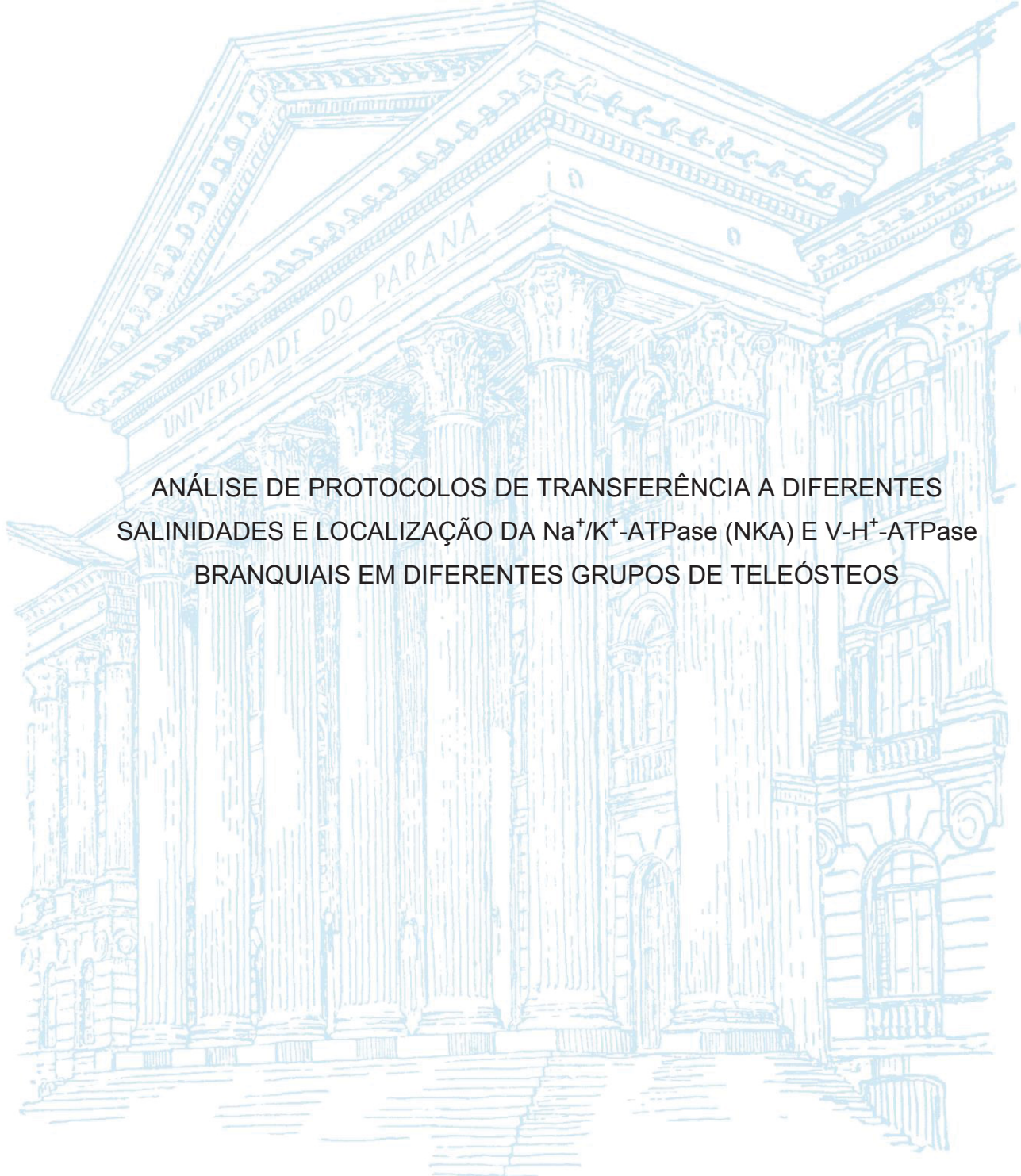


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
FÁTIMA JULIANE MACHADO CERON



ANÁLISE DE PROTOCOLOS DE TRANSFERÊNCIA A DIFERENTES
SALINIDADES E LOCALIZAÇÃO DA Na^+/K^+ -ATPase (NKA) E V-H^+ -ATPase
BRANQUIAIS EM DIFERENTES GRUPOS DE TELEÓSTEOS

CURITIBA

2017

FÁTIMA JULIANE MACHADO CERON

ANÁLISE DE PROTOCOLOS DE TRANSFERÊNCIA A DIFERENTES
SALINIDADES E LOCALIZAÇÃO DA Na^+/K^+ -ATPase (NKA) E V-H^+ -ATPase
BRANQUIAIS EM DIFERENTES GRUPOS DE TELEÓSTEOS

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Fisiologia, área de concentração em Fisiologia Comparada, Departamento de Ciências Fisiológicas, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor (a) em Fisiologia.

Orientador (a): Carolina Arruda de Oliveira Freire

CURITIBA

2017

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.
Biblioteca de Ciências Biológicas.
(Marcia Andreiko –CRB/9-1582)

Ceron, Fátima Juliane Machado

Análise de protocolos de transferência a diferentes salinidades e localização da Na^+/K^+ -ATPase (NKA) E V-H^+ -ATPase branquiais em diferentes grupos de teleósteos. / Fátima Juliane Machado Ceron. – Curitiba, 2017.

133 p.: il. ; 30cm.

Orientadora: Carolina Arruda de Oliveira Freire
Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia.

1. Regulação osmótica. 2. Salinidade. 3. Teleósteos. I. Título. II. Freire, Carolina Arruda de oliveira. III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia.

CDD (20. ed.) 597.5




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

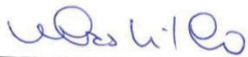


Ata da Defesa de Tese de Doutorado de Fátima Juliane Machado Ceron

Aos dezoito dias do mês de outubro do ano de dois mil e dezessete, foi realizada no auditório do Departamento de Fisiologia no Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, a defesa de tese da doutoranda FÁTIMA JULIANE MACHADO CERON, intitulada "ANÁLISE DE PROTOCOLOS DE TRANSFERÊNCIA A DIFERENTES SALINIDADES E LOCALIZAÇÃO DA Na^+/K^+ -ATPase (NKA) E V-H^+ -ATPase BRANQUIAIS EM DIFERENTES GRUPOS DE TELEÓSTEOS". A abertura teve início às 14h00min pela Presidente da Banca Examinadora e Orientadora da candidata, Professora Doutora Carolina Arruda de Oliveira Freire. A Presidente apresentou ao público presente os membros da banca examinadora e logo passou à palavra a aluna, para que fizesse uma apresentação sucinta de sua tese. Após a explanação oral, a Professora Doutora Carolina Arruda de Oliveira Freire passou à palavra ao primeiro examinador, Doutor Flávio Henrique Tincani Osório, consultor do Departamento Estadual de Políticas Públicas sobre Drogas (DEPSD-SESP PR). Na sequência, passou à palavra a segunda examinadora, Professora Doutora Marisa Fernandes do Departamento de Fisiologia da UFPR. Em seguida passou a palavra ao terceiro examinador Professor Doutor Daniel Bussolaro do IFPR e por último passou a palavra à quarta examinadora Doutora Izonete Cristina Guiloski, Pós-Doutoranda do departamento Farmacologia da UFPR. A aluna respondeu as perguntas dos examinadores e se posicionou frente às críticas. Findas as arguições pelos demais membros da banca, a Presidente, Professora Doutora Carolina Arruda de Oliveira Freire fez uma rápida apreciação das conclusões mais importantes dos debates realizados e comunicou que a Banca Examinadora iria reunir-se em sessão secreta para discussão e atribuição dos conceitos. Os trabalhos foram interrompidos por cinco minutos. Após haver analisado o referido trabalho e argüido a candidata, os membros da banca examinadora reunidos em sessão secreta deliberaram pela "APPROVAÇÃO", habilitando-a ao título de Doutor em Fisiologia, condicionada à implementação das correções sugeridas pelos membros da banca examinadora e ao cumprimento integral das exigências estabelecidas no Art. 59º do Regimento interno deste Programa de Pós-Graduação. Eu, Professora Doutora Carolina Arruda de Oliveira Freire, Presidente da Banca Examinadora lavrei a presente ata, da qual assino juntamente com os senhores examinadores.

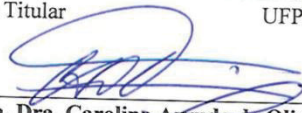
Curitiba, 18 de outubro de dois mil e dezessete.


Dr. Flávio Henrique Tincani Osório
DEPSD-SESP PR - Membro Titular


Profa. Dra. Marisa Fernandes de Castilho
UFPR - Membro Titular


Prof. Dr. Daniel Bussolaro
IFPR - Membro Titular


Dra. Izonete Cristina Guiloski
UFPR - Membro Titular


Profa. Dra. Carolina Arruda de Oliveira Freire
UFPR - Orientadora e Presidente da Banca Examinadora



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



PARECER

Os abaixo-assinados, membros da Banca Examinadora da Defesa de Tese de Doutorado, a qual se submeteu **FATIMA JULIANE MACHADO CERON** para fins de obter o título de Doutor em Fisiologia pela Universidade Federal do Paraná, são de parecer à APROVAÇÃO (aprovação/reprovação) da acadêmica.

A obtenção do título está condicionada à implementação das correções sugeridas pelos membros da banca examinadora e ao cumprimento integral das exigências estabelecidas no Regimento interno deste Programa de Pós-Graduação, bem como do item III do artigo 80 da resolução 65/08 do CEPE-UFPR.

Curitiba, 18 de outubro de 2017.

Parecer (Aprovada/Reprovada)	Nome	Assinatura
Aprovada	Dr. Flávio Henrique Tincani Osório DEPSD-SESP PR - Membro Titular	
Aprovada	Profa. Dra. Marisa Fernandes de Castilho UFPR - Membro Titular	
Aprovada	Prof. Dr. Daniel Bussolaro IFPR - Membro Titular	
Aprovada	Dra. Izonete Cristina Guiloski UFPR - Membro Titular	
APROVADA	Profa. Dra. Carolina Arruda de Oliveira Freire UFPR - Membro Titular	

Tudo tem seu apogeu e seu declínio... É natural que seja assim, todavia, quando tudo parece convergir para o que supomos o nada, eis que a vida ressurge, triunfante e bela!... Novas folhas, novas flores, na infinita benção do recomeço!

(Chico Xavier)

AGRADECIMENTOS

Reconstrução. Recomeço. Renascimento. Na vivência profissional e pessoal, posso resumir estes quatro anos com estas palavras. Em cada dia, uma transformação. Envolvendo ou não um progresso, mas uma mudança constante. Agradeço cada tropeço e queda por ter me permitido mudar. E cada momento sereno por me permitir avaliar que mudei. E continuo mudando. E irei muitas vezes ainda mudar.

Mais uma etapa vem sendo cumprida, mais uma transformação será acionada. Me preparo hoje para o meu dia, considerando as lições do passado, com a consciência que meu futuro ainda não existe, mas não deve ser inconsequente.

E ao passar por estes quatro anos, sou muito grata as belas almas que trilharam até aqui meu caminho. Cada qual em seu tempo, cada uma com seu propósito.

Agradeço imensamente a contínua confiança e compreensão de minha orientadora Carolina Arruda de Oliveira Freire, por quem tenho uma admiração imensa, e a quem sou eternamente grata por me orientar, não apenas em laboratório ou escritas. Por sua paciência e solicitude.

Agradeço às professoras Viviane Prodocimo e Sônia Regina Groetzner (Departamento de Biologia Celular), pelas contribuições no segundo capítulo da tese e no manuscrito da histologia dos caranguejos, respectivamente. Obrigada pelo carinho e atenção por qual sempre me trataram. Ao professor Leandro Portz (Palotina) pela possibilidade de um projeto em conjunto.

Ao professor Edvaldo Trindade, do Departamento de Biologia Celular por sua disposição linda e admirável, e seu sorriso sempre estampado. Ainda a ele por nos direcionar a utilização de novos equipamentos e sugerir adaptações no protocolo. Aos seus técnicos muito além de profissionais qualificados, pessoas realmente sublimes: Israel Bini, Lis Maba, Alessandra e João. Ao Gustavo, seu aluno, por dicas e conversas científicas agradáveis.

Ao professor Ciro A. de Oliveira Ribeiro, também do Departamento de Biologia Celular, pelo empréstimo do espaço e de materiais no decorrer dos experimentos, e ao seu pessoal sempre divertido e disposto, Dandie, Renata e Flávia em especiais. À professora Daniela, do Departamento de Farmacologia,

pelo auxílio em dispor o leitor de placas de Elisa para a análise enzimática ser realizada, e a atenção especial dedicada por sua aluna Bruna. À professora Ana Paula Baldam, da Pontifícia Universidade Católica, por ceder os jundiás utilizados na tese.

Aos demais mestres que pelo corredor ou durante as disciplinas se dispuseram a crescer minha alma de conhecimento e sabedoria.

Especialmente à Luciana Rodrigues de Souza-Bastos por se dispor a também me ajudar na melhor forma de escrever grande parte das introduções desta tese, além de orientar a reformulação dos capítulos, que me ajudou muito. Ao Marcos Paulo Trindade da Veiga por me orientar na escrita de uma porção da tese, à Giovanna Carsten Castellano por me auxiliar na análise estatística do capítulo 1 e muito especial Todos os três, agradeço a ajuda profissional, além da amizade e confidências.

À CAPES, por permitir que eu encaminhasse o doutorado com dedicação exclusiva.

Ao secretário do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia, Roberto, e a técnica Hely pelas sempre dispostas e divertidas recepções.

Aos meus grandes colegas, e em meu coração grandes amigos do LFCO: Giovanna, Leonardo, Eloísa, Felipe, Natascha, Isis, Guilherme, Deivyson e Gustavo. Pela parceria, pela companhia, pelas sugestões, pelas conversas e pelos pagodes (sshh).

Aos meus novos, mas não menos saborosos encontros: Renata e Thiago.

As minhas sempre parceiras, irmãs não biológicas, ainda que nem sempre fisicamente próximas Sacha, Luciana (sim, a mesma da escrita), Mari, Andressa, May e Gláucia.

À minha família, por me fazer reinventar a cada tribulação. Em especial minha mãe, por sempre, da forma que pôde, me apoiar e reconhecer o que faço.

Aos meus anjos protetores, às provisões divinas que alimentam meu corpo e alma todos os meus dias.

RESUMO

A osmorregulação permite o equilíbrio de água e sal no plasma. A capacidade osmorregulatória confere a possibilidade de o teleósteo tolerar diferentes salinidades, o que caracteriza seu grau de eurihalidade. Esta tolerância está relacionada com a manutenção da osmolalidade e hidratação tecidual e da atividade ou expressão de proteínas osmorregulatórias. No capítulo 1 foram analisados artigos com estudos em teleósteos submetidos a variações de salinidade, para se avaliar se a transferência gradual ou abrupta interfere na discussão sobre a eurihalidade. A análise dos resultados dos artigos permitiu identificar que a transferência gradual aumenta o tempo de exposição na salinidade limite tolerada para os teleósteos dulcícolas, confirmando parcialmente o modelo teórico de SCHULTZ & McCORMICK (2013). Ao que tudo indica, o tempo para a ativação de respostas osmorregulatórias é o principal fator que interfere nesta tolerância. No capítulo 2, foram estudadas as características constitutivas (localização e atividade e relação destas entre as espécies) de enzimas chave para a osmorregulação, a basolateral Na^+, K^+ -ATPase (NKA) e a apical V-H^+ -ATPase em dois grupos de teleósteos, os primários (ostariofíseos); e secundários de água doce, diádomos ou marinhos/estuarinos (acanthopterígeos). Os teleósteos, quando em água doce, são hiperosmóticos, pois mantêm a osmolalidade interna acima da do ambiente, principalmente através da captação ativa de íons. A estrutura branquial é o epitélio de troca mais reconhecido neste processo osmorregulatório, pois mantém contato direto com o meio externo. A NKA transporta o Na^+ para o plasma e é uma das principais proteínas branquiais envolvidas na captação de sal. Há também a V-H^+ -ATPase, que promove o efluxo de H^+ que gera o gradiente eletro-químico favorável ao transporte de íons Na^+ para o meio intracelular, que é identificada, nos modelos teóricos para captação de sal, apenas em células branquiais de teleósteos dulcícolas. A princípio os mecanismos osmorregulatórios relacionados a captação de íons deve ser diferente entre teleósteos com diferentes histórias evolutivas ou de diferentes ambientes. A localização de NKA foi diferente entre ostariofíseos e acanthopterígeos. A V-H^+ -ATPase teve distribuição dispersa, porém, mais pontual em teleósteo marinho/estuarino (baiacu). A atividade de NKA foi maior que de V-H^+ -ATPase em tilápia e baiacu. O resultado para a atividade enzimática em baiacu é o oposto do observado na imunofluorescência. A piracanjuba teve maior atividade da V-H^+ -ATPase do que em baiacu, também oposto ao resultado da imunofluorescência. Sugere-se que tais resultados são observados devido as a diferença entre a atividade funcional e expressão de uma proteína. Os resultados da tese permitem considerar que as proteínas constitutivas são diferentes conforme o grupo de teleósteos estudados (NKA), ou com o ambiente aquático de coleta e/ou aclimação (V-H^+ -ATPase), e também sugerir a ancestralidade dulcícola dos teleósteos

Palavras-chave: eurihalidade, protocolos de transferência, NKA, V-H^+ -ATPase, ostariofíseos, acanthopterígeos

ABSTRACT

The osmoregulation allows to maintain the equilibrium of water and salts in plasma. The osmoregulatory capability confers the possibility of teleosts to tolerate different salinities. This characterizes their eurihalinity. This tolerance is related with osmolality and tissue hydration maintenance and with the activity or expression of osmoregulatory proteins. In chapter 1 papers with teleosts submitted to salinities variation were analyzed for to identify if gradual or abrupt exposure interfere in eurihalinity discussion. The analysis of these papers allowed to identify that in freshwater teleosts, the time tolerated in limiting salinity is higher at gradual transfer, partially confirming the theoretical model of SCHULTZ and McCORMICK (2013). It all shows that the time for to activate osmoregulatory answers its the main factor for this tolerance. In chapter 2 were studied constitutive characteristics (local and activity, and the relation of these between the species) of basolateral Na^+, K^+ -ATPase (NKA) and apical V-H^+ -ATPase in two groups of teleosts, the primary (ostariophysean) and secondary freshwater, diadromous or estuarine/marine (acanthopterygian). Freshwater teleosts are hyperosmotics, because they keep the osmolality above of the environment, mainly trough ions capture. The gill structure is the most recognized exchange epithelium, due to your direct contact with water. The NKA transports Na^+ to plasma, and is one of the main osmoregulatory gills proteins for salt capture. The V-H^+ -ATPase promotes H^+ efflux, that creates an eletro-chemical gradient favorable to intracellular Na^+ entry, that is just identificated in gills cells of freshwater teleosts, on theorical models of salt capture. At first, osmorregulatory mechanisms should be different between teleosts with differents evolutionary history or environments. The NKA localization was different between ostariophysians and acanthopterygians. In general, V-H^+ -ATPase distribution was scattered, but was more punctual in marine/estuarine teleost (baiacu). The NKA activity was higher than the V-H^+ -ATPase in tilapia and baiacu. In baiacu, the enzyme activity results was opposite than immunofluorescence. Piracanjuba had higher V-H^+ -ATPase activity than baiacu, also an opposite result than immunofluorescence. Its suggest that these results are due the difference between functional activity and protein expression. These thesis results allows to consider that the constitutive proteins in teleosts are different according groups of teleosts (NKA) and aquatic environment of collect/acclimation, and also that teleosts have a freshwater ancestry.

Key-word: eurihalinity, transfer protocols, NKA, V-H^+ -ATPase, ostariophyseans, acanthopterygeans

LISTA DE SIGLAS

AC: enzima anidrase carbônica

BW: brackishwater (água salobra) – capítulo 1

Cl^- : cloreto

FW: freshwater (água doce) – capítulo 1

H^+ : próton

HCO_3^- : bicarbonato

K^+ : potássio

NaCl: cloreto de sódio

Na^+ : sódio

NCC: cotransportador eletroneutro 1 Na^+ , 1 Cl^-

NKA: enzima Na^+, K^+ -ATPase

NKCC: cotransportador eletroneutro 1 Na^+ , 1 K^+ , 2 Cl^-

SW: seawater (água do mar) – capítulo 1

V- H^+ -ATPase: enzima transportadora de prótons vacuolar (ou próton-ATPase vacuolar)

*Figura: nº capítulo. nº figura

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 – Esquema que representa a migração, ou tolerância de um animal aquático a pequenas variações de salinidade (setas brancas), caracterizando espécies estenohalinas, e espécies que toleram amplas faixas de salinidade (setas vermelhas), até mesmo com a migração entre água doce e água do mar (setas amarelas), caracterizando, respectivamente, espécies eurihalinas e diádromas. Fonte: a autora
..... 20
- Figura 2 – Modelo esquemático dos mecanismos (A): hipoosmorregulatórios utilizados por teleósteos em água do mar. (B): hiperosmorregulatórios utilizados por teleósteos em água doce. Traduzido de WILLMER *et al.*, 2005
..... 22
- Figura 3 – (A): Esquema de uma brânquia de teleósteo. Adaptado de EVANS & CLAIBORNE, 2009 (B): Representação do fluxo contracorrente em lamelas branquiais de teleósteos. Traduzido de WILLMER *et al.*, 2005
..... 23
- Figura 4 - Epitélio branquial de *mumichog* (*Fundulus heteroclitus*) observado em Microscopia Eletrônica de Transmissão. (A): água do mar e (B): após 30 dias de transferência a água doce. MRC: célula rica em mitocôndria (célula de cloreto). As setas destacam a formação em cripta da membrana apical da MRC quando em água do mar, e as microvilosidades quando em água doce. CPV: célula pavimentar. Traduzido de EVANS *et al.*, 2005
..... 24
- Figura 5 – Modelo esquemático de célula branquial de teleósteos com o mecanismo proposto para a secreção iônica em água do mar. Canais iônicos de Cl^- (em vermelho) são localizados nas células pavimentares (CPV) e células ricas em mitocôndria (MRC - célula de cloreto) e permitem a secreção do íon. O transporte de NaCl para o meio intracelular é feito pelo cotransportador $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ (NKCC, em azul). A Na^+, K^+ -ATPase (NKA, em roxo) permite a saída do Na^+ para o meio extracelular. A ciclagem do K^+ é feita através de canais basolaterais, e a secreção de K^+ , por canais apicais (em laranja). A secreção de Na^+ se faz via paracelular (em verde). IC: meio intracelular. EC: meio extracelular. Modificado de MARSHALL, 2002
..... 25
- Figura 6 – Modelo esquemático de célula branquial de teleósteos com o mecanismo proposto para a captação iônica em água doce. A reação enzimática da anidrase carbônica AC (em azul), no interior das células ricas em mitocôndria (MRC - célula de cloreto) tem como subprodutos H^+ e HCO_3^- . Ambos servem como substrato para o funcionamento dos trocadores apicais $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ (em verde) e Na^+/H^+ (NHE, em cinza) e da V-H^+ -ATPase apical (em vermelho). O trocador $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ também está presente em células pavimentares, CPV. Canais basolaterais de Cl^- (em vermelho) na CPV transportam o íon para o plasma. A V-H^+ -ATPase promove a saída de H^+ , que gera um gradiente favorável a entrada de Na^+ , através de canais (em

amarelo). A Na^+, K^+ -ATPase (NKA, em roxo) transporta o Na^+ captado para o plasma do organismo, além de promover a entrada do K^+ , que é ciclado por canais basolaterais (em laranja). IC: meio intracelular. EC: meio extracelular. Modificado de MARSHALL, 2002
 27

CAPÍTULO 1

Figura 1.1 – Representação de uma transferência gradual (A) e abrupta (B), em aumentos e reduções (setas tracejadas) de salinidade. Nestes exemplos, a variável estressora (e.g.: salinidade) é o principal fator que diferencia as respostas fisiológicas. No experimento gradual o animal aquático atinge a salinidade limite a partir da submissão de salinidades intermediárias (pré-aclimação). Na exposição abrupta, a transferência da salinidade controle à experimental é direta. S_0 representa a salinidade máxima experimental, e S_1 a de mínima. Fonte: a autora
 36

Figura 1.2 – Número de espécies de teleósteos conforme sua ordem e ambientes aquáticos que habitam ou migram, em estudos que utilizaram transferências a variação de salinidade gradual e/ou abrupta (1974 – 2016): 107 artigos, utilizados para reunir todos os resultados presentes neste capítulo. Estes artigos pesquisados estão listados nas referências. Espécies marinhas/estuarinas são espécies marinhas que podem migrar para o estuário, e espécies dulcícolas/estuarinas são espécies dulcícolas que podem migrar para o estuário..... 43

Figura 1.3 – Correlação de transferência x salinidade x tempo de tolerância entre (A) teleósteos marinhos e/ou estuarinos aclimatados em água salobra ou água do mar (24 dados para a transferência gradual e 39 para a abrupta) e (B): teleósteos dulcícolas e/ou estuarinos aclimatados em água doce (32 dados para a transferência gradual e 36 para a abrupta) (1974 – 2016): 75 artigos. Os artigos que não trataram diretamente da tolerância, se supôs a sobrevivência de 100% para a metodologia desenvolvida. Os artigos não avaliados (32) para elaborar o gráfico são artigos que tratam de células (morfologia a partir de aclimação ou ensaio *in vitro*), locus gênico de uma população, salinidade combinado com metal e/ou temperatura, avaliação na própria salinidade aclimatada (sem transferência a outra salinidade), avaliação no local de coleta ou tolerância em dias após a eclosão. Estes artigos somam os 107 utilizados para compilar todos os resultados presentes neste capítulo. Estes artigos pesquisados estão listados nas referências. 44

Tabela 1.1 – Número de estudos com suas metodologias principais (1974 – 2016): 107 artigos, utilizados para compilar todos os resultados presentes neste capítulo. Estes artigos pesquisados estão listados nas referências. (A): Estudos com transferências graduais e abruptas (B): Estudos com transferências graduais (C): Estudos com transferências abruptas
 40

Tabela 1.2 – Dados obtidos da literatura, datados de 1974-2016, relacionando nº de espécies/ordem de teleósteos (actinopterygii), ambientes aquáticos que habitam ou migram, principais resultados e referência. Grupo: Teleósteos. Total de artigos plotados: 107 (1974-2016). Enzimas (atividade ou expressão): AC (anidrase carbônica), NKA (Na^+ , K^+ - ATPase), e V-H ⁺ -ATPase. TH (teor hídrico muscular). Ordens em sequência alfabética	49
---	----

CAPÍTULO 2

Figura 2.1 – Modelo esquemático de célula branquial de teleósteos com o mecanismo proposto para a secreção iônica em água do mar. 1.: canal de K^+ 2.: cotransportador eletroneutro NKCC 3.: canal de Cl^- 4.: Na^+ , K^+ -ATPase (NKA) 5.: secreção de Na^+ via paracelular. IC: meio intracelular. EC: meio extracelular. Modificado de EVANS & CLAIBORNE, 2009	74
--	----

Figura 2.2 – Modelo esquemático de célula branquial de teleósteos com os principais mecanismos propostos para a captação iônica em água doce. Este modelo representa uma hibridização de vários subtipos celulares. 1.: anidrase carbônica (AC) 2.: trocador $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$. 3.: canal de Cl^- 4.: cotransportadores eletroneutros Na^+ , K^+ , 2Cl^- (NKCC) e 5.: Na^+ , Cl^- (NCC) 6.: trocador Na^+/H^+ (NHE) 7.: canal de Na^+ 8.: Na^+ , K^+ -ATPase (NKA) 9.: canal de K^+ e 10.: V-H ⁺ -ATPase. *Asterisco destaca enzima que será estudada na tese. IC: meio intracelular. EC: meio extracelular. Modificado de PERRY <i>et al.</i> , 2003	76
--	----

Figura 2.3 – Funcionamento da Na^+ , K^+ -ATPase (NKA), na porção basolateral da membrana plasmática. Os íons Na^+ e K^+ se ligam aos sítios de ligação específicos, e com a quebra de ATP (energia química), há a mudança de conformação protéica, que permite a liberação de três íons Na^+ para o meio extracelular e dois íons K^+ para o meio intracelular, contra seus gradientes químicos. IC: meio intracelular. EC: meio extracelular. Modificado de WILLMER <i>et al.</i> , 2005	77
--	----

Figura 2.4 – Configuração da enzima V-H ⁺ -ATPase. O domínio V_1 , promove a hidrólise do ATP, que rotaciona o domínio V_0 , permitindo o transporte de prótons para o meio extracelular. IC: meio intracelular. EC: meio extracelular Modificado de NISHI & FORGAC, 2002	78
--	----

Figura 2.5 – Representação dos eventos radiativos que originaram os teleósteos. Fonte: a autora	81
---	----

Figura 2.6 – Filogenia das ordens estudadas. Os traços pretos na linhagem de Actinopterygii representam um corte proposital da continuação desta linhagem, para	
---	--

destacar apenas as derivações das ordens representantes das espécies estudadas na tese. Modificado de NELSON, 2006 84

Figura 2.7 – Espécies utilizadas no experimento, identificando suas respectivas ordens e famílias. (A): *Astyanax bimaculatus*, lambari (B): *Brycon orbignyanus*, piraicanjuba (C): *Ctenopharyngodon idella*, carpa-capim (D): *Rhamdia quelen*, jundiá (E): *Oreochromis niloticus*, tilápia do Nilo (F): *Lutjanus jocu*, baúna (G): *Centropomus parallelus*, robalo (H): *Sphoeroides greeleyi*, baiacu (Fonte: Fish Base, 2016). Asteriscos indicam espécies diádromas ou marinhas/estuarinas. Fonte: a autora 91

..

Figura 2.8 – Representação da mensuração de intensidade de fluorescência através de captura em Z. Fonte: a autora 94

Figura 2.9 – Imunomarcção em teleósteos dulcícolas da ordem Characiformes, com aumento de 60x. (A): Marcação de NKA (B): e V-H⁺-ATPase em *Astyanax bimaculatus*, lambari (C): Marcação de NKA (D): e V-H⁺-ATPase em *Brycon orbygnianus*, piraicanjuba. Fluoróforo FITC (verde) e DAPI (azul, marcador de núcleo, para NKA). NKA apontada por setas e V-H⁺-ATPase por setas tracejadas 96

Figura 2.10 – Imunomarcção em teleósteos dulcícolas das ordens Cypriniformes e Siluriformes, com aumento de 60x. (A): Marcação de NKA (B): e V-H⁺-ATPase em *Ctenopharyngodon idella*, carpa-capim (C): Marcação de NKA (D): e V-H⁺-ATPase em *Rhamdia quelen*, jundiá. Fluoróforo FITC (verde) e DAPI (azul, marcador de núcleo, para NKA). NKA apontada por setas e V-H⁺-ATPase por setas tracejadas 97

Figura 2.11 – Imunomarcção em teleósteo dulcícola/estuarino da ordem Perciformes, com aumento de 60x. (A): Marcação de NKA (B): e V-H⁺-ATPase em *Oreochromis niloticus*, tilápia-do-Nilo. Imunomarcção em teleósteo diádromo da ordem Perciformes, com aumento de 60x. (C): Marcação de NKA (D): e V-H⁺-ATPase em *Lutjanus jocu*, baúna. Fluoróforo FITC (verde) e DAPI (azul, marcador de núcleo, para NKA). NKA apontada por setas e V-H⁺-ATPase por setas tracejadas 98

Figura 2.12 – Imunomarcção em teleósteo marinho/estuarino da ordem Tetraodontiformes, com aumento de 60x. (A): Marcação de NKA (B): e V-H⁺-ATPase em *Sphoeroides greeleyi*, baiacu. Fluoróforo FITC (verde) e DAPI (marcador de núcleo). NKA apontada por setas e V-H⁺-ATPase por setas tracejadas 99

Figura 2.13 – Quantificação das imunomarcções constitutivas de NKA e V-H⁺-ATPase dos diferentes teleósteos estudados, feitas no aumento de 20x. *Astyanax bimaculatus*, lambari; *Brycon orbignyanus*, piraicanjuba; *Ctenopharyngodon idella*, carpa-capim; *Rhamdia quelen*, jundiá; *Oreochromis niloticus*, tilápia do Nilo; *Lutjanus jocu*, baúna; *Centropomus parallelus*, robalo; *Sphoeroides greeleyi*, baiacu. CN: controle negativo.

