma pequena faixa de salinidade (Péqueux, 1995; Willmer *et al.*, 2005).

Organismos dulcícolas apresentam, em sua maioria, mecanismos de hiperregulação, de forma a lidar com influxo de água e perda iônica constante para o meio onde estão inseridos (Willmer *et al.*, 2005). Assim, crustáceos dulcícolas contam com mecanismos regulatórios capazes de manter as concentrações iônicas internas necessárias. Entretanto, quando expostos a desafios osmóticos e iônicos, possuem a capacidade restaurar o volume celular e a concentração dos solutos intracelulares (Péqueux, 1995; Weihrauch *et al.*, 2004).

Dentro de todos os processos de osmorregulação, as brânquias desempenham as funções mais importantes na regulação osmótica e iônica (Tsai e Lin, 2007; Freire *et al.*, 2008). O transporte iônico em crustáceos é realizado por uma vasta quantidade de enzimas especializadas presentes nas brânquias, como transportadores de membrana, Na^+/K^+ -ATPase (NKA), canais de K^+ e Cl^- , $\text{V}(\text{H}^+)$ -ATPase (HA) e trocadores $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ e a enzima anidrase carbônica (AC) (Figura 1, Introdução Geral) (Lucu e Towle, 2010; Weihrauch *et al.*, 2004; Lucena *et al.*, 2015).

A metaloenzima anidrase carbônica está presente em procariontes e eucariontes e catalisa uma reação fisiológica bastante simples. Está envolvida em um processo fisiológico relacionado à respiração, transporte de CO_2 / HCO_3^- , a manutenção da homeostase e secreção iônica em uma variedade de tecidos. Basicamente, a AC oferece suporte ao transporte iônico, fornecendo H^+ e HCO_3^- , através da hidratação intracelular reversível de CO_2 ($\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$). Assim, excreção de CO_2 é alcançada, mas também fornece íons Na^+ e Cl^- para

os trocadores, que gerenciam o equilíbrio ácido base (Morris, 2001; Weihrauch *et al.*, 2001; 2004; Supuran *et al.*, 2004).

Crustáceos de água doce apresentam grandes quantidades da atividade de AC, característica esta que parece ser um aspecto molecular geral (concomitantemente à atividade da Na⁺/K⁺-ATPase) de hiperregulação. Esta ideia é reforçada pela redução da atividade destas proteínas em espécies marinhas estenoalinas (Henry *et al.*, 2000; Henry, 2001). Estudos já demonstram que a exposição a diferentes salinidades leva a alterações nos níveis de expressão de AC em crustáceos (Henry *et al.*, 2003; Roy *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2012; Maraschi *et al.*, 2015). Ainda a exposição a condições osmóticas e iônicas desfavoráveis, podem causar alterações no metabolismo do animal, como consumo de oxigênio (McNamara *et al.*, (1986)).

O presente estudo tem como objetivo analisar as variações na osmolalidade da hemolinfa, na atividade branquial da enzima anidrase (AC) carbônica, e na produção de lactato frente a alterações de salinidade no camarão dulcícola *M. acanthurus*. Por apresentar estratégia hiporreguladora com aumento de salinidade, espera-se que a atividade da enzima AC seja maior na condição controle, apresentando uma redução gradual em salinidade 20 psu frente ao aumento no tempo de exposição.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

- Caracterizar a resposta osmorregulatória do camarão *M. acanthurus* sob influência do aumento do tempo de exposição a salinidade 20 psu durante um curso temporal.

2.2. Objetivos Específicos

- Analisar as variações na atividade branquial da AC, nos mecanismos osmorregulatórios e na produção de lactato do camarão eurihalino *Macrobrachium acanthurus* frente a desafio hipersalino por um curso temporal.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Coleta e Experimento

Os indivíduos de *Macrobrachium acanthurus* utilizados neste estudo foram obtidos de pescadores em Pontal do Paraná. Os indivíduos desta espécie foram coletados no Rio dos Barrancos (25°36'32.0"S 48°24'02.5"W) e revendidos como isca-viva em Pontal do Paraná. Os camarões foram transportados em galões com aeração por todo transporte (1h30min) até o Laboratório de Fisiologia Comparativa da Osmorregulação em Curitiba, na Universidade Federal do Paraná. Já em laboratório os animais foram aclimatados por cinco dias em água doce, filtrada com aeração constante e temperatura controlada (20 ± 2 °C).

Após o período de aclimação os indivíduos foram submetidos individualmente a condições experimentais em recipientes de 800 ml. Os animais foram submetidos à salinidade 20 psu nos tempos de 3, 6, 24, 48, 120, 144, 158 h e cada condição teve uma condição controle. Cada condição experimental (tempo e salinidade) contabilizou 6 indivíduos, seguindo o mesmo padrão para a condição controle. A salinidade de 20 psu foi escolhida por esta condição ser tolerável (sub-letal), embora represente desafio osmótico significativo. Enquanto no Capítulo I a intenção foi testar os limites de tolerância máxima a aumento de salinidade, neste segundo Capítulo o objetivo foi acompanhar o curso temporal das respostas a uma salinidade alta, porém tolerável pelo camarão. Após o período de exposição, os animais foram anestesiados em recipiente com gelo (~ 5 min) até estarem completamente imóveis. Foram retiradas amostras de hemolinfa, tecido muscular e brânquias para as devidas análises.

3.2. Dosagem das concentrações osmóticas, iônicas e de lactato da hemolinfa

A osmolalidade da hemolinfa foi dosada em micro-osmômetro de pressão de vapor (Wescor VAPRO modelo 5520, EUA), em amostras não diluídas. Para as dosagens iônicas, as amostras foram devidamente diluídas, de forma a situarem-se na faixa de leitura dos métodos.

As concentrações dos íons cloreto (Cl^-), magnésio (Mg^{2+}) e lactato foram determinadas por métodos colorimétricos, utilizando-se Kits comerciais (Labtest, Brasil). Todas as amostras foram diluídas conforme o protocolo dos fabricantes e a leitura de absorbância realizada em espectrofotômetro (Ultrospec 2100 PRO Amersham Pharmacia biotech, EUA) sob comprimentos de onda de 470 nm para o cloreto, 505 nm para o magnésio e 550nm para lactato.

3.3. Determinação do teor hídrico muscular

A porcentagem de teor hídrico foi medida no tecido muscular dos animais expostos aos diferentes tempos de salinidades experimentais e controle. As amostras de tecido muscular foram pesadas logo após a dissecação, obtendo-se assim o peso úmido do fragmento (Pu). Em seguida, as amostras foram colocadas na estufa a 60° C, por 24 h. Após este período, as amostras foram novamente pesadas para a obtenção do peso seco (Ps). Por fim, o teor de hidratação do tecido foi calculado através da diferença entre o peso úmido e seco e o resultado foi apresentado em forma de porcentagem.

3.4. Anidrase carbônica

O ensaio enzimático de anidrase carbônica foi delineado através do método estabelecido por Vitale et al. (1999) baseado em Henry (1991). O tecido foi pesado e posteriormente homogeneizado, em uma proporção de 1:10 de tecido para tampão, composto por manitol (225 mM), sacarose (75 mM) e tris-fosfato (10 mM), com ajuste de pH 7,4. Após a centrifugação refrigerada de 5 min a 12000 RPM o sobrenadante das amostras à temperatura ambiente foi retirado e separado para o ensaio. Em seguida, em um becker de 10 ml, foram adicionados 7,5 ml de solução tampão, 50 μL de amostra de tecido homogeneizado e 1 ml de água deionizada saturada com gás carbônico, sendo esta a taxa catalisada (TC) pela anidrase carbônica. A taxa de reação não catalisada (TNC) foi determinada acrescentando-se a 7,5 ml do tampão, 1 ml de água deionizada saturada com gás carbônico. Esta solução foi mantida por todo o experimento entre 2,5 e 4 °C. A partir da inserção da água oxigenada, observou-se a queda do pH a cada 4 segundos, durante 20 segundos através do pHmetro de bancada inoLAB pH Level 1 da WTW, obtendo-se uma reta de regressão linear pH x tempo. As quantidades de proteínas totais foram dosadas

pelo método de Bradford (1976) para cálculo de atividade específica da AC. A atividade da anidrase carbônica (AAC) foi calculada através da fórmula: $AAC = [(TC/TNC)-1]/mg$ proteína total (Burnett *et al.*, 1981; Vitale *et al.*, 1999).