Letras diferentes identificam diferenças entre as quantificações das enzimas NKA ou V-H⁺-ATPase entre as diferentes espécies. Asteriscos identificam diferenças entre as quantificações das enzimas dentro de uma mesma espécie 100

Figura 2.14 – Atividades enzimáticas constitutivas de NKA e V-H⁺-ATPase dos diferentes teleósteos estudados. *Astyanax bimaculatus*, lambari; *Brycon orbignyanus*, piracanjuba; *Ctenopharyngodon idella*, carpa-capim; *Rhamdia quelen*, jundiá; *Oreochromis niloticus*, tilápia do Nilo; *Lutjanus jocu*, baúna; *Centropomus parallelus*, robalo; *Sphoeroides greeley*, baiacu. Letras diferentes identificam diferenças entre as atividades enzimáticas de V-H⁺-ATPase entre as diferentes espécies. Asteriscos identificam diferenças entre as atividades de NKA e V-H⁺-ATPase dentro da mesma espécie 101

Tabela 2.1 – Época de origem (provável) das ordens e/ou famílias de ostariofíseos e acanthopterígeos. Fontes: SANTINI & TYLER, 2003; NELSON, 2006; LÉVÊQUE *et al*, 2008 e habitats das espécies estudadas na tese, conforme cada ordem. Fonte: a autora..... 88

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	19
1.1 Os ambientes aquáticos e a osmorregulação	19
1.2 Fisiologia e papel das brânquias na osmorregulação	22
1.3 Mecanismos de regulação iônica: secreção e captação ativa de íons	24
1.4 Justificativas	27
1.5 Hipóteses	28
2 OBJETIVOS	28
2.1 Objetivos gerais	28
2.2 Objetivos específicos	28
REFERÊNCIAS	29
CAPÍTULO 1: Análise de literatura sobre protocolos de transferência a diferentes salinidades e a influência no grau de eurihalidade de teleósteos	32
RESUMO	33
ABSTRACT	34
1 INTRODUÇÃO	35
1.1 Osmorregulação, eurihalidade e desenho experimental	35
1.2 Idealização do capítulo	38
2 OBJETIVO	39
3 METODOLOGIA	39
4 RESULTADOS	40
4.1 Quantidade de estudos/protocolos e metodologias	40
4.2 Quantidade de espécies/ordens utilizadas	42
4.3 Salinidade limite e tempo de exposição na salinidade limite conforme os protocolos de transferência	44
4.4 Resultados principais dos artigos pesquisados, conforme o protocolo de transferência utilizado	45
4.4.1 Estudos de osmorregulação com teleósteos, em relação a transferência gradual e/ou abrupta (exemplos)	46
4.4.2 Estudos de osmorregulação com teleósteos, em relação a transferência crônica ou aguda (exemplos)	47
5 DISCUSSÃO	55

6 CONCLUSÕES	59
REFERÊNCIAS CAPÍTULO 1	59
CAPÍTULO 2: Caracterização da Na⁺,K⁺ - ATPase e V-H⁺-ATPase branquiais em teleósteos, relacionadas com sua história evolutiva e o ambiente aquático de coleta ou aclimação	70
RESUMO.....	71
ABSTRACT.....	72
1 INTRODUÇÃO	73
1.1 A osmorregulação de teleósteos em água do mar e dulcícolas	73
1.1.1 A enzima NKA	76
1.1.2 A enzima V-H ⁺ -ATPase	77
1.2 Osmorregulação e a história evolutiva	79
1.2.1 A história evolutiva (resumida) dos teleósteos	80
1.2.2 Divisão dos teleósteos.....	83
1.2.3 Características dos teleósteos ostariofíseos (primários de água doce) estudados.....	85
1.2.3.1 Ordem Characiformes, Família Characidae	85
1.2.3.2 Ordem Characiformes, Subfamília Bryconidae	85
1.2.3.3 Ordem Cypriniformes, Família Cyprinidae.....	86
1.2.3.4 Ordem Siluriformes, Família Heptapteridae	86
1.2.4 Características dos teleósteos acanthopterígeos (Perciformes: Cichlidae, secundários de água doce e espécies aclimatadas em água do mar) estudados	87
1.2.4.1 Ordem Perciformes, Família Cichlidae	87
1.2.4.2 Ordem Perciformes, Família Lutjanidae	87
1.2.4.3 Ordem Perciformes, Família Centropomidae	87
1.2.4.4 Ordem Tetraodontiformes, Família Tetraodontidae.....	88
2 OBJETIVOS	89
2.1 Geral.....	89
2.2 Específicos	89
3 METODOLOGIA.....	89
3.1 Coleta dos animais.....	89
3.1.1 Teleósteos dulcícolas (ostariofíseos)	89
3.1.2 Teleósteo dulcícola e aclimatados em água do mar (acanthopterígeos).....	90
3.2 Aclimação e eutanásia dos animais	91
3.3 Imunomarcção da NKA e V-H ⁺ -ATPase.....	92
3.4 Atividade específica da NKA e V-H ⁺ -ATPase.....	94
3.5 Proteínas totais	95
3.6 Análise estatística	95

4	RESULTADOS	96
4.1	<i>Imunomarcção da NKA e V-H⁺-ATPase em brânquias de teleósteos da ordem Characiformes (ostariofíseos, primários de água doce)</i>	96
4.2	<i>Imunomarcção da NKA e V-H⁺-ATPase em brânquias de teleósteos das ordens Cypriniformes e Siluriformes (ostariofíseos, primários de água doce)..</i>	97
4.3	<i>Imunomarcção da NKA e V-H⁺-ATPase em brânquias de teleósteos da ordem Perciformes (acanthopterígeos, família Cichlidae com representantes secundários de água doce e espécie diádroma)</i>	98
4.4	<i>Imunomarcção da NKA e V-H⁺-ATPase em brânquias de teleósteo da ordem Tetraodontiformes (acanthopterígeo, espécie marinha/estuarina)</i>	99
4.5	<i>Quantificação das imunomarcções constitutivas da NKA e V-H⁺-ATPase</i>	99
4.6	<i>Atividade enzimática da NKA e V-H⁺-ATPase em teleósteos ostariofíseos (primários de água doce) e acanthopterígeos (Perciformes: Cichlidae, secundários de água doce e espécies aclimatadas em água do mar)</i>	100
5	DISCUSSÃO	102
5.1	<i>Localização e atividade de NKA e V-H⁺-ATPase em ostariofíseos</i>	102
5.2	<i>Localização e atividade de NKA e V-H⁺-ATPase em acanthopterígeos (Perciformes: Cichlidae, secundários de água doce e espécies aclimatadas em água do mar)</i>	103
5.3	<i>Comparação entre a localização, quantificação de imunofluorescência e atividades enzimáticas de NKA e V-H⁺ATPase e sua possível relação com a história evolutiva de ostariofíseos (primários de água doce) e acanthopterígeos (Perciformes: Cichlidae, secundários de água doce e espécies aclimatadas em água do mar)</i>	105
5.3.1	<i>Em relação a enzima NKA</i>	105
5.3.2	<i>Em relação a enzima V-H⁺-ATPase</i>	106
5.3.3	<i>Em relação a NKA e V-H⁺-ATPase</i>	108
5.4	<i>Relação entre os resultados e possível história evolutiva dos teleósteos</i>	109
6	CONCLUSÕES	110
	REFERÊNCIAS CAPÍTULO 2	110
	CONCLUSÕES GERAIS	117
	REFERÊNCIAS	119
	ANEXO	135

Obs.: Esta tese será apresentada em modelo convencional, com apenas os “abstracts” sem ser na língua vernácula

1 INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Os ambientes aquáticos e a osmorregulação

Os ambientes aquáticos são classificados em água doce, marinho e estuarino, conforme a salinidade que apresentam. O ambiente de água doce apresenta salinidade de 0 a 0,5‰ (partes por mil: até 0,5 g de sal/ litro), o marinho entre 32 a 35‰ e o estuarino, salinidades intermediárias entre a água doce e a água do mar (WILLMER *et al.*, 2005). Nestes ambientes aquáticos, fauna com grande diversidade é representada pelos peixes teleósteos, que se caracterizam por apresentar nadadeira caudal homocerca (simétrica), escamas cicloides e bexiga natatória (NELSON, 2006). Esta diversidade está relacionada (dentre outros fatores) com a capacidade de manter as concentrações de água e soluto no meio interno (plasma), diferenciadas através de estratégias osmorregulatórias (e.g.: EVANS *et al.*, 2005; FREIRE *et al.*, 2008).

A capacidade osmorregulatória dos teleósteos influencia a distribuição deste grupo nas mais diferentes salinidades (BUCKUP, 1999) e também confere a tolerância fisiológica destes organismos frente a variações de salinidade, ou seja, seu grau de eurihalidade. Teleósteos estenohalinos toleram uma estreita faixa de variação de salinidade enquanto teleósteos eurihalinos toleram uma ampla faixa de variação de salinidade. Dentre as espécies eurihalinas, existem espécies que migram da água doce para água do mar e vice-versa, sendo chamadas diádromas (e.g.: EVANS *et al.*, 2005; FREIRE *et al.*, 2008) (Figura 1).

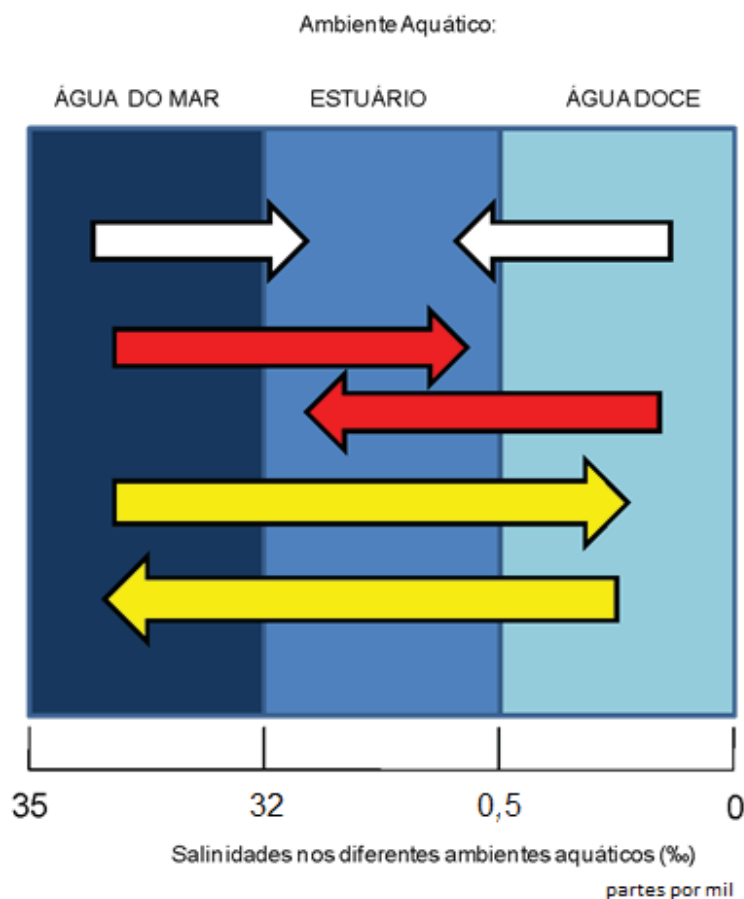


Figura 1 – Esquema que representa a migração, ou tolerância de um animal aquático a pequenas variações de salinidade (setas brancas), caracterizando espécies estenohalinas, e espécies que toleram amplas faixas de salinidade (setas vermelhas), até mesmo com a migração entre água doce e água do mar (setas amarelas), caracterizando, respectivamente, espécies eurihalinas e diádromas. Fonte: a autora.

A eurihalinidade pode ser avaliada por dois protocolos de transferência a variações de salinidade. O protocolo gradual, que possibilita uma pré-aclimatação em salinidades intermediárias, anterior à salinidade limite, e o protocolo abrupto, com a transferência direta à salinidade experimental limite. As respostas osmorregulatórias são desencadeadas conforme estímulos de osmosensores e pode ser mediada também por ações hormonais (McCORMICK & BRADSHAW, 2006), e podem ocorrer em curto ou longo prazo. Quando diante de um desafio salino, as respostas de curto prazo se dão pelo funcionamento de proteínas osmorregulatórias constitutivas, já expressas (e.g.: EVANS & CLAIBORNE, 2009). Por outro lado, respostas de longo prazo dependem do potencial de regulação da expressão das proteínas que atuam na osmorregulação, quando apenas o funcionamento das proteínas constitutivas não é suficiente (e.g.: EVANS *et al.*, 2005). Independente do

mecanismo de ativação, tanto teleósteos marinhos quanto dulcícolas devem manter sua concentração iônica interna, garantindo a hidratação tecidual (WOOD & PÄRT, 1997; SAKAMOTO *et al.*, 2001; FREIRE *et al.*, 2008).

Os teleósteos gastam energia química para efetivar a regulação iônica de seu meio interno, que se mantém diferente das concentrações iônicas do meio externo (e.g.: EVANS *et al.*, 2005; FREIRE *et al.*, 2008). Portanto, são caracterizados como osmorreguladores (e.g.: EVANS & CLAIBORNE, 2009). Assim, teleósteos que habitam ou migram para o ambiente marinho devem se manter hiposmóticos (350-400 mOsm/kg), mantendo o meio interno menos concentrado que o meio externo (e.g.: EVANS *et al.*, 2005; FREIRE *et al.*, 2008). A hiporregulação se faz através da ingestão de água, excreção de urina isosmótica (com excreção de íons divalentes), e secreção ativa de íons por epitélios de troca, como através do epitélio branquial, que mantém contato direto com o meio externo (EVANS & CLAIBORNE, 2009) (Figura 2A). Por sua vez, teleósteos que habitam ou migram para o ambiente dulcícola devem se manter hiperosmóticos (250-400 mOsm/kg), ou seja, manter o meio interno mais concentrado que o meio externo. Para hiperosmorregular, há a ingestão de água apenas durante a alimentação, a redução da permeabilidade corporal (EVANS & CLAIBORNE, 2009), excreção de urina diluída (MARSHALL & GROSSELL, 2006) e captação ativa de íons, realizada principalmente pelo epitélio branquial (Figura 2B) (EVANS *et al.*, 2005).

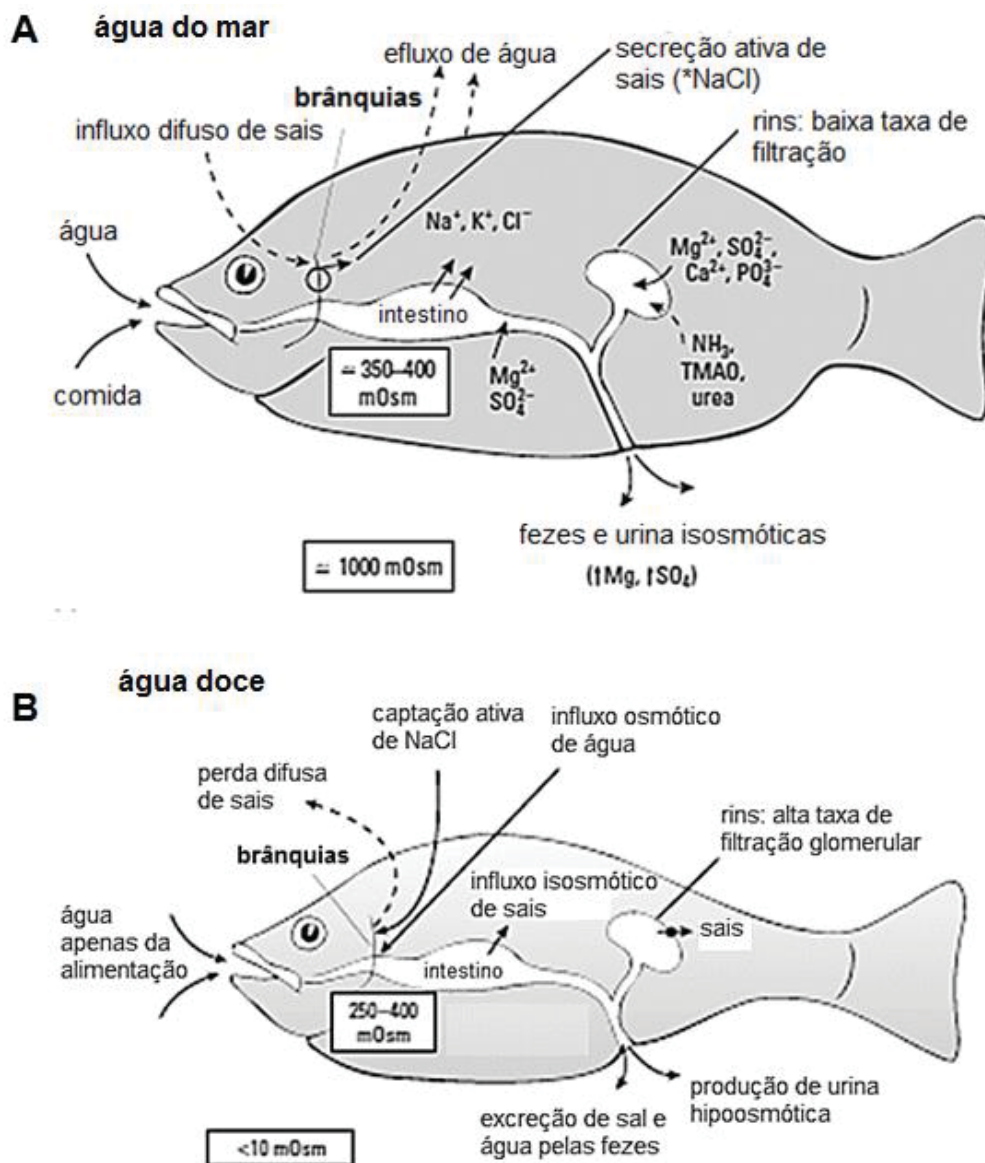


Figura 2 – Modelo esquemático dos mecanismos (A): hipoosmorregulatórios utilizados por teleósteos em água do mar. (B): hiperosmorregulatórios utilizados por teleósteos em água doce. Traduzido de WILLMER *et al.*, 2005.

1.2 Fisiologia e papel das brânquias na osmorregulação

Em sua estrutura geral, as brânquias dos teleósteos são formadas por duas hemibrânquias lateralizadas, que são sustentadas pelo arco branquial. Delas partem quatro holobrânquias. Nas holobrânquias inserem-se numerosos filamentos branquiais que apresentam inúmeras lamelas secundárias (Figura 3A). A direção do fluxo sanguíneo por entre as células lamelares é contrária à direção do fluxo de água do meio externo. Isto gera um fluxo contracorrente

(Figura 3B) entre a água o meio interno, que otimiza a troca entre gases respiratórios e de água e solutos (e.g.: EVANS *et al.*, 2005; EVANS & CLAIBORNE, 2009).

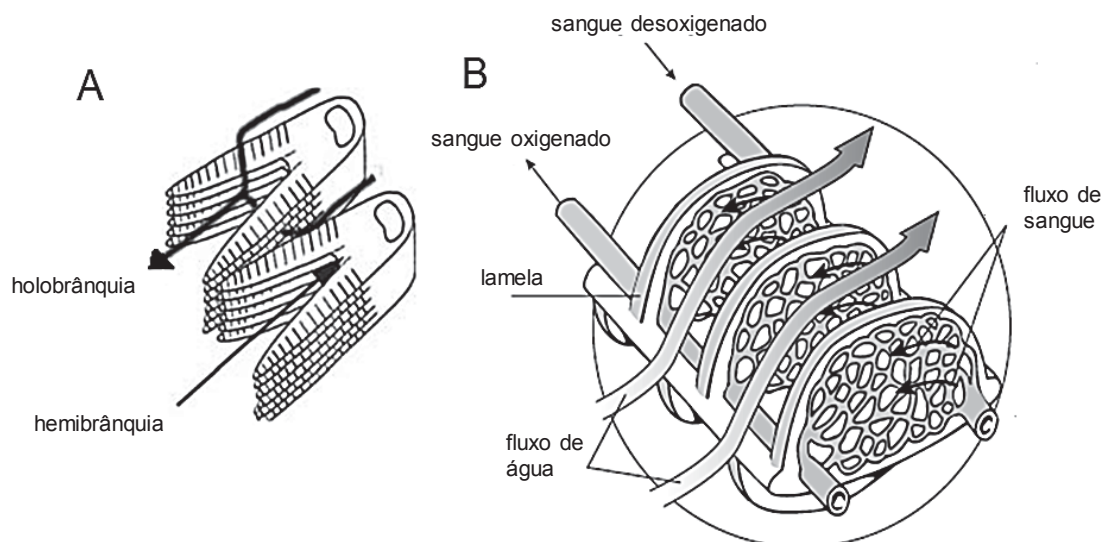


Figura 3 – (A): Esquema de uma brânquia de teleosteo. Adaptado de EVANS & CLAIBORNE, 2009 (B): Representação do fluxo contracorrente em lamelas branquiais de teleosteos. Traduzido de WILLMER *et al.*, 2005.

No epitélio branquial, existem células que possuem proteínas expressas com atividades relacionadas ao transporte iônico. Entre estas células, cerca de 10% são ionócitos denominados de células de cloreto (denominação dada a mesma funcionalidade de células intercalares em rins de mamíferos) ou células ricas em mitocôndrias (*Mitochondrion Rich Cells* - MRC's) (EVANS *et al.*, 2005; EVANS & CLAIBORNE, 2009). Os 90% restantes são representados por células pavimentares (e.g.: EVANS *et al.*, 2005) que também possuem capacidade de regular volume e realizar trocas gasosas (LEGUEN & PRUNET, 2004). As células pavimentares que participam da osmorregulação possuem grande quantidade de mitocôndrias (MOYES & SCHULTE, 2009). Porém, aparentemente a contribuição das células pavimentares para a regulação iônica é menor do que em MRC's. Portanto, não há uma separação absoluta entre as funções e características destes dois tipos de células (MARSHALL & GROSELL, 2006). Os tipos e as quantidades de proteínas existentes nestas células, bem como o número e a morfologia destes tipos celulares podem

sofrer influência da salinidade do meio externo (UCHIDA, 2000; HWANG, 2009; OUATTARA *et al.*, 2009; HWANG *et al.*, 2011) (Figura 4).

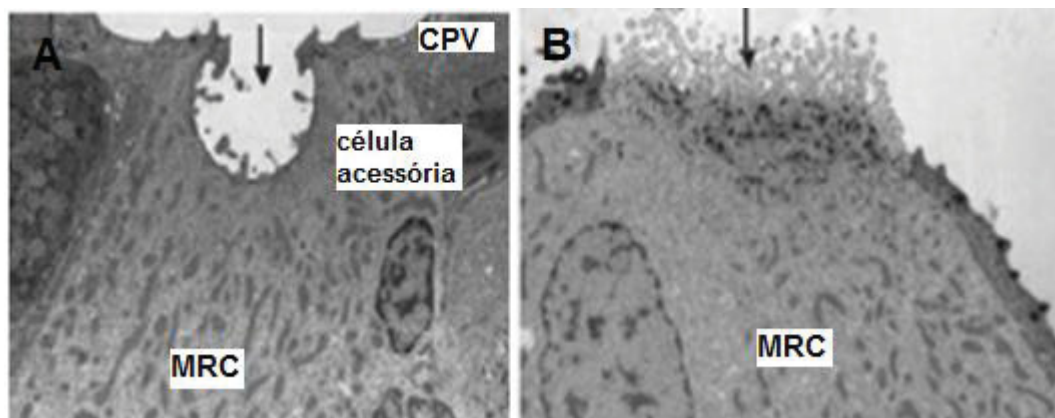


Figura 4 – Epitélio branquial de *mumichog* (*Fundulus heteroclitus*) observado em Microscopia Eletrônica de Transmissão. (A): água do mar e (B): após 30 dias de transferência a água doce. MRC: célula rica em mitocôndria (célula de cloreto). As setas destacam a formação em cripta da membrana apical da MRC quando em água do mar, e as microvilosidades quando em água doce. CPV: célula pavimentar. Traduzido de EVANS *et al.*, 2005.

1.3 Mecanismos de regulação iônica: secreção e captação ativa de íons

Em modelos teóricos para a secreção ativa de íons em brânquias de teleósteos, tanto as células MRC's como as pavimentares apresentam canais apicais de Cl^- para a secreção ativa do íon (WOOD *et al.*, 2002; EVANS *et al.*, 2005). Nas MRC's outros transportadores são identificados, como a isoforma secretora (basolateral) do cotransportador eletroneutro $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - 2\text{Cl}^-$ (ou NKCC) que permite o transporte de NaCl para o meio intracelular (HORISBERGER *et al.*, 1991; JORGENSEN *et al.*, 2003; WEHNER *et al.*, 2003; STRANGE, 2004). Este transporte é direcionado pela geração de um gradiente de Na^+ criado pelo funcionamento da enzima $\text{Na}^+, \text{K}^+ - \text{ATPase}$ (NKA) basolateral (WILSON, 2007). Esta enzima é responsável por promover a saída de 3 Na^+ para o meio extracelular em troca de 2 K^+ para o interior da célula. Este transporte gera o gradiente que também permite a secreção de Na^+ por via paracelular (e.g.: EVANS & CLAIBORNE, 2009) (Figura 5). Nos modelos de secreção iônica as MRC's estão associadas a células acessórias, que fazem parte integral do mecanismo, devido a ausência de *tigh junctions* nas MRC's (WILSON, 2007).

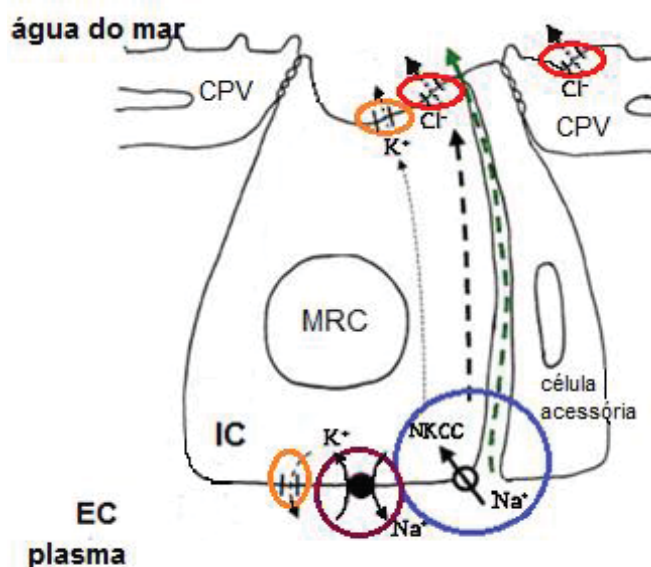


Figura 5 - Modelo esquemático de célula branquial de teleostes com o mecanismo proposto para a secreção iônica em água do mar. Canais iônicos de Cl^- (em vermelho) são localizados nas células pavimentares (CPV) e células ricas em mitocôndria (MRC - célula de cloreto) e permitem a secreção do íon. O transporte de NaCl para o meio intracelular é feito pelo cotransportador $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ (NKCC, em azul). A Na^+, K^+ -ATPase (NKA, em roxo) permite a saída do Na^+ para o meio extracelular. A ciclagem do K^+ é feita através de canais basolaterais, e a secreção de K^+ , por canais apicais (em laranja). A secreção de Na^+ se faz via paracelular (em verde). IC: meio intracelular. EC: meio extracelular. Modificado de MARSHALL, 2002.

Os mecanismos osmorregulatórios envolvidos para a captação de íons são direcionados pelo funcionamento de uma enzima citosólica encontrada nas MRC's, chamada anidrase carbônica (AC). A AC, a partir da catálise de hidratação do dióxido de carbono ($\text{H}_2\text{O} + \text{CO}_2 \leftrightarrow \text{H}_2\text{CO}_3 \leftrightarrow \text{H}^+ + \text{HCO}_3^-$) gera subprodutos que são utilizados na captação de NaCl , realizada por outros transportadores. O HCO_3^- é utilizado como substrato para a captação de Cl^- nas MRC's e em células pavimentares; e o H^+ , para a captação de Na^+ apenas nas MRC's (e.g.: EVANS *et al.*, 2005).

Para a captação de Cl^- há o funcionamento do trocador apical $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$. Esta captação se dá através do transporte de HCO_3^- para o meio extracelular em troca do transporte de Cl^- para o interior da célula (e.g.: WOOD *et al.*, 2002). O Cl^- então é transportado para o plasma por via transcelular ou por canais basolaterais (e.g.: MARSHALL *et al.*, 2002; EVANS *et al.*, 2005).

Para a captação de Na^+ , dois mecanismos são propostos. Estes mecanismos envolvem o funcionamento do trocador apical Na^+/H^+ (NHE), e da V-H^+ -ATPase apical. Alguns autores sugerem que este mecanismo está

associado a origem dos teleósteos (NHE para origens marinhas e V-H⁺-ATPase para espécies dulcícolas) (WILSON, 2007). Independente do mecanismo de captação, é a NKA que promove o transporte de Na⁺ para o plasma (e.g.: EVANS *et al.*, 2005).

A existência do NHE em brânquias de teleósteos é sugerida devido a resultados com o bloqueador fenamil, que é um bloqueador de canais de Na⁺. Em experimentos realizados em anfíbios, a utilização da droga não resultou no bloqueio total da captação de Na⁺. Em teleósteos, como a truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), por sua vez, este bloqueio foi total (GOSS *et al.*, 2011). Em tilápia moçambicana (*Oreochromis mossambicus*), a expressão de NHE foi identificada em brânquias e rins, sendo maior em água doce quando comparada a água do mar (HIROI *et al.*, 2008). Ainda em tilápia moçambicana, a marcação de NHE foi identificada apenas em células branquiais acessórias (WILSON *et al.*, 2000) - células associadas a MRC's nos modelos de secreção iônica (WILSON, 2007).

Em teleósteos dulcícolas, o principal mecanismo reconhecido para a captação de Na⁺ se faz pelo funcionamento da V-H⁺-ATPase apical. A V-H⁺-ATPase gera gradiente eletro-químico favorável a entrada do Na⁺, através de canais específicos, por meio da externalização do H⁺ produzido pela reação realizada pela AC (e.g.: EVANS *et al.*, 2005) (FENWICK *et al.*, 1999; McCORMICK *et al.*, 2009) (Figura 6).

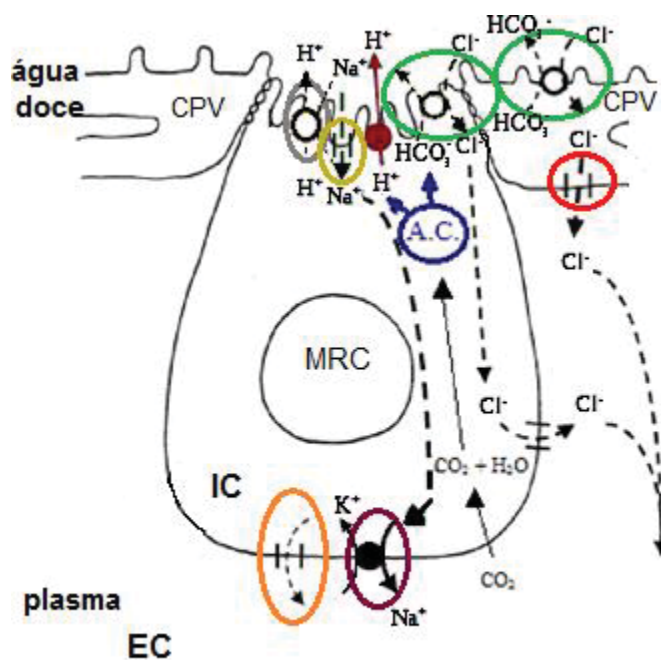


Figura 6 - Modelo esquemático de célula branquial de teleostes com o mecanismo proposto para a captação iônica em água doce. A reação enzimática da anidrase carbônica AC (em azul), no interior das células ricas em mitocôndria (MRC - célula de cloreto) tem como subprodutos H^+ e HCO_3^- . Ambos servem como substrato para o funcionamento dos trocadores apicais Cl^-/HCO_3^- (em verde) e Na^+/H^+ (NHE, em cinza) e da $V-H^+$ -ATPase apical (em vermelho). O trocador Cl^-/HCO_3^- também está presente em células pavimentares, CPV. Canais basolaterais de Cl^- (em vermelho) na CPV transportam o íon para o plasma. A $V-H^+$ -ATPase promove a saída de H^+ , que gera um gradiente favorável a entrada de Na^+ , através de canais (em amarelo). A Na^+,K^+ -ATPase (NKA, em roxo) transporta o Na^+ captado para o plasma do organismo, além de promover a entrada do K^+ , que é ciclado por canais basolaterais (em laranja). IC: meio intracelular. EC: meio extracelular. Modificado de MARSHALL, 2002.

1.4 Justificativas

Na literatura pesquisada, se observa uma carência de estudos que abordem os protocolos de transferência (gradual ou abrupto) utilizados em estudos com teleostes, e sua possível interferência na eurihalinidade. Da mesma forma, não foi encontrado na literatura pesquisada nenhum artigo de NKA e $V-H^+$ -ATPase em lambari, piracanjuba, carpa capim, tilápia do Nilo, baúna, robalo e baiacu, que foram teleostes estudados na tese, que identificasse a marcação ou a relação entre estas marcações e atividades enzimáticas com a história evolutiva ou o ambiente dos teleostes estudados. A marcação de enzimas não possui muitos estudos, mesmo em grupos de teleostes não analisados nesta tese.

1.5 Hipóteses

Capítulo 1:

- O protocolo de transferência interfere na discussão da eurihalidade do teleósteo.
- A transferência gradual aumenta a salinidade limite tolerada e o tempo tolerado na salinidade limite.

Capítulo 2:

- A enzima NKA tenha uma localização mais concentrada (localizada) em teleósteos diádromo e marinho/estuarino, com maiores atividades enzimáticas do que dulcícolas;
- Os peixes dulcícolas primários possuam uma localização mais espalhada (dispersa, menos localizada) de V-H⁺-ATPase, sendo esta mais abundante em teleósteos dulcícolas, com maiores atividades enzimáticas.

2 OBJETIVOS

2.1 *Objetivos gerais*

Identificar a influência do protocolo de aclimação sobre os padrões de eurihalidade de teleósteos e relacionar a distribuição da NKA e V-H⁺-ATPase constitutivas de teleósteos de água doce e aclimatados em água do mar com suas histórias evolutivas e com o ambiente aquático que foram coletados.

2.2 *Objetivos específicos*

Capítulo 1:

- Identificar, através da análise de resultados da literatura, se o protocolo de transferência interfere no grau de eurihalidade do teleósteo.

Capítulo 2:

- Relacionar o padrão de distribuição e atividades enzimáticas da NKA e V-H⁺-ATPase de teleósteos dulcícolas primários e secundários de água doce e teleósteos aclimatados em água do mar;

- Sugerir a ancestralidade dos teleósteos, a partir de informações da literatura e dos resultados da tese.

REFERÊNCIAS

BUCKUP, P.A. Sistemática e biogeografia de peixes de riachos. **Oecologia Australis**. v. 6, 1999.

EVANS, D.H.; PERMARINI, P.M. & CHOE, KP. The multifunctional fish gill: dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation, and excretion of nitrogenous waste. **Physiological Reviews**, v. 85, pgs. 97-177, 2005.

EVANS, D.H. & CLAIBORNE, J.B. **Osmotic and Ionic Regulation in Fishes**. In: EVANS, D.H. (ed.). *Osmotic and Ionic Regulation: cells and animals*. CRC Press, 2009.

FENWICK, J. C.; WENDERLAAR BONGA, S. E. & FLIK, G. In vivo bafilomycin-sensitive Na⁺ uptake in young freshwater fish. **Journal of Experimental Biology**. v. 202, pgs. 3659–3666, 1999.