3.5. Análises Estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas através do *software* Sigma Stat 11.0 para Windows. Os dados foram testados para normalidade e os grupos foram comparados através de ANOVA de duas vias de forma a avaliar o efeito de tempo e da salinidade em todos os parâmetros. O teste *post hoc* utilizado foi Holm-Sidak de forma a localizar diferenças dentro dos grupos submetidos a diferentes salinidades. O limite de significância estabelecido foi de 0,05.

4. RESULTADOS

4.1. Osmolalidade e íons

A osmolalidade da hemolinfa de *M. acanthurus* manteve-se em torno de ~450 mOsm/kgH₂O na condição controle (Figura 7) e diferiu da condição experimental (~500 mOsm/kgH₂O) em todos os tempos experimentais exceto em 144 h. Nos resultados de conteúdo de água tecidual houve diferença entre controle e condições experimentais apenas nos tempos 6 (Figura 7). Na condição controle o teor hídrico muscular manteve-se em torno de 77%, já em 6h houve redução de 76% para 75% e em 120h houve de 2% 78% para 76%.

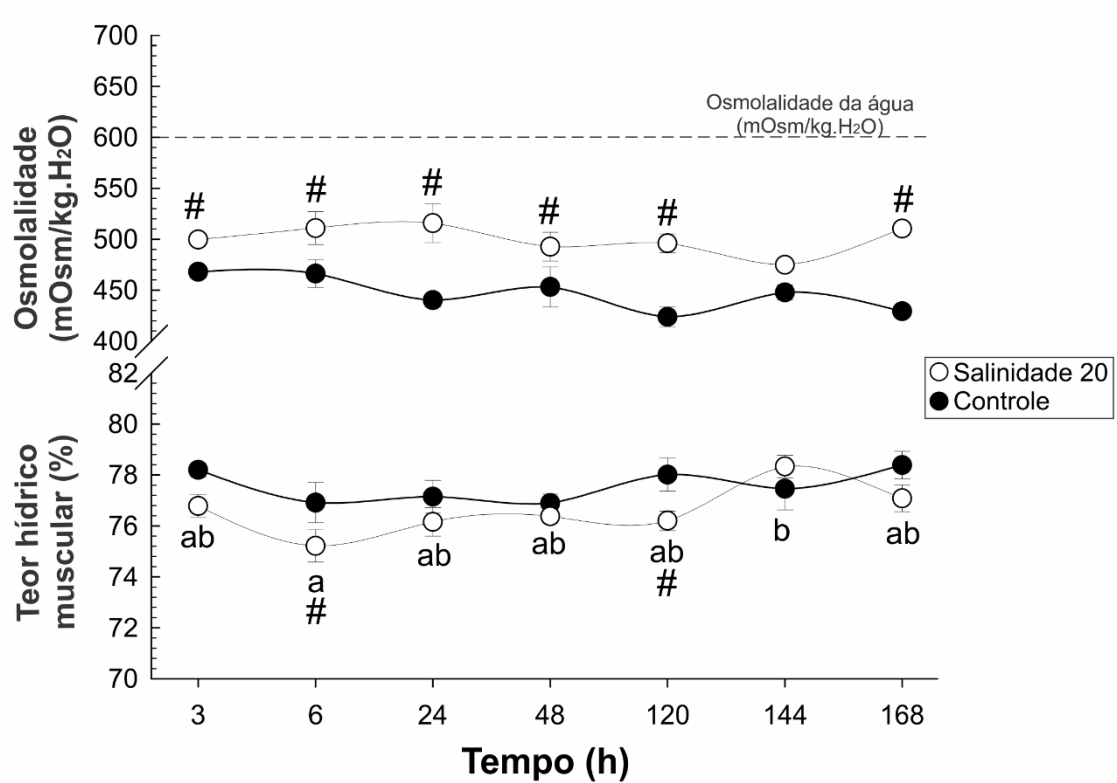


Figura 7. Osmolalidade e teor hídrico muscular de *Macrobrachium acanthurus* em condição controle e após exposição por diferentes tempos à salinidade 20 psu. A linha pontilhada representa a osmolalidade da água em salinidade 20 psu. Letras minúsculas representam diferenças entre tempos dentro de cada condição. # indicam diferenças com o controle. n=6 para cada condição.

A exposição à salinidade 20 psu foi suficiente para causar aumento na concentração de cloreto na hemolinfa de *M. acanthurus* (Figura 8). A concentração de cloreto não diferiu entre tempos dentro de cada condição, mas houve diferenças entre controle e condição experimental a partir de 48 h. A condição controle manteve-se em torno de $105 \pm 9,35$ mM e a condição experimental de 20 psu manteve-se a aproximadamente $127 \pm 9,66$ mM. As concentrações de magnésio também não diferiram entre tempos dentro de cada condição. Entretanto, diferiram entre controle e salinidade 20 psu dentro dos tempos 6 e 168 h, aumentando de 2,77 para 4,03 mM em 6 h e reduzindo de 4,30 para 2,71 mM em 168 h (Figura 8).

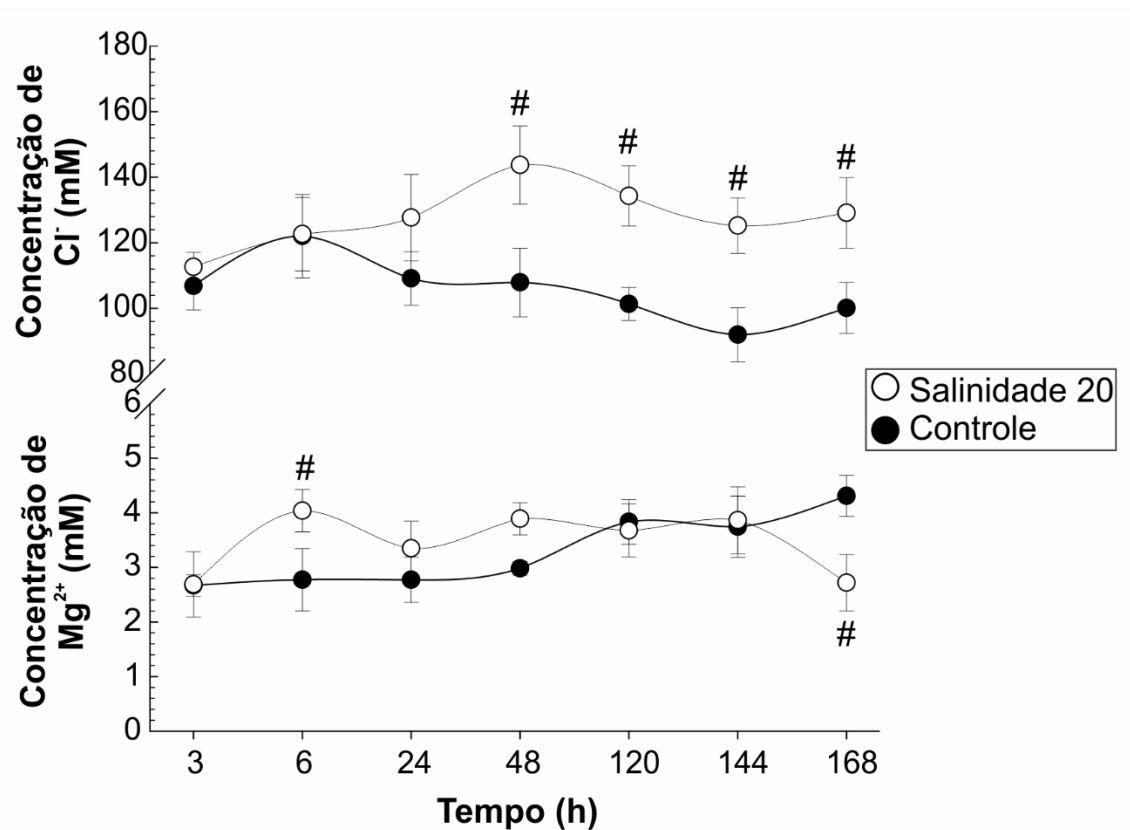


Figura 8. Concentrações de íons Cloreto e Magnésio na hemolinfa de *Macrobrachium acanthurus* ao longo da exposição em salinidade 20 psu por diferentes tempos. # indicam diferenças com o controle. n=6 para cada condição.