FREIRE, C.A.; AMADO, E.M.; SOUZA, L.R.; VEIGA, M.P.T.; VITULE, J.R.S.; SOUZA, M.M; & PRODOCIMO, V. Muscle water control in crustaceans and fishes as a function of habitat, osmoregulatory capacity, and degree of euryhalinity. **Comparative Biochemistry and Physiology**. v. 149, pgs. 435-446, 2008.

GOSS, G.; GILMOUR, K.; HAWKINGS G.; BRUMBACH, J.H.; HUYNH, M. & GALVEZ, F. Mechanism of sodium uptake in PNA negative MR cells from rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* as revealed by silver and copper inhibition. **Comparative Biochemistry and Physiology**. v. 159, v. 234-241, 2011.

HIROI, J.; YASUMASU, S.; McCORMICK, S.D.; HWANG P-P. & KANEKO, T. Evidence for an apical Na–Cl cotransporter involved in ion uptake in a teleost fish. **Journal of Experimental Biology**. v. 211, pgs. 2584-2599, 2008.

HORISBERGER, J-D.; LEMAS, V.; KRAEHENBIHL, J-P. & ROSSIER, B.C. Structure-function relationship of Na,K-ATPase. **Annual Review of Physiology**. v.53, pgs. 565-584, 1991.

HWANG, P-P. Ion uptake and acid secretion in zebrafish (*Danio rerio*). **Journal of Experimental Biology**, v. 212, pgs. 1745-1752, 2009.

HWANG, P.P.; LEE, T-H. & LIN, L-Y. Ion regulation in fish gills: recent progress in the cellular and molecular mechanisms. *American Journal Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, v. 302, pgs. R28-R47, 2011.

JORGENSEN, P.L.; HÅKANSSON, K.O. & KARLISH, S.J.D. Structure and mechanism of Na⁺,K⁺-ATPase: Functional sites and their interactions. **Annual Review of Physiology**. v.65, pgs. 817-849, 2003.

LEGUEN, I.; PRUNET, P. Effect of hypotonic shock on cultured pavement cells from freshwater or seawater rainbow trout gills. **Comparative Biochemistry and Physiology**. v. 137, pgs. 259-269, 2004.

MARSHALL, W.S. Na^+ , Cl^- , Ca^{2+} and Zn^{2+} transport by fish gills: retrospective review and prospective synthesis. **The Journal of Experimental Zoology**, v. 293, pgs. 264–283, 2002.

MARSHALL, W.S. & GROSELL, M. Ion transport, osmoregulation, and acid-base balance. *In*: Evans DH & Claiborne JB (Eds). **The Physiology of Fishes**, Taylor & Francis, 2006.

MARSHALL, W.S.; HOWARD J.A.; COZZI, R.R & LYINCH, E.M. NaCl and fluid secretion by intestine of teleost *Fundulus heteroclitus*: involvement of CFTR. **The Journal of Experimental Biology**, v. 205, pgs. 745 –758, 2002.

McCORMICK, S.D. & BRADSHAW, D. Hormonal control of salt and water balance in vertebrates. **General and Comparative Endocrinology**. v. 147, pgs. 3-8, 2006.

McCORMICK, S.D.; REGISH, A.M. & CHRISTENSEN, A.K. Distinct freshwater and seawater isoforms of Na^+/K^+ -ATPase in gill chloride cells of *Atlantic salmon*. **The Journal of Experimental Biology**, v. 212, pgs. 3994-4001, 2009.

MOYES, C.D.; SCHULTE, P.M. **Principles of Animal Physiology**. 2ª edição. British Columbia, 2009.

NELSON, J.S. **Fishes of the World**. [S.I.]: John Wiley & Sons, Inc, 2006.

OUATTARA, N'G.; BODINIER, C.; NÈGRE-SADARGUES, G.; D'COTTA, H.; MESSAD, S.; CHARMANTIER, G.; PANFILLI, J. & BAROILLER, J.F. Changes in gill ionocyte morphology and function following transfer from fresh to hypersaline waters in the tilapia *Sarotherodon melanotheron*. **Aquaculture**, v. 290, pgs. 155-164, 2009.

SAKAMOTO, T.; KOZAKA, T.; TAKAHASHI, A.; KAWAUCHI, H. & ANDO, M. Medaka (*Oryzias latipes*) as a model for hypoosmoregulation of euryhaline fishes. **Aquaculture**, v. 193, pgs. 347-354, 2001.

STRANGE, K. Cellular volume homeostasis. **Advances in Physiology Education**. v. 28, pgs. 155–159, 2004.

UCHIDA, K.; KANEKO, T.; MIYAZAKI, H.; HASEGAWA, S.; HIRANO, T. Excellent salinity tolerance of Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*): elevated chloride cell activity in the branchial and opercular epithelia of the fish adapted to concentrated seawater. **Zoological Science**, v. 17, pgs. 149-160, 2000.

WEHNER, F.; OLSEN, H.; TINEL, H.; KINNE-SAFFRAN, E. & KINNE, R.K.H. Cell volume regulation: osmolytes, osmolyte transport, and signal transduction. **Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology**. v. 148, pgs. 1–80, 2003.

WILLMER, P.; STONE, G. & JOHNSTON, I. **Environmental physiology of animals**. Second edition. Blackwell Science, Oxford, U.K. 2005.

WILSON, J.M. **The use of immunochemistry in the study of branchial ion transport mechanisms**. *In*: BALDISSEROTTO, B.; ROMERO, J.M.M. & KAPOOR, B.G. (eds). Fish Osmoregulation. CRC Press, 2007.

WILSON, J.; LAURENT, P.; TUFTS, B.L.; BENOS, D.J.; DONOWITZ, M.; VOGL, A.W. & RANDALL, D.J. NaCl uptake by the branchial epithelium in freshwater teleost fish: an immunological approach to ion-transport protein localization. **Journal of Experimental Biology**. v. 203, pgs. 2279-2296, 2000.

WOOD, C.M.; KELLY, S.P.; ZHOU, B.; FLETCHER, M.; O'DONELL, M.; ELETTI, B. & PÄRT, P. Cultured gill epithelia as models for the freshwater fish gill. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1566, pgs. 72-83, 2002.

WOOD, C.M. & PÄRT, P. Cultured branchial epithelia from freshwater fish gills. **The Journal of Experimental Biology**, v. 200, pgs. 1047-1059, 1997.

CAPÍTULO 1

Análise de literatura sobre protocolos de transferência a diferentes salinidades e a influência no grau de eurihalinidade de teleósteos.

RESUMO

A tolerância fisiológica de um organismo aquático a diferentes salinidades determina seu grau de eurihalidade. Animais estenohalinos toleram uma pequena faixa de variação de salinidade, enquanto animais eurihalinos toleram uma ampla faixa de variação de salinidade. Quando os teleósteos são submetidos a uma variação de salinidade, o organismo pode ser capaz de ativar respostas compensatórias a este estresse. Estas respostas se configuram em respostas de curto prazo, sem a ativação de expressões gênicas para regular a atividade de proteínas, e longo prazo, podendo alterar a taxa de expressão de proteínas. A ativação destas respostas pode ser diferenciada conforme o desenho experimental escolhido pelo pesquisador, através da definição do protocolo e intensidade ou duração do desafio salino imposto. Estudos que identificam a tolerância de teleósteos podem ser realizados através de protocolos de transferência gradual ou abrupta a diferentes salinidades. Em ambos os protocolos, o pesquisador pode optar por investigar as respostas osmorregulatórias conforme o tempo de exposição a uma determinada salinidade. No modelo teórico de SCHULTZ & McCORMICK (2013), que serviu de base para idealizar o capítulo desta tese, a transferência gradual permite um maior tempo de tolerância do teleósteo na salinidade limite tolerada, e/ou uma maior salinidade limite tolerada. Artigos foram analisados (1974-2016) através da base de busca Web of Science (107 artigos). Destes, 52 foram com transferências graduais, e as metodologias mais utilizadas foram de análise de sobrevivência, osmolalidade e hidratação tecidual. Foi possível identificar que espécies diádromas foram as mais utilizadas em estudos com transferências graduais e/ou abruptas. As ordens Perciformes e Salmoniformes foram as mais estudadas. A correlação de Pearson permitiu observar que em teleósteos dulcícolas submetidos a transferências graduais a aumentos de salinidade, há um maior tempo de tolerância na salinidade limite, confirmando parcialmente o modelo teórico de SCHULTZ & McCORMICK (2013). Na análise de cada estudo, pode-se observar que em geral, os teleósteos possuem uma maior tolerância diante transferências graduais, além de manter de forma mais adequada as concentrações iônicas e hidratação tecidual. A atividade ou expressão da NKA (Na^+ , K^+ -ATPase) em geral aumenta com o aumento de salinidade, e a de V- H^+ -ATPase diminui com o aumento de salinidade. A tolerância dos teleósteos em diferentes salinidades pode ser influenciada por sua história evolutiva (que interfere em sua capacidade de ativar mecanismos osmorregulatórios), e também parece estar mais relacionada ao tempo de exposição a diferentes salinidades do que à transferência gradual ou abrupta.

Palavras-chaves: eurihalidade, transferência gradual e/ou abrupta, respostas osmorregulatórias, tempo de ativação

ABSTRACT

The physiological tolerance of an aquatic organism to different salinities can determine your euryhalinity. Estenohaline animals tolerate a small range of salinity variation, while eurihaline animals tolerate a wide range of salinity variation. When teleosts are submitted to a salinity variation, they can be able to activate compensatory responses to this stress. These responses can be of short term, without regulation of proteins, and long term, when the expression of proteins can be changed. These responses can be differentiated according the experiment chosen by the researcher, through the protocol, intensity and duration of the salinity challenge. The studies that identify the teleosts tolerance can be made through gradual or abrupt exposures to different salinities. At both of protocols, the researcher can investigate osmoregulatory responses according the time of exposure at a salinity. In theoretical model of SCHULTZ & McCORMICK (2013), which was the basis for to think in this chapter, the gradual exposure allows a higher tolerance time at limit salinity, and/or a higher salinity tolerated. Papers were analyzed (1974-2016) through Web of Science (107 papers). Of total papers, 52 were with gradual exposure, and the tolerance, osmolality and tissue water content were the most used methodologies. It was possible to identify that diadromous species were the most used for both protocols. The Perciformes and Salmoniformes orders were the most studied. Pearson Correlation allowed to observe that freshwater teleosts have a higher tolerance time at limit salinity when submitted to gradual increase of salinity, partially confirming the theoretical model of SCHULTZ and McCORMICK (2013). At each study analysis was observed that, in general, teleosts have a higher tolerance at gradual exposure, besides the better maintenance of ionic levels and tissue water content. The activity or expression of the NKA (Na^+, K^+ -ATPase) increase with salinity increase, in general, and of the V-H^+ -ATPase decrease with salinity increase. The teleosts tolerance can be influenced by evolutionary history (that interfere in osmoregulatory activations), and also seems to be related with the exposure time to different salinities than gradual or abrupt exposures.

Key-words: euryhalinity, gradual and/or abrupt exposure, osmoregulatory responses, activation time

1 INTRODUÇÃO

1.1 Osmorregulação, eurihalidade e desenho experimental

A distribuição de teleósteos no ambiente aquático está relacionada com a capacidade destes organismos tolerarem diferentes variáveis ambientais (como temperatura, pH e salinidade). A osmorregulação está relacionada a manutenção de água e sal no plasma e, portanto, influencia na tolerância do animal à salinidade, conforme as respostas celulares ativadas, de curto e longo prazo (BUCKUP, 1999). Os tempos de ativação de respostas osmorregulatórias podem influenciar a tolerância fisiológica da espécie estudada (SCHULTZ & McCORMICK, 2013) e portanto, sua migração e/ou estabelecimento para ambientes aquáticos com distintas salinidades.

Portanto, a utilização de diferentes protocolos de transferência (gradual ou abrupto) a diferentes salinidades podem influenciar no grau de eurihalidade dos teleósteos (SCHULTZ & McCORMICK, 2013). Em transferências graduais o organismo é submetido a variação de salinidade de uma forma que o permita se aclimatar à salinidade anterior (Figura 1.1A). Neste protocolo, a pré-aclimação possibilita a espécie aumentar as chances de resistir a transferências subsequentes a outras salinidades (SCHOFIELD *et al.*, 2010), já que permite um maior tempo para o organismo ativar respostas, até nível gênico, como reduções ou aumentos de expressões de RNAm (FIOL & KÜLTZ, 2007).

Em transferências abruptas (ou diretas), a transferência para a salinidade desejada se faz a partir da salinidade controle sem períodos de pré-aclimação (Figura 1.1B). Isto permite ativar mecanismos compensatórios, como as atividades enzimáticas. No entanto, nem todos organismos conseguem ativar respostas de longo prazo (FIOL & KÜLTZ, 2007). O estresse, por ser mais severo, em princípio diminui a possibilidade de tolerância do animal quanto maior a variação do agente estressor (SCHOFIELD *et al.*, 2010). Por isto, em modelo teórico de SCHULTZ & McCORMICK (2013) relacionando o protocolo de transferência com o tempo de tolerância na salinidade limite, é demonstrado que em transferências graduais há um maior tempo de tolerância

na salinidade limite. Adicionalmente, em teoria, a salinidade limite também é maior do que a identificada em transferências abruptas.

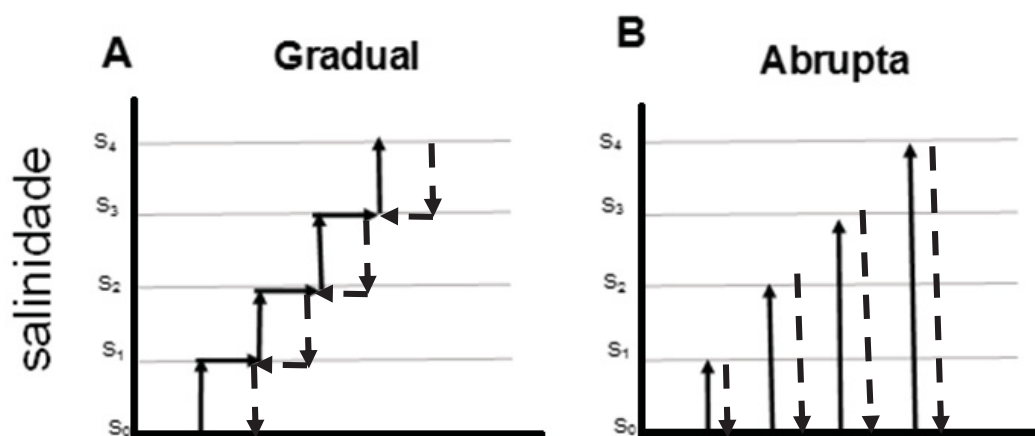


Figura 1.1 – Representação de uma transferência gradual (A) e abrupta (B), em aumentos e reduções (setas tracejadas) de salinidade. Nestes exemplos, a variável estressora (e.g.: salinidade) é o principal fator que diferencia as respostas fisiológicas. No experimento gradual o animal aquático atinge a salinidade limite a partir da submissão de salinidades intermediárias (pré-aclimatação). Na exposição abrupta, a transferência da salinidade controle à experimental é direta. S4 representa a salinidade máxima experimental, e S0, a de mínima. Fonte: a autora.

Transferências graduais, portanto, permitem uma melhor avaliação da tolerância crônica dos animais expostos a diferentes salinidades, necessitando um menor número de peixes para se observar o resultado da possível interferência da salinidade nas respostas osmorregulatórias. Por outro lado, a simplicidade do desenho experimental no caso da transferência abrupta permite melhor comparação entre estudos. Ela é também a melhor opção para entender e/ou explicar a tolerância de animais dulcícolas em estuários, onde os animais podem ser rapidamente expostos a grande variação de salinidade (SCHULTZ & McCORMICK, 2013). Obviamente, na natureza, a aproximação a um ambiente estuarino pode também ser gradual, mas o teste abrupto em laboratório pode permitir inferências mais seguras a respeito da tolerância dos peixes ao aumento brusco ou redução brusca de salinidade, conforme o caso.

Tanto em transferências graduais ou abruptas, o tempo para coleta e análise de amostras podem ser feitos por experimentos crônicos ou agudos, de acordo com a duração total do experimento. Experimentos crônicos são aqueles em que o organismo fica exposto à determinada variável a um tempo

geralmente longo, que pode levar semanas para se retirar o organismo e avaliar suas condições fisiológicas. Quando o protocolo é agudo, o tempo de análise destas condições pode levar desde horas a dias, retirando algumas amostras da população conforme o tempo. Neste exemplo, transferências graduais podem ser realizadas quando a mudança de salinidade ocorre ao longo de 5-10% do tempo total de transferência. Portanto, exposições agudas geralmente acompanham transferências abruptas a variações de salinidade.

A variação de salinidade que os teleósteos encontram no ambiente natural são identificadas em regiões costeiras ou entre-marés do oceano, e em estuários, que são corpos d'água entre os ambientes dulcícola e marinho (BRUSCA & BRUSCA, 2005). Desta forma, espécies que toleram águas estuarinas devem comportar uma estratégia que permita regular com eficiência a secreção e captação ativa de íons, conforme o ambiente que vivem e eventuais mudanças de salinidade a que sejam expostas, dado que peixes são osmorreguladores (e.g: EVANS *et al.*, 2005). Assim, teleósteos que migram ou habitam estuários devem possuir estratégias osmorregulatórias para lidar com salinidades variáveis (WILLMER *et al.*, 2005).

Existem mais espécies marinhas em estuários do que dulcícolas. Isto é resultado de restrições fisiológicas. Também, de maneira interessante, em seu ciclo de vida, teleósteos marinhos entram em diversos períodos em estuários de forma mais frequente que dulcícolas. Aparentemente, é mais "fácil" para o teleósteo marinho migrar para a água doce do que para o teleósteo dulcícola migrar para o oceano. Uma das razões para isto é a de que o aumento de salinidade pode acarretar em desnaturação de proteínas com maior facilidade do que em reduções de salinidade (FREIRE & PRODOCIMO, 2007).

A eurihalidade em teleósteos define qual a faixa da tolerância em relação a variação de salinidade (FREIRE *et al.*, 2008). A eurihalidade pode se distinguir em sentidos ecológicos e fisiológicos. Enquanto a eurihalidade ecológica refere-se à ocorrência da espécie em água doce, salobra ou do mar (halohabitat), a eurihalidade fisiológica faz referência a capacidade que a espécie tem de tolerar a salinidades destes ambientes aquáticos, ou mesmo a variação de salinidade entre os mesmos (SCHULTZ & McCORMICK, 2013). Assim, animais aquáticos estenohalinos toleram estreitas faixas de variações de salinidade, enquanto os eurihalinos podem migrar e eventualmente se

estabelecer em distintas salinidades. Entre as espécies eurihalinas, existem teleósteos que têm o período reprodutivo em água doce, mas habitam água do mar (anádromos) e os que migram da água doce para a água do mar para o período reprodutivo (catádromos) (WILLMER *et al.*, 2005).

O grau de eurihalidade de uma espécie depende em conjunto dos mecanismos de osmosensores na sinalização do possível estresse osmótico (FIOL & KÜLTZ, 2007). Quando eficazes, estes mecanismos possibilitam uma resposta de ajuste e evitam a morbidade e mortalidade do organismo. A morte do organismo é a primeira avaliação para determinar o grau de tolerância de uma espécie ou do estágio de vida desta espécie a uma variação de salinidade. Possíveis mudanças na osmolalidade ou concentrações iônicas (SCHULTZ & McCORMICK, 2013) e desidratação tecidual (FREIRE *et al.*, 2008) também são metodologias para se avaliar esta tolerância.

A tolerância fisiológica, portanto, está relacionada com a ativação de mecanismos compensatórios que permitam o teleósteo manter a homeostase sem configurar um estresse osmótico. Qual a possível influência do protocolo de transferência a variações de salinidade sob esta tolerância fisiológica?

1.2 Idealização do capítulo

Os autores SCHULTZ & McCORMICK (2013), que propuseram o modelo teórico em que a transferência gradual aumenta a salinidade limite tolerada e o tempo tolerado nesta salinidade, pesquisaram artigos em peixes que tratassem de transferências a variações de salinidade, entre os períodos de 1971-2012, com a base de pesquisa Aquatic Sciences and Fisheries Abstracts. Como poucas referências analisaram a tolerância em elasmobrânquios (peixes cartilaginosos, não teleósteos), e nenhuma em sarcopterídeos (peixes ósseos, não teleósteos), os autores confinaram a análise em 108 estudos com 141 teleósteos. A partir deste montante, os autores elaboraram a filogenia entre as espécies/famílias conforme seus graus de tolerância.

A partir da leitura deste estudo, e dos resultados de CERON (2012), que demonstrou a sobrevivência de tilápias do Nilo transferidas a 20‰ por 24 horas, de forma abrupta, foi discutido a elaboração deste capítulo teórico, para

identificar as principais diferenças entre os protocolos experimentais de transferência em diferentes salinidades.

2 OBJETIVO

Investigar, pela literatura, a relação entre os protocolos de transferências de salinidade com a tolerância fisiológica (eurihalinidade) de teleósteos submetidos a diferentes salinidades.

3 METODOLOGIA

Buscas no Web of Knowledge e Web of Science, de literatura relacionada aos efeitos de salinidades diferentes sobre a sobrevivência, homeostasia extracelular, e atividades enzimáticas branquiais de peixes teleósteos, em exposições abruptas e/ou graduais. As palavras chaves de busca foram: *espécie e/ou grupo + *osmoregulation ou water content ou enzyme activities + abrupt exposure ou gradual exposure.

O levantamento de dados na literatura, através das bases Web of Science e Web of Knowledge pelo periódico da Capes, entre os meses de 05/2010 a 19/08/2016, datados de 1974-2016. Primeiramente foi feita uma análise quantitativa dos artigos pesquisados, para cada tipo de transferência e metodologia, relacionando as espécies utilizadas nos mesmos, aos distintos grupos (ordens) e ambientes. Depois, foi feita a análise da correlação entre transferência x salinidade x tempo através de correlação de Pearson, com nível de significância de $< 0,05$. Para esta análise, foram avaliados apenas artigos que fazem referência direta da sobrevivência dos teleósteos conforme o desafio salino.

Pela correlação de Pearson (transferência x salinidade x tempo de tolerância) para teleósteos marinhos e/ou estuarinos, a transferência não interfere na salinidade tolerada. Também, para estes últimos, quanto maior a salinidade menor a tolerância de tempo. Para avaliar de forma mais efetiva esta interferência entre salinidade x tempo, foi calculada a diferença entre a salinidade aclimatada e a salinidade experimental, e novamente feito a

correlação de Pearson para estes teleósteos (marinhos ou estuarinos). Isto pois, para um teleósteo marinho, por exemplo, a aclimação de 35‰ para uma salinidade 30‰, com um gradiente de 5‰, gera - a princípio, menor desafio salino do que um teleósteo aclimatado em 15‰ transferido para 30‰ (gradiente de 15‰). Nesta segunda análise de correlação (com o gradiente de salinidade, e não a salinidade diretamente), não houve interferência entre as variáveis transferência x salinidade x tempo de exposição.

Em teleósteos dulcícolas submetidos a aumentos de salinidade, a correlação foi positiva entre a transferência gradual e o tempo de exposição, ou seja, quando comparada a transferência abrupta, a transferência gradual permite um maior tempo de exposição na salinidade limite.

4 RESULTADOS

4.1 Quantidade de estudos/protocolos e metodologias

Dos 107 artigos analisados, 52 utilizam a transferência gradual para a avaliação da tolerância fisiológica de teleósteos diante desafios salinos. As metodologias que avaliam mecanismos osmorregulatórios de curto prazo, como regulação da concentração iônica e hidratação tecidual, além das taxas de sobrevivência (tolerância) são as mais utilizadas, visto que já respondem se o animal é ou não tolerante. É observado o aumento de estudos de proteínas osmorregulatórias, de forma a complementar, ou explicar, como se dá estas respostas osmorregulatórias (Tabela 1.1).

Tabela 1.1 – Número de estudos com suas metodologias principais (1974 – 2016): 107 artigos, utilizados para compilar todos os resultados presentes neste capítulo. Estes artigos pesquisados estão listados nas referências. (A): Estudos com transferências graduais e abruptas (B): Estudos com transferências graduais (C): Estudos com transferências abruptas.

(A)

Transferência abrupta e gradual	1974-1999	2000-2010	2011-2016	TOTAL
SOBREVIVÊNCIA (SOB)	0	2	0	2
AC	0	0	0	0
NKA	0	0	0	0
V-H ⁺ -ATPase	0	0	0	0

PROTEÍNAS (PROT)	0	1	0	1
TH/OSM (ou células, crescimento, hormônios e rins)	0	1	0	1
PROTEÍNAS/TH/OSM	0	1	3	4
SOB/PROT/TH/OSM	1	1	2	4
				12

(B)

Transferência gradual	1974-1999	2000-2010	2011-2016	TOTAL
SOBREVIVÊNCIA (SOB)	2	3	1	6
AC	1	0	1	2
NKA	2	2	0	4
V-H ⁺ -ATPase	0	0	0	0
PROTEÍNAS (PROT)		6	4	10
TH/OSM (ou células, crescimento, hormônios e rins)	5	1	7	13
PROTEÍNAS/TH/OSM	5	2	6	13
SOB/PROT/TH/OSM	0	2	2	4
				52

(C)

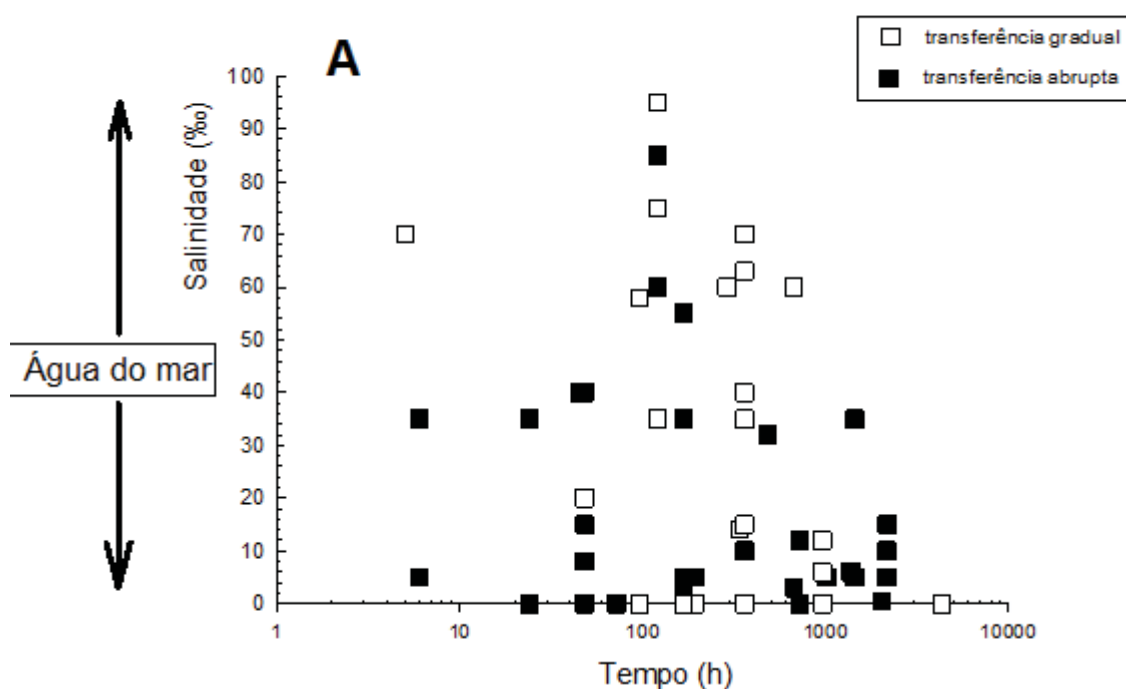
Transferência abrupta	1974-1999	2000-2010	2011-2016	TOTAL
SOBREVIVÊNCIA (SOB)	1	4	0	5
AC	0	0	0	0
NKA	0	2	1	3
V-H ⁺ -ATPase	0	1	0	1
PROTEÍNAS (PROT)	0	2	1	3
TH/OSM (ou células, crescimento, hormônios e rins)	1	7	7	15
PROTEÍNAS/TH/OSM	2	1	4	7
SOB/PROT/TH/OSM	3	3	3	9
				43

4.2 Quantidade de espécies/ordens utilizadas

A soma da quantidade de espécies utilizadas entre os 107 artigos pesquisados foi de 67. As ordens mais representativas são da ordem Perciformes, que possui bastante espécies eurihalinas com 18 espécies utilizadas, e 15 da ordem Salmoniformes, sendo 10 espécies diádromas.

4.3 Salinidade limite e tempo de exposição na salinidade limite conforme os protocolos de transferência

Através da correlação de Pearson, foi possível identificar a ausência de interferência entre o tipo de transferência (gradual e abrupta), a salinidade limite experimental e o tempo de exposição na salinidade limite tolerada para teleósteos marinhos ou dulcícolas submetidos a aumentos ou reduções de salinidade (Figura 1.3 A). Já para teleósteos dulcícolas submetidos a aumentos de salinidade, foi possível identificar uma correlação positiva entre a transferência gradual e o tempo de exposição na salinidade limite tolerada. Ou seja, a transferência gradual permite um maior tempo de tolerância na salinidade experimental (Figura 1.3 B).



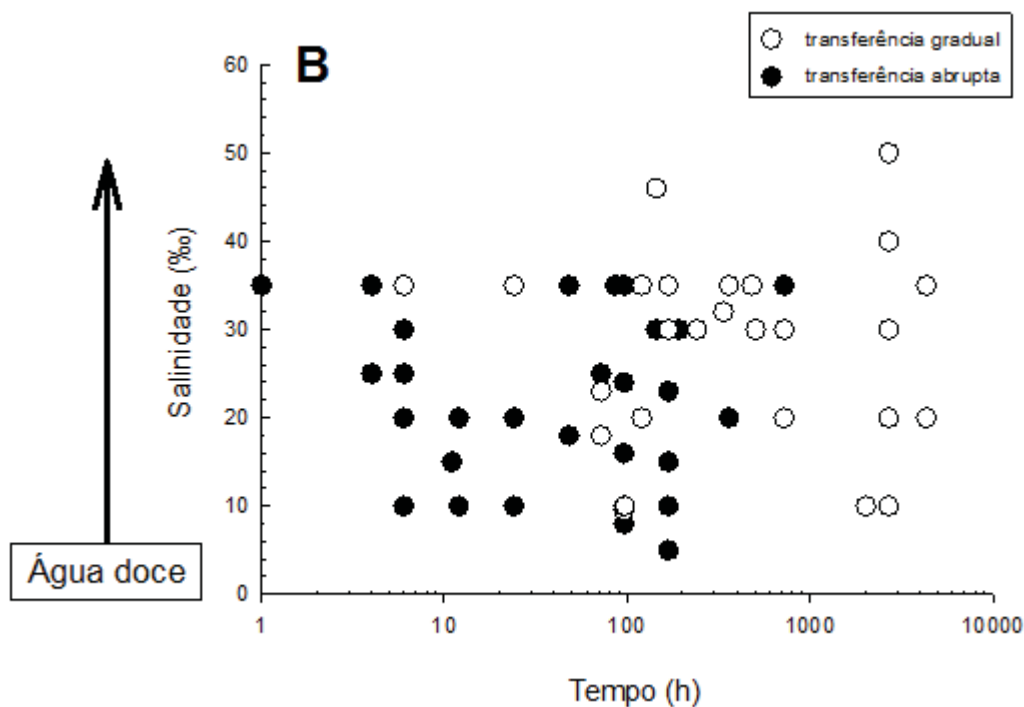


Figura 1.3 – Correlação de transferência x salinidade x tempo de tolerância entre (A) teleósteos marinhos e/ou estuarinos aclimatados em água salobra ou água do mar (24 artigos para a transferência gradual e 39 para a abrupta) e (B): teleósteos dulcícolas e/ou estuarinos aclimatados em água doce (32 artigos para a transferência gradual e 36 para a abrupta) (1974 – 2016): 75 artigos. Os artigos que não trataram diretamente da tolerância, se supôs a sobrevivência de 100% para a metodologia desenvolvida. Os artigos não avaliados (32) para elaborar o gráfico são artigos que tratam de células (morfologia a partir de aclimação ou ensaio *in vitro*), *locus* gênico de uma população, salinidade combinado com metal e/ou temperatura, avaliação na própria salinidade aclimatada (sem transferência a outra salinidade), avaliação no local de coleta ou tolerância em dias após a eclosão. Estes artigos somam os 107 utilizados para compilar todos os resultados presentes neste capítulo. Estes artigos pesquisados estão listados nas referências.

4.4 Resultados principais dos artigos pesquisados, conforme o protocolo de transferência utilizado

A análise de cada artigo permitiu identificar as principais similaridades e diferenças entre as transferências graduais e/ou abruptas em protocolos de variações de salinidade, entre as ordens e habitats de diferentes teleósteos. De maneira geral, a osmolalidade é maior em maiores salinidades, bem como a atividade branquial de NKA. A atividade de V-H⁺-ATPase em geral é menor em maiores salinidades, e nem sempre a expressão destas proteínas foi alterada diante desafios salinos. A salinidade limite tolerada, em valores absolutos, é maior em transferências graduais, embora isto não tenha sido confirmado nos resultados de correlação. As atividades enzimáticas também podem ser

diferentes conforme o protocolo de transferência e/ou o ambiente dos teleósteos (Tabela 1.2). Alguns dos resultados dos artigos podem ser observados nas sessões abaixo (4.4.1 e 4.4.2).

4.4.1 Estudos de osmorregulação com teleósteos, em relação a transferência gradual e/ou abrupta (exemplos)

O jundiá, *Rhamdia quelen*, é exclusivamente dulcícola. Sua transferência abrupta para as salinidades 5, 15 e 25‰, dentro de 6 horas promove estresse osmótico (aumento de osmolalidade e perda tecidual) na maior salinidade, provavelmente por desajustes na atividade enzimática da AC (SOUZA-BASTOS & FREIRE, 2009).