4.2. Lactato

O lactato na hemolinfa de *M. acanthurus* apresentou alterações ao longo do tempo de exposição (Figura 9). Em condição controle a concentração foi de $3,74 \pm 0,92$ mg/l. Em 3, 6 e 24 h não foram observadas alterações, mantendo a concentração em torno de 5 mg/l. No entanto, em 48 h um aumento significativo foi observado (11,37mg/l), retornando aos valores próximos ao controle em 120 e 144 h e apresentando uma queda significativa em 168 h (2,35 mg/l).

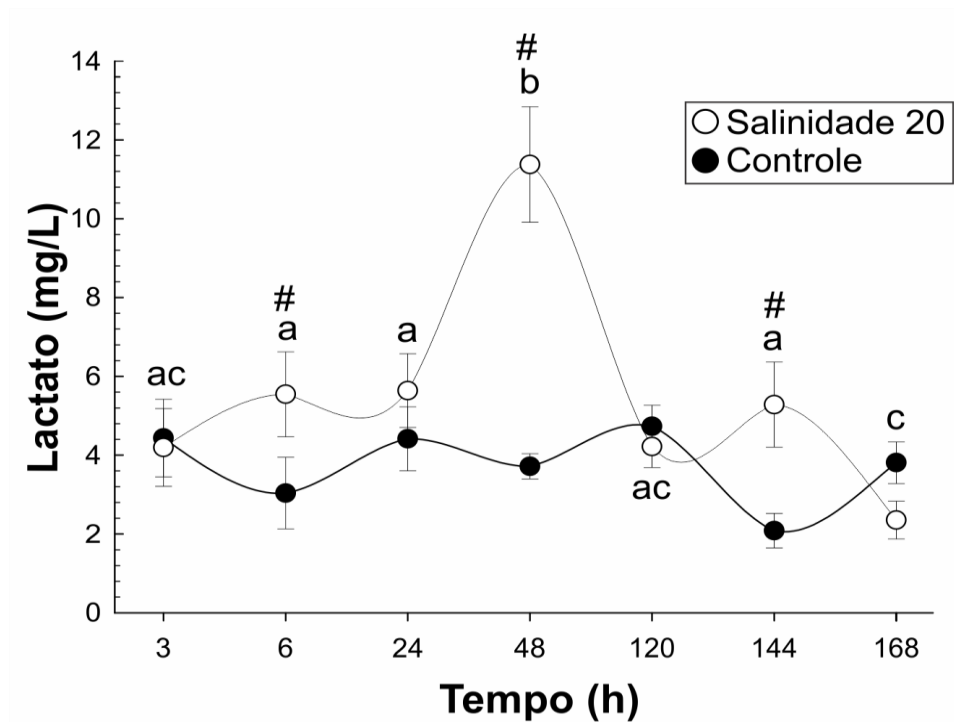


Figura 9. Concentração de lactato na hemolinfa de *Macrobrachium acanthurus* submetido a condição controle e salinidade 20 psu por diferentes tempos. Letras minúsculas representam diferenças entre tempos dentro de cada condição. # indicam diferenças com o controle. n=6 para cada condição.

4.3. Atividade da enzima Anidrase carbônica

A atividade da Anidrase carbônica branquial foi afetada pela exposição de longa duração em salinidade 20 psu (Figura 10). Em condição controle a anidrase carbônica teve uma média de atividade de $3,25 \pm 2,02$ /mg. Na condição experimental de salinidade 20 psu, um pico de atividade foi observado em 3 h (37,31 /mg). Nos tempos seguintes de 6 até 120 h houve uma queda, quando comparado com 3 h (19,3 e 11 /mg, respectivamente). Entretanto, quando comparado com o controle ainda assim manteve a alta atividade da anidrase carbônica. Um novo aumento na atividade foi registrado em 144 h (23,33 /mg proteínas) seguindo de um retorno aos valores semelhantes a 24 h (13,34 /mg), em 168 h.

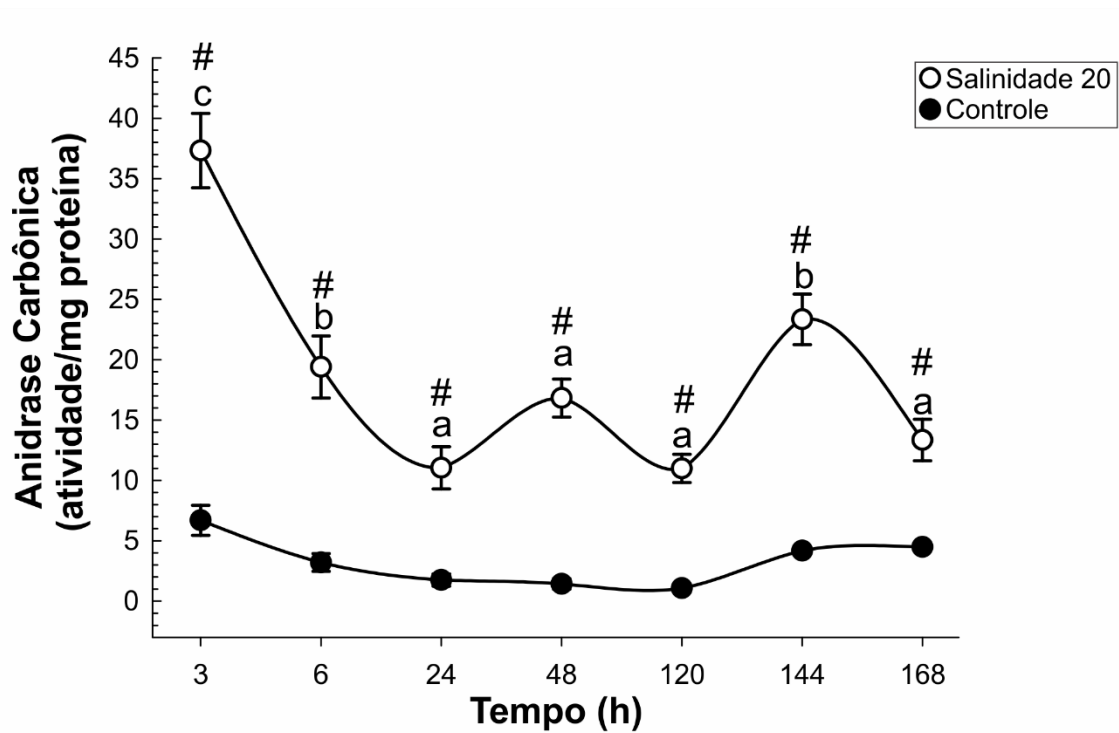


Figura 10. Atividade específica da Anidrase Carbônica branquial de *Macrobrachium acanthurus*, após exposição a condição controle e salinidade 20 psu por diferentes tempos. Letras minúsculas representam diferenças entre tempos dentro de cada condição. # indicam diferenças com o controle.

5. DISCUSSÃO

O camarão *M. acanthurus* é um forte hiperregulador em água doce, mas a partir do ponto isosmótico (~450 mOsm/kgH₂O), tende a hiporregular (Moreira *et al.*, 1983, Foster *et al.*, 2010; Freire *et al.*, 2013). A condição experimental de 20 psu (~600 mOsm/kgH₂O), representa desafio osmótico e esse desafio aumenta de acordo com o tempo de exposição. Ao longo de todos os tempos experimentais a osmolalidade permaneceu em torno de ~500 mOsm/kgH₂O, bem como o conteúdo de água muscular em 76%. Essa resposta corrobora o perfil hiporregulatório frente a alteração salina, também relatado por Foster *et al.*, (2010) e Maraschi *et al.*, (2015).