O ciclídeo tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*, tolera águas hipersalinas (46‰) em transferências graduais (LEMARIÉ *et al.*, 2004). Estudos com protocolos de transferência abrupta evidenciam um tempo de tolerância de 24 horas em 20‰ (tempo máximo observado nesta salinidade), e até 9 horas (CERON, 2012) ou 4 horas (GÜNER *et al.*, 2005) em água do mar (35‰). Do mesmo gênero, a tilápia mossambicana *O. mossambicus* aclimatada em salinidade da água do mar não altera sua hidratação tecidual (TANG *et al.*, 2009), enquanto a transferência abrupta a partir da água doce provoca mortalidade dentro de 6 horas já na salinidade de 30‰ (HWANG *et al.*, 1989).

Em *mumichog*, *Fundulus heteroclitus*, eurihalino, a aclimação em água do mar e sequente transferência abrupta a águas hipersalinas promove diminuição da permeabilidade do epitélio intestinal dentro de 24 horas (GENZ & GROSELL, 2011). Esta mesma espécie, quando transferida abruptamente de água doce a água do mar, tem um aumento da osmolalidade a partir de 12 horas, e retorno dos valores das concentrações iônicas a valores próximos de água doce, após 4 dias (MARSHALL *et al.*, 1999). Quando esta espécie é aclimatada em salinidade 3,5‰ e após transferida abruptamente para água doce ou água do mar, os valores de NaCl se reestabelecem dentro de 2 horas (WOOD, 2011). Com este mesmo desenho experimental, foi estudado o transporte de íons no epitélio opercular. Neste estudo, as concentrações iônicas foram reestabelecidas após 7 dias (WOOD & LAURENT, 2003).

A truta arco-íris, *Oncorhynchus mykiss*, tolera a exposição a água do mar em transferências graduais (PRODOCIMO *et al.*, 2007). Este período permite a espécie ajustar sua atividade enzimática, com o aumento da atividade de NKA e diminuição da de V-H⁺-ATPase (GILMOUR *et al.*, 2012). Já a transferência abrupta à água do mar promove aumento de osmolalidade proporcional à salinidade, junto ao aumento das concentrações iônicas de NaCl, Mg⁺ e K⁺. Estes desajustes osmorregulatórios resultam em estresse osmótico (AL-JANDAL & WILSON, 2011) e mortalidade dentro de dois dias (BATH & EDDY, 1979).

Desta forma, pode-se identificar que o protocolo escolhido interfere na tolerância da espécie, possivelmente devido aos desajustes osmorregulatórios mais severos diante da transferência abrupta.

4.4.2 Estudos de osmorregulação com teleósteos, em relação a transferência crônica ou aguda (exemplos)

Protocolos de transferência gradual ou abrupta podem ter tempos de avaliação diferenciados, conforme a exposição crônica (longo prazo, dias) ou aguda (curto prazo, geralmente horas). Este tempo de avaliação pode refletir o tempo de ativação de respostas osmorregulatórias nas espécies avaliadas. Quando o desenho experimental compara os resultados da transferência abrupta com a gradual, podemos relacionar estes protocolos com os tempos analisados. Também podemos analisar distintos efeitos de uma exposição crônica ou aguda quando distintos tempos são feitos para a avaliação de respostas osmorregulatórias.

AL-AMOUDI (1987) demonstrou que em transferência gradual, algumas espécies de tilápias foram capazes de sobreviver a água do mar, quando mantidas por dois dias em salinidades menores. Também foi identificado que o tempo médio de aclimatação em salinidades mais baixas, para se atingir a salinidade limite, foi de 4 a 8 dias. Já em transferência abrupta para água do mar há 100% de mortalidade dentro de 24 horas.

Em um estudo com *killifish*, *F. seminolis*, a transferência gradual foi feita de água doce a 32‰, com aumentos da salinidade a cada 4 horas. A taxa de sobrevivência foi de 100% até 32‰. Em outro experimento, a transferência

abrupta de água doce para 8, 16, 24 e 32‰ teve taxas de mortalidade avaliadas a cada hora, de 0-12 horas de experimento, a cada 6 horas, de 12-48 horas, e a cada 12 horas, de 48-96 horas. A salinidade mais alta promoveu 100% de mortalidade dentro de 13 horas (DIMAGGIO *et al.*, 2009).

Em estudo de ARJONA *et al.* (2007) com espécies de sole senegalês, *Solea senegalensis*, os autores avaliaram respostas de curto e longo prazo em diferentes salinidades. A espécie foi transferida de forma abrupta de água 38‰ para salinidades de 5, 15, 38 e 55‰, e amostras foram coletadas antes da transferência (grupo pré-transferência) e em 1, 3, 7 e 17 dias após a transferência. A osmolalidade mais baixa nas salinidades menores do que em relação ao grupo controle (38‰), e a osmolalidade mais alta na maior salinidade quando comparado também ao controle foi transiente, e após 8 dias, os valores da osmolalidade foram semelhantes. A atividade de NKA branquial foi menor em 5 e 15‰ após 7 dias, e maior em 55‰ após 3 dias, quando comparado ao grupo controle.

Em salmonídeos, *Salvelinus namaycush* e *S. fontinalis*, quando na transferência gradual, não houve mortalidade entre as espécies. A NKA aumentou de atividade conforme a salinidade nas duas primeiras espécies, enquanto em *Salmo salar*, a atividade foi alta já em água doce. Já na transferência abrupta de água doce para 30‰, a atividade branquial da enzima NKA aumentou em até 7 dias com mortalidades de 20 a 50% durante 6 dias de transferência. Neste mesmo estudo, com *Salmo salar*, não houve mortalidade nem diferença nas atividades branquiais de NKA (HIROI & McCORMICK, 2007).

Em um estudo com *seas breams*, *Sparus aurata*, expostos a salinidades de 5 a 60‰, em protocolos agudos (2 a 192 horas) e crônicos (2 semanas), a atividade branquial da NKA manteve uma “forma de U”, ou seja, com menores atividades em salinidades intermediárias e maiores atividades na salinidade mais baixa e na água hipersalina. No estresse agudo, a atividade aumentou dentro de 24 e 96 horas, permanecendo alta até 192 horas (LAIZ-CARRIÓN *et al.*, 2005).

Assim, pode-se identificar que o tempo de exposição influencia nas respostas osmorregulatórias, diante protocolos de transferência gradual ou abrupta.

Tabela 1.2 – Dados obtidos da literatura, datados de 1974-2016, relacionando nº de espécies/ordem de teleósteos (actinoptérgios), ambientes aquáticos que habitam ou migram, principais resultados e referência. Grupo: Teleósteos. Total de artigos plotados (1974-2016): 107, utilizados para compilar todos os resultados presentes neste capítulo. Estes artigos pesquisados estão listados nas referências. Enzimas (atividade ou expressão): AC (anidrase carbônica), NKA (Na^+ , K^+ - ATPase), e V-H^+ -ATPase. TH (teor hídrico muscular). Ordens em seqüência alfabética.

(Nº espécies)/ordem/habitat	Resultados diante de exposição gradual e abrupta (ga), gradual (g) apenas, ou abrupta (a) apenas	Referências
(3) Acipenseriformes (diádroma)	(g/a) Maior osmolalidade e atividade branquial de NKA em água do mar (g) FW, 10 e 33‰ (4 meses): osmolalidade proporcional a salinidade (g) FW e 15‰ (2 meses): aumento NaCl e atividade branquial NKA (a) Diminuição teor hídrico e recuperação após 20 dias	Martinez-Alvarez et al., 2002 Allen et al., 2011 Allen et al., 2014 Zhao et al., 2016
(2) Anguiliformes (diádroma)	(g) NHE renal aumenta com aumento da salinidade; NKCC2 sem diferenças; NCC tende a aumentar com diminuição da salinidade (a) água doce à 30‰ não altera atividade da AC branquial (g) 100% sobrevivência até 105‰, manutenção da osmolaridade	Haswell et al., 1983 Teranishi et al., 2013
(1) Atheriniforme (diádroma)		Wedderburn et al., 2016
(1) Beloniformes (marinha)	(a) RNAm NKA é 3 vezes maior em aclimatação à água doce em relação à do mar	Kang et al., 2008
(2) Beloniformes (dulcícola/estuarina)	(g) FW/SW (33 dias): Maior expressão de isoformas de NKA em SW	Bollinger et al., 2016
(1) Clupeiformes (diádroma)	(g) Variações de salinidades afetam apenas concentrações de Cl^-	Engel et al., 1987
(1) Cypriniformes (dulcícola)	(a) Morrem dentro de 12h em 15‰ (juvenis)	Hwang & Hirano, 1985
(6) Cyprinodontiformes (dulcícola; dulcícola/estuarina)	(g/a) Maior expressão NKCC em maiores salinidades. Menor atividade NKA em menores salinidades (g) Tolerância em transferência para água hipersalina (g) Diminui 11% influxo Na^+ e 33% Cl^- em SW. Valores controle de NaCl restabelecidos em 3 dias (g) Maior imunoreatividade V-H^+ -ATPase em baixos níveis de sódio (g) Maior osmolalidade e teor hídrico constante em água doce-água do mar. Maior atividade branquial NKA em água do mar, embora menos abundante (a) Maior mortalidade em 5‰, aumento RNAm NKA branquial em 1 semana em 0,5‰ (a) TEP: negativo em água doce e positivo em água do mar. Reversão rápida na transferência de água do mar para doce, mas o inverso não ocorre rapidamente (a) Salinidade explica maior parte de alterações morfométricas durante embriogênese. Ureia ausente em todos estágios em 30‰, presente em 15‰. (a) Hipotonicidade diminui criptas apicais de MRC em água do mar. Sem diferença de densidades celulares (a) Aumento do influxo NaCl em água do mar, diminui 50% em 2h	Shikano & Fujio, 1998 Marshall et al., 1999 Daborn et al., 2001 Kato et al., 2003 Wood & Laurent, 2003 Wood & Grosell, 2008 Yang et al., 2009 Flemmer et al., 2010 Genz & Grosell, 2011 Yang et al., 2011 Wood, 2011 Brown et al., 2012 Patterson et al., 2012

	<p>(a) Aumento de número, tamanho e área NKA-IR cells em água do mar</p> <p>(a) Sem alteração na atividade de NKA na transferência de FW-SW (1h – 30 dias)</p> <p>(a) Down regulation NKCC1 branquial água do mar-água doce. Up regulation (4 a 5 vezes) água doce-água do mar, com colocalização com NKA</p>	<p>Amason <i>et al.</i>, 2013</p>
(1) Gadiformes (marinha/estuarina)	<p>(g/a) Menor crescimento em 32‰</p> <p>(g/a) Redução gradual de salinidade (2 dias) – transferência abrupta à 32‰ (56 dias), em diferentes estágios: até 13% de mortalidade (SW). Sem diferenças em NaCl</p> <p>(g/a) 0.5% de mortalidade em peixes pequenos, 7% em médios e 2% em grandes com aumento gradual de salinidade.</p>	
(1) Gonorynchiformes (diádroma)	<p>(g) Sem diferenças em teor hídrico em aumentos de salinidade, até água do mar</p> <p>(g) NKA, CFTR (apical) e NKCC e NKA (basolateral) em filamentos branquiais quando em água do mar e em filamentos e lamelas quando em água doce</p>	<p>Tang <i>et al.</i>, 2009</p> <p>Tang <i>et al.</i>, 2011</p>
(1) Osmeriformes (diádroma)	<p>(a) Morrem dentro de 6h em 30‰ (juvenis)</p>	<p>Hwang & Hirano, 1985</p>
(4) Perciformes (marinha/estuarina)	<p>(a) Diminuição do teor hídrico dentro de 12h (20‰) e dentro de 6h (30‰)</p> <p>(a) Redução do TH a partir de 5‰</p> <p>(g) 14 a 30‰ (14 dias): sem diferença na osmolalidade, nem número de MRC's</p> <p>(a) 93% sobrevivência em 10‰ (15 dias)</p> <p>(a) Maior osmolalidade 20 e 30‰ do que 10 e 5‰ (6 semanas)</p> <p>(a) (aclim em 20‰): 4 a 20‰ por 15 dias: NaCl e K maior em 20 do que em 4‰</p> <p>(a) 0, 10 e 20‰: Na⁺, K⁺, Cl⁻ sem diferenças (15 dias)</p> <p>(a) FW por 8h até 7 dias. Plasma, Cl⁻, Mg⁺, Ca⁺² reduz após 24h (Cl⁻ e Mg⁺ recupera em 7 dias)</p> <p>(a) Maior densidade MRC em 20 dias (40‰) e maior tamanho em 40 dias</p> <p>(a) 5 a 35‰: 100% sobrevivência, aumento osmolalidade conforme salinidade</p> <p>(a) 100% mortalidade em 8 dias em água doce</p> <p>(a) Menor atividade branquial NKA em alevinos. Aumento atividade NKA em 12h, diminuição em 20 dias, mortalidade</p> <p>(a) (aclim em 30‰): 3 a 32‰ 15 dias: Maior NKA em 3‰</p> <p>(a) 5, 15 e 31‰ (90 dias): NKA branquial em forma de U (menor atividade em 15‰)</p> <p>(a) Sem efeito na atividade e localização NKA em FW (7 dias)</p> <p>(a) Aumento atividade V-H⁺-ATPase intestinal em 55‰</p> <p>(a) Redução Cl⁻ muscular, sem diferença no TH em FW (7 dias)</p>	<p>Watanabe <i>et al.</i>, 1985</p> <p>Al-Amoudi, 1987</p> <p>Hwang, 1987</p> <p>Villegas, 1990</p> <p>Cataldi <i>et al.</i>, 1991</p> <p>Kültz <i>et al.</i>, 1992</p> <p>Baldissotto <i>et al.</i>, 1994</p> <p>Madsen <i>et al.</i>, 1994</p> <p>Likongwe <i>et al.</i>, 1996</p> <p>Morgan <i>et al.</i>, 1997</p> <p>Vonck <i>et al.</i>, 1998</p> <p>Nolan <i>et al.</i>, 1999</p> <p>Caberoy & Quinito, 2000</p> <p>Ostrensky, 2000</p> <p>Uchida <i>et al.</i>, 2000</p> <p>Kubitza, 2000</p> <p>Fontainhas-Fernandes <i>et al.</i>, 2002</p> <p>Weng <i>et al.</i>, 2002</p> <p>Lee <i>et al.</i>, 2003</p> <p>McCormick <i>et al.</i>, 2003</p> <p>Nugon Jr, 2003</p> <p>Lemarié <i>et al.</i>, 2004</p> <p>Sardella, 2004</p> <p>Güner, 2005</p> <p>Karsi & Yavuzcan Yildiz, 2005</p>
(9) Perciformes –	<p>(g/a) Sem diferença em imunofluorescência de brânquias ou rins em 20‰ comparando a água doce.</p>	

<p>dulçicolia/estuarina</p>	<p>(g/a) Maior tolerância a aumento de salinidade (g/a) Aumento de atividade NKA branquial em 30‰ e 65% de água do mar (g/a) Maior NCC e NHE em água doce (g/a) Aumento NKCC branquial em água do mar (g) Nenhuma mortalidade até 20‰, redução de linfócitos e maior expressão TGF em menores salinidades (g) 96h a 18‰ – desequilíbrio hidromineral (alevinos) (g) SLM de 46 a 123‰. Quantidade de sal x mortalidade proporcionais nos primeiros dias (g) SLM 54‰ (eurihalina) a 115‰ (mais eurihalina) e 97-112‰ (híbridos). (g) Aumento NaCl dentro de 8 horas em água do mar (g) Aumento AC branquial proporcional ao aumento de salinidade (g) Aumento atividade NKA branquial em 23-25‰ (g) Aumento da atividade e expressão NKA branquial em diminuição de salinidade (g) Sem diferenças em teor hídrico em aumentos de salinidade, até água do mar (g) Prolactina: mantém densidade iônica de água doce; influência nos níveis de RNAM de NCC e NKA. Cortisol: Efeito estimulatório na expressão de RNAM de NCC e NKA, quando junto com PRL. (a) 100% mortalidade em água do mar (1h) (a) Sobrevivência depende do estágio de vida e sofre interferência da pré aclimação (a) 100% mortalidade dentro de 24h em 23‰ (a) 81% sobrevivência em 15‰, 50% em 20‰ e 0% em 35‰: relacionado ao tamanho do corpo (a) 100% mortalidade em 90 minutos em 30‰ (a) 81% de mortalidade em 20‰ e 100% em 35‰ dentro de 97 horas (alevinos) (a) 100% mortalidade em 25,4‰ (alevinos) (a) Mortalidade dentro de 9h em 35‰ e ~12h em 30‰ (a) Mortalidade dentro de 6h em 30‰ (a) Mortalidade dentro de 6h em 35‰ (2 resultados idênticos) (a) Mortalidade dentro de 4h em 35‰ (2 resultados idênticos) (a) 100% de mortalidade em 19‰ dentro de 96 horas (alevinos) (a) SLM de 19,8‰ (alevinos) (a) SLM de 19,5‰ (eurihalina); 25,4‰ (mais eurihalina) (a) Melhores crescimentos em 10‰. Em 20‰ apresentam descamações epiteliais (a) Descamações na pele em 16‰ e 32° (a) Diminui área glomerular em água do mar, aumento do lúmen tubular 20‰ (a) Nascidos e mantidos em várias salinidades: maior densidade de MRC em água doce e do mar, assim como atividade NKA. Osmolaridade linear à salinidade. (a) Osmolaridade aumenta após 6h em peixes transferidos de FW para SW. BW-SW menor aumento em 6h, retorno após 24h. SW-FW diminui após 48h, valores controle em 7 dias. (a) Maior abundância de MRC cells em água do mar, maior área em água doce e salobra (a) Aumento osmolaridade em 30‰ (a) Aumento de osmolaridade conforme salinidade (2 a 20‰) (a) Aumento osmolaridade a partir de 20‰, em 24h diminui</p>	<p>Kubtiza, 2005 Plechnik <i>et al.</i>, 2006 Tang <i>et al.</i>, 2008 Tang <i>et al.</i>, 2009 Bodnier <i>et al.</i>, 2009 DiMaggio <i>et al.</i>, 2009 Univali, 2009 Breves, 2010 Kammerer <i>et al.</i>, 2010 Schofield, 2010 Gutierrez, 2011 Ceron, 2012 Lorin-Nebel <i>et al.</i>, 2012 Weakley <i>et al.</i>, 2012 Baysoy <i>et al.</i>, 2013 Choi <i>et al.</i>, 2013 Gregório <i>et al.</i>, 2013 Sterzelecki <i>et al.</i>, 2013 Zhao <i>et al.</i>, 2013 Perez-Velasquez <i>et al.</i>, 2014 Watson <i>et al.</i>, 2014 Garcia <i>et al.</i>, 2015 Lisboa <i>et al.</i>, 2015 Moorman <i>et al.</i>, 2015 Nakkrasae <i>et al.</i>, 2015 Suárez-Batista & Rodriguez-Forero, 2015 Vargas-Chacoff <i>et al.</i>, 2015 Gui <i>et al.</i>, 2016 Timm <i>et al.</i>, 2016 Watanabe <i>et al.</i>, 2016</p>
-----------------------------	---	---

	<p>(a) Aumento osmolaridade dentro de 24h em água do mar, retorna a valores controle em 4 dias</p> <p>(a) Aumento de Na⁺ e K⁺ dentro de 3 dias em 18‰</p> <p>(a) Aumenta Na⁺ dentro de 3h, pico em 12h, em 96h retorna valores controle</p> <p>(a) Maior atividade NKA em 25‰, diminui em salinidades maiores que 30‰</p> <p>(a) Aumento atividade NKA branquial dentro de 1h em 25‰, e 1,5h em 35‰</p> <p>(a) Maior atividade NKA branquial em aumento de salinidade</p> <p>(a) 2 e 8 ‰ (14 dias): aumento de 49 e 39% atividade NKA branquial</p> <p>(a) Aumento atividade branquial NKA dentro de 12h em 20‰ e de 6h em 30‰</p> <p>(a) Dobro da atividade NKA branquial dentro de 4 dias em água do mar</p> <p>(a) Atividade NKA branquial duas vezes maior em água do mar e 5 vezes maior em 180‰ água do mar em relação a água doce</p> <p>(a) Atividade branquial NKA aumenta em água doce e renal aumenta em água do mar (+ confinamento)</p> <p>(a) Aumento da expressão de NKA branquial em água do mar, comparada a água doce, porém sem aumento de atividade</p> <p>(a) Aumento de RNAM e atividade branquial de NKA em 12h (água doce-salobra), diminui atividade dentro de 5h (água doce – água do mar)</p> <p>(a) Maior expressão NKCC1 e CFTR em aumento de salinidade</p> <p>(a)NCC branquial: expressão diminui em 6h tilápias de FW-SW. BW-SW diminuição retorna a valores controle em 48h. SW-FW aumenta, pico em 48h. NKCC/CFTR: FW-SW: aumento dentro de 6h. BW-SW aumenta, pico em 24h. SW-FW diminui, valores controle em 48h/24h (CFTR). NKA/NHE: FW-SW: diminui dentro de 6h. BW-SW aumenta, pico em 48h. SW-FW aumenta dentro de 24h-7dias/6h-24h (NHE).</p> <p>(a) Teor hídrico diminui de 78 (água doce) para 72% (água do mar) em alevinos</p>	
(5) Perciformes (diádrroma)	<p>(g/a) Diminuição de expressão de RNAm ATPases em geral e diminuição CFTR em água doce</p> <p>(g) 40 dias (0,6, 12 e 24‰): atividade NKA branquial maior em 6 e 12‰ (forma de U)</p> <p>(a) 5 e 35 ‰ (6, 24 e 96h; 30 e 60 dias): 100% sobrevivência</p> <p>(a) Aumento atividade NKA em água do mar em relação a menores salinidades</p> <p>(a) Colocalização de V-H⁺-ATPase e NKA em 15‰ e 32‰. Maior expressão V-H⁺-ATPase em água doce e com hipercapnia</p> <p>(a) Sem alteração na NKA branquial em 32‰, renal 16% menor</p> <p>(a) Maior atividade NKA branquial em 96h SW</p> <p>(a) Sem diferença em atividade NKA, aumento de NKA-IR cells; maior expressão CFTR em maiores salinidades</p> <p>(a) Aumento teor hídrico em 19‰. Diminuição Na⁺ e aumento em Cl⁻</p> <p>(a) 150mOsm, para 300 e 450 mOsm (células renais): menor atividade, expressão NKA e tamanho celular</p> <p>(a) 100% mortalidade em água doce dentro de 24h</p> <p>(a) Aumento de cortisol em salinidades extremas, proteínas diminuem (5 e 55‰)</p>	Haswell <i>et al.</i> , 1983 Hwang & Hirano, 1985 Brown & Tyler, 1993
(2) Pleuronectiformes (marinha)		

<p>(3) Pleuronectiformes (marinha/estuarina)</p>	<p>(a) Osmolaridade proporcional à salinidade (a) NKA branquial: formato de "U", menor atividade em 15‰, renal: proporcional à salinidade (a) NKA branquial proporcional à salinidade, sem diferença na NKA renal (a) Cortisol maior em 15 e 55‰ do que em 5 e 38‰</p> <p>(g) Diminuição de Cl⁻ em água doce. Maior atividade branquial NKA (a) Não sobrevivem mais que 48h em água doce (juvenis) (a) Maior absorção de água em água do mar, maior osmolaridade (a) Alteração na concentração de Cl⁻ em diluições de salinidade (a) Sem alteração de NKA branquial em diluições de salinidade</p>	<p>Gaumet <i>et al.</i>, 1995 Sampaio & Bianchini, 2002 Arjona <i>et al.</i>, 2007 Herrera <i>et al.</i>, 2009</p>
<p>(1) Pleuronectiformes (diádroma) (3) Salmoniformes (marinha/estuarina) (2) Salmoniformes (dulcícola) (10) Salmoniformes (diádroma)</p>	<p>(a) Água doce à 30‰ não altera atividade AC branquial (g) Salinidade x eutanásia: Mg²⁺, Na⁺, plasma concentrações maiores em SW</p> <p>(g) Maior expressão NKA branquial, porém com igual atividade/ igual expressão V-H⁺-ATPase com menor atividade: em água do mar comparado a doce; aumenta RNAm de AC (g) Aumento da expressão proteica em estuário, comparado à água doce</p> <p>(g/a) Aumento V-H⁺-ATPase (4 vezes) de água do mar para água doce; aumento de expressão, anterior a atividade, de NKA (4-5 vezes) de água doce para do mar + ingestão de água, aumento de íons (a) Aumento de osmolaridade em aumento de salinidade, diminuição progressiva do teor hídrico em 25 e 35‰. Aumento de Na⁺ e Mg²⁺ no plasma e músculo, Cl⁻ e Ca²⁺ no plasma, K⁺ no músculo (a) Interferência de expressões alélicas na tolerância a transferências de salinidade</p> <p>(a) Maior concentração de magnésio na urina em água do mar (a) Espécies mais tolerantes a água do mar (2 semanas) ou água doce (1 mês) (a) Diminuição de NaCl em até 24h em água doce</p>	<p>Leadem <i>et al.</i>, 1974 Bath & Eddy, 1979 Morgan & Iwama, 1998 Hawkins <i>et al.</i>, 2004 Hiroi <i>et al.</i>, 2007 Prodócimo <i>et al.</i>, 2007 Al-Jandal & Wilson, 2011 Bystryanski & Schulte 2011 Norman <i>et al.</i>, 2011 Gilmour <i>et al.</i>, 2012 Papakostas <i>et al.</i>, 2012 Stewart <i>et al.</i>, 2016 Oikari, 1978</p>
<p>(2) Scorpaeniformes (marinha/estuarina)</p>	<p>(a) Maior atividade AC branquial em 25‰, sem diferença AC renal (a) Diminui teor hídrico em 25‰ (6h)</p>	<p>Souza-Bastos & Freire, 2009</p>
<p>(1) Tetraodontiformes (marinha/estuarina) (2) Tetraodontiformes (dulcícola/estuarina)</p>	<p>(a) Embriões transferidos para 5 até 40‰ (45h). 7.8% de sobrevivência em 5‰, 89.6% em 40‰. Osmolaridade acompanha salinidade</p> <p>(g/a) Colocalização branquial de NKA e NKCC em água doce e água do mar. CFTR apical em água do mar, ausente em água doce (g) Sem diferenças em teor hídrico em aumentos de salinidade, até água do mar (a) Atividade NKA branquial maior em água do mar</p>	<p>Lin <i>et al.</i>, 2004 Lee <i>et al.</i>, 2005 Prodócimo <i>et al.</i>, 2008 Tang <i>et al.</i>, 2009 Tang <i>et al.</i>, 2011 Li <i>et al.</i>, 2014 Pérez-Robles <i>et al.</i>, 2016</p>

<p>(1) Tetraodontiformes (diádroma)</p>	<p>(a) Diminuição da atividade renal de NKA em diluição de salinidade</p> <p>(a) 100% mortalidade em 1 e 0‰ (a) Pré aclimatação em 25‰ não influencia tolerância (a) 10, 20 e 30‰, por 8 dias: Aumento osmolalidade conforme salinidade. Aumento rápido da atividade de NKA (pico em 48h), gradual retorno ~ FW em 8 dias. (a) Sem alteração na atividade NKA</p>	
---	---	--

5 DISCUSSÃO

A transferência gradual é o principal protocolo utilizado nos estudos de osmorregulação com teleósteos. A regulação das concentrações iônicas foram as principais metodologias identificadas para se avaliar a tolerância de teleósteos tanto em transferências graduais quanto abruptas. Esta manutenção, combinada a atividade ou expressão de proteínas com potenciais osmorregulatórios é crescente ao longo dos anos quando se avalia o protocolo de transferência abrupta. A avaliação da concentração iônica sinaliza se o organismo está em um ambiente desafiador para a sua homeostase. Por outro lado, analisar as proteínas que auxiliam na manutenção destas concentrações pode pontuar quando há um estresse osmótico (desregulação da concentração interna e perda da hidratação tecidual) do organismo. Logo, em uma transferência abrupta, as combinações destas metodologias dão mais fundamentos para a discussão do pesquisador sobre a tolerância fisiológica (ou a não tolerância) dos teleósteos estudados.

Espécies diádromas são as mais utilizadas tanto em protocolos de transferência gradual ou abrupta. Esta observação faz sentido, visto que estas espécies possuem uma maior tolerância fisiológica diante de variações de salinidade. Assim, os resultados podem indicar quais são as respostas compensatórias utilizadas pelos teleósteos. Espécies estritamente marinhas, nos artigos analisados, são utilizadas apenas em protocolos de transferência abrupta. De forma semelhante, espécies marinhas que podem migrar para estuário são mais utilizadas em protocolos de transferência abrupta. Por outro lado, espécies dulcícolas que podem migrar para estuário são mais utilizadas em protocolos de transferência gradual. Visto que a transferência abrupta configura um estresse mais severo para a tolerância fisiológica dos teleósteos, estes resultados são coerentes com o discutido em FREIRE & PRODOCIMO (2007), que tratam da “maior facilidade” de teleósteos marinhos tolerarem reduções de salinidade do que teleósteos dulcícolas, aumentos de salinidade. As ordens Perciformes e Salmoniformes foram as mais utilizadas nos estudos avaliados, principalmente com espécies dulcícolas que podem migrar a estuários (Perciformes) e diádromas (Salmoniformes).

Pode-se observar, através da análise dos resultados dos artigos analisados, que protocolos de aumentos de salinidade, com aclimação em água doce ou estuarina, são mais frequentes quando comparados a protocolos de reduções de salinidade. Possivelmente, pois há mais espécies dulcícolas e/ou diádromas estudadas. Também se observa que a transferência gradual, para teleósteos dulcícolas, aumenta o tempo de exposição na salinidade limite tolerada, confirmando de forma parcial o modelo teórico proposto por SCHULTZ & McCORMICK (2013). Assim, pela análise da correlação, pode-se sugerir que o maior tempo de tolerância na salinidade limite está relacionado ao tempo de ativação de respostas osmorregulatórias. Isto pois, se o teleósteo ativa respostas osmorregulatórias de atividades de proteínas constitutivas ou reguladas em um menor tempo, sua tolerância a princípio é maior do que o teleósteo que ativa respostas osmorregulatórias com um maior tempo necessário.

Na análise dos dados dos artigos, a salinidade limite tolerada pelos teleósteos é, em geral, maior em transferências graduais do que em transferências abruptas, embora este resultado não tenha sido confirmado pela correlação. De forma similar, em ambos os protocolos, a osmolalidade é maior em maiores salinidades, e a atividade branquial de NKA em geral é maior em maiores salinidades. A atividade branquial de V-H⁺-ATPase em geral é maior em salinidades mais baixas. A expressão de ambas as proteínas nem sempre foi influenciada pela variação de salinidade. As salinidades experimentais toleradas pelos teleósteos, de acordo com SCHULTZ & McCORMICK (2013, podem sofrer influências do desenho experimental, da espécie ou ordem. Assim, a análise destes autores conclui, similar a discussão desta tese, que o grau de eurihalinidade está relacionado ao habitat da espécie, bem como a história evolutiva da mesma, representada pelo seu táxon.

Analisando os resultados observados diante a transferência gradual a diferentes salinidades, percebe-se a manutenção do teor hídrico tecidual e um maior tempo (dias) para alteração da expressão de proteínas osmorregulatórias. Comparando resultados avaliados em Cyprinodontiformes, observa-se que o retorno de valores iônicos próximos a uma salinidade controle (água doce ou do mar) levam um maior tempo do que em

transferências abruptas. A exposição gradual confere um grau “natural” de tolerância do animal (SCHULTZ & McCORMICK, 2013).

Diante da transferência abrupta, o teor hídrico geralmente diminui em maiores salinidades, e a recuperação do mesmo é observada após dias (MARTÍNEZ-ÁLVAREZ, 2002). A alteração da expressão de proteínas osmorregulatórias é observada até mesmo após horas. A exposição abrupta a salinidades variadas nos faz discutir o potencial que a espécie tem em dispersar para distintos ambientes aquáticos, sem que sua homeostase seja comprometida.

A transferência abrupta requer a ativação de mecanismos rápidos no organismo para tolerar a salinidade submetida, como aumentos da atividade enzimática para manter a concentração de íons e o teor hídrico dentro de valores que possibilitem a homeostasia do organismo. A longo prazo, ou seja, em uma situação crônica, o organismo necessita expressar mais proteínas que mantenham esta atividade. Mesmo espécies muito eurihalinas requerem um tempo para iniciar o processo desta transcrição (e.g.: CABEROY & QUNITIO, 2000; SHIKANO & FUJIO, 1998; BODINIER *et al.*, 2009; YANG *et al.*, 2011; PATTERSON *et al.*, 2012). Em uma exposição abrupta, normalmente o organismo não está “preparado” para este choque. O teleósteo é exposto ao agente estressor em um tempo muito curto, não permitindo que o organismo efetivamente esta manutenção a nível enzimático, tão pouco a nível molecular.

Mesmo que a curto prazo e que esta manutenção da atividade enzimática seja suficiente, as atividades enzimáticas frente a variações de salinidade se mostram distintas conforme o tipo de exposição e/ou o habitat da espécie. Por exemplo, a atividade da AC branquial é constante em transferências abruptas (HASWELL *et al.*, 1983), e proporcional a salinidade em graduais (KÜLTZ *et al.*, 1992). A NKA branquial apresenta maior atividade em água doce (espécies marinhas) (SAMPAIO & BIANCHINI, 2002) e maior atividade em água do mar (espécies dulcícolas). Em maiores salinidades o tempo para aumentar a atividade de NKA em espécies dulcícolas é menor (HWANG, 1987). O NKCC é mais expresso em estuário em *O. niloticus*, e em água do mar em *O. mossambicus* (BREVES *et al.*, 2010).

Desta forma, a pré-aclimação a uma salinidade intermediária a que será submetida pode facilitar este processo osmorregulatório, e assim

umentar a resistência do animal a outras variações de salinidade (SHIKANO & FUJIO, 1998; BALDISSEROTTO *et al.*, 1994; ARJONA *et al.*, 2007; DiMAGGIO *et al.*, 2009). Ainda, a história evolutiva da espécie pode servir para explicar seus mecanismos osmorregulatórios e suas tolerâncias frente às variações de salinidade, ou mesmo interferir nestes ajustes osmorregulatórios, pela ausência ou não da capacidade da espécie reestruturar seu organismo frente uma variação fisiológica (SCHULTZ & McCORMICK, 2013).