Este comportamento hiporregulatório é uma consequência da secreção ativa de sal. Adicionalmente, pode ser explicado pela queda na atividade de transportadores de membrana, como por exemplo, a Na⁺/K⁺-ATPase. Esta proteína de membrana está envolvida no processo de troca iônica de Na⁺ e K⁺. A queda na atividade deste transportador de membrana já foi evidenciada nos congêneres *M. amazonicum*, Heller, 1862 e *Macrobrachium olfersi* Wiegmann,

1836, ambos dulcícolas e fortes hiperreguladores (Mendonça *et al.*, 2007; Faleiros *et al.*, 2010). Entretanto, *M. acanthurus*, quando exposto à salinidade 25 psu por 24 h, não apresentou alterações na atividade da Na⁺/K⁺-ATPase branquial (Maraschi *et al.*, 2015). Os autores explicam estas alterações como uma possível interrupção na absorção de sal.

Com relação as concentrações de íons Cl⁻ e Mg²⁺, houve aumento apenas de Cl⁻, a partir de 24 horas, quando comparado com o controle. Em um trabalho com *M. rosenbergii* (Fieber e Lutz, 1985), foi visto que a quantidade de Mg²⁺ na hemolinfa foi semelhante a água em condição controle. Isto sugere um movimento de água por difusão por uma membrana epitelial permeável, assim mantendo ambiente externo e interno com condições semelhantes. Além disso, possivelmente o Mg²⁺ é tido como cofator de ATPases envolvidas no transporte iônico durante o período de muda, por exemplo (Fieber e Lutz, 1985). O Cl⁻ é um importante ânion no processo de osmorregulação. Este ânion é utilizado no trocador HCO₃, o qual é produzido na hidratação de CO₂ pela atividade AC (Morris, 2001; Henry, 2001). Já foi verificado que a inibição da Anidrase Carbônica afeta a absorção de Cl⁻, mais do que a absorção de Na⁺ (Cameron, 1986). Portanto, a atividade da AC está relacionada com a tomada de Cl⁻, o que reflete com os resultados do presente estudo, onde o aumento da atividade da AC, também refletiu no aumento de Cl⁻ na hemolinfa.

Tratando-se da concentração de lactato na hemolinfa, o camarão *M. acanthurus* apresentou variações ao longo do tempo de exposição em salinidade 20 psu, com um pico de produção em 48 h. Basicamente, o acúmulo de lactato tanto no tecido muscular como na hemolinfa é resultado do metabolismo anaeróbico (Henry *et al.*, 1994). Segundo Booth *et al.*, (1982) a redução no consumo de oxigênio pode levar a uma alta produção de lactato na hemolinfa. E um dos fatores que podem reduzir a taxa de consumo de O₂ é a alteração de salinidade, como já evidenciado por McNamara *et al.*, (1986) no camarão diádromo *M. olfersi*. Em um trabalho com *Macrobrachium tuxtlaense* (Villalobos & Alvarez, 1999), exposto a aumento de salinidade até 30 psu, foi relatado o consumo de oxigênio em salinidade 5 e 10 psu e redução nas outras salinidades (Ordiano *et al.*, 2005). Entretanto, em outro trabalho com *M. acanthurus*, submetido a salinidades 0, 10, 20 e 30 psu por 4 e 8 horas, o camarão não

apresentou redução no consumo e nem aumento na produção de lactato em nenhuma condição (Freire *et al.*, 2017 dados ainda não publicados). Os autores discutem que se houvesse um comportamento de esquiva (redução na permeabilidade por redução na perfusão branquial) desta condição, haveria uma redução no consumo de oxigênio. Possivelmente o curto tempo de exposição do camarão não reduziu o consumo e nem teve aumento na produção de lactato. Diferentemente do presente trabalho, onde o animal em um tempo de exposição prolongado não foi capaz de manter-se em suas condições estáveis, aumentado a produção de lactato. Possivelmente neste tempo, o camarão procurou reduzir o consumo de O₂, afim de reduzir o gasto energético em suas atividades metabólicas.

A enzima Anidrase Carbônica é encontrada em diferentes tecidos e realiza uma importante função nos mecanismos de transporte iônico e equilíbrio ácido-base (Henry, 2001). A indução da atividade da AC branquial em resposta a exposição a salinidade tem sido estudada em várias espécies de crustáceos, e é associada ao processo de captação de íons branquiais subjacentes à osmorregulação da hemolinfa (McNamara e Faria, 2012; Henry *et al.*, 2002; Henry, 2001). No presente trabalho, logo em 3 h de exposição a atividade da AC estava alta, seguido de uma redução nos tempos seguintes. Entretanto, ainda se mantendo elevada quando comparada com o controle. Maraschi *et al.*, (2015) verificaram que a exposição de *M. acanthurus* a salinidade 25 psu por 24 h, não foi suficiente para causar alterações na atividade da AC branquial. Por ser um curto período de exposição, é possível que sua atividade não tenha sido alterada. Porém, os resultados do presente estudo demonstram que, a atividade da AC pode ser influenciada pelo aumento do tempo de exposição em salinidade constante.

O aumento da atividade da AC já foi encontrado no teleósteeo dulcícola *Rhamdia quelen*, quando exposto por 1 h a salinidade 25 psu (Souza-Bastos e Freire, 2009; Gutierre, 2011). Bem como em outras espécies de crustáceos dulcícolas (Henry, 1996; Henry *et al.*, 2012). Nestes trabalhos o aumento da atividade da AC pode estar relacionado com a absorção de sal e conseqüentemente com a regulação iônica (Henry e Cameron, 1983; Evans *et al.*, 2005; Souza-Bastos e Freire 2009). O aumento de sal dificulta a regulação

iônica, respiração e a regulação ácido-base, de forma integrada, sobrecarregando a atividade da AC. A atividade da AC na regulação iônica é utilizada na manutenção ácido-base, sendo esta, restaurada após uma perturbação. A regulação iônica pode ser mediada, por exemplo, pelos trocadores $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ e Na^+/H^+ (Weihrauch *et al.*, 2004; Lucena *et al.*, 2015). Com base nisso, a AC trabalha no processo de fornecimento de íons para os transportadores iônicos, conseqüentemente atuando na manutenção ácido-base (Henry e Cameron, 1983; Henry, 2001; Henry *et al.*, 2003).

Durante a invasão dulcícola, *M. olfersi* emprega uma estratégia constante de regulação onde os níveis osmóticos e iônicos são mantidos constantes, mas ainda elevados, apresentando um considerável custo energético. Visto que o consumo de O_2 em água doce é bastante alto (McNamara *et al.*, 1986), o gasto energético é sempre elevado. Entretanto este gasto aparenta ser compensado pela manutenção da osmolalidade da hemolinfa permitindo assim a exploração de um novo ambiente (McNamara *et al.*, 1986). A ocupação de ambientes distintos ao longo do ciclo de vida de *Macrobrachium acanthurus* (Anger, 2013) é um forte indicador do mesmo tipo de estratégia, permitindo a exploração e ocupação de ambientes osmoticamente variados.

5.1. Conclusão

O presente trabalho traz novas elucidaciones a respeito do metabolismo osmorregulatório de *Macrobrachium acanthurus* em resposta a salinidade. O aumento salino possivelmente provocou aumento nas trocas iônicas pelas brânquias. Entretanto, é possível que em 48 h, o camarão não tenha conseguido manter suas condições estáveis e então tendo um aumento na produção de lactato. O aumento na atividade da AC pode estar relacionado a sua funcionalidade na osmorregulação e no transporte iônico para a manutenção do equilíbrio ácido base. O que também pode ser corroborado pelo aumento da concentração da osmolalidade e do íon Cl^- .

REFERÊNCIAS

- Anger, K. 2013. Neotropical *Macrobrachium* (Caridea: Palaemonidae): on the biology, origin, and radiation of freshwater-invading shrimp. *Journal of Crustacean Biology* **33(2)**: 151-183.
- Booth, C. E., McMahon, B. R., e Pinder, A. W. 1982. Oxygen uptake and the potentiating effects of increased hemolymph lactate on oxygen transport during exercise in the blue crab, *Callinectes sapidus*. *Journal of comparative physiology* **148(1)**: 111-121.
- Burnett, L. E., Woodson, P. B., Rietow, M. G., e Vilicich, V. C. 1981. Crab gill intra-epithelial carbonic anhydrase plays a major role in haemolymph CO₂ and chloride ion regulation. *Journal of Experimental Biology* **92(1)**: 243-254.
- Evans, D. H. (Ed.). 2008. **Osmotic and ionic regulation: cells and animals**. CRC Press.
- Faleiros, R. O. 2011. *Osmorregulação em camarões Palaemonidae (Decapoda, Caridea): uma abordagem molecular e bioquímica* (Doctoral dissertation, Universidade de São Paulo).
- Foster, C., Amado, E. M., Souza, M. M., e Freire, C. A. 2010. Do osmoregulators have lower capacity of muscle water regulation than osmoconformers? A study on decapod crustaceans. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology* **313(2)**: 80-94.
- Freire, C. A., Onken, H., e McNamara, J. C. 2008. A structure–function analysis of ion transport in crustacean gills and excretory organs. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular e Integrative Physiology* **151(3)**: 272-304.
- Freire, C. A., Souza-Bastos, L. R., Amado, E. M., Prodocimo, V., e Souza, M. M. 2013. Regulation of muscle hydration upon hypo-or hyper-osmotic shocks: differences related to invasion of the freshwater habitat by decapod crustaceans. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology* **319(6)**: 297-309.
- Gutierrez S. M. M. 2011. Ferramentas fisiológicas para avaliação do potencial invasor de peixes dulcícolas. Universidade Federal do Paraná.
- Henry, R. P. 2001. Environmentally mediated carbonic anhydrase induction in the gills of euryhaline crustaceans. *Journal of Experimental Biology* **204(5)**: 991-1002.
- Henry, R. P., e Cameron, J. N. 1983. The Role of Carbonic Anhydrase in Respiration, Ion Regulation and Acid-Base Balance in the Aquatic Crab *Callinectes Sapidus* and the Terrestrial Crab *Gecarcinus Lateraus*. *Journal of Experimental Biology* **103(1)**: 205-223.

- Henry, R. P., Booth, C. E., Lallier, F. H., e Walsh, P. J. 1994. Post-exercise lactate production and metabolism in three species of aquatic and terrestrial decapod crustaceans. *Journal of Experimental Biology* **186(1)**: 215-234.
- Henry, R. P., Garrelts, E. E., McCarty, M. M., e Towle, D. W. 2002. Differential induction of branchial carbonic anhydrase and Na⁺/K⁺ ATPase activity in the euryhaline crab, *Carcinus maenas*, in response to low salinity exposure. *Journal of Experimental Zoology* **292(7)**: 595-603.
- Henry, R. P., Lucu, C., Onken, H., e Weihrauch, D. 2012. Multiple functions of the crustacean gill: osmotic/ionic regulation, acid-base balance, ammonia excretion, and bioaccumulation of toxic metals. *Frontiers in physiology* **(3)**: 431.
- Lucena, M. N., Pinto, M. R., Garçon, D. P., McNamara, J. C., e Leone, F. A. 2015. A kinetic characterization of the gill V (H⁺)-ATPase in juvenile and adult *Macrobrachium amazonicum*, a diadromous palaemonid shrimp. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* **181**: 15-25.
- Lucu, Č., e Towle, D. W. 2010. Characterization of ion transport in the isolated epipodite of the lobster *Homarus americanus*. *Journal of Experimental Biology* **213(3)**: 418-425.
- Maraschi, A. C., Freire, C. A., e Prodocimo, V. 2015. Immunocytochemical localization of V-H⁺-ATPase, Na⁺/K⁺-ATPase, and carbonic anhydrase in gill lamellae of adult freshwater euryhaline shrimp *Macrobrachium acanthurus* (Decapoda, Palaemonidae). *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology* **323(7)**: 414-421.
- McNamara, J. C., e Faria, S. C. 2012. Evolution of osmoregulatory patterns and gill ion transport mechanisms in the decapod Crustacea: a review. *Journal of Comparative Physiology B* **182(8)**: 997-1014.
- Mcnamara, J. C., Moreira, G. S., e Souza, S. C. 1986. The effect of salinity on respiratory metabolism in selected ontogenetic stages of the freshwater shrimp *Macrobrachium olfersii* (Decapoda, Palaemonidae). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology* **83(2)**: 359-363.
- Mendonça, N. N., Masui, D. C., McNamara, J. C., Leone, F. A., e Furriel, R. P. M. 2007. Long-term exposure of the freshwater shrimp *Macrobrachium olfersii* to elevated salinity: effects on gill (Na⁺, K⁺)-ATPase α -subunit expression and K⁺-phosphatase activity. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular e Integrative Physiology* **146(4)**: 534-543.
- Moreira, G. S., McNamara, J. C., Shumway, S. E., e Moreira, P. S. 1983. Osmoregulation and respiratory metabolism in brazilian *Macrobrachium* (Decapoda, Palaemonidae). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology* **74(1)**: 57-62.

- Morris, S. 2001. Neuroendocrine regulation of osmoregulation and the evolution of air-breathing in decapod crustaceans. *Journal of Experimental Biology* **204(5)**: 979-989.
- Ordiano A, Alvarez F, Alcaraz G 2005 Osmoregulation and oxygen consumption of the hololimnetic prawn, *Macrobrachium tuxtlaense* at varying salinities (Decapoda, Palaemonidae). *Crustaceana* **78(8)**: 1013-1022.
- Palacios, E., Bonilla, A., Pérez, A., Racotta, I. S., e Civera, R. 2004. Influence of highly unsaturated fatty acids on the responses of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) postlarvae to low salinity. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **299(2)**: 201-215.
- Pequeux, A. 1995. Osmotic regulation in crustaceans. *Journal of Crustacean Biology* **15(1)**: 1-60.
- Pequeux, A., e Gilles, R. 1981. Na⁺ fluxes across isolated perfused gills of the Chinese crab *Eriocheir sinensis*. *Journal of Experimental Biology* **92(1)**: 173-186.
- Souza-Bastos, L. R., & Freire, C. A. 2009. The handling of salt by the neotropical cultured freshwater catfish *Rhamdia quelen*. *Aquaculture* **289(1)**: 167-174.
- Supuran, C T., A Scozzafava, and Conway, J eds. 2004. **Carbonic anhydrase: its inhibitors and activators**. Vol. 1. CRC Press.
- Tsai, J. R., e Lin, H. C. 2007. V-type H⁺-ATPase and Na⁺, K⁺-ATPase in the gills of 13 euryhaline crabs during salinity acclimation. *Journal of Experimental Biology* **210(4)**: 620-627.
- Vitale, A. M., Monserrat, J. M., Castilho, P., e Rodriguez, E. M. 1999. Inhibitory effects of cadmium on carbonic anhydrase activity and ionic regulation of the estuarine crab *Chasmagnathus granulata* (Decapoda, Grapsidae). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology* **122(1)**: 121-129.
- Weihrauch, D., McNamara, J. C., Towle, D. W., e Onken, H. 2004. Ion-motive ATPases and active, transbranchial NaCl uptake in the red freshwater crab, *Dilocarcinus pagei* (Decapoda, Trichodactylidae). *Journal of experimental biology* **207(26)**: 4623-4631.
- Weihrauch, D., Ziegler, A., Siebers, D., e Towle, DW 2001. Molecular characterization of V-type H⁺ (+)-ATPase (B-subunit) in gills of euryhaline crabs and its physiological role in osmoregulatory ion uptake. *Journal of Experimental Biology* **204(1)**: 25-37.
- Willmer, P., Stone, G., e Johnston, I. 2005. **Environmental physiology of animals**. John Wiley e Sons.