De todo modo, mesmo em uma exposição abrupta, algumas espécies possuem a capacidade de ativar respostas osmorregulatórias, conforme o tempo em que são avaliadas. Esta discussão pode ser feita a partir da análise de estudos que não avaliaram o tempo máximo de tolerância a uma salinidade não letal. Como exemplo, em CERON (2012), foi identificado 100% de sobrevivência em transferência abrupta de tilápia do Nilo à salinidade de 20‰, dentro de 24 horas. Se este tempo fosse estendido, esta taxa de sobrevivência seria equivalente? Quais seriam as respostas osmorregulatórias ativadas?

Pode-se discutir o fator tempo também a partir da observação de desenhos experimentais que avaliaram a tolerância máxima a uma salinidade limite. Quais seriam os processos osmorregulatórios ativados na espécie, em tempos menores de avaliação de sua tolerância, ou seja, anterior a sua mortalidade?

Este capítulo permitiu discutir a tolerância fisiológica de diferentes teleósteos em relação ao protocolo de transferência escolhido, concluindo que a transferência gradual interfere no tempo de tolerância do teleósteo em uma salinidade experimental limite. Sugere-se a formulação de desenhos experimentais que possibilitem comparar a tolerância fisiológica de um teleósteo diante diferentes protocolos de transferência, priorizando a avaliação da influência do tempo na ativação de respostas compensatórias, a exemplo dos artigos de MARSHALL *et al.* (1999) e ARJONA *et al.* (2007). Ou seja, que durante o tempo de tolerância sejam analisados os mecanismos ativados, ou que o tempo de observação em uma salinidade limite seja estendido.

6 CONCLUSÕES

Espécies diádromas pertencentes as ordens Perciformes e Salmoniformes são as mais utilizadas em protocolos de transferência gradual ou abrupta. Espécies marinhas são mais utilizadas em protocolos de transferência abrupta, e dulcícolas, em protocolos de transferência gradual. A correlação positiva entre transferência gradual e tempo de exposição tolerado na salinidade experimental confirma em parte o modelo teórico elaborado por SCHULTZ & McCORMICK (2013), para espécies dulcícolas. Sugere-se que o efeito maior sobre tolerância ou atividade e expressão de enzimas é mais determinado pelo tempo, já que este confere a ativação de mecanismos osmorregulatórios, do que propriamente a exposição gradual ou abrupta a distintas salinidades. Além disso, que os mecanismos compensatórios de osmorregulação do organismo, determinada pela sua história evolutiva, também influencia a ativação de respostas compensatórias, e logo, sua tolerância ou estabelecimento no ambiente. Portanto, é válido a elaboração de estudos que priorizem a avaliação da influência do tempo durante o estudo da osmorregulação, diante de transferências graduais ou abruptas.

REFERÊNCIAS CAPÍTULO 1

AL-AMOUDI, M.M. Acclimation of commercially cultured *Oreochromis* species to sea water – an experimental study. **Aquaculture**. v. 65, pgs. 333-342, 1987.

AL-JANDAL, A.J. & WILSON, R.W. A comparison of osmoregulatory responses in plasma and tissues of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) following acute salinity challenges. **Comparative Biochemistry and Physiology**. v. 159, pgs. 175-181, 2011.

ALLEN, P.J.; McENROE, M.; FOROSTYAN, T.; COLE, S. NICHOLL, M.N.; HODGE, B. & CECH JR, J.J. Ontogeny of salinity tolerance and evidence for seawater-entry preparation in juvenile Green sturgeon, *Acipenser medirostris*. **Journal of Comparative Physiology**. v. 181, pgs. 1045-1062, 2011.

ALLEN, P.J.; MITCHELL, Z.A.; DeVRIES, R.J.; ABOAGYE, D.L.; CIARAMELLA, M.A.; RAMEE, S.W.; STEWART. H.A. & SHARTAU. R.B. Salinity effects on Atlantic sturgeon (*Acipenser oxyrinchus oxyrinchus* Mitchill, 1815) growth and osmoregulation. **Journal of Applied Ichthyology**. v. 30, pgs. 1229-1236, 2014.

ARJONA, F.J.; VARGAS-CHACOFF, L.; RUÍZ-JARABO, I.; MARTÍN-DEL RÍO, M.P. & MANCERA, J.M. Osmoregulatory response of Senegalese sole (*Solea senegalensis*) to

changes in environmental salinity. **Comparative Biochemistry and Physiology**. v.148, pgs. 413-421, 2007.

ÁRNASON, T.; MAGNADÓTTIR, B.; BJÖRNSSON, B.; STEINARSSON, A. & BJÖRNSSON, B.T. Effects of salinity and temperature on growth, plasma ions, cortisol and immune parameters of juvenile Atlantic cod (*Gadus morhua*). **Aquaculture**. v. 380-383, pgs. 70-79, 2013.

BALDISSEROTTO, B.; MIMURA, O.M. & SALOMÃO, L.C. Urophyseal control of plasma ionic concentration in *Oreochromis mossambicus* (PISCES) exposed to osmotic stress. **Ciência e Natura**. v. 16, pgs. 39-50, 1994.

BATH, R.N. & EDDY, F.B. Salt and water balance in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) rapidly transferred from freshwater to seawater. **Journal of Experimental Biology**. v. 83, pgs. 193-202, 1979.

BAYSOY, E. ATLI, G. & CANLI, M. The Effects of salinity and salinity+metal (chromium and lead) exposure on ATPase activity in the gill and intestine of Tilapia *Oreochromis niloticus*. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**. v. 64, pgs. 291-300, 2013.

BODINIER, C.; LORIN-NEBEL, C.; CHARMANTIER, G. & BOULO, V. Influence of salinity on the localization and expression of the CFTR chloride channel in the ionocytes of juvenile *Dicentrarchus labrax* exposed to seawater and freshwater. **Comparative Biochemistry and Physiology**. v. 153, pgs. 345-351, 2009.

BOLLINGER, R.J.; MADSEN, S.S.; BOSSUSL, M.C. & TIPSMARKI, C.K. Does Japanese medaka (*Oryzias latipes*) exhibit a gill Na^+/K^+ -ATPase isoform switch during salinity change?. **Journal of Comparative Biology**. v. 186, pgs. 485-501, 2016.

BREVES, J.P.; WATANABE, S.; KANEKO, T.; HIRANO, T. & GRAU, G. Prolactin restores branchial mitochondrion-rich cells expressing Na^+/Cl^- cotransporter in hypophysectomized Mozambique tilapia. **American Physiological Society**. v. 99, pgs. 702-710, 2010.

BROWN, J.A & TYTLER, P. Hypoosmoregulation of larvae of the turbot, *Scophthalmus maximus*: drinking and gut function in relation to environmental salinity. **Fish Physiology and Biochemistry**. v. 10, pgs. 475-483, 1993.

BROWN, C.A.; GALVEZ, F. & GREEN, C.C. Embryonic development and metabolic costs in Gulf killifish *Fundulus grandis* exposed to varying environmental salinities. **Fish Physiology and Biochemistry**. v. 38, pgs. 1071-1082, 2012.

BRUSCA, G.J. & BRUSCA, R.J. **Invertebrados**. 1ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.

BUCKUP, P.A. Sistemática e biogeografia de peixes de riachos. **Oecologia Australis**. v. 6, 1999.

BYSTRIANSKY, J.S.; SCHULTE, P.M. Changes in gill H^+ -ATPase and Na^+/K^+ -ATPase expression and activity during freshwater acclimation of Atlantic salmon (*Salmo salar*). **Journal of Experimental Biology**. v. 214, pgs. 2435-2442, 2011.

CABEROY, N.B. & QUINITIO, G.F. Changes in Na⁺, K⁺-ATPase activity and gill chloride cell morphology in the grouper *Epinephelus coioides* larvae and juveniles in response to salinity and temperature. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 23, pgs. 83-94, 2000.

CATALDI, E.; GARIBALDI, L.; CROSETTI, D.; LEONI, C. & CATAUDELLA, S. Variations in renal morphology during adaptation to salinities in tilapias. **Environmental Biology of Fishes**. v. 31, pgs. 101-106, 1991.

CERON, F.J.M. **Plasticidade osmorregulatória de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) e o uso de estuários como pontes de dispersão de peixes eurihalinos. (Dissertação)**. Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2012.

CHOI, K.; COPE, W.G.; HARMS, C.A. & LAW, J.M. Rapid decreases in salinity, but not increases, lead to immune dysregulation in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). **Journal of Fishes Diseases**. v. 36, pgs. 389-399, 2013.

DABORN, K.; COZZI, R.R.F. & MARSHALL, W.S. Dynamics of pavement cell-chloride cell interactions during abrupt salinity change in *Fundulus heteroclitus*. **Journal of Experimental Biology**, v. 204, pgs. 1889-1899, 2001.

DIMAGGIO, M.A.; OHS, C.L. & PETTY, B.D. Salinity tolerance of the Seminole killifish, *Fundulus seminolis*, a candidate species for marine baitfish aquaculture. **Aquaculture**, v. 293, pgs. 74-80, 2009.

ENGEL, D.W.; HETLER, W.F.; COSTON-CLEMENTS, L. & HOSS, D.E. Effects of abrupt salinity changes on the osmoregulatory abilities of the Atlantic menhaden *Brevoortia tyrannus*. **Comparative Biochemistry and Physiology**. v. 86, pgs. 723-727, 1987.

EVANS, D.H.; PERMARINI, P.M. & CHOE, KP. The multifunctional fish gill: dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation, and excretion of nitrogenous waste. **Physiological Reviews**, v. 85, pgs. 97-177, 2005.

FIOL, D.F. & KÜLTZ, D. Osmotic stress sensing and signaling in fishes. **Journal of Federation of European Biochemical Societies**. v. 274, pgs. 5790-5798, 2007.

FLEMMER, A.W.; MONETTE, M.Y.; DJURISIC, M.; DOWD, B.; DARMAN, R.; GIMENEZ, I. & FORBUSH, B. Phosphorylation state of the Na⁺-K⁺-Cl⁻ cotransporter (NKCC1) in the gills of Atlantic killifish (*Fundulus heteroclitus*) during acclimation to water of varying salinity. **The Journal of Experimental Biology**. v. 213, pgs. 1558-1566, 2010.

FONTAINHAS-FERNANDES, A.; GOMES, E.; REIS-HENRIQUES, M.A. & COIMBRA, J. Efeito da suplementação da dieta com NaCl no crescimento de tilápia *Oreochromis niloticus* cultivada em diferentes salinidades. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 54, pgs. 204-211, 2002.

FREIRE, C.A.; AMADO, E.M.; SOUZA, L.R.; VEIGA, M.P.T.; VITULE, J.R.S.; SOUZA, M.M. & PRODOCIMO, V. Muscle water control in crustaceans and fishes as a function of habitat, osmoregulatory capacity, and degree of euryhalinity. **Comparative Biochemistry and Physiology**. v. 149, pgs. 435-446, 2008.

FREIRE, C.A. & PRODOCIMO, V. Special challenges to teleost fish osmoregulation in environmentally extreme or unstable habitats. *In: Fish Osmoregulation* (eds. BALDISSEROTTO, B.; MANCERA, J.M. & KAPOOR, B.G.). **Science Publishers**, Enfield, pp. 249–276, 2007.

GARCIA, B.A.; PARTRIDGE, G.J.; FLIK, G.; ROQUES, J.A.C. & ABBINK, W. Ambient salinity and osmoregulation, energy metabolism and growth in juvenile yellowtail kingfish (*Seriola lalandi* Valenciennes 1833) in a recirculating aquaculture system. **Aquaculture Research**. v. 46, pgs., 2789-2797, 2015.

GAUMET, F.; BOEUF, G.; SEVERE, A.; LE ROUX, A. & MAYER-GOSTANT. Effects of salinity on the ionic balance and growth of juvenile turbot. **Journal of Fish Biology**. v. 47, pgs. 865-876, 1995.

GENZ, J. & GROSELL, M. *Fundulus heteroclitus* acutely transferred from seawater to high salinity require few adjustments to intestinal transport associated with osmoregulation. **Comparative Biochemistry and Physiology**. v. 160, pgs. 156-165, 2011

GILMOUR, K.M.; PERRY, S.F.; ESBAUGH, A.J.; GENZ, J.; TAYLOR, J.R. & GROSELL, M. Compensatory regulation of acid–base balance during salinity transfer in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Journal of Comparative Physiology**. v. 182, pgs. 259-274, 2012.

GREGÓRIO, S.F.; CARVALHO, E.S.; ENCARNAÇÃO, S.; WILSON, J.M.; POWER, D.M.; CANÁRIO, A.V. & FUENTES, J. Adaptation to different salinities exposes functional specialization in the intestine of the sea bream (*Sparus aurata* L.). **The Journal of Experimental Biology**. v. 216, pgs. 470-479, 2013.

GUI, L.; ZHANG, P.; LIANG, X.; SU, M.; WU, D. & ZHANG, J. Adaptive responses to osmotic stress in kidney-derived cell lines from *Scatophagus argus*, a euryhaline fish. **Gene**. v. 583, pgs. 134-140, 2016.

GÜNER, Y.; ÖZDEN, O.; ÇAGIRGAN, H.; ALTUNOK M.; KIZAK, V. Effects of salinity on the osmoregulatory functions of the gills in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Turkey Journal of Veterinary and Animal Science**, v. 29, pgs. 1259-1266, 2005.

GUTIERRE, S.M.M. **Ferramentas fisiológicas para avaliação do potencial invasor de peixes dulcícolas**. (Dissertação) Universidade Federal do Paraná, 73 p., 2011.

HASWELL, M.S.; RAFFIN, J-P & LERAY, C. An investigation of the carbonic anhydrase inhibitor in eel plasma. **Comparative Biochemistry and Physiology**. v. 74, pgs. 175-177, 1983.

HAWKINGS, G.S.; GALVEZ, F. & GOSS, G.G. Seawater acclimation causes independent alterations in Na⁺/K⁺-ATPase and H⁺-ATPase activity in isolated mitochondria-rich cell subtypes of the rainbow trout gill. **The Journal of Experimental Biology**. v. 207, pgs. 905-912, 2004.

HERRERA, M.; VARGAS-CHACOFF, L.; HACHERO, I.; RUÍZ-JARABO, I.; RODILES, A.; NAVAS, J.I. & MANCERA, J.M. Osmoregulatory changes in wedge sole (*Dicologlossa cuneata* Moreau, 1881) after acclimation to different environmental salinities. **Aquaculture Research**. v. 40, pgs. 762-771, 2009.

HIROI, J. & McCORMICK, S.D. Variation in salinity tolerance, gill Na⁺/K⁺-ATPase, Na⁺/K⁺/2Cl⁻ cotransporter and mitochondria-rich cell distribution in three salmonids *Salvelinus namaycush*, *Salvelinus fontinalis* and *Salmo salar*. **Journal of Experimental Biology**, v. 210, pgs. 1015-1024, 2007.

HWANG, P.P. Tolerance and ultrastructural responses of branchial chloride cells to salinity changes in the euryhaline teleost *Oreochromis mossambicus*. **Marine Biology**. v. 94, n. 4, p. 643-649, 1987.

HWANG, P.P & HIRANO, R. Effects of environmental salinity on intercellular organization and junctional structure of chloride cells in early stages of teleost development. **Journal of Experimental Zoology**, v. 236, pgs. 115-126, 1985.

HWANG, P-P.; SUN, C-M. & WU, S-M. Changes of plasma osmolality, chloride concentration and gill Na⁺-K⁺-ATPase activity in tilapia *Oreochromis mossambicus* during seawater acclimation. **Marine Biology**, v. 100, pgs. 295-299, 1989.

KAMMERER, B. D.; CECH JR., J. J.; KÜLTZ, D. Rapid changes in plasma cortisol, osmolality, and respiration in response to salinity stress in tilapia (*Oreochromis mossambicus*). **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 157, pgs. 260–265, 2010.

KANG, C.K.; TSAI, S.C.; LEE, T.H. & HWANG, P.P. Differential expression of branchial Na⁺/K⁺-ATPase of two medaka species, *Oryzias latipes* and *Oryzias dancena*, with different salinity tolerances acclimated to fresh water, brackish water and seawater. **Comparative Biochemistry and Physiology**. v.151, pgs. 566-575, 2008.

KARSI, A.; YAVUZCAN YILDIZ, H. Secondary stress response of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, after direct transfer to different salinities. **Tarim Bilimleri Dergisi**. v. 11, pgs. 139-141, 2005.

KATOH, F; HYODO, S & KANEKO, T. Vacuolar-type proton pump in the basolateral plasma membrane energizes ion uptake in branchial mitochondria-rich cells of killifish *Fundulus heteroclitus*, adapted to a low ion environment. **Journal of Experimental Biology**. v. 206, pgs. 793-803, 2003.

KUBITZA, F. **Tilápia: tecnologia e planejamento na produção comercial**. F. Kubitza, Jundiaí., 2000.

KUBITZA, F. Tilápia em água doce e salgada. **Revista Panorama de Aquicultura**. v. 15, 2005.

KÜLTZ, D.; BASTROP, R.; JÜRSS, K. & SIEBERS, D. Mitochondria-rich (MR) cells and the activities of the Na⁺/K⁺ - ATPase and carbonic anhydrase in the gill and opercular epithelium of *Oreochromis mossambicus* adapted to various salinities. **Comparative Biochemistry and Physiology**. v. 102, pgs. 293-301, 1992.

LAIZ-CARRIÓN, R.L.; GUERREIRO, P.M.; FUENTES, J.; CANARIO, A.V.M.; DEL RIO, M.A.M. & MANCERA, J. Branchial osmoregulatory response to salinity in the Gilthead Sea Bream, *Sparus auratus*. **Journal of Experimental Zoology**. v. 303, pgs. 563–576, 2005.

LEADEM, T.P.; CAMPBELL, R.D. & JOHNSON, D.W. Osmoregulatory responses of DDT and varying salinities in *Salmo gairdneri* I. Gill $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$. **Journal of Comparative Biochemistry and Physiology**. v. 49, pgs. 197-203, 1974.

LEE, T.H., FENG, S.H.; LIN, C.H.; HWANG, Y.H.; HUANG, C. L. & HWANG, P.P. Ambient salinity modulates the expression of sodium pumps in branchial mitochondria-rich cells of Mozambique tilapia, *Oreochromis mossambicus*. **Zoological Science**. v. 20, pgs. 29-36, 2003.

LEE, K.M.; KANEKO, T. & AIDA, K. Low-salinity tolerance of juvenile fugu *Takifugu rubripes*. **Fisheries Science**. v. 71, pgs. 1324-1331, 2005.

LEMARIÉ G., BAROILLER, J.F.; CLOTA, F.; LAZARD, J. & DOSDAT, A. A simple test to estimate the salinity resistance of fish with specific application to *O. niloticus* and *S. melanotheron*. **Aquaculture**, v. 240, pgs. 575-584, 2004.

LI, J.; WANG, J.; YANG, L.; CHEN, Y. & YANG, Z. Changes in plasma osmolality and Na^+/K^+ ATPase activity of juvenile obscure puffer *Takifugu obscurus* following salinity challenge. **Biochemical Systematics and Ecology**. v. 56, pgs. 111-117, 2014.

LIKONGWE, J.S.; STECKO, T.D.; STAUFFER, J.R. & CARLINE, R.F. Combined effects of water temperature and salinity on growth and feed utilization of juvenile Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (Linnaeus). **Aquaculture**. v. 146, pgs. 37-46, 1996.

LIN, C.H.; TSAI, R.S. & LEE, T.H. Expression and distribution of Na, K-ATPase in gill and kidney of the spotted green pufferfish, *Tetraodon nigroviridis*, in response to salinity challenge. **Comparative Biochemistry and Physiology**. v. 138, pgs. 287-295, 2004.

LISBOA, V.; BARCAROLLI, I.F.; SAMPAIO, L.A. & BIANCHINI, A. Effect of salinity on survival, growth and biochemical parameters in juvenile Lebranch mullet *Mugil liza* (Perciformes: Mugilidae). **Neotropical Ichthyology**. v. 13, pgs. 447-452, 2015.

LORIN-NEBEL, C.; AVARRE, J.C.; FAIVRE, N.; WALLON, S.; CHARMANTIER, G. & DURAND, J.D. Osmoregulatory strategies in natural populations of the black-chinned tilapia *Sarotherodon melanotheron* exposed to extreme salinities in West African estuaries. **Journal of Comparative Physiology**. v. 182, pgs. 771-780, 2012.

MADSEN, S.S.; McCORMICK, S.D.; YOUNG, G.; ENDERSEN, J.S.; NISHIOKA, R.S. & BERN, H.A. Physiology of seawater acclimation in the striped bass, *Morone saxatilis* (Walbaum). **Fish Physiology and Biochemistry**. v. 13, pgs. 1-11, 1994.

MARSHALL, W.S. Na^+ , Cl^- , Ca^{2+} and Zn^{2+} transport by fish gills: retrospective review and prospective synthesis. **The Journal of Experimental Zoology**. v. 293, pgs. 264-283, 2002.

MARSHALL, W.S.; EMBERLEY, T.R.; SINGER, T.D.; BRYSON, S.E. & McCORMICK, S.D. Time course of salinity adaptation in a strongly euryhaline estuarine teleost, *Fundulus heteroclitus*: a multivariable approach. **Journal of Experimental Biology**. v. 202, pgs. 1535-1544, 1999.

MARTÍNEZ-ÁLVAREZ, R.M. Physiological changes of sturgeon *Acipenser naccarii* caused by increasing environmental salinity. **The Journal of Experimental Biology**. v. 205, pgs. 3699–3706, 2002.

MCCORMICK, S.D.; SUNDELL, K.; BJÖRNSSON, B.T.; BROWN, C.L. & HIROI, J. Influence of salinity on the localization of Na⁺/K⁺-ATPase, Na⁺/K⁺/2Cl⁻ cotransporter (NKCC) and CFTR anion channel in chloride cells of the Hawaiian goby (*Stenogobius hawaiiensis*). **Journal of Experimental Biology**. v. 206, pgs. 4575-4583, 2003.

MOORMAN, B.P.; LERNER, D.T.; GRAU, E.G. & SEALE, A. The effects of acute salinity challenges on osmoregulation in Mozambique tilapia reared in a tidally changing salinity. **Journal of Experimental Biology**. v. 218, pgs. 731-739, 2015.

MORGAN, J.D.; SAKAMOTO, T.; GRAU, E.G. & IWAMA, G.K. Physiological and respiratory responses of the Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*) to salinity acclimation. **Comparative Biochemistry and Physiology**. v. 117, pgs. 391-398, 1997.

MORGAN, J.D. & IWAMA, G.K. Salinity effects on oxygen consumption, gill Na⁺, K⁺-ATPase and ion regulation in juvenile coho salmon. **Journal of Fish Biology**. v. 53, pgs. 1110-1119, 1998.

NAKKRASAE, L-I.; WISETDEE, K.; CHAROENPHANDHU, N. Osmoregulatory adaptations of freshwater air-breathing snakehead fish (*Channa striata*) after exposure to brackish water. **Journal of Comparative Biology**, v. 185, pgs. 527-537, 2015.

NOLAN, D.T.; OP'T VELD, R.L.J.M.; BALM, P.H.M. & WENDELAAR BONGA, S.E. Ambient salinity modulates the response of the tilapia, *Oreochromis mossambicus* Peters), to net confinement. **Aquaculture**. v. 177, pgs. 297-309, 1999.

NORMAN, J.D.; DANZMANN, R.G.; GLEBE, B. & FERGUSON, M.M. The genetic basis of salinity tolerance traits in Arctic charr (*Salvelinus alpinus*). **BMC genetics**. v. 12, pgs. 81, 2011.

NUGON JR, R.W. **Salinity tolerance of juveniles of four varieties of tilapia**. (Tese), Louisiana State University and Aquaculture and Mechanical College, 76 p., 2003.

OIKARI, A. Aspects of osmotic and ionic regulation in two Baltic teleosts: Effects of salinity on blood and urine composition. **Marine Biology**. v. 44, pgs. 345-355, 1978.

OSTRENSKY, A.; FARIAS, H. & GOMES, E. **Tilapia (*Oreochromis niloticus*) production in marine shrimp ponds in Guaraquecaba Bay, Parana, Brazil**. In: Proceedings, Fifth International Symposium on Tilapia in Aquaculture. 2000.

PAPAKOSTAS, S.; GI, A.; VÄHÄ, J-P.; HIMBERG, M. PEIL, L. & PRIMMER, C.R. A proteomics approach reveals divergent molecular responses to salinity in populations of European whitefish (*Coregonus lavaretus*). **Molecular Ecology**. v. 21, pgs. 3516-3530, 2012.

PATTERSON, J.; BODINIER, C. & GREEN, C. Effects of low salinity media on growth, condition, and gill ion transporter expression in juvenile Gulf killifish *Fundulus grandis*. **Comparative Biochemistry and Physiology**. v. 161, pgs. 415-421, 2012.

PÉREZ-ROBLES, J; DIAZ, F.; IBARRA-CASTRO, L.; GIFFARD-MENA, I.; RE, A.D.; IBARRA, L.E.R. & SOTO, J.A.I. Effects of salinity on osmoregulation during the embryonic

development of the bullseye puffer (*Sphoeroides annulatus* Jenyns 1842). **Aquaculture Research**. v. 47, pgs. 838-846, 2016.

PEREZ-VELASQUEZ, M.; URQUIDEZ-BEJARANO, P.; GONZÁLEZ-FÉLIX, M.L. & MINJAREZ-OSORIO, C. Evidence of euryhalinity of the Gulf Corvina (*Cynoscion othonopterus*). **Physiological Researches**. v. 63, pgs. 659-666, 2014.

PIECHNIK, C.A. **Atividade da Na⁺, K⁺-ATPase e alterações histológicas nas brânquias do peixe *Bathygobius soporator* Valenciennes (Gobiidae) após exposição a diferentes salinidades**. (Tese). Universidade Federal do Paraná, 2006.

PRODOCIMO, V.; GALVEZ, F.; FREIRE, C.A. & WOOD, C.M. Unidirectional Na⁺ and Ca⁺ fluxes in two euryhaline teleost fishes, *Fundulus heteroclitus* and *Oncorhynchus mykiss*, acutely submitted to a progressive salinity increase. **Journal of Comparative Physiology**. v. 177, pgs. 519-528, 2007.

PRODOCIMO, V.; SOUZA, C.F.; PESSINI, C.; FERNANDES, L.C. & FREIRE, C.A. Metabolic substrates are not metabolized from the osmoregulatory organs (gills and kidney) of the estuarine pufferfishes *Sphoeroides greeleyi* and *S. testudineus* upon shortterm salinity reduction. **Neotropical Ichthyology**. v. 6, pgs. 613-620, 2008.

SAMPAIO, L.A. & BIANCHINI, A. Salinity effects on osmoregulation and growth of the euryhaline flounder *Paralichthys orbignyanus*. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**. v. 269, pgs. 187-196, 2002.

SARDELLA, B.A.; MATEY, V.; COOPER, J.; GONZALEZ, R.J. & BRAUNER, C.J. Physiological, biochemical and morphological indicators of osmoregulatory stress in California/Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus* × *O. urolepis hornorum*) exposed to hypersaline water. **Journal of Experimental Biology**. v. 207, pgs. 1399-1413, 2004.

SCHOFIELD, P.J.; PETERSON, M.S.; LOWE, M.R.; BROWN-PETERSON, N.J.; SLACK, W.T. (2010) Effects of temperature and salinity on survival, growth and reproduction of non-native Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) established in southern Mississippi, USA. Disponível em: http://fl.biology.usgs.gov/projects/tilapia_salinity.html. Acesso em dezembro de 2011.

SCHULTZ, E.T. & McCORMICK, S.D. **Eurihalinity in an evolutionary context**. Department of Ecology and Evolutionary Biology, University of Connecticut, 2013.

SHIKANO, T. & FUJIO, Y. Immunolocalization of Na⁺, K⁺-ATPase and morphological changes in two types of chloride cells in the gill epithelium during seawater and freshwater adaptation in a euryhaline teleost, *Poecilia reticulata*. **Journal of Experimental Zoology**. v. 281, pgs. 80-89, 1998.

SOUZA-BASTOS, L. R. & FREIRE, C. A. The Handling of salt by the neotropical cultured freshwater catfish *Rhamdia quelen*. **Aquaculture**, 289, pgs. 167-174, 2009.

STERZELECKI, F.C.; RODRIGUES, E.; FANTA, E. & RIBEIRO, C.A.O. The effect of salinity on osmoregulation and development of the juvenile fat snook, *Centropomus parallelus* (POEY). **Brazilian Journal of Biology**. v. 73, pgs. 609-615, 2013.

STEWART, H.A.; NOAKES, D.L.G.; COGLIATI, K.M.; PETERSON, J.T.; IVERSEN, M.H. & SCHRECK, C.B. Salinity effects on plasma ion levels, cortisol, and osmolality in Chinook salmon following lethal sampling. **Comparative Biochemistry and Physiology**. v. 192, pgs. 38-43, 2016.

SUÁREZ-BATISTA, B.J. & RODRÍGUEZ-FORERO, A. Ionregulation in juvenile swordspine snook (*Centropomus ensiferus*, Poey, 1860) in relation to environmental salinity. **Journal of Applied Ichthyology**. v. 31, pgs. 900-904, 2015.

TANG, C.H.; CHANG, I.C.; CHEN, C.H.; LEE, T.H. & HWANG, P.P. Phenotypic changes in mitochondrion-rich cells and responses of Na⁺/K⁺-ATPase in gills of tilapia exposed to deionized water. **Zoological Science**. v. 25, pgs. 205-211, 2008.

TANG, C-H.; TZENG, C-S.; HWANG, L-Y.; LEE T-H. Constant muscle water content and renal HSP90 expression reflect osmotic homeostasis in euryhaline teleosts acclimated to different environmental salinities. **Zoological Studies**, v. 48, pgs. 435-441, 2009.

TANG, C-H & LEE, T-H. Morphological and ion-transporting plasticity of branchial mitochondrion-rich cells in the euryhaline spotted green pufferfish, *Tetraodon nigroviridis*. **Zoological Studies**. v. 50, pgs. 31-42, 2011.

TERANISHI, K.; MEKUCHI, M. & KANEKO, T. Expression of sodium/hydrogen exchanger 3 and cation-chloride cotransporters in the kidney of Japanese eel acclimated to a wide range of salinities. **Comparative Biochemistry and Physiology**. v. 164, pgs. 333-343, 2013.

TIMM, A.; HALLERMAN, E.; DOLLOF, C.A.; HUDY, M. & KOLKA, R. Identification of a barrier height threshold where brook trout population genetic diversity, differentiation, and relatedness are affected. **Environmental Biology of Fishes**. v. 99, pgs. 195-208, 2016.

UCHIDA, K.; KANEKO, T.; MIYAZAKI, H.; HASEGAWA, S.; HIRANO, T. Excellent salinity tolerance of Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*): elevated chloride cell activity in the branchial and opercular epithelia of the fish adapted to concentrated seawater. **Zoological Science**, v. 17, pgs. 149-160, 2000.

UNIVALI – Universidade do Vale do Itajaí. Disponível em: <<http://www.univali.com.br>>. Acesso em 05 de outubro de 2009.

VARGAS-CHACOFF, L.; SAAVEDRA, E.; OYARZÚN, R.; MARTÍNEZ-MONTAÑO, E.; PONTIGO, J.P.; YÁÑEZ, A.; RUIZ-JARABO I.; MANCERA, J.M.; ORTIZ, E. & BERTRÁN, C. Effects on the metabolism, growth, digestive capacity and osmoregulation of juvenile of Sub-Antarctic Notothenioid fish *Eleginops maclovinus* acclimated at different salinities. **Fish Physiology and Biochemistry**. v. 41, pgs. 1369-1381, 2015.

VILLEGAS, C.T. Evaluation of salinity tolerance of *Oreochromis mossambicus*, *O. niloticus*, and their F1 hybrids. **Aquaculture**. v. 85, n. 281, pgs. 282, 287, 1990.

VONCK, A.P.M.A.; BONGA, S.E. & FLIK, G. Sodium and calcium balance in Mozambique tilapia, *Oreochromis mossambicus*, raised at different salinities. **Comparative Biochemistry and Physiology**. v. 119, pgs. 441-449, 1998.

ZHAO, F.; WANG, Y.; ZHANG, L.; ZHUANG, P. & LIU, J. Survival, growth, food conversion efficiency and plasma osmolality of juvenile *Siganus guttatus* (Bloch, 1787): experimental analyses of salinity effects. **Fish Physiology and Biochemistry**. v. 39, pgs. 1025-1030, 2013.

ZHAO, F.; WU, B.; YANG, G.; ZHANG, T.; ZHUANG, P. Adaptive alterations on gill Na^+ , K^+ -ATPase activity and mitochondrion-rich cells of juvenile *Acipenser sinensis* acclimated to brackish water. **Fish Physiology and Biochemistry**. v. 42, pgs., 749-756, 2016.

WANG, P.-J.; LIN, C.-H.; HWANG, L.-Y.; HUANG, C.-H.; LEE, T.-H.; HWAG, P.P. Differential responses in gills of euryhaline tilapia, *Oreochromis mossambicus*, to various hyperosmotic shocks. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*, v. 152, pgs. 544-551, 2009.

WATANABE, W.O.; KUO, C.-M. & HUANG, M.C. Salinity tolerance of Nile tilapia fry (*Oreochromis niloticus*), spawned and hatched at various salinities. **Aquaculture**: v.48, pgs. 159-176, 1985.

WATANABE, S.; ITOH, K. & KANEKO, T. Prolactin and cortisol mediate the maintenance of hyperosmoregulatory ionocytes in gills of Mozambique tilapia: Exploring with an improved gill incubation system. **General and Comparative Endocrinology**. v. 232, pgs. 151-156, 2016.

WATSON, C.J.; NORDI, W.M. & ESBAUGH, A.J. Osmoregulation and branchial plasticity after acute freshwater transfer in red drum, *Sciaenops ocellatus*. **Comparative Biochemistry and Physiology**. v. 178, pgs. 82-89, 2014.

WEAKLEY, J.C.; CLAIBORNE, J.B.; HYNDMAN, K.A. & EDWARDS, S.L. The effect of environmental salinity on H^+ efflux in the euryhaline barramundi *Lates calcarifer*. **Aquaculture**. 338, 190-196, 2012.