6. CONCLUSÃO GERAL

Quando submetido às condições de salinidade 20 psu, *M. acanthurus* apresentou comportamento hiporregulador. Enquanto que em exposição à aumento de salinidade (25 e 35 psu), a espécie apresentou comportamento hipoconformador. Analisando os dados coletados nos dois capítulos, podemos inferir e corroborar que a intensidade e o agente estressor interferem nas respostas metabólicas e osmorregulatórias desta espécie. Diante dos resultados obtidos, fica claro que todos os mecanismos de respostas se correlacionam (e.g. influência do tempo de exposição e intensidade da salinidade nas respostas da expressão de HSP70, embora não tenham tido um padrão, e atividade da AC). Entretanto, as repostas observadas foram frente ao estresse abrupto, sendo que em aumento salino gradual, esta resposta possivelmente será diferente. Desta forma, estudos da atividade das proteínas transportadoras de membrana e avaliação da expressão de HSP70 em outros tecidos, como as brânquias, são de extrema importância. Tais resultados, irão complementar a caracterização dos mecanismos osmorregulatórios de *M. acanthurus* em resposta a diferentes níveis de estresses salinos evidenciados no presente estudo de forma a elucidar processos ecofisiológicos e evolutivos que permitem a irradiação do gênero como um todo.

REFERÊNCIAS GERAIS

- Anger, K. 2013. Neotropical *Macrobrachium* (Caridea: Palaemonidae): on the biology, origin, and radiation of freshwater-invading shrimp. *Journal of Crustacean Biology* **33(2)**: 151-183.
- Augusto, A., Pinheiro, A. S., Greene, L. J., Laure, H. J., e McNamara, J. C. 2009. Evolutionary transition to freshwater by ancestral marine palaemonids: evidence from osmoregulation in a tide pool shrimp. *Aquatic Biology* **7(1-2)**: 113-122.
- Bond-Buckup, Georgina, e Buckup, Ludwing G. 1989. Os Palaemonidae de águas continentais do Brasil meridional (Crustacea, Decapoda). *Revista Brasileira de Biologia* **49(4)**: 883-896.
- Booth, C. E., McMahon, B. R., e Pinder, A. W. 1982. Oxygen uptake and the potentiating effects of increased hemolymph lactate on oxygen transport during exercise in the blue crab, *Callinectes sapidus*. *Journal of comparative physiology* **148(1)**: 111-121.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* **72(1-2)**: 248-254.
- Burnett, L. E., Woodson, P. B., Rietow, M. G., e Vilicich, V. C. 1981. Crab gill intra-epithelial carbonic anhydrase plays a major role in haemolymph CO₂ and chloride ion regulation. *Journal of Experimental Biology* **92(1)**: 243-254.
- Carvalho, H A., Gomes, M D G S., Gondim, A Q, e Pereira, M C G. 1979. Sobre a Biologia do Pitú *Macrobrachium acanthurus* (Wiegmann, 1836) em populações naturais da Ilha de Itaparica. *Universitas* (24), 25.
- Cesar, J. R. O., e Yang, J. 2007. Expression patterns of ubiquitin, heat shock protein 70, α -actin and β -actin over the molt cycle in the abdominal muscle of marine shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Molecular reproduction and development* **74(5)**: 554-559.
- Charmantier, G U Y. 1998. Ontogeny of osmoregulation in crustaceans: a review. *Invertebrate reproduction e development* **33(2-3)**: 177-190.
- Charmantier, G., e Anger, K. 2010. Ontogeny of osmoregulatory patterns in the South American shrimp *Macrobrachium amazonicum*: loss of hypo-regulation in a land-locked population indicates phylogenetic separation from estuarine ancestors. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **396(2)**: 89-98.
- Cieluch, U., Anger, K., Aujoulat, F., Buchholz, F., Charmantier-Daures, M., e Charmantie, G. 2004. Ontogeny of osmoregulatory structures and functions

- in the green crab *Carcinus maenas* (Crustacea, Decapoda). *Journal of experimental biology* **207(2)**: 325-336.
- Coelho, P. A. 1963. Observações Preliminares Sobre a Biologia e a Pesca dos Camarões do Gênero *Macrobrachium* Bate, 1868 (Decapoda Palaemonidae) no Estado de Pernambuco. *Tropical oceanography* **3(1)**.
- De Maio, A. 1999. Heat shock proteins: facts, thoughts, and dreams. *Shock* **11(1)**: 1-12.
- Denny, M. W., e Gaines, S. D. 2007. *Encyclopedia of tidepools and rocky shores* (No. 1). University of California Press.
- Dong, Y., e Dong, S. 2008. Induced thermotolerance and expression of heat shock protein 70 in sea cucumber *Apostichopus japonicus*. *Fisheries Science* **74(3)**, 573-578.
- Dyer, S. D., Dickson, K. L., Zimmerman, E. G., e Sanders, B. M. 1991. Tissue-specific patterns of synthesis of heat-shock proteins and thermal tolerance of the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Canadian Journal of Zoology* **69(8)**: 2021-2027.
- Evans, D. H. (Ed.). 2008. **Osmotic and ionic regulation: cells and animals**. CRC Press.
- Faleiros, R. O. 2011. *Osmorregulação em camarões Palaemonidae (Decapoda, Caridea): uma abordagem molecular e bioquímica* (Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo).
- Faleiros, R. O., Goldman, M. H. S., Furriel, R. P., e McNamara, J. C. 2010. Differential adjustment in gill Na⁺/K⁺-and V-ATPase activities and transporter mRNA expression during osmoregulatory acclimation in the cinnamon shrimp *Macrobrachium amazonicum* (Decapoda, Palaemonidae). *Journal of Experimental Biology* **213(22)**: 3894-3905.
- Feder, M. E., e Hofmann, G. E. 1999. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. *Annual review of physiology* **61(1)**: 243-282.
- Fernandes, F. A. 2010. Estresse osmótico: proteínas de estresse e balanço oxidativo em *Neohelice granulata* (Crustacea, Decapoda, Veronidae). (Dissertação de Doutorado, Universidade de São Paulo).
- Foster, C., Amado, E. M., Souza, M. M., e Freire, C. A. 2010. Do osmoregulators have lower capacity of muscle water regulation than osmoconformers? A study on decapod crustaceans. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology* **313(2)**: 80-94.
- Freire, C. A., Amado, E. M., Souza, L. R., Veiga, M. P., Vitule, J. R., Souza, M. M., e Prodócimo, V. 2008. Muscle water control in crustaceans and fishes as

a function of habitat, osmoregulatory capacity, and degree of euryhalinity. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular e Integrative Physiology* **149(4)**: 435-446.

Freire, C. A., Cavassin, F., Rodrigues, E. N., Torres, A. H., e McNamara, J. C. 2003. Adaptive patterns of osmotic and ionic regulation, and the invasion of fresh water by the palaemonid shrimps. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular e Integrative Physiology* **136(3)**: 771-778.

Freire, C. A., e Prodocimo, V. 2007. Special challenges to teleost fish osmoregulation in environmentally extreme or unstable habitats. *Fish osmoregulation* **1**: 249-276.

Freire, C. A., Onken, H., e McNamara, J. C. 2008a. A structure–function analysis of ion transport in crustacean gills and excretory organs. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular e Integrative Physiology* **151(3)**: 272-304.

Freire, C. A., Souza-Bastos, L. R., Amado, E. M., Prodocimo, V., e Souza, M. M. 2013. Regulation of muscle hydration upon hypo-or hyper-osmotic shocks: differences related to invasion of the freshwater habitat by decapod crustaceans. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology* **319(6)**: 297-309.

Grosell, M. 2006. Intestinal anion exchange in marine fish osmoregulation. *Journal of Experimental Biology* **209(15)**: 2813-2827.

Gutierre S. M. M. 2011. Ferramentas fisiológicas para avaliação do potencial invasor de peixes dulcícolas. Universidade Federal do Paraná.

Gutierre, S. M. M., Vitule, J. R. S., Freire, C. A., e Prodocimo, V. 2014. Physiological tools to predict invasiveness and spread via estuarine bridges: tolerance of Brazilian native and worldwide introduced freshwater fishes to increased salinity. *Marine and Freshwater Research* **65(5)**: 425-436.

Häussinger, D., Kubitz, R., Reinehr, R., Bode, J. G., e Schliess, F. 2004. Molecular aspects of medicine: from experimental to clinical hepatology. *Molecular aspects of medicine* **25(3)**: 221-360.

Hendrickx, M. E. 1995. Checklist of brachyuran crabs (Crustacea: Decapoda) from the eastern tropical Pacific. *Bulletin de l'Institut royal des Sciences naturelles de Belgique, Biologie* **65**: 125-150.

Henry, R. P. 1996. Multiple roles of carbonic anhydrase in cellular transport and metabolism. *Annual Review of Physiology* **58(1)**: 523-538.

Henry, R. P. 2001. Environmentally mediated carbonic anhydrase induction in the gills of euryhaline crustaceans. *Journal of Experimental Biology* **204(5)**: 991-1002.

- Henry, R. P., Booth, C. E., Lallier, F. H., e Walsh, P. J. 1994. Post-exercise lactate production and metabolism in three species of aquatic and terrestrial decapod crustaceans. *Journal of Experimental Biology* **186(1)**: 215-234.
- Henry, R. P., e Cameron, J. N. 1983. The Role of Carbonic Anhydrase in Respiration, Ion Regulation and Acid-Base Balance in the Aquatic Crab *Calunectes Sapidus* and the Terrestrial Crab *Gecarcinus Lateraus*. *Journal of Experimental Biology* **103(1)**: 205-223.
- Henry, R. P., Garrelts, E. E., McCarty, M. M., e Towle, D. W. 2002. Differential induction of branchial carbonic anhydrase and Na⁺/K⁺ ATPase activity in the euryhaline crab, *Carcinus maenas*, in response to low salinity exposure. *Journal of Experimental Zoology* **292(7)**: 595-603.
- Henry, R. P., Lucu, C., Onken, H., e Weihrauch, D. 2012. Multiple functions of the crustacean gill: osmotic/ionic regulation, acid-base balance, ammonia excretion, and bioaccumulation of toxic metals. *Frontiers in physiology* **(3)**: 431.
- Hickman Jr, C. P., Roberts, L. S., e Larson, A. L. 2004. **Princípios integrados de Zoologia**. Guanabara Koogan.
- Hill RW, Wyse GA, Anderson M. 2009. **Animal Physiology** (Vol. 3) Massachusetts Sinauer Associates.
- Huey, R. B., Kearney, M. R., Krockenberger, A., Holtum, J. A., Jess, M., e Williams, S. E. 2012. Predicting organismal vulnerability to climate warming: roles of behavior, physiology and adaptation. *Phil. Trans. R. Soc. B* **367(1596)**: 1665-1679.
- Jorgensen, P. L., Håkansson, K. O., e Karlsh, S. J. 2003. Structure and mechanism of Na, K-ATPase: functional sites and their interactions. *Annual review of physiology* **65(1)**: 817-849.
- Larsen, P. F., Nielsen, E. E., Koed, A., Thomsen, D. S., Olsvik, P. A., e Loeschcke, V. 2008. Interpopulation differences in expression of candidate genes for salinity tolerance in winter migrating anadromous brown trout (*Salmo trutta L.*). *BMC genetics* **9(1)**: 1.
- Lindquist, S., e Craig, E. A. 1988. The heat-shock proteins. *Annual review of genetics* **22(1)**: 631-677.
- Lionetto, M. G., Giordona, M. E., Nicolardi, G., e Schettino, T. 2001. Hypertonicity Stimulates Cl-Transport in the Intestine of Fresh Water Acclimated EEL, *Anguilla Anguilla*. *Cellular Physiology and Biochemistry* **11(1)**: 41-54.
- Liu, Y., e Steinacker, J. M. 2001. Changes in skeletal muscle heat shock proteins: pathological significance. *Front Biosci*, **6(D12-25)**, D12-D25.

- Lucena, M. N., Pinto, M. R., Garçon, D. P., McNamara, J. C., e Leone, F. A. 2015. A kinetic characterization of the gill V (H⁺)-ATPase in juvenile and adult *Macrobrachium amazonicum*, a diadromous palaemonid shrimp. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* **181**: 15-25.
- Lucu, Č., e Towle, D. W. 2003. Na⁺/K⁺-ATPase in gills of aquatic crustacea. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular e Integrative Physiology*, 135(2), 195-214.
- Lucu, Č., e Towle, D. W. 2010. Characterization of ion transport in the isolated epipodite of the lobster *Homarus americanus*. *Journal of Experimental Biology* **213(3)**: 418-425.
- Madeira, D., Narciso, L., Cabral, H. N., Vinagre, C., e Diniz, M. S. 2012. HSP70 production patterns in coastal and estuarine organisms facing increasing temperatures. *Journal of Sea Research* **73**: 137-147.
- Magalhães, C. 2003. **Manual de identificação dos Crustacea Decapoda de água doce do Brasil**. G. A. S. de Melo (Ed.). Edições Loyola.
- Maraschi, A. C., Freire, C. A., e Prodocimo, V. 2015. Immunocytochemical localization of V-H⁺-ATPase, Na⁺/K⁺-ATPase, and carbonic anhydrase in gill lamellae of adult freshwater euryhaline shrimp *Macrobrachium acanthurus* (Decapoda, Palaemonidae). *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology* **323(7)**: 414-421.
- Marshall, W.S. and M. Grosell. 2005. Ion transport, osmoregulation and acid-base balance. In: *Physiology of Fishes*, D.H. Evans and J.B. Claiborne (eds.). 3rd Edition. CRC Press, Boca Raton, pp. 177–230
- McNamara, J. C., e Faria, S. C. 2012. Evolution of osmoregulatory patterns and gill ion transport mechanisms in the decapod Crustacea: a review. *Journal of Comparative Physiology B* **182(8)**: 997-1014.
- McNamara, J. C., Freire, C. A., Torres, A. H., e Faria, S. C. 2015. The conquest of fresh water by the palaemonid shrimps: an evolutionary history scripted in the osmoregulatory epithelia of the gills and antennal glands. *Biological Journal of the Linnean Society* **114(3)**: 673-688.
- Mcnamara, J. C., Moreira, G. S., e Souza, S. C. 1986. The effect of salinity on respiratory metabolism in selected ontogenetic stages of the freshwater shrimp *Macrobrachium olfersii* (Decapoda, Palaemonidae). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology* **83(2)**: 359-363.
- Mendonça, N. N., Masui, D. C., McNamara, J. C., Leone, F. A., e Furriel, R. P. M. 2007. Long-term exposure of the freshwater shrimp *Macrobrachium olfersii* to elevated salinity: effects on gill (Na⁺, K⁺)-ATPase α -subunit expression and K⁺-phosphatase activity. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular e Integrative Physiology* **146(4)**: 534-543.