WEDDERBURN, S.D.; BAILEY, C.P.; DELEAN, S. & PATON, D.C. Population and osmoregulatory responses of a euryhaline fish to extreme salinity fluctuations in coastal lagoons of the Coorong, Australia. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**. v. 168, pgs. 50-57, 2016.

WENG, C.-F.; CHIANG, C.-C.; GONG, H.-Y.; CHEN, M. H.-C.; LIN, C. J.-F.; HUANG, W.-T.; CHENG, C.-Y.; HWANG, P.P. & WU, J.-L. Acute changes in gill Na^+ - K^+ -ATPase and creatine kinase in response to salinity changes in the euryhaline teleost, tilapia (*Oreochromis mossambicus*). **Physiological and Biochemical Zoology**, v. 75, pgs. 29-36, 2002.

WILLMER, P.; STONE, G. & JOHNSTON, I. **Environmental physiology of animals**. 2nded. Blackwell Science, Oxford, U.K., 2005.

WOOD, C.M. Rapid regulation of Na^+ and Cl^- flux rates in killifish after acute salinity challenge. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**. v. 409, pgs. 62-69, 2011.

WOOD, C.M. & LAURENT, P. Na^+ versus Cl^- transport in the intact killifish after rapid salinity transfer. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1618, pgs. 106-119, 2003.

WOOD, C.M. & GROSELL, M. A critical analysis of transepithelial potential in intact killifish (*Fundulus heteroclitus*) subjected to acute and chronic changes in salinity. **Journal of Comparative Physiology**. v. 178, pgs. 713-727, 2008.

YANG, W.K.; HSEU, J.R.; TANG, C.H.; CHUNG, M.J.; WU, S.M. & LEE, T. H. Na⁺,K⁺-ATPase expression in gills of the euryhaline sailfin Molly, *Poecilia latipinna*, is altered in response to salinity challenge. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**. v. 375, pgs. 41-50, 2009.

YANG, W.K.; KANG, C.K.; CHEN, T.Y.; CHANG, W.B. & LEE, T.H. Salinity-dependent expression of the branchial Na⁺/K⁺/2Cl⁻ cotransporter and Na⁺/K⁺-ATPase in the sailfin molly correlates with hypoosmoregulatory endurance. **Journal of Comparative Physiology**. v. 181, pgs. 953-964, 2011.

CAPÍTULO 2

Caracterização da Na^+, K^+ - ATPase e V-H^+ -ATPase branquiais em teleósteos, relacionadas com sua história evolutiva e o ambiente aquático de coleta ou aclimatação

RESUMO

Teleósteos dulcícolas, para manter sua osmolalidade interna maior que do meio externo, captam ativamente íons. Esta captação se faz principalmente pelo funcionamento das enzimas branquiais NKA basolateral e V-H⁺-ATPase apical. Ambas as enzimas são altamente conservadas desde organismos procariontes. Porém, em modelos teóricos, a V-H⁺-ATPase é apenas identificada em epitélios branquiais de teleósteos de água doce. A superordem Ostariophysi é representada por teleósteos primários de água doce, ou seja, teleósteos que estão há tempo estabelecidos no ambiente dulcícola, conforme sua história evolutiva. Dentre seus representantes, estão teleósteos das ordens Characiformes, Cypriniformes e Siluriformes. A superordem Acanthopterygii, por sua vez, possui representantes da ordem Perciformes (família Cichlidae) secundários de água doce e representantes diádromos. A ordem Tetraodontiformes (acanthopterígeos) possui representantes marinho/estuarino. Em teoria, os mecanismos osmorregulatórios para a captação iônica ativa devem ser diferentes entre estes dois grupos e no ambiente de água doce em relação a água do mar ou estuarina. Neste capítulo foi observada a marcação (localização), quantificação de imunofluorescência e a atividade destas enzimas no epitélio branquial de espécies de ostariofíseos e acanthopterígeos. A NKA possui uma distribuição interlamelar e ao longo das lamelas secundárias nos representantes ostariofíseos. Em acanthopterígeos esta distribuição é restrita à região interlamelar, demonstrando uma diferença entre a distribuição de NKA entre ostariofíseos e acanthopterígeos. Provavelmente, os ostariofíseos possuem uma maior distribuição desta enzima para otimizar a captação de sal. No teleósteo marinho baúna (acanthopterígeo), a intensidade de fluorescência de NKA foi maior que a de V-H⁺-ATPase. A V-H⁺-ATPase teve uma distribuição pontual e uma maior fluorescência do que a NKA apenas no teleósteo marinho/estuarino baiacu (acanthopterígeo). Assim, o ambiente aquático influencia na distribuição e/ou intensidade de fluorescência de V-H⁺-ATPase. A atividade enzimática da NKA foi maior do que a V-H⁺-ATPase nos acanthopterígeos tilápia do Nilo (dulcícola/estuarina) e baiacu (marinho/estuarino). Em relação ao baiacu, este resultado foi o oposto ao identificado na imunofluorescência. Resultado similar foi observado na identificação de maior atividade de V-H⁺-ATPase em piracajuba (ostariofíseo) do que em baiacu. Sugere-se que os resultados conflitantes entre a marcação e a atividade enzimática podem indicar proteínas inativas (marcadas, porém sem estarem funcionais). A presença de V-H⁺-ATPase em teleósteos marinhos, bem como a leitura sobre a história evolutiva de teleósteos pode sugerir a ancestralidade dulcícola deste grupo.

Palavras-chaves: osmorregulação, teleósteos, NKA, V-H⁺-ATPase, ostariofíseos (primários de água doce), acanthopterígeos (Perciformes: Cichlidae secundários de água doce e espécies aclimatadas em água do mar)

ABSTRACT

Freshwater teleosts, for to keep their internal medium higher than water, needs to capture ions, on active way. This capture is promote mainly by gills enzyme NKA (basolateral) and V-H⁺-ATPase (apical). Both of these enzyme are preserved since procariots. But, at theoretical models, V-H⁺-ATPase is only identified in gills of freshwater fishes. The Ostariophysi superorder is represented by primary freshwater fishes, that is teleosts which have been a long time at freshwater, according their evolutionary history. Among its representatives, are Characiformes, Cypriniformes and Siluriformes orders. To other side, the Acanthopterygii superorder has representatives of Perciformes (Cichlidae) that are secondary freshwater and diadromous fishes. The Tetraodontiformes order (acanthopterygean) has marine/estuarine representatives. In theory, the osmoregulatory mechanisms for ionic capture should be different between these groups and also between the aquatic environment. In this chapter was observed these enzyme localization, immunofluorescence quantification and activities, in gills of ostariophysean and acanthopterygean species. The NKA has a interlamellar and lamellar distribution in ostariophysean. In acanthopterygeans, NKA were found only in interlamellar region wchich demonstrate a difference between ostariophyseans and acanthopterygeans NKA distribution. Probably, the NKA distribution could improve the salt capture in ostariophyseans. In baúna (marine, acanthopterygean) the NKA fluorecence was higher than of the V-H⁺-ATPase. The V-H⁺-ATPase had a ponctual distribution and a higher fluorecence than NKA just in baiacu (marine/estuarine, acanthopterygean). Then, the aquatic environment interfere in V-H⁺-ATPase distribution and/or fluorecence. The NKA activity was higher than V-H⁺-ATPase in Nile tilapia (freshwater/estuarine) and baiacu (marine/estuarine), both acanthopterygeans. For baiacu, this result was opposite to immunofluorescence. A similar result was observed for higher V-H⁺-ATPase activity in piracanjuba (ostariophysean) than baiacu. Its suggested that conflicts results between fluorecence and activities can indicated inactivated proteins (that is, not functionals). The V-H⁺-ATPase even in marine teleosts can suggest the freshwater ancestry.

Key words: osmoregulation, teleosts, NKA, V-H⁺-ATPase, ostariophyseans (primary freshwater), acanthopterygeans (Perciformes: Cichlidae secondary freshwater and seawater acclimated species)

1 INTRODUÇÃO

A osmorregulação garante o equilíbrio interno entre as concentrações de íons e o volume de água plasmáticos. Teleósteos hiporregulam em água do mar diminuindo a captação ou secretando ativamente íons. Em água doce, teleósteos hiperregulam, captando íons de forma ativa. Esta regulação iônica se dá em epitélios de troca, principalmente no epitélio branquial, devido ao contato direto com o meio externo e os transportadores iônicos expressos em suas células. As células que possuem proteínas relacionadas aos processos osmorregulatórios são as células ricas em mitocôndrias (MRC's) e as células pavimentares. Entre os transportadores expressos nestas células, os principais envolvidos para a secreção e captação de sal é a Na^+, K^+ -ATPase (NKA) e a V-H^+ -ATPase (e.g.: EVANS *et al.*, 2005).

1.1 A osmorregulação de teleósteos em água do mar e dulcícolas

Os oceanos ocupam 70% da superfície terrestre, apresentam águas mais alcalinas que ambientes dulcícolas e tem uma baixa variação de seu gradiente osmótico e iônico (exceto nas costas ou ambientes entre-marés), devido a descarga de compostos químicos fluviais, pela continuidade entre os oceanos, e pela mistura constante de suas águas por marés e correntes, além de complexos processos biogeoquímicos. Estes fatores resultam em uma concentração osmótica de ~ 1050 mOsm, em salinidade de 35‰ (35 g de sal/litro). Os íons mais representativos são o Na^+ (~ 470 mmol l^{-1}) e o Cl^- (~ 548 mmol l^{-1}) (WILMMER *et al.*, 2005).

Teleósteos marinhos são osmoticamente menos permeáveis do que dulcícolas. No ambiente marinho, os teleósteos mantêm seu meio interno hipoosmótico em relação ao meio externo. Desta forma, há a perda de água e a entrada de íons de forma passiva (WILLMER *et al.*, 2005). A secreção ativa de íons nestes organismos se faz através de canais de K^+ e NKCC basolaterais e do CFTR (canal de Cl^-) apical. A regulação de NaCl no plasma dos teleósteos é realizada pelo funcionamento da NKA. O transporte de Na^+ se faz por via paracelular (Figura 2.1) (EVANS & CLAIBORNE, 2009).

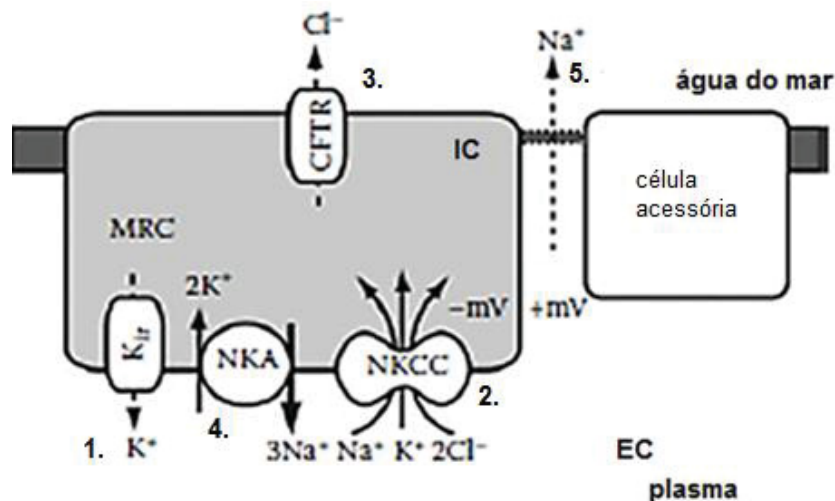


Figura 2.1 - Modelo esquemático de célula branquial de teleostes com o mecanismo proposto para a secreção iônica em água do mar. 1.: canal de K^+ 2.: cotransportador eletroneutro NKCC 3.: canal de Cl^- 4.: Na^+, K^+ -ATPase (NKA) 5.: secreção de Na^+ via paracelular. IC: meio intracelular. EC: meio extracelular. Modificado de EVANS & CLAIBORNE, 2009.

Ambientes dulcícolas representam 1% da porção de água terrestre. Águas não subterrâneas, representando rios e lagos, possuem concentrações médias de Na^+ , K^+ e Ca^{+2} menores que 1 mM. Assim, a água doce possui baixas concentrações iônicas quando comparadas a outros corpos d'água, com valores médios de $\sim 0,001$ a $\sim 0,05$ g/L de sal (WILLMER *et al.*, 2005).

Teleostes que habitam ou migram à água doce devem manter sua osmolalidade interna mais concentrada (hiperosmótica) do que o meio externo (e.g.: EVANS *et al.*, 2005; WILLMER *et al.*, 2005; FREIRE *et al.*, 2008a). Assim, neste ambiente, tendem a ganhar água (e.g.: DAWSON & LIU, 2009; EVANS & CLAIBORNE, 2009) e perder íons de forma passiva (e.g.: WILLMER *et al.*, 2005). Este efluxo passivo de íons é diminuído pela alta resistência transepitelial em epitélios de troca, como as brânquias (WOOD *et al.*, 2002). Além disso, a concentração interna é mantida pela captação ativa de íons. Neste processo, a reação enzimática da anidrase carbônica (AC) encontrada em células ricas em mitocôndria (MRC's) gera subprodutos que ativam outros transportadores para a captação de NaCl. A captação de cloreto pode ser realizada pelo trocador Cl^-/HCO_3^- (e.g. FENWICK *et al.*, 1999; CHANG & HWANG, 2004; EVANS *et al.*, 2005; McCORMICK *et al.*, 2009). O cloreto, por sua vez, é transportado para o plasma via transcelular ou por canais

basolaterais localizados nas células pavimentares (e.g.: MARSHALL *et al.*, 2002; EVANS *et al.*, 2005).

Nas MRC's, outros transportadores iônicos apicais, como o cotransportador eletroneutro NKCC (1 Na⁺, 1 K⁺ e 2 Cl⁻) e o NCC (1 Na⁺ e 1 Cl⁻) estão envolvidos nesta captação de sais (EVANS & CLAIBORNE, 2009). São discutidos diferentes mecanismos para a captação de Na⁺, como através do trocador Na⁺/H⁺ (NHE) apical (FENWICK *et al.*, 1999). Também existem evidências indiretas que fortalecem a ideia de um canal apical de Na⁺ dependente da V-H⁺-ATPase. Este argumento se baseia na diminuição da captação do íon quando utilizado bafilomicina, um inibidor específico da V-H⁺-ATPase. Resultados semelhantes foram identificados em tilápia moçambicana (*Oreochromis mossambicus*), carpa comum (*Cyprinus carpio*) e truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) (PERRY *et al.*, 2003). Independente destes mecanismos de captação, o transporte de Na⁺ para o plasma se dá principalmente pelo funcionamento da NKA basolateral, que transporta dois íons K⁺ para o interior e três Na⁺ para o exterior da célula. O K⁺ é ciclado através de canais iônicos específicos (EVANS *et al.*, 2005). Em algumas espécies, como em peixe zebra (*Danio rerio*) se evidenciam células imunorreativas para a captação de Na⁺ e secreção ácida (células imunorreativas à V-H⁺-ATPase) com este modelo de transportadores. Outros subtipos estariam envolvidos com a captação de Ca⁺ (células imunorreativas à NKA), e outras com a captação do Cl⁻ (células imunorreativas ao NCC) (HWANG *et al.*, 2009).

O principal mecanismo reconhecido envolvido na captação de Na⁺ se faz pelo funcionamento da V-H⁺-ATPase apical. O H⁺ produzido pela atividade da AC é externalizado pelo funcionamento da enzima V-H⁺-ATPase (Figura 2.2) (EVANS *et al.*, 2005). Este efluxo é realizado para tamponar o transporte de amônia (GOSS *et al.*, 2011). A V-H⁺-ATPase, promovendo a saída de prótons, gera o gradiente eletro-químico favorável a entrada do Na⁺ para o meio intracelular (EVANS *et al.*, 2005). Diferentes transportadores podem realizar a captação de Na⁺. Canais iônicos apicais específicos para o Na⁺ do tipo ENaC, identificados em pele de sapo (*Bufo* sp.) (GOSS *et al.*, 2011), ainda não foram evidenciados em teleósteos. Portanto, a existência destes transportadores é contestada por alguns autores (e.g.: EVANS *et al.*, 2005).

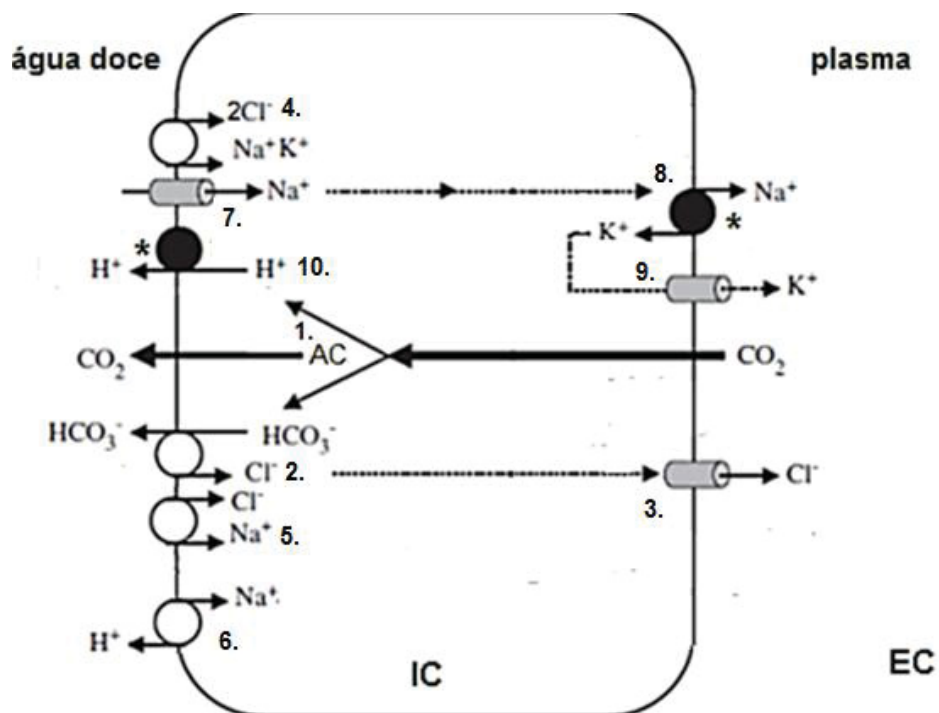


Figura 2.2 – Modelo esquemático de célula branquial de teleostes com os principais mecanismos propostos para a captação iônica em água doce. Este modelo representa uma hibridização de vários subtipos celulares. 1.: anidrase carbônica (AC) 2.: trocador $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$. 3.: canal de Cl^- 4.: cotransportadores eletroneutros $\text{Na}^+,\text{K}^+,2\text{Cl}^-$ (NKCC) e 5.: Na^+,Cl^- (NCC) 6.: trocador Na^+/H^+ (NHE) 7.: canal de Na^+ 8.: Na^+,K^+ -ATPase (NKA) 9.: canal de K^+ e 10.: V-H^+ -ATPase. *Asterisco destaca enzima que será estudada na tese. IC: meio intracelular. EC: meio extracelular. Modificado de PERRY *et al.*, 2003.

1.1.1 A enzima NKA

Esta proteína transmembrana tem sua estrutura altamente conservada desde organismos procarióticos (SAÉZ *et al.*, 2009). Em mamíferos, é formada por um complexo proteico $(\alpha\beta)_2$ de aproximadamente 160 kDa, sendo α a subunidade catalítica (HWANG *et al.*, 2011). Alguns teleostes apresentam mais isoformas destas subunidades, quando comparados aos mamíferos (HWANG *et al.*, 2011).

A NKA realiza o transporte de 3 íons Na^+ para o meio extracelular em troca de 2 íons K^+ para o meio intracelular (Figura 2.4). Assim, contribui para a manutenção dos gradientes eletroquímicos destes íons entre os meios celulares, garantindo o potencial de membrana celular (LEE *et al.*, 2003). A

geração destes gradientes fornece o substrato para o funcionamento de outros transportadores da membrana celular. A NKA desta forma também participa da regulação de volume celular e da internalização do íon Na^+ para o plasma (HWANG & LEE, 2007; SAÉZ *et al.*, 2009; EVANS, 2010).

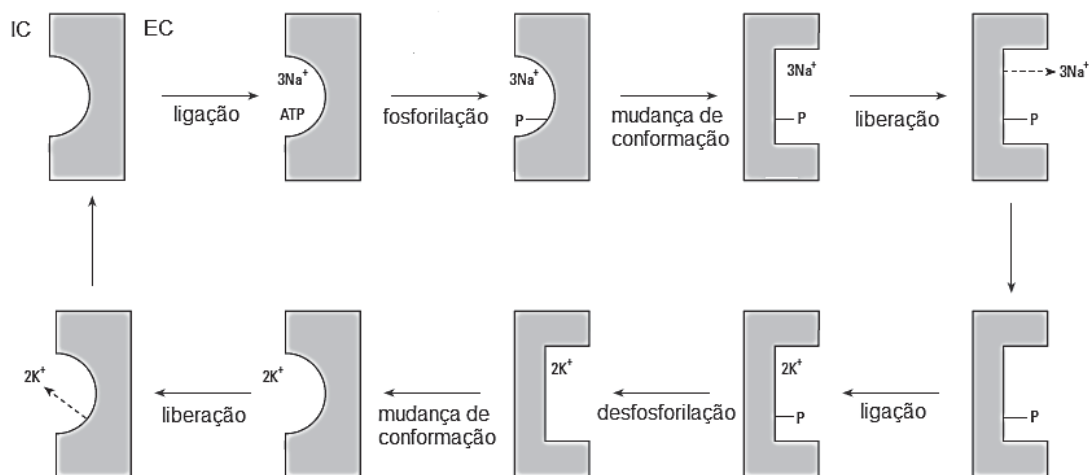


Figura 2.3 – Funcionamento da Na^+, K^+ -ATPase (NKA), na porção basolateral da membrana plasmática. Os íons Na^+ e K^+ se ligam aos sítios de ligação específicos, e com a quebra de ATP (energia química), há a mudança de conformação protéica, que permite a liberação de três íons Na^+ para o meio extracelular e dois íons K^+ para o meio intracelular, contra seus gradientes químicos. IC: meio intracelular. EC: meio extracelular. Modificado de WILLMER *et al.*, 2005.

O papel osmorregulatório da NKA não é totalmente elucidado, pois depende da célula ou organismo estudado (ALLEN, *et al.*, 2009; SAÉZ *et al.*, 2009). Observa-se na maioria das vezes o aumento de sua atividade branquial com o aumento de salinidade (e.g.: HWANG *et al.*, 1998). A ouabaína é um potente inibidor desta bomba, e sua utilização permite avaliar a atividade enzimática da mesma (LEE *et al.*, 2003).

1.1.2 A enzima V-H^+ -ATPase

A enzima próton ATPase vacuolar (V-H^+ -ATPase) apresenta alto grau de homologia química desde protozoários e leveduras até mamíferos (MARSHANSKY & FUTAI, 2008; ALLEN *et al.*, 2009). É assim chamada pois inicialmente era identificada em compartimentos intracelulares, embora seja crescente o número de estudos que demonstram suas funções na membrana celular (NISHI & FORGAC, 2002).

A $V\text{-H}^+\text{-ATPase}$ é formada por um complexo de subunidades que se agrupam em dois domínios. O primeiro forma um complexo periférico, na porção intracelular, de 640 kDa (NISHI & FORGAC, 2002) responsável pela hidrólise do ATP, comportando oito subunidades e sendo denominado domínio V_1 . O segundo domínio V_0 , de 260 kDa (NISHI & FORGAC, 2002) é formado por proteínas transmembranas, composto por seis subunidades, e responsável pelo transporte dos prótons. Subunidades do domínio V_1 catalítico se ligam a subunidades hidrofóbicas do domínio V_0 , formando uma espécie de rotor, que possibilita a passagem do próton para o meio extracelular após a hidrólise do ATP (Figura 2.5) (MARSHANSKY & FUTAI, 2008).

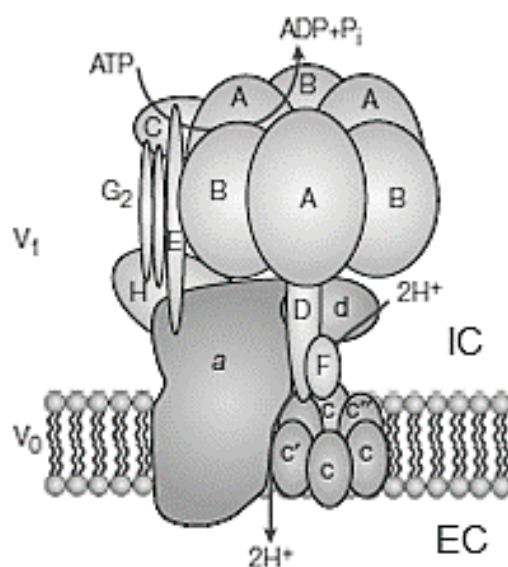


Figura 2.4 – Configuração da enzima $V\text{-H}^+\text{-ATPase}$. O domínio V_1 , promove a hidrólise do ATP, que rotaciona o domínio V_0 , permitindo o transporte de prótons para o meio extracelular. IC: meio intracelular. EC: meio extracelular Modificado de NISHI & FORGAC, 2002.

Enquanto em teleósteos sua função se relaciona principalmente com a captação de Na^+ , em outros organismos eucarióticos suas funções de destaque se relacionam à acidificação luminal e controle de pH. Nestes organismos, suas atividades são também relacionadas com a fusão de membranas e com o transporte intracelular (NISHI & FORGAC, 2002). A bafilomicina (FENWICK, 1999) ou o NEM (n-etilmaleimida) (GIBBS & SOMERO, 1989) são exemplos de

inibidores que podem ser utilizados para quantificar a atividade enzimática da V-H⁺-ATPase.

Durante a embriogênese da truta arco-íris (*O. mykiss*), foi possível observar dois tipos celulares, denominados α e β , que possuem uma diferença funcional relacionada a localização da V- H⁺-ATPase. Enquanto o tipo α possui a V- H⁺-ATPase apical, para a captação de Na⁺ e excreção de H⁺, o tipo β possui a V- H⁺-ATPase basolateral, relacionada a captação de Cl⁻ e excreção de HCO₃⁻ quando em água doce, com maior atividade de NKA (EVANS & CLAIBORNE, 2009; PARKS *et al.*, 2010). A proporção destes tipos celulares, bem como as atividades enzimáticas de NKA e V- H⁺-ATPase são diferentes conforme o ambiente aquático, com uma maior razão de células α em água doce e de β em água estuarina (HAWKINGS, 2004).

Sugere-se que a capacidade de ativar mecanismos osmorregulatórios, bem como a ativação da resposta destas enzimas (que podem se relacionar aos tipos celulares) podem estar relacionadas a história evolutiva dos teleósteos.

1.2 Osmorregulação e a história evolutiva

A história evolutiva interfere diretamente nos padrões osmorregulatórios ou mesmo nos ajustes fisiológicos necessários para a migração e/ou dispersão de uma espécie (FINN & KRISTTENSEN, 2007; FREIRE *et al.*, 2008b). A compreensão da história evolutiva também auxilia no entendimento dos mecanismos de adaptação (respostas fisiológicas) utilizados (SALA-BOZANO & MARIANI, 2011). Muitas vezes a interpretação de resultados fisiológicos é dificultada pela pouca informação da história evolutiva das espécies (COLAUTTI *et al.*, 2006).

Quando se examina a história evolutiva, três fatores fundamentais devem ser observados. Os dois primeiros caracterizam a macroevolução, sendo eles a especiação (surgimento de novas espécies) e a extinção de espécies. A microevolução, por sua vez, é caracterizada por mudanças fenotípicas ao longo do tempo e direcionada pela seleção natural (BRUSCA & BRUSCA, 2005). Os organismos aquáticos, conforme a estabilidade ou variações de seu habitat, podem sofrer a ação da seleção natural (FIKSEN &

CARLOTTI, 1998; SALA-BOZANO & MARIANI, 2011), a qual, a longo prazo, regula a expressão genética que dará origem ao fenótipo da espécie, e está relacionada com a plasticidade osmorregulatória do organismo (WILMER *et al.*, 2005; ALLEN *et al.*, 2011).

Um dos conceitos fundamentais para se entender ou estudar a história evolutiva de um grupo é o estudo filogenético do táxon. Um táxon monofilético é um grupo de espécies que possui um único ancestral comum, com todas as espécies formadas a partir de modificações deste (linha evolutiva única). A parafilia, por sua vez, exclui um ou mais táxons com descendência do ancestral comum. Por fim, um grupo polifilético compreende espécies originadas de ancestrais diretos diferentes (BRUSCA & BRUSCA, 2005).

1.2.1 A história evolutiva (resumida) dos teleósteos

A filogenia dos peixes (cordados vertebrados) se divide em agnathos (peixes sem mandíbula) e gnathotomatos (peixes com mandíbula). A radiação evolutiva representa múltiplas divergências de um ancestral comum que origina mais de duas linhagens descendentes. A radiação dos gnathotomatos foi observada a partir dos placodermes (YOUNG, 2010) e de acantódeos (entre os períodos Siluriano e Devoniano – 443 a 359 milhões de anos) (HICKMAN *et al.*, 2001; FINN & KRISTTENSEN, 2007). Estes dois grupos tiveram origem em ambiente marinho e dispersão para águas diluídas, até chegar a água doce (HICKMAN *et al.*, 2001; YOUNG, 2010). A radiação destes dois grupos promoveu a origem dos peixes ósseos modernos no Siluriano intermediário (HICKMAN *et al.*, 2001).

Dentre os peixes ósseos, a linhagem dos acantódeos deu origem a classe Actinopterygii (peixes de nadadeiras raiadas), que por sua vez deu origem aos teleósteos. Alguns autores indicam que os actinopterígeos primitivos eram pequenos palaeoniscídeos, no início do Siluriano tardio (425 milhões de anos) (HICKMAN *et al.*, 2001; FRIEDMAN *et al.*, 2015), ao mesmo tempo que os acantódeos foram extintos. A partir dos palaeoniscídeos, surgiram as linhagens dos condrósteos (esturjões e outras espécies anádromas) e neopterígeos. Estes últimos, presentes no fim do Permiano (290

milhões de anos), tiveram uma intensa radiação na era Mesozóica, com uma das linhagens originando os teleósteos (HICKMAN *et al.*, 2001).

Porém, os actinopetrígeos começam a representar o clado marinho dominante a partir do Triássico (250-200 milhões de anos) (FRIEDMAN, 2015). Por isso, outros autores defendem que evidências paleontológicas indicam que seus primeiros representantes surgiram neste período, com uma intensa radiação entre o Jurássico Superior (~163 milhões de anos) e o Cretáceo Inferior (~145 milhões de anos) (SFERCO *et al.*, 2015). Estas observações geram dúvidas sobre a origem dos teleósteos. Embora exista essa discussão, modelos filogenéticos demonstram que o tectonismo evidenciado no Mioceno, há ~23 milhões de anos, pôde determinar a radiação de clados de teleósteos (ALBERT *et al.*, 2006). As Figuras 2.6 e 2.7 resumem os principais eventos da origem dos teleósteos.

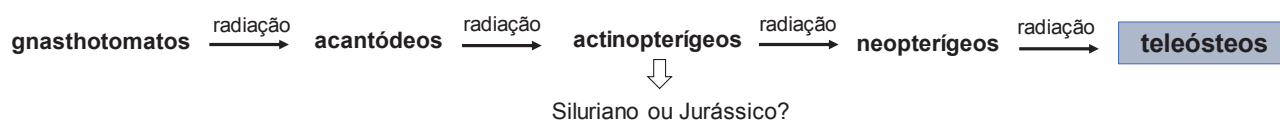


Figura 2.5 – Representação dos eventos radiativos que originaram os teleósteos. Fonte: a autora.

Há também controvérsias sobre o ambiente de origem dos teleósteos. Alguns autores defendem a origem marinha (MAPLES & ARCHER, 1989) dos teleósteos, outros a dulcícola (VIZE, 2004) e alguns a origem em estuário (VEGA & WIENS, 2012).

O surgimento marinho dos teleósteos é atribuído aos registros fósseis - identificados como sendo do Cambriano (520 milhões de anos) (POUGH *et al.*, 2006) - e à fisiologia de invertebrados deuterostômios (origem do ânus) e vertebrados estritamente marinhos (EVANS & CLAIBORNE, 2009). Ainda que grande parte das datações fósseis sejam de sedimentos marinhos (BETANCURT *et al.*, 2015; SFERCO *et al.*, 2015), o registro fóssil de teleósteos pode sugerir comportamentos diádromos (FINN & KRISTOFFERSEN, 2007).

A primeira sugestão de origem dos teleósteos é de que ela é identificada no período Permiano. Contudo, faunas marinhas do Permiano Superior (~245 milhões de anos) são escassas, enquanto as dulcícolas são representativas (embora com poucos indícios de ancestralidade). Esta escassez pode ser resultado da extinção em massa do Permiano (FRIEDMAN, 2015).

Já os que defendem a ancestralidade dulcícola, se baseiam em um dos registros mais primitivos dos actinoptérigeos, que é de um gênero estritamente dulcícola, *Cheirolepis* (VEGA & WIENS, 2012), registrado no período do Jurássico Inferior (~200 milhões de anos) (FINN & KRISTOFFERSEN, 2007). Conforme a sugestão de que a origem dos teleósteos seja no Jurássico, isto pode indicar a ancestralidade dos mesmos, com fósseis de linhagens derivadas evidenciadas em sedimentos de água doce. Porém, a evidência desta ancestralidade pode ter sua conclusão limitada ao registro de fósseis, amostras filogenéticas e métodos comparativos de estudos (BETANCURT *et al.*, 2015). Outros autores, como WILLMER *et al.* (2005), sugere a ocupação secundária de grande parte dos teleósteos dos oceanos, com a origem dos mesmos em água doce.

Dentro da superclasse dos actinoptérigeos, representantes das subclasses Holostei, Cladistia e Chondrostei representam peixes não teleósteos como grupos irmãos dos teleósteos. Na subclasse Holostei, identifica-se a família Lepisosteidae, que contém dois gêneros, sendo um deles restritos à água doce. Já em Cladistia, dezoito espécies da família Polypteridae são encontradas exclusivamente em rios africanos. Os condrósteos possuem características que se aproximam de traços primitivos dos teleósteos. Os condrósteos modernos são restritos a águas dulcícolas da Ásia, Europa e América do Norte (FRIEDMAN, 2015).

Outras são as observações para considerar a ancestralidade dulcícola dos teleósteos. Os teleósteos mais derivados, extintos e existentes são dulcícolas (FINN & KRISTOFFERSEN, 2007). A colonização de teleósteos marinhos na água doce (mais comum que o inverso) desencadeia uma rápida especiação nestes ambientes (BETANCURT *et al.*, 2015). A manutenção do meio interno hipoosmótico quando em ambientes marinhos (FINN & KRISTOFFERSEN, 2007) e a presença de néfrons glomerulares na maioria dos vertebrados, ao invés de aglomerulares como em grande parte dos néfrons

de teleósteos marinhos (FREIRE & PRODOCIMO, 2007; SCHULTZ & McCORMICK, 2013) podem refletir um passado dulcícola dos teleósteos.

1.2.2 Divisão dos teleósteos

A divisão Teleostei é representada por mais de 32.000 espécies, que constituem 99% dos actinoptérigeos (BETANCURT *et al.*, 2015; SFERCO *et al.*, 2015). Na divisão Teleostei, temos a subdivisão Otocephala, com a superordem Ostariophysi. A distribuição geográfica de algumas ordens dos ostariofíseos pode ser observada abaixo (Figura 2.8). Os ostariofíseos são representados, entre outras, pelas ordens Characiformes, Cypriniformes e Siluriformes (Figura 2.10) (NELSON, 2006), com espécies estudadas na tese. A super ordem Ostariophysi é um grupo monofilético com grande diversificação ocorrendo no fim do Cretáceo e Mioceno (144 – 23 milhões de anos) (LÉVÊQUE *et al.*, 2008). Os ostariofíseos são classificados em 5 ordens, contendo 63 famílias, 1.000 gêneros e 6.500 espécies (NELSON, 2006), com representantes marinhos ou primariamente dulcícolas. Embora seja necessária uma reconstrução filogenética na superordem, os ostariofíseos são muito utilizados em discussões sobre a biogeografia, devido a sua representatividade de teleósteos dulcícolas (SAITOH *et al.*, 2003). Aproximadamente 68% das espécies de ostariofíseos são de água doce (NELSON, 2006).

Dentre outras subdivisões de Teleostei, a subdivisão Euteleostei apresenta a superordem Acanthopterygii. Entre as ordens dos acanthoptérigeos estão os Perciformes. Os ciclídeos são considerados recentes invasores dulcícolas (CHAKRABARTY, 2004). Um ciclídeo e duas outras espécies Perciformes diádromas foram estudadas na tese. Os acanthoptérigeos são também classificados na ordem Tetraodontiformes (com espécie marinha/estuarina estudada na tese) além de outras ordens. Há discussões sobre a monofilia do grupo, que compreende 13 ordens, 267 famílias, 2.422 gêneros e 14.797 espécies, 24% destas estritamente dulcícolas. A princípio, os primeiros representantes acanthoptérigeos foram da ordem Stephanoberyciformes, que compreende 75 espécies exclusivamente dulcícolas (NELSON, 2006).

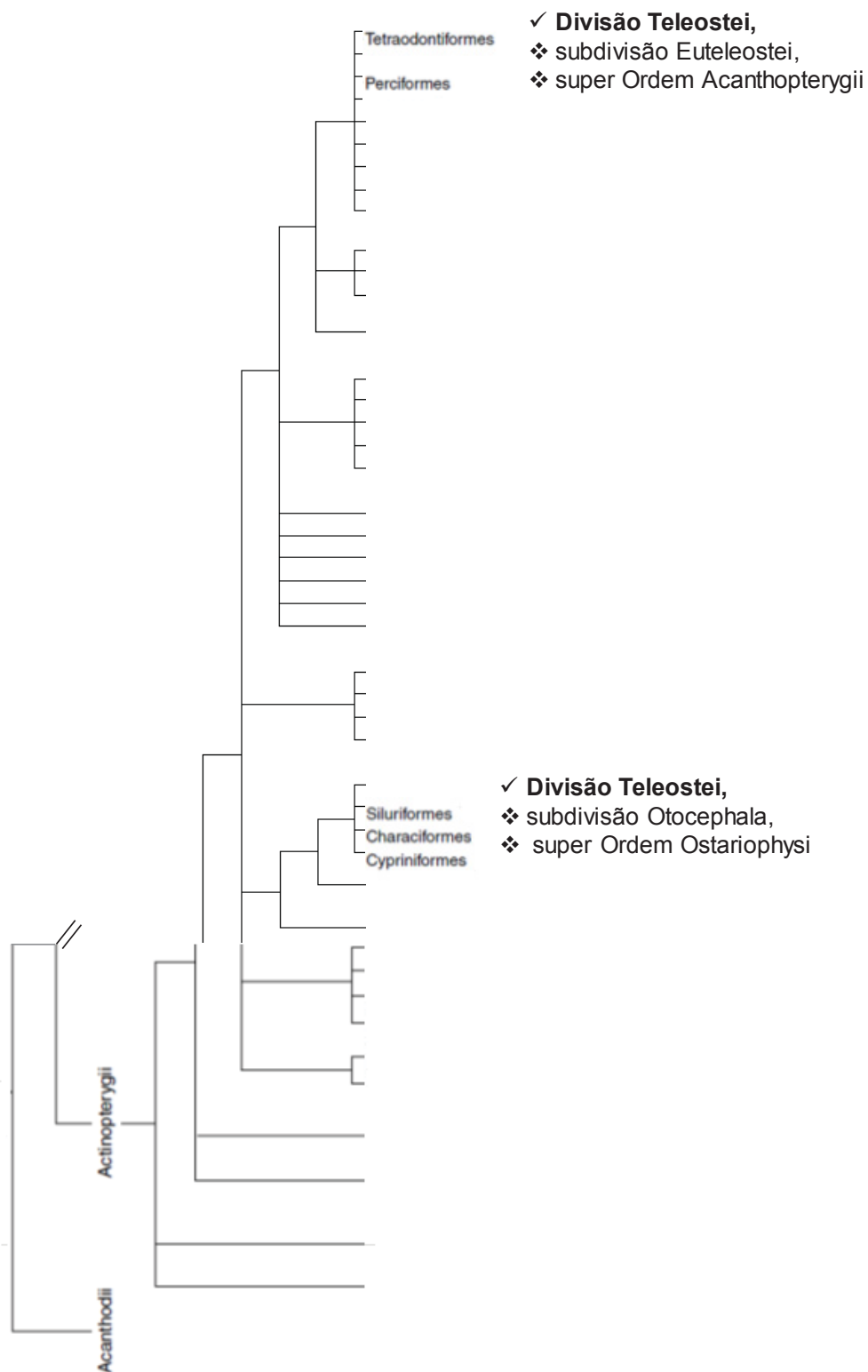


Figura 2.6 – Filogenia das ordens estudadas. Os traços pretos na linhagem de Actinopterygii representam um corte proposital da continuação desta linhagem, para destacar apenas as derivações das ordens representantes das espécies estudadas na tese. Modificado de NELSON, 2006.

Na lista do FishBase de 2005, foram listadas ~12.674 espécies de teleósteos exclusivamente dulcícolas, e ~14.922 dulcícolas/estuarinas (FISH BASE, 2005). Alguns estudiosos avaliam que este número deve ser próximo de 11.952 espécies estritamente dulcícolas, e ~12.457 que migram à água doce (NELSON, 2006). Outra contagem se dá em aproximadas 13.000 espécies dulcícolas estritas (170 famílias e 2.513 gêneros), 15.000 estuarinas e 16.000 marinhas (LÉVÊQUE *et al.*, 2008). De acordo com BETANCURT *et al.* (2015), das espécies de teleósteos, 15.964 dulcícolas e 16.161 marinhas são consideradas eurihalinas.

Para identificar se as proteínas osmorregulatórias podem estar relacionadas a história evolutiva destes grupos de teleósteos, neste capítulo foi demonstrado a localização e atividade das enzimas NKA e V-H⁺-ATPase entre ostariofíseos (teleósteos primários de água doce), e acanthopterígeos (secundários de água doce - Perciformes: Cichlidae, e aclimatados em água do mar).

1.2.3 Características dos teleósteos ostariofíseos (primários de água doce) estudados

1.2.3.1 Ordem Characiformes, Família Characidae

A ordem Characiformes possui, de acordo com LÉVÊQUE *et al.* (2008), 17 famílias com representantes dulcícolas, ou que possam migrar para águas salobras. Destas famílias, 1.674 a 1.794 espécies são exclusivamente dulcícolas e 1.674 a 1.801 também são encontradas em águas estuarinas (FISH BASE, 2005; NELSON, 2006). A família Characidae tem 88 gêneros, sendo a *Astyanax bimaculatus*, lambari, exemplo de espécie exclusivamente dulcícola.

A origem dulcícola da família Characidae (47 gêneros monofiléticos) está nos primeiros fósseis encontrados nas Américas do Sul e Central, tendo espécies distribuídas ao longo do sudoeste do Texas e México (NELSON, 2006).

1.2.3.2 Ordem Characiformes, Subfamília Bryconidae

Dentro da família Characidae, a subfamília Bryconidae possui 3 gêneros, distribuídos pelo México e Argentina, e 43 espécies, sendo *Brycon orbignyianus*, piracanjuba, uma das espécies dulcícolas representante (NELSON, 2006). De acordo com piscicultores, a espécie é coletada também em águas estuarinas.

1.2.3.3 Ordem Cypriniformes, Família Cyprinidae

A origem da ordem Cypriniformes é sugerida pela presença de fósseis na América do Sul e posterior migração para a Ásia no período Jurássico, há 206 milhões de anos. A ordem Cypriniformes possui, de acordo com LÉVÊQUE *et al.* (2008), 7 famílias com representantes dulcícolas ou que possam migrar para águas salobras. Destas famílias, 3.268 a 3.451 espécies são exclusivamente dulcícolas e 3.268 a 3.664 também são encontradas em águas estuarinas (FISH BASE, 2005; NELSON, 2006). A família Cyprinidae tem 220 gêneros e 2.420 espécies, sendo a *Ctenopharyngodon idella*, carpa-capim, exemplo de espécie dulcícola. A família Cyprinidae se distribui pela América do Norte, África e Eurásia, com espécies raramente encontradas em água salobra, sendo assim a maior família de espécies dulcícolas da ordem (NELSON, 2006).

A origem da família Cyprinidae é estipulada nos períodos Eoceno, há 55 milhões de anos, e Oligoceno, há 33,4 milhões de anos (NELSON, 2006) (Tabela 2.1). Períodos de glaciações do Pleistoceno (~2 milhões de anos) estão relacionados à diversificação e distribuição da família (BUONERBA *et al.*, 2015).

1.2.3.4 Ordem Siluriformes, Família Heptapteridae

O debate entre a origem dulcícola dos Siluriformes está nos primeiros fósseis encontrados na América do Sul, sugerindo sua migração para a Ásia no Jurássico, há aproximadamente 206 milhões de anos (LÉVÊQUE *et al.*, 2008); e sua origem na Austrália, durante o Cretáceo, há 144 milhões de anos, com posterior migração ao México e América do Sul (NELSON, 2006) (Tabela 2.1).

A ordem Siluriformes possui, de acordo com LÉVÊQUE *et al.* (2008), 34 famílias com representantes dulcícolas, ou que possam migrar para águas salobras. Destas famílias, 2.740 a 2.835 espécies são exclusivamente

dulcícolas e a 2.750 a 2.992 também são encontradas em águas estuarinas (FISH BASE, 2005; NELSON, 2006). A família Heptapteridae possui 25 gêneros, sendo o *Rhamdia quelen*, jundiá, exemplo de espécie dulcícola.

1.2.4 Características dos teleósteos acanthopterígeos (Perciformes: Cichlidae, secundários de água doce e espécies aclimatadas em água do mar) estudados

1.2.4.1 Ordem Perciformes, Família Cichlidae

A ordem Perciformes possui 1.539 gêneros e 10.033 espécies, representando a dominância de vertebrados em águas marinhas e de peixes tropicais e subtropicais em água doce. Nesta ordem, 2.040 a 2.402 espécies são exclusivamente dulcícolas e 2.335 a 3.368 também são encontradas em águas estuarinas (FISH BASE, 2005; NELSON, 2006). A origem da ordem é sugerida no período Paleoceno superior, há 65 milhões de anos; e Eoceno, há 55 milhões de anos (NELSON, 2006) (Tabela 2.1). Entre os gêneros desta ordem, 34 possuem representantes exclusivamente dulcícolas, e 51 representantes dulcícolas que possam migrar para águas salobras LÉVÊQUE *et al.* (2008).

Dentro desta ordem, a família Cichlidae tem 112 gêneros com distribuição cosmopolita. Os ciclídeos representam a família “não-Ostariophysii” com maior riqueza de espécies que habitam água doce (LÉVÊQUE *et al.*, 2008). Relembrando, a família dos ciclídeos é considerada recente invasora dulcícola (CHAKRABARTY, 2004; NELSON, 2006). A espécie dulcícola e estuarina *Oreochromis niloticus*, tilápia-do-Nilo, é uma das representantes desta família (NELSON, 2006).

1.2.4.2 Ordem Perciformes, Família Lutjanidae

A família Lutjanidae possui 70 gêneros e 105 espécies, dispersas pelo Atlântico, Índico e Pacífico. Raras espécies representantes são encontradas em estuário e água doce. A espécie marinha *Lutjanus jocu*, baúna, é um exemplo de espécie diádroma (NELSON, 2006).

1.2.4.3 Ordem Perciformes, Família Centropomidae

Grupo parafilético, com apenas um gênero (*Centropomus*), com 12 espécies. Possuem representantes no ambiente marinho, de estuário e dulcícola, em águas tropicais e subtropicais das Américas do Norte e Central (NELSON, 2006). A espécie *Centropomus parallelus*, robalo, é diádroma (FISH BASE, 2005).

1.2.4.4 Ordem Tetraodontiformes, Família Tetraodontidae

A origem da ordem Tetraodontiformes é estipulada no período Eoceno, há 55 milhões de anos (Tabela 2.1). A ordem Tetraodontiformes possui 100 famílias, que compreendem 101 gêneros e 357 espécies (SANTINI & TYLER, 2003; LÉVÊQUE *et al.* 2008). Destas famílias, a Tetraodontidae é a única que possui representantes dulcícolas, ou que possam migrar para águas salobras (LÉVÊQUE *et al.* 2008). Seus representantes se distribuem pelo Atlântico, Índico e Pacífico, com espécies marinhas comumente encontradas em águas salobras e dulcícolas, em águas tropicais e subtropicais. Nesta família, 19 gêneros compreendem 130 espécies. Dentro destas espécies, 12 a 29 espécies são exclusivamente dulcícolas (FISH BASE, 2005; NELSON, 2006; LÉVÊQUE *et al.*, 2008) e 22 a 48 são encontradas em águas estuarinas (FISH BASE, 2005; NELSON, 2006). Espécie representante desta família é a *Sphoeroides greeleyi*, baiacu, que habita o ambiente marinho e estuarino.

Tabela 2.1 – Época de origem (provável) das ordens e/ou famílias de ostariofíseos e acanthopterígeos. Fontes: SANTINI & TYLER (2003); NELSON (2006); LÉVÊQUE *et al.* (2008) e habitats das espécies estudadas na tese, conforme cada ordem. Fonte: a autora.

Ordem/Família	Origem (milhões de anos)	Habitat
Characiformes	?	dulcícola
Cypriniformes	206	dulcícola
Siluriformes	206 – 144	dulcícola
Perciformes	65 – 55	dulcícola/estuarina/diádromo
Tetraodontiformes	55	marinho/estuarino

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Investigar se a localização e as atividades das enzimas NKA e V-H⁺-ATPase branquiais em teleósteos se relacionam com suas histórias evolutivas e com diferentes ambientes aquáticos.

2.2 Específicos

- Comparar a localização e atividade das enzimas NKA e V-H⁺-ATPase em diferentes representantes de teleósteos ostariofíseos (primários de água doce) e acanthopterígeos (Perciformes: Cichlidae, secundários de água doce e espécies aclimatadas em água do mar);
- Identificar a localização e atividade das enzimas NKA e V-H⁺-ATPase em teleósteos primários e secundários de água doce e aclimatados em água do mar;
- Quantificar a marcação das enzimas NKA e V-H⁺-ATPase em teleósteos primários e secundários de água doce e aclimatados em água do mar;
- Avaliar a relação entre localização, a quantificação e a atividade das enzimas NKA e V-H⁺-ATPase em teleósteos primários e secundários de água doce e aclimatados em água do mar.

3 METODOLOGIA

3.1 Coleta dos animais

3.1.1 Teleósteos dulcícolas (ostariofíseos)

Representantes das espécies dulcícolas *Astyanax bimaculatus*, Linnaeus, 1758 (9,82±0,41cm) (lambari – Characiformes/Characidae) (Figura 2.7A); *Brycon orbignyianus*, Valenciennes, 1850 (8,57±0,14cm) (piracanjuba – Characiformes/Bryconidae) (Figura 2.7B) e *Ctenopharyngodon idella*, Valenciennes, 1844 (10,73±0,28cm) (carpa-capim – Cypriniformes/Cyprinidae) (Figura 2.7C), foram trazidos de piscicultura, na “Alevinos Itaipu”, em Curitiba-PR. Os teleósteos foram transportados de carro em sacos plásticos com

oxigênio e com água do cultivo, até o Laboratório de Fisiologia Comparativa da Osmorregulação (LFCO), em Curitiba-PR.

Espécimes da espécie dulcícola *Rhamdia quelen*, Quoy & Gaimard, 1824 (17,19±0,64cm) (jundiá – Siluriformes/Heptapteridae) (Figura 2.7D), foram coletados na piscicultura da Pontifícia Universidade Católica (São José dos Pinhais - PR).

3.1.2 Teleósteo dulcícola e aclimatados em água do mar (acanthopterígeos)

Representantes da espécie dulcícola/estuarina (eurihalina) *Oreochromis niloticus* (10,78±0,30cm) (tilápia do Nilo, Linnaeus, 1758 – Perciforme/Cichlidae) (Figura 2.7E) foram também trazidos de piscicultura, na “Alevinos Itaipu”, em Curitiba-PR. Os teleósteos foram transportados de carro em sacos plásticos com oxigênio e com água do cultivo, até o LFCO, em Curitiba-PR.

As espécies de teleósteos diádromos *Lutjanus jocu* (baúna, Bloch & Schneider, 1801- Perciformes/Lutjanidae) (Figura 2.7F) – para imunofluorescência, e *Centropomus parallelus* (robalo, Poey, 1860 – Perciformes/Centropomidae) – para o ensaio de atividade enzimática (Figura 2.7G) foram coletados no Estado do Espírito Santo (ES) (20°S 66°30.34' W; 40°S 51°89.06' W), e as amostras foram trazidas congeladas, de avião. Espécimes da espécie marinha/estuarina *Sphoeroides greeleyi* (9,28±0,29cm) (baiacu, Gilbert, 1900 – Tetraodontiformes/Tetraodontidae) (Figura 2.11H) foram coletados na Gamboa do rio Bagaçu na margem sul da Baía de Paranaguá (PR) (25°S 33'6.33" S, 48°W 23'41.63" W) na parte rasa da praia, próximo a desembocadura do rio, através de rede de arrasto manual. Estes teleósteos foram transportados de carro em sacos plásticos com oxigênio e com água da coleta, até o LFCO, em Curitiba-PR.

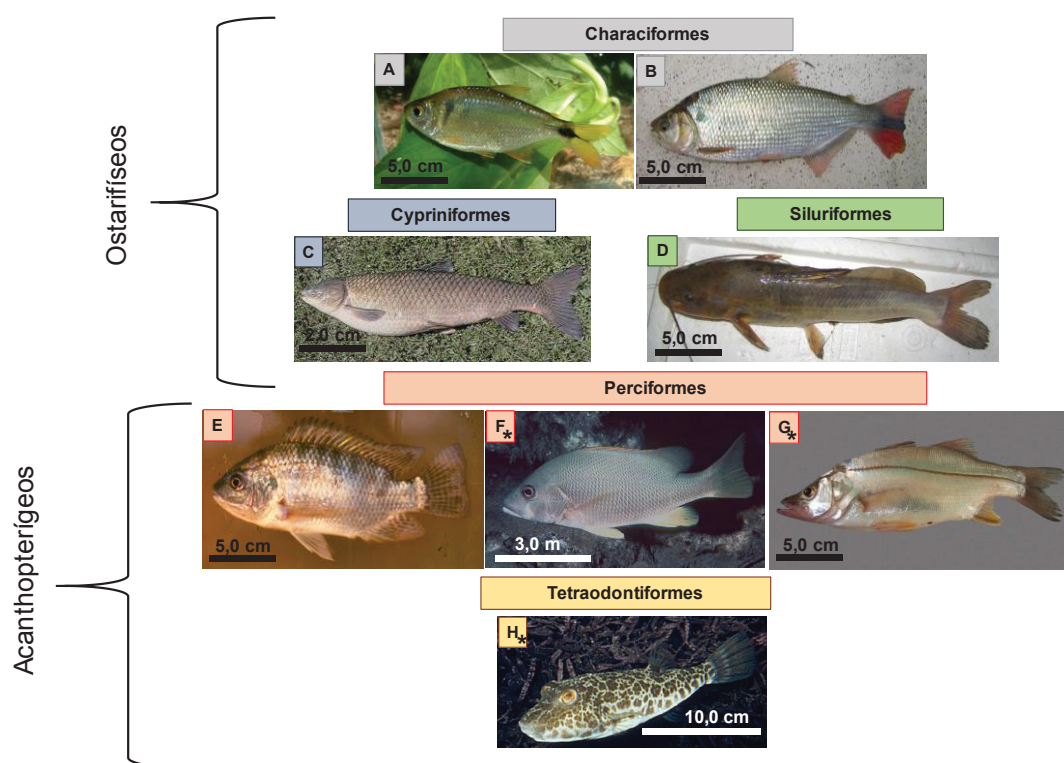


Figura 2.7 – Espécies utilizadas no experimento, identificando suas respectivas ordens e famílias. (A): *Astyanax bimaculatus*, lambari (B): *Brycon orbignyanus*, piraicanjuba (C): *Ctenopharyngodon idella*, carpa-capim (D): *Rhamdia quelen*, jundiá (E): *Oreochromis niloticus*, tilápia do Nilo (F): *Lutjanus jocu*, baúna (G): *Centropomus parallelus*, robalo (H): *Sphoeroides greeleyi*, baiacu (Fonte: Fish Base, 2016). Asteriscos indicam espécies diádromas ou marinhas/estuarinas. Fonte: a autora.

3.2 Aclimação e eutanásia dos animais

No laboratório, os teleósteos dulcícolas foram aclimatados por até uma semana em aquário estoque (~250 litros) de água doce com água filtrada, e os diádromos (baúna e robalo) e o marinho/estuarino (baiacu) em aquário estoque marinho (~400 litros). Ambos aquários possuem filtração e aeração constante. A alimentação foi dada em dias intercalares, sendo que 24 horas antes da eutanásia, os animais não foram alimentados. Os parâmetros abióticos de temperatura, salinidade e pH são mensurados semanalmente no laboratório. Para cada espécie, 5 espécimes foram anestesiados com benzocaína 5% (massa/volume) e eutanasiados com secção medular para a retirada do segundo arco branquial do lado esquerdo para o protocolo de imunofluorescência, mantidas em -20°C até análise das fluorescências; e das

brânquias do lado direito para as atividades enzimáticas, mantidas a -80°C até os ensaios enzimáticos.

A imunofluorescência de robalo não teve sinal, o que pode ter sido influenciado pela situação do atraso de envio de amostras. O ideal será comparar com novas amostras, o que provavelmente será feito posteriormente.

3.3 Imunomarcacão da NKA e $V\text{-H}^+\text{-ATPase}$

O 2º arco branquial de cada espécie foi fixado por 3 horas em solução paraformaldeído (PFA) 2%, diluída em tampão fosfato (PBS – *phosphate buffer solution*) 1x. O tampão é formado a partir da solução de PBS 10x (NaCl 139mM; Na_2HPO_4 8mM; KH_2PO_4 1,5 mM; KCl 2,7mM; CaCl_2 1mM e MgCl_2 0,5mM). Após este tempo, os tecidos foram repetidamente lavados com PBS 1x, seguidos de incubação com PBS 1x e sacarose 5% por 3 horas, e PBS 1x e sacarose 15% *overnight*, em geladeira. Depois, os tecidos foram incubados em crioprotetor OCT (Tissue-Plus®, Fisher Health Care, Scigen Scientific Gardena, CA 90248 USA, Houston, TX 77038) por 1 hora, e emblocados em OCT (solução crioprotetora de seccionamento de temperatura ótima, Tissue-Tek) para congelamento em -20°C .

Os cortes histológicos ($\sim 10\mu\text{m}$) foram feitos em criostato (Criostato Leica® CM1850 IEC – International Equipment Company, USA), e os materiais postos em lâminas de vidro foscas (Global Trade Technology, 25,4 x 76,2 mm) que passaram anteriormente por protocolo de lavagem em soluções de NaOH, água destilada, acetona e organocilano. As lâminas foram mantidas também refrigeradas em 20°C até sua coloração para fotomicroscopias no Microscópio Confocal Ti Nikon A1RSiMP (NIKON, Tokyo, Japão) localizado no Departamento de Bioquímica da UFPR.

Para a coloração dos cortes, as lâminas foram lavadas em PBS 1x por 10 minutos, e em PBS 1x com glicina (0,1M) também por 10 minutos, e mais uma vez PBS 1x, por 5 minutos. Na sequência, foi preparada a solução de BSA 1% (diluído em PBS 1x), para o bloqueio, por 1,5 hora. Após, fez-se a incubação com anticorpo Ac primário anti- $\text{Na}^+, \text{K}^+\text{-ATPase}$ (subunidade $\alpha 5$, anti camundongo, Banco de Estudos de Desenvolvimento de Hibridoma, Departamento de Ciências Biológicas) ou anti- $V\text{-H}^+\text{-ATPase}$ (B1/2 H-180,

produzido em coelho, Santa Cruz Biotechnology®) diluídos 1:100 em BSA 0,1% (diluído em PBS 1x). A incubação se fez em câmara úmida escura (*overnight*, a 4°C). Depois, fez-se novamente a lavagem com PBS 1x (3 x de 10 minutos), o bloqueio em BSA 1% por 1,5 hora, e a incubação com o Ac secundário anti-coelho (V-H⁺-ATPase) ou anti-camundongo (NKA) IgG (diluídos como o Ac primário) conjugados com cromógeno fluoresceína (FITC) (Pierce, EUA), por 2,5 horas em câmara úmida escura (4°C). Por fim, para a montagem das lâminas, foi feita a lavagem com PBS 1x (3x de 5 minutos), seguida de Fluormount™ e lamínula e colados com esmalte base. Em algumas lâminas, após a última lavagem em PBS 1x, foi pipetado 50µL do meio de montagem DAPI (Vecta Shield), para também avaliar a coloração com DAPI (para lâminas marcadas com NKA).

A fluorescência foi obtida por captura de imagem no Microscópio Confocal Ti Nikon A1RSiMP (NIKON, Tokyo, Japan), com o software de captura Nis Elements 4.20 Confocal, e Nis Elements 4.20 Advantech Research para análise das imagens e quantificação de fluorescência. As objetivas utilizadas foram de 20x (abertura numérica de 0.75) e 60x com imersão em óleo (abertura numérica de 1.40). Para o GFP (*green fluorescent protein*) foi utilizado *laser* 488 para excitação e filtro de intervalo ("*band pass*") de 500-550nm e para o DAPI foi utilizado *laser* 405 para excitação e filtro de intervalo ("*band pass*") de 425 - 475 nm.

Para cada espécime, foram montadas: 1 lâmina "branco", 1 lâmina controle negativo (para cada comparação de lâminas marcadas) e 10 lâminas marcadas, sendo 5 para cada enzima. Para a primeira visualização da marcação das enzimas, foi feita uma lâmina "branco" para cada espécie em relação ao controle negativo. Esta lâmina não teve adição de nenhum anticorpo, e é importante para validar a especificidade do anticorpo secundário utilizado nos controles negativos. O controle negativo, por sua vez, é montado apenas com o Ac 1°. Isto possibilita a análise da autofluorescência do tecido, e sua comparação com as lâminas marcadas. Em cada lâmina, foram colocados 4 cortes. Para cada corte, foram selecionados 6 campos aleatórios. Em cada campo selecionado, para a quantificação das marcações, foi utilizado o software Nis Elements. A imagem é obtida em três dimensões, e portanto, gera

campos de médias de fluorescência. Dentre estes, foi selecionado o campo com maior intensidade de fluorescência, através da captura em “Z” (Figura 2.8).

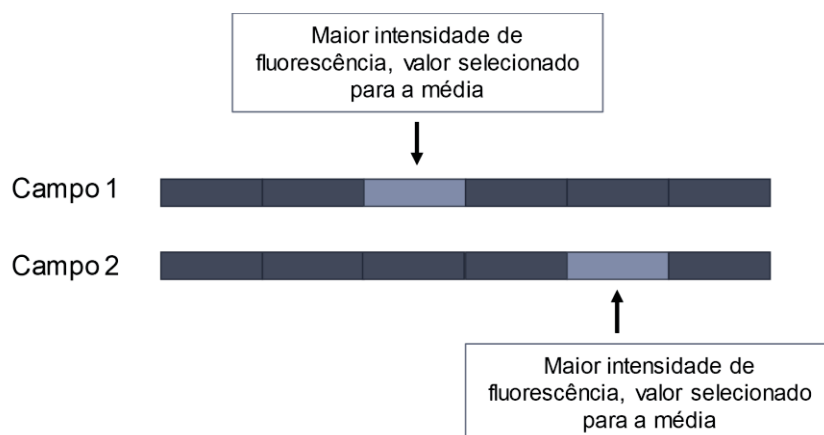


Figura 2.8 – Representação da mensuração de intensidade de fluorescência através de captura em Z. Fonte: a autora.

3.4 Atividade específica da NKA e V-H⁺-ATPase

A atividade específica branquial foi identificada a partir de uma adaptação do protocolo original de GIBBS & SOMERO (1989). O tampão de homogeneização foi composto SEID 0,5%, formado por SEI (sacarose (150mM), imidazol (50mM) e EDTA (10mM), com pH ajustado para 7.5) e ácido deoxicólico. A homogeneização foi feita na proporção de 1:20 de tampão. Após a homogeneização, foi feita a centrifugação (7 minutos, 3200 RPM, 4°C). A partir daí, foi preparada uma solução de mistura (salt mix), composta de Imidazol (30mM), NaCl, cloreto de sódio (45mM), KCl, cloreto de potássio (15mM), MgCl₂6H₂O, cloreto de magnésio hexahidratado (3mM) e KCN, cianeto de potássio (0.4mM), ATP, adenosina tri-fosfato (1mM), NADH, dinucleotídeo de adenina nicotinamida (0.2mM), PK, piruvato quinase (3IU/mL), LDH, lactato desidrogenase (2IU/mL), frutose 1,6 difosfato (0.1mM) e PEP, fosfoenol (phosphoenol) piruvato (2mM).

O volume desta solução foi então dividido em três partes. Na primeira, nenhum inibidor foi adicionado. Na segunda parte, foi adicionado 2mM de ouabaína e na terceira, 2mM de NEM, n-etilmaleimida.

Para a leitura da microplaca, foram colocados 5µL do homogenado em cada poço. Cada amostra foi pipetada doze vezes, em quadruplicatas: 1 para a solução sem inibidor; 1 para a solução com ouabaína e 1 para a solução com

NEM. A leitura foi feita no Espectrofluorímetro BioTek Synergy HT, com comprimento de onda de 340 nm, em 20 minutos de leitura, com intervalos de 50 segundos. Após, foram calculadas as inclinações de absorbância pelo tempo, utilizando apenas a porção linear para o cálculo. A atividade final é expressa em $\mu\text{mol ADP} \cdot \text{mgproteína}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$

3.5 Proteínas totais

A concentração de proteínas totais dos homogeneizados utilizados para todos os ensaios enzimáticos foi determinada utilizando-se o protocolo descrito por BRADFORD (1976), adaptado para microplacas (96 poços) de fundo chato. Utilizaram-se microplacas com leitura em leitor de Elisa (Espectrofluorímetro Biotec Instruments EL 800). O método é baseado na ligação de grupos funcionais básicos ou aromáticos das proteínas ao corante Coomassie Brilliant Blue G-250, com leitura feita a 595 nm (MIWA *et al.*, 2008).

3.6 Análise estatística

Anterior aos testes estatísticos para analisar as quantificações em lâminas marcadas (NKA e V-H⁺-ATPase), foi feita ANOVA de uma via para comparar as fluorescências entre as lâminas marcadas com a do controle negativo (CN, sem Ac 1°). O teste-T foi utilizado para analisar as quantificações das marcações das enzimas (NKA e V-H⁺-ATPase) dentro da mesma espécie. A ANOVA de uma via foi feita para identificar diferenças nas quantificações entre as diferentes espécies. Para analisar a atividade específica das enzimas, foi utilizado ANOVA de uma via para identificar diferenças dentro de espécies diferentes (enzima x espécie), e teste-T para cada enzima (NKA e V-H⁺-ATPase) dentro de uma mesma espécie. Holm-Sidak foi o teste post-hoc para ANOVA de uma via quando a análise de ANOVA para NKA não passou no teste de normalidade. O nível de significância para os testes foi de $< 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Imunomarcação da NKA e V-H⁺-ATPase em brânquias de teleósteos da ordem Characiformes (ostariofíseos, primários de água doce)

A localização da NKA em lambari, *Astyanax bimaculatus* (Figura 2.9A) e piracanjuba, *Brycon orbignianus* (Figura 2.9B) tem distribuição em regiões interlamelares e ao longo da lamela secundária. Para a enzima V-H⁺-ATPase, a distribuição foi marcada de forma difusa em ambas as espécies, parecendo preencher todo o citoplasma celular (Figura 2.9B e D).