- Moreira, G. S., McNamara, J. C., Shumway, S. E., e Moreira, P. S. 1983. Osmoregulation and respiratory metabolism in brazilian *Macrobrachium* (Decapoda, Palaemonidae). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology* **74(1)**: 57-62.
- Morris, J. P. 2015. *The physiological viability of bathymetric range shifts in marine ectotherms* (Doctoral thesis, University of Southampton).
- Morris, J. P., Thatje, S., e Hauton, C. 2013. The use of stress-70 proteins in physiology: a re-appraisal. *Molecular ecology* **22(6)**: 1494-1502.
- Morris, S. 2001. Neuroendocrine regulation of osmoregulation and the evolution of air-breathing in decapod crustaceans. *Journal of Experimental Biology* **204(5)**: 979-989.
- Moyes, C. D., e Schulte, P. M. 2009. **Principios de Fisiologia Animal**. Artmed Editora.
- Ordiano A, Alvarez F, Alcaraz G 2005 Osmoregulation and oxygen consumption of the hololimnetic prawn, *Macrobrachium tuxtilaense* at varying salinities (Decapoda, Palaemonidae). *Crustaceana* **78(8)**: 1013-1022.
- Palacios, E., Bonilla, A., Pérez, A., Racotta, I. S., e Civera, R. 2004. Influence of highly unsaturated fatty acids on the responses of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) postlarvae to low salinity. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **299(2)**: 201-215.
- Pequeux, A. (1995). Osmotic regulation in crustaceans. *Journal of Crustacean Biology*, 15(1), 1-60.
- Pequeux, A., e Gilles, R. 1981. Na⁺ fluxes across isolated perfused gills of the Chinese crab *Eriocheir sinensis*. *Journal of Experimental Biology* **92(1)**: 173-186.
- Perez-Pinzon, M. A., e Lutz, P. L. 1991. Activity related cost of osmoregulation in the juvenile snook (Centropomus undecimalis). *Bulletin of Marine Science* **48(1)**: 58-66.
- Pinheiro, M. A. A., e Hebling, N. J. 1998. Biologia de *Macrobrachium rosenbergii* (De Man, 1879). *Carcinicultura de água doce. Tecnologia para produção de camarões* 21-46.
- Robert, J. 2003. Evolution of heat shock protein and immunity. *Developmental e Comparative Immunology* **27(6)**: 449-464.
- Roberts, R. J., Agius, C., Saliba, C., Bossier, P., e Sung, Y. Y. 2010. Heat shock proteins (chaperones) in fish and shellfish and their potential role in relation to fish health: a review. *Journal of fish diseases* **33(10)**: 789-801.

- Ruppert, E. E., e Barnés, R. D. 1996. **Zoologia dos Invertebrados**. 6a. Edição. Roca, São Paulo, 1029p.
- Sammy De Grave, N., Pentcheff, D., e Ahyong, S. T. 2009. A classification of living and fossil genera of decapod crustaceans. *Raffles Bulletin of Zoology* 1-109.
- Sanders, B. M., Martin, L. S., Howe, S. R., Nelson, W. G., Hegre, E. S., e Phelps, D. K. 1994. Tissue-specific differences in accumulation of stress proteins in *Mytilus edulis* exposed to a range of copper concentrations. *Toxicology and applied pharmacology* **125(2)**: 206-213.
- Schmidt-Nielsen, K. 1997. **Animal physiology: adaptation and environment**. Cambridge University Press.
- Schubart, C. D., Reimer, J., e Diesel, R. 1998. Morphological and molecular evidence for a new endemic freshwater crab, *Sesarma ayatum* sp. n. (Grapsidae, Sesarminae) from eastern Jamaica. *Zoologica Scripta* **27(4)**: 373-380.
- Selvakumar, S., e Geraldine, P. 2005. Heat shock protein induction in the freshwater prawn *Macrobrachium malcolmsonii*: acclimation-influenced variations in the induction temperatures for Hsp70. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular e Integrative Physiology* **140(2)**: 209-215.
- Selvakumar, S., Geraldine, P., Shanju, S., e Jayakumar, T. 2005a. Stressor-specific induction of heat shock protein 70 in the freshwater prawn *Macrobrachium malcolmsonii* (H. Milne Edwards) exposed to the pesticides endosulfan and carbaryl. *Pesticide biochemistry and physiology* **82(2)**: 125-132.
- Smith, T. R., Tremblay, G. C., e Bradley, T. M. 1999. Hsp70 and a 54 kDa protein (Osp54) are induced in salmon (*Salmo salar*) in response to hyperosmotic stress. *Journal of Experimental Zoology* **284(3)**: 286-298.
- Sørensen, J. G., Kristensen, T. N., e Loeschcke, V. 2003. The evolutionary and ecological role of heat shock proteins. *Ecology Letters* **6(11)**: 1025-1037.
- Souza-Bastos, L. R., & Freire, C. A. 2009. The handling of salt by the neotropical cultured freshwater catfish *Rhamdia quelen*. *Aquaculture* **289(1)**: 167-174.
- Sun, M., Jiang, K., Zhang, F., Zhang, D., Shen, A., Jiang, M., ... e Ma, L. 2012. Effects of various salinities on Na⁺-K⁺-ATPase, Hsp70 and Hsp90 expression profiles in juvenile mitten crabs, *Eriocheir sinensis*. *Genetics and Molecular Research* **11(2)**: 978-986.
- Supuran, C T., A Scozzafava, and Conway, J eds. 2004. **Carbonic anhydrase: its inhibitors and activators**. Vol. 1. CRC Press.

- Tamburus, A. F., Mossolin, E. C., e Mantelatto, F. L. 2012. Populational and reproductive aspects of *Macrobrachium acanthurus* (Wiegmann, 1836) (Crustacea: Palaemonidae) from north coast of São Paulo State, Brazil. *Brazilian Journal of Aquatic Science and Technology* **16(1)**: 9-18.
- Tine, M., Bonhomme, F., McKenzie, D. J., e Durand, J. D. 2010. Differential expression of the heat shock protein Hsp70 in natural populations of the tilapia, *Sarotherodon melanotheron*, acclimatised to a range of environmental salinities. *BMC ecology* **10(1)**: 1.
- Tomanek, L. 2008. The importance of physiological limits in determining biogeographical range shifts due to global climate change: the heat-shock response. *Physiological and Biochemical Zoology* **81(6)**: 709-717.
- Tsai, J. R., e Lin, H. C. 2007. V-type H⁺-ATPase and Na⁺, K⁺-ATPase in the gills of 13 euryhaline crabs during salinity acclimation. *Journal of Experimental Biology* **210(4)**: 620-627.
- Valenti, W. C., Mello, J. D. T., e Lobão, V. L. 1989. Fecundidade em *Macrobrachium acanthurus* (Wiegmann, 1836) do Rio Ribeira de Iguape (Crustacea, Decapoda, Palaemonidae). *Revista brasileira de Zoologia* **6(1)**: 9-15.
- Vitale, A. M., Monserrat, J. M., Castilho, P., e Rodriguez, E. M. 1999. Inhibitory effects of cadmium on carbonic anhydrase activity and ionic regulation of the estuarine crab *Chasmagnathus granulata* (Decapoda, Grapsidae). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology* **122(1)**: 121-129.
- Weihrauch, D., McNamara, J. C., Towle, D. W., e Onken, H. 2004. Ion-motive ATPases and active, transbranchial NaCl uptake in the red freshwater crab, *Dilocarcinus pagei* (Decapoda, Trichodactylidae). *Journal of experimental biology* **207(26)**: 4623-4631.
- Weihrauch, D., Ziegler, A., Siebers, D., e Towle, DW 2001. Molecular characterization of V-type H⁺-ATPase (B-subunit) in gills of euryhaline crabs and its physiological role in osmoregulatory ion uptake. *Journal of Experimental Biology* **204(1)**: 25-37.
- Werner, I., Smith, T. B., Feliciano, J., e Johnson, M. L. 2005. Heat shock proteins in juvenile steelhead reflect thermal conditions in the Navarro River watershed, California. *Transactions of the American Fisheries Society* **134(2)**: 399-410.
- Wilder, M. N., Atmomarsono, M., Hien, T. T. T., Phu, T. Q., e Yang, W. J. 2000. Characterization of Na/K-ATPase in *Macrobrachium rosenbergii* and the effects of changing salinity on enzymatic activity. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular e Integrative Physiology* **125(3)**: 377-388.

- Willmer, P., Stone, G., e Johnston, I. 2005. **Environmental Physiology of Animals**. John Wiley e Sons.
- Yamuna, A., Kabila, V., e Geraldine, P. 2000. Expression of heat shock protein 70 in freshwater prawn *Macrobrachium malcolmsonii* (H. Milne Edwards) following exposure to Hg and Cu. *Indian journal of experimental biology* **38(9)**: 921-925.
- Yancey, P. H., Clark, M. E., Hand, S. C., Bowlus, R. D., e Somero, G. N. 1982. Living with water stress: evolution of osmolyte systems. *Science* **217(4566)**: 1214-1222.
- Yenari, M. A., Giffard, R. G., Sapolsky, R. M., e Steinberg, G. K. 1999. The neuroprotective potential of heat shock protein 70 (HSP70). *Molecular medicine today* **5(12)**: 525-531.