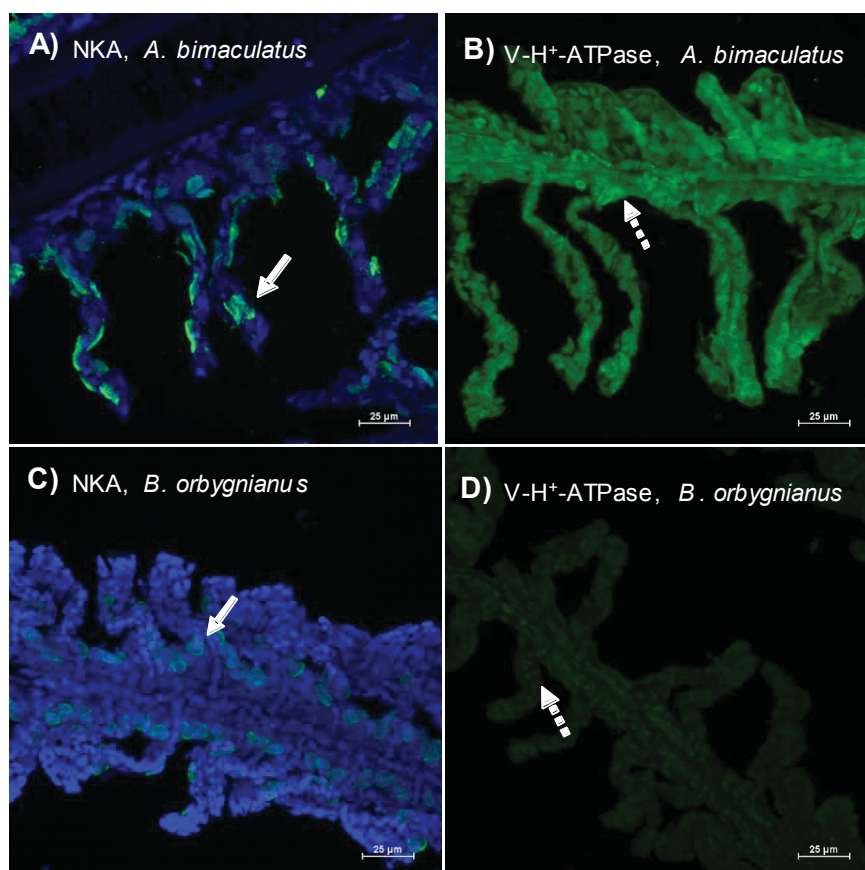


Figura 2.9 – Imunomarcação em teleósteos dulcícolas da ordem Characiformes, com aumento de 60x. (A): Marcação de NKA (B): e V-H⁺-ATPase em *Astyanax bimaculatus*, lambari (C): Marcação de NKA (D): e V-H⁺-ATPase em *Brycon orbignianus*, piracanjuba. Fluoróforo FITC (verde) e DAPI (azul, marcador de núcleo, para NKA). NKA apontada por setas e V-H⁺-ATPase por setas tracejadas.

4.2 Imunomarcacão da NKA e V-H⁺-ATPase em brânquias de teleósteos das ordens Cypriniformes e Siluriformes (ostariofíseos, primários de água doce)

A localizao da NKA em carpa-capim, *Ctenopharyngodon idella* (Figura 2.10A) foi semelhante aos representantes ostariofíseos das ordens Characiformes e Siluriformes, com distribuo em regiões interlamelares e ao longo da lamela secundária. Para a enzima V-H⁺-ATPase, os resultados da tese evidenciam uma distribuo dispersa por todo o epitélio branquial, parecendo preencher todo o citoplasma celular (Figura 2.10B).

Em jundiá, *Rhamdia quelen* (Figura 2.10C) foi observada uma marcao intensa de NKA em regiões interlamelares e ao longo da lamela secundária. A localizao de V-H⁺-ATPase foi difusa, em grande parte das espécies estudadas, e parece preencher todo o citoplasma celular (Figura 2.10D).

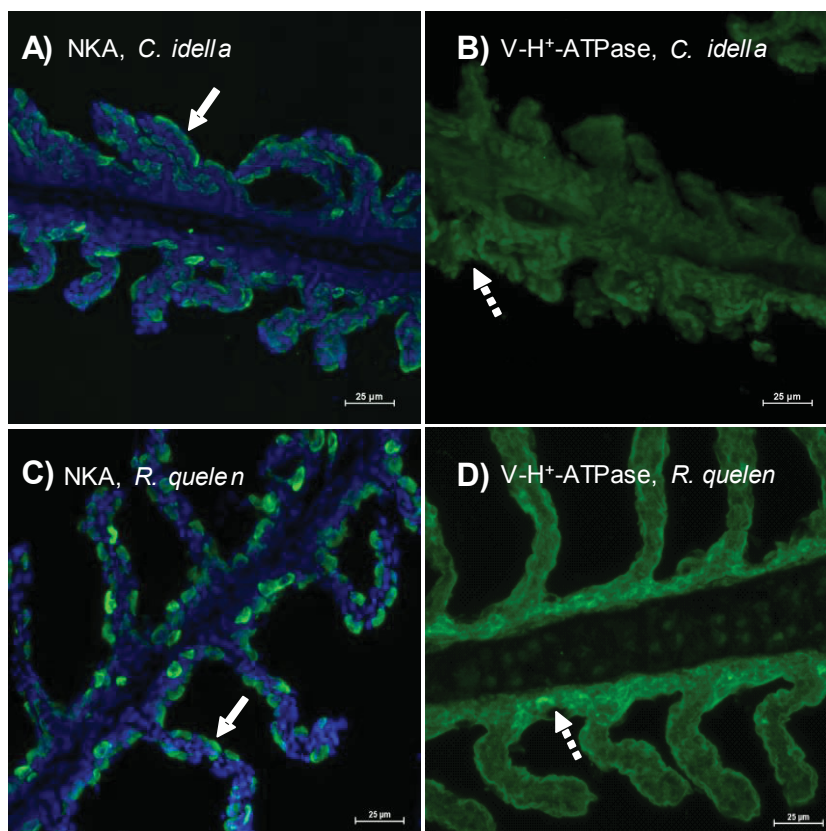


Figura 2.10 – Imunomarcacão em teleósteos dulcícolas das ordens Cypriniformes e Siluriformes, com aumento de 60x. (A): Marcao de NKA (B): e V-H⁺-ATPase em *Ctenopharyngodon idella*, carpa-capim (C): Marcao de NKA (D): e V-H⁺-ATPase em *Rhamdia quelen*, jundiá. Fluoróforo FITC (verde) e DAPI (azul, marcador de núcleo, para NKA). NKA apontada por setas e V-H⁺-ATPase por setas tracejadas.

4.3 Imunomarcacão da NKA e V-H⁺-ATPase em brânquias de teleósteos da ordem Perciformes (acanthopterígeos, família Cichlidae com representantes secundários de água doce e espécie diádroma)

Em tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*, Cichlidae, e no teleósteo marinho baúna *Lutjanus jocu*, foi possível identificar uma localização de NKA estrita a base do filamento branquial, em regiões interlamelares (Figura 2.11A e C). Os resultados permitem observar em ambos os Perciformes uma localização dispersa de V-H⁺-ATPase, parecendo preencher todo o citoplasma celular (Figura 2.11B e D).

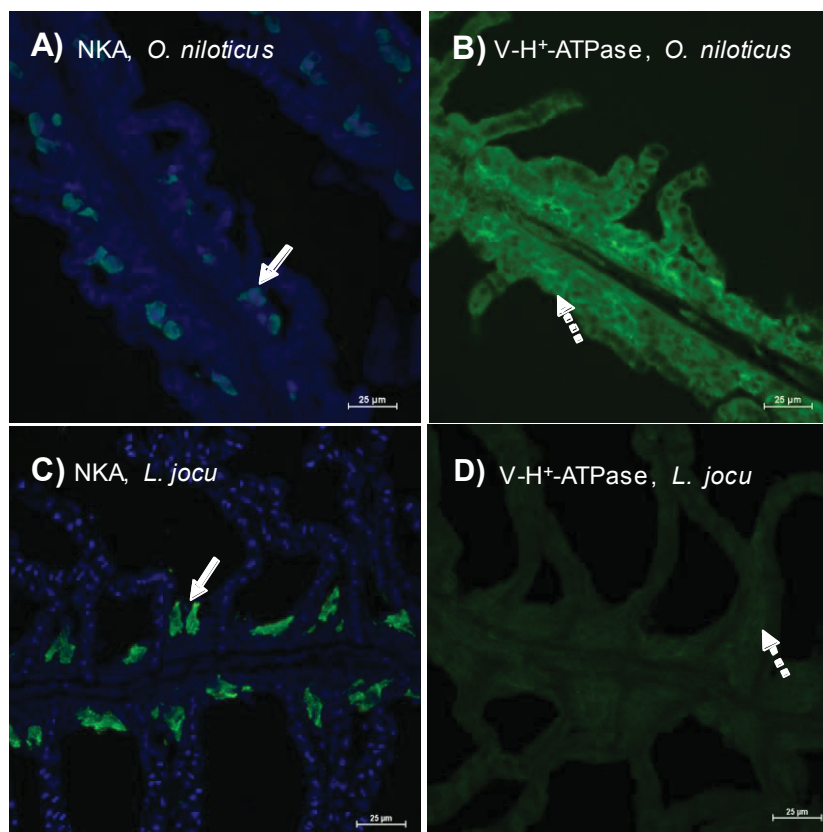


Figura 2.11 – Imunomarcacão em teleósteo dulcícola/estuarino da ordem Perciformes, com aumento de 60x. (A): Marcação de NKA (B): e V-H⁺-ATPase em *Oreochromis niloticus*, tilápia-do-Nilo. Imunomarcacão em teleósteo diádromo da ordem Perciformes, com aumento de 60x. (C): Marcação de NKA (D): e V-H⁺-ATPase em *Lutjanus jocu*, baúna. Fluoróforo FITC (verde) e DAPI (azul, marcador de núcleo, para NKA). NKA apontada por setas e V-H⁺-ATPase por setas tracejadas.

4.4 Imunomarcação da NKA e V-H⁺-ATPase em brânquias de teleósteo da ordem Tetraodontiformes (acanthopterígeo, espécie marinha/estuarina)

Em baiacus marinhos/estuarinos, *Sphoeroides greeleyi*, a localização da NKA é distribuída em regiões interlamelares (Figura 2.12A). Nos resultados desta tese, a localização da V-H⁺-ATPase foi marcada de forma pontual, ao longo do filamento e das lamelas, parecendo preencher todo o citoplasma celular (Figura 2.12B).

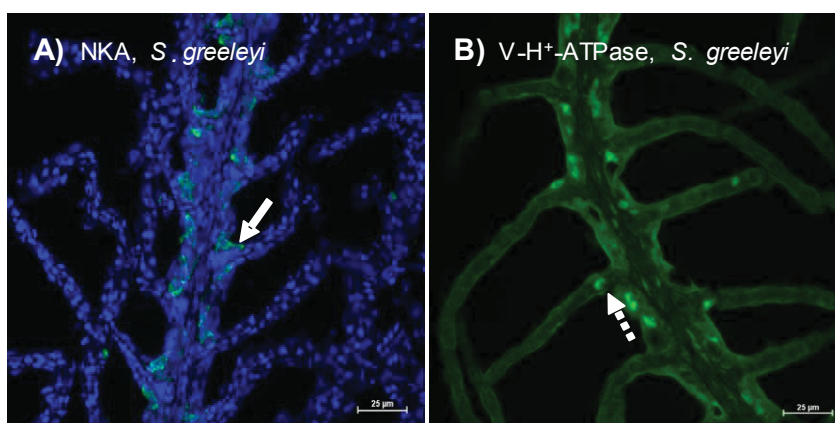


Figura 2.12 – Imunomarcação em teleósteo marinho/estuarino da ordem Tetraodontiformes, com aumento de 60x. (A): Marcação de NKA (B): e V-H⁺-ATPase em *Sphoeroides greeleyi*, baiacu. Fluoróforo FITC (verde) e DAPI (marcador de núcleo). NKA apontada por setas e V-H⁺-ATPase por setas tracejadas.

4.5 Quantificação das imunomarcações constitutivas da NKA e V-H⁺-ATPase

Os valores da fluorescência do controle negativo foram utilizados para evidenciar que há a marcação de NKA e V-H⁺-ATPase, não sendo mostrados no gráfico. A quantificação (intensidade) de imunofluorescência entre os teleósteos, para NKA, foi de 1061±98,1. Para a V-H⁺ATPase, a intensidade foi de 1078±167. Para o grupo dos ostariofíseos (primários de água doce), a NKA teve uma média de 1149±137,9 de intensidade de fluorescência. Para os acanthopterígeos (Perciformes: Cichlidae, secundários de água doce e espécies aclimatadas em água do mar), este valor foi de 945±103,7. Para a V-

H⁺ATPase a média da intensidade de fluorescência foi de 1062±186,2 em ostariofíseos e de 1100±299,7 no grupo dos acanthopterígeos. A NKA não teve diferença estatística entre os teleósteos, enquanto a H⁺-V-ATPase foi menor em piracanjuba e baúna. Piracanjuba não teve diferença de fluorescência em relação a lambari e carpa, apenas. A baúna, por sua vez, só foi semelhante a piracanjuba. A NKA teve maior fluorescência que H⁺-V-ATPase em baúna, e menor que a H⁺-V-ATPase em baiacu.

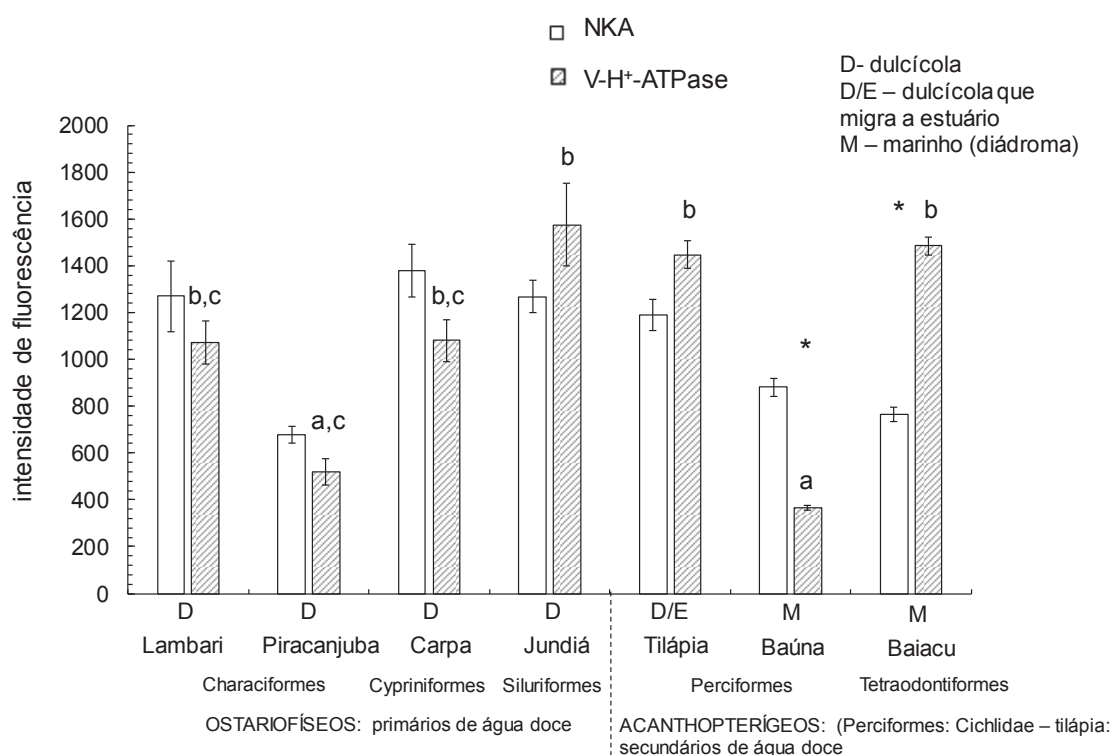


Figura 2.13 – Quantificação das imunomarcações constitutivas de NKA e V-H⁺-ATPase dos diferentes teleósteos estudados, feitas no aumento de 20x. *Astyanax bimaculatus*, lambari; *Brycon orbignyana*, piracanjuba; *Ctenopharyngodon idella*, carpa-capim; *Rhamdia quelen*, jundiá; *Oreochromis niloticus*, tilápia do Nilo; *Lutjanus jocu*, baúna; *Centropomus parallelus*, robalo; *Sphoeroides greeley*, baiacu. Letras diferentes identificam diferenças entre as quantificações das enzimas NKA ou V-H⁺-ATPase entre as diferentes espécies. Asteriscos identificam diferenças entre as quantificações das enzimas dentro de uma mesma espécie.

4.6 Atividade enzimática da NKA e V-H⁺-ATPase em teleósteos ostariofíseos (primários de água doce) e acanthopterígeos (Perciformes: Cichlidae, secundários de água doce e espécies aclimatadas em água do mar)

Os valores da atividade ATPásica total foram utilizados apenas para calcular os valores da atividade enzimática de NKA e V-H⁺-ATPase, não sendo

mostrados no gráfico, e nem utilizados para a análise estatística. Em relação a NKA, os teleósteos tiveram uma média de atividade enzimática de $1,75 \pm 0,39 \mu\text{mol ADP} \cdot \text{mg ptn}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. Para os ostariofíseos (primários de água doce), a atividade enzimática da NKA teve uma média maior ($1,98 \pm 0,67 \mu\text{mol ADP} \cdot \text{mg ptn}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) do que em acanthopterígeos (Perciformes: Cichlidae, secundários de água doce e espécies aclimatadas em água do mar), com a atividade média de $1,46 \pm 0,33 \mu\text{mol ADP} \cdot \text{mg ptn}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. Em relação a $V\text{-H}^+\text{-ATPase}$, os teleósteos tiveram uma média de atividade enzimática de $1,08 \pm 0,40 \mu\text{mol ADP} \cdot \text{mg ptn}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. Para os ostariofíseos, a atividade enzimática da $V\text{-H}^+\text{-ATPase}$ teve uma média de $1,53 \pm 0,62 \mu\text{mol ADP} \cdot \text{mg ptn}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, maior que para os acanthopterígeos, com a atividade média de $0,47 \pm 0,17 \mu\text{mol ADP} \cdot \text{mg ptn}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$.

Não houve diferença estatística entre as diferentes espécies em relação a atividade de NKA. Em relação a $V\text{-H}^+\text{-ATPase}$, a piracanjuba teve uma atividade enzimática maior ($3,17 \pm 1,03 \mu\text{mol ADP} \cdot \text{mg ptn}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) que em baiacu ($0,12 \pm 0,16 \mu\text{mol ADP} \cdot \text{mg ptn}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$). Em tilápia do Nilo foi identificado uma maior atividade enzimática da NKA ($2,02 \pm 0,54 \mu\text{mol ADP} \cdot \text{mg ptn}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) do que em $V\text{-H}^+\text{-ATPase}$ ($0,69 \pm 0,20 \mu\text{mol ADP} \cdot \text{mg ptn}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$), assim como em baiacu (NKA $0,88 \pm 0,47 \mu\text{mol ADP} \cdot \text{mg ptn}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ e $V\text{-H}^+\text{-ATPase}$ $0,12 \pm 0,16 \mu\text{mol ADP} \cdot \text{mg ptn}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) (Figura 2.14).

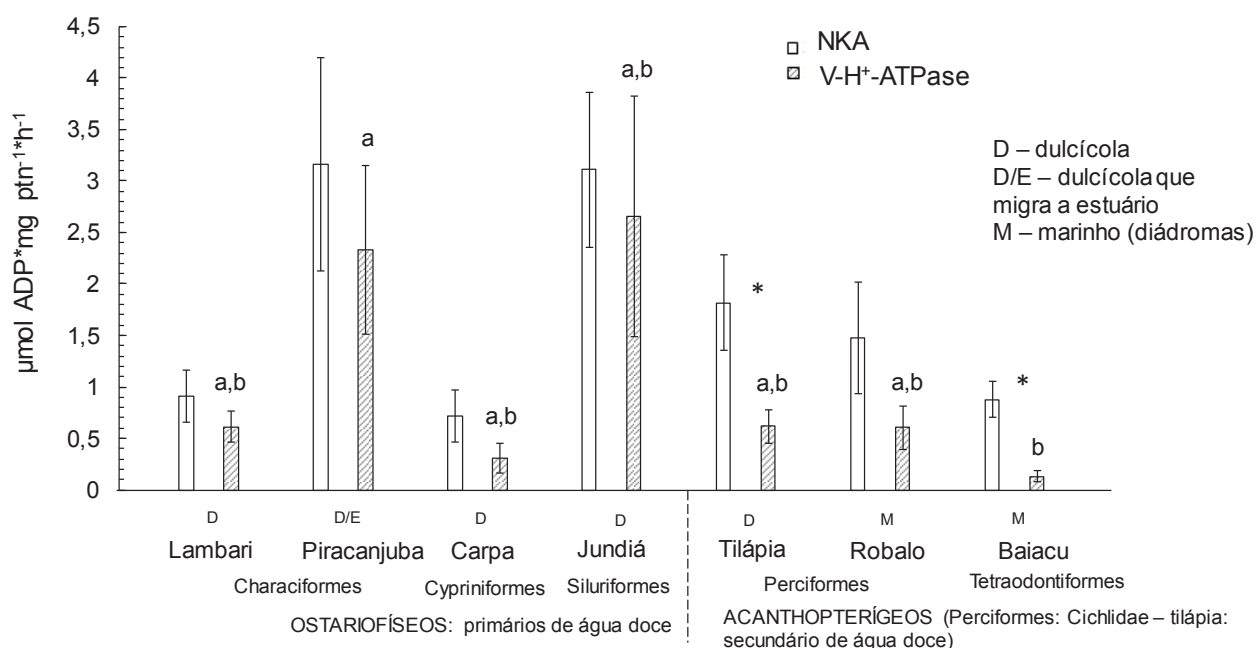


Figura 2.14 – Atividades enzimáticas constitutivas de NKA e V-H⁺-ATPase dos diferentes teleósteos estudados. *Astyanax bimaculatus*, lambari; *Brycon orbignyanus*, piracanjuba; *Ctenopharyngodon idella*, carpa-capim; *Rhamdia quelen*, jundiá; *Oreochromis niloticus*, tilápia do Nilo; *Lutjanus jocu*, baúna; *Centropomus parallelus*, robalo; *Sphoeroides greeley*, baiacu. Letras diferentes identificam diferenças entre as atividades enzimáticas de V-H⁺-ATPase entre as diferentes espécies. Asteriscos identificam diferenças entre as atividades de NKA e V-H⁺-ATPase dentro da mesma espécie.

5 DISCUSSÃO

5.1 Localização e atividade de NKA e V-H⁺-ATPase em ostariofíseos

Os Characiformes lambari e piracanjuba tiveram igual distribuição de NKA do que o teleósteo dulcícola curimbatá, *Prochilodus lineatus* (SIMONATO *et al.*, 2013), e uma atividade de NKA menor (para lambari) e maior (para piracanjuba) do que curimbatá em água doce (SIMONATO *et al.*, 2013).

O Cypriniformes carpa-capim teve uma localização de NKA diferente do identificado em *snow trout*, *Schizothorax curvifrons*, observadas apenas em regiões interlamelares (MIR & NABI, 2011). Mas em peixe zebra, *Danio rerio* as enzimas NKA e V-H⁺-ATPase foram identificadas em regiões interlamelares e lamelares (HWANG, 2009). Em relação a atividade enzimática, a NKA foi menor do que o identificado em vobla, *Rutilus caspicus*, também em água doce (KOLBADINEZHAD *et al.*, 2012).

Em jundiá, a distribuição de NKA e V-H⁺-ATPase foi similar ao observado em água doce e 15‰, com a mesma espécie (MARASCHI, 2014), o que dá consistência aos resultados. Em relação as atividades enzimáticas, nesta tese os valores foram maiores do que em MARASCHI (2014).

Para os ostariofíseos, o padrão de marcação de NKA foi semelhante a de outras ordens estudadas. No teleósteo ostariofíseo diádroso *milkfish* (*Chanos chanos*, Gonorynchiformes) a imunolocalização de NKA em água do mar, a localização de NKA é observada ao longo do filamento branquial, enquanto em água doce esta distribuição também é identificada nas lamelas (LIN & LEE, 2003; TANG *et al.*, 2011).

Este padrão de distribuição de NKA, diferente do evidenciado em acanthopterígeos, sugere uma otimização para a captação de sal.

5.2 Localização e atividade de NKA e V-H⁺-ATPase em acanthopterígeos (Perciformes: Cichlidae, secundários de água doce e espécies aclimatadas em água do mar)

Para a tilápia do Nilo, dulcícola e estuarina, a distribuição de NKA foi semelhante a imunoensaios no ciclídeo *blackchin* tilápia, *Sarotherodon melanotheron*, quando em água doce. Em água do mar ou hipersalina, a imunofluorescência para esta espécie também foi identificada nas lamelas secundárias (OUATTARA *et al.*, 2009). Em relação a V-H⁺-ATPase, o ciclídeo *O. mossambicus*, a V-H⁺-ATPase foi imunorreativa apenas em células pavimentares, e não teve imunorreatividade em água do mar (HIROI *et al.*, 1999). Na mesma espécie foi observada a marcação interlamelar de NKA e demonstrada a co-localização de V-H⁺-ATPase e ENaC (canais específicos de Na⁺) apenas em células pavimentares, recobrando a região lamelar e o filamento (WILSON *et al.*, 2000). Em relação as atividades enzimáticas, a NKA nos resultados da tese foi maior que na mesma espécie identificado em CERON (2012). Alguns estudos identificam uma pré-adaptação da enzima em transferências a variações de salinidade, com uma maior atividade em salinidades mais baixas (GÜNER *et al.*, 2005; YAO & AHOUSSE, 2008). Em estudo com o teleósteo dulcícola tricogáster (*T. microlepis*, em água doce, a atividade enzimática branquial em, foi menor do que identificado em tilápia nesta tese (HUANG *et al.*, 2010).

Em comparação ao diádroso baúna, no teleósteo marinho *grouper*, *Epinephelus coioides*, a distribuição de MRC's (com localização da NKA) também foi identificada em regiões interlamelares (CABEROY & QUINITIO, 2000). No teleósteo diádroso monodactilus (ou *silver moony*) (*Monodactylus argenteus*, Monodactylidae) aclimatado em água doce, água salobra e água do mar, a localização de NKA foi identificada em regiões interlamelares, e também nas lamelas, apenas para o grupo de água doce (KANG *et al.*, 2012). No teleósteo diádroso barramundi, *Lates calcarifer*, a expressão da enzima, em barramundi, é aumentada em hipercapnia após 2 horas quando comparado a situação controle. A distribuição da enzima é observada ao longo do filamento, e de maneira mais esparsa, também ao longo das lamelas. A

imunorreatividade de V-H⁺-ATPase também aparece no citoplasma da célula (WEAKLEY *et al.*, 2012). Para a atividade enzimática, o Perciforme diádroso robalo teve, nos resultados desta tese, valores menores de NKA do que nos marinhos *rabbitfish*, *Siganus rivulatus* (SAOUD *et al.*, 2007) e *grouper*, *Epinephelus coioides* (CABEROY & QUINTIO, 2000).

Para o Tetraodontiformes baiacu, a distribuição de NKA foi semelhante ao baiacu *Tetraodon nigroviridis*, tanto em água do mar quanto água doce (TANG *et al.* 2011). A distribuição da V-H⁺-ATPase, pontual, foi diferente dos demais teleósteos estudados na tese.

Em outras ordens de acanthopterígeos, como Cyprinodontiformes, a NKA fica localizada em regiões interlamelares, como em *guppy*, *Poecilia reticulata* (SHIKANO & FUJIO, 1998) e *sailfin molly*, *P. latipinna* (YANG *et al.*, 2011). Em um estudo com duas espécies de *killifish*, *Lucania goodei*, estenohalina e *L. parva*, eurihalina, transferidos para 0, 10 e 20‰, foi observado que a espécie eurihalina expressa mais proteínas relacionadas a captação e secreção de íons, incluindo a NKA. Por outro lado, a espécie estenohalina expressa altas taxas de proteínas relacionadas apenas a captação de íons. Ambas as espécies expressam níveis similares de V-H⁺-ATPase (BERDAN & FULLER, 2012). Em teleósteos marinhos/estuarinos *longhorn sculpin* (*Myoxocephalus octodecemspinosus*, Scorpaeniformes), mantidos em água do mar, a NKA é identificada em MRC's largas e ovoides de regiões interlamelares, colocalizada com o trocador NHE (Na⁺/H⁺). A enzima V-H⁺-ATPase foi marcada de forma difusa em células na base da lamela (poucas em regiões interlamelares), com um indicativo de localização basolateral, com poucas células colocalizadas com a enzima NKA (CATCHES *et al.*, 2006). Em *sheepshead minnow*, *Cyprinodon variegatus*, a maior atividade enzimática de NKA é identificada em aclimatação a água do mar (KARNAKY *et al.*, 1976).

5.3 Comparação entre a localização, quantificação de imunofluorescência e atividades enzimáticas de NKA e V-H⁺ATPase e sua possível relação com a história evolutiva de ostariofíseos (primários de água doce) e acanthopterígeos (*Perciformes: Cichlidae*, secundários de água doce e espécies aclimatadas em água do mar)

Nesta tese, foram feitas análises constitutivas das enzimas NKA e V-H⁺ATPase, o que permite uma análise entre os grupos de teleósteos. Importante salientar que foi estudada a filogenia básica destes grupos. Este conhecimento é importante para poder comparar e relacionar, ou ao menos discutir a relação entre os padrões de localização e/ou atividades enzimáticas e suas histórias evolutivas.

O estudo de enzimas chave para a osmorregulação, como a NKA e a V-H⁺ATPase são metodologias para se discutir a plasticidade osmorregulatória da espécie aliada a possível filogenia conhecida (RUIZ-JARABO *et al.*, 2016). A marcação permite evidenciar a presença da proteína, porém não nos diz se ela é ativa (i.e., funcional) – ainda que possuam anticorpos que se ligam apenas a epítomos ativados. Ou seja, a especificidade da ligação é imunológica, e não biológica (WILSON, 2007). Também, as proteínas possuem isoformas, que podem ser responsáveis por regular o transporte de íons conforme a espécie ou o ambiente (e.g.: FENG *et al.*, 2002; RICHARDS *et al.*, 2003; IP *et al.*, 2012) e que podem não ser marcadas caso o anticorpo não possua a ligação para determinada isoforma.

5.3.1 Em relação a enzima NKA

Em geral, os estudos com teleósteos mostram como resultados a localização interlamelar da NKA. Na tese, em relação a localização da NKA, todos os ostariofíseos estudados tiveram uma distribuição semelhante da enzima na região interlamelar e ao longo das lamelas secundárias. Este padrão é observado em grande parte dos estudos com teleósteos das mesmas ordens, e no estudo com outros ostariofíseos, como *Chanos chanos* (TANG *et al.*, 2011). Esta semelhança pode sugerir que em ostariofíseos, com uma história evolutiva de maior tempo de estabelecimento em água doce, esta distribuição

deva ser mais dispersa, para otimizar a captação de sal por todo o tecido branquial.

Este padrão foi diferente do observado entre os acanthopterígeos. O grupo com representantes secundariamente dulcícolas e marinhos possuem a localização apenas na região interlamelar, consistente com outros estudos com espécies de acanthopterígeos. Em relação a espécie dulcícola (tilápia do Nilo), possivelmente isto reflita sua história evolutiva. Em hipótese, suas células quando em água do mar, precisavam secretar sal. Quando passaram a ter de absorver sal, o espaço para o transportador de secreção “diminuiu”, pois os transportadores para a captação se tornaram mais necessários.

A detecção da similaridade de fluorescência e atividade enzimática entre os teleósteos sugere a conservação de sua localização e distribuição devido a sua função na manutenção do gradiente químico intracelular bem como sua participação na osmorregulação.

5.3.2 Em relação a enzima V-H⁺-ATPase

Para a enzima chave para a captação de sal, V-H⁺ATPase, a localização da enzima foi dispersa em todas as espécies dulcícolas. Na espécie marinha baúna a localização é dispersa, porém com menor intensidade de fluorescência. Em baiacu, marinho/estuarino, a localização é mais pontual, ainda que por todo o tecido branquial. Não foi possível identificar, com esta técnica, se a enzima está translocada em MRC'S ou células pavimentares, ou em ambas. Esta terceira opção parece ser o mais provável, visto a sua distribuição ser dispersa (MRC's ficam em bases lamelares, e células pavimentares ao longo das lamelas e filamento). A enzima V-H⁺ATPase também desempenha uma função importante no organismo, de equilíbrio ácido-base. Além disso, pode estar na porção citosólica (vacuolar) e possui várias isoformas. O anticorpo 1º, policlonal, pode-se ligar a estas diversas isoformas. Estas características podem ter contribuído com o resultado da localização da enzima.

Em relação a intensidade de fluorescência entre os ostariofíseos, o jundiá teve uma maior intensidade de fluorescência do que a piracanjuba. A piracanjuba pode migrar a regiões estuarinas, o que pode sugerir esta

diferença entre a espécie estritamente dulcícola. Ou pode estar relacionada a existência de outros transportadores para a captação de sal (RUIZ-JARABO *et al.*, 2016). Em relação as espécies dulcícolas, a tilápia do Nilo (acanthoptérigeo, dulcícola/estuarina - eurihalina) também teve uma maior intensidade de fluorescência do que a piracanjuba. A tilápia tolera maiores salinidades que piracanjuba. Salinidades diferentes possuem pH's diferentes. Em geral, águas com maiores salinidades possuem um pH mais alcalino (e.g.: WILLMER *et al.*, 2005). Portanto, esta diferença pode estar relacionada com a função não osmorregulatória da V-H⁺ATPase.

O baiacu (acanthoptérigeo, marinho/estuarino) teve também maior intensidade de fluorescência do que baúna, o que já se podia esperar, visto que a baúna foi coletada em água do mar. Mas baiacu também teve maior fluorescência que a piracanjuba. Esperava-se que este resultado fosse inverso. Uma sugestão para esta observação é a própria marcação pontual da enzima no baiacu (que acresce a média da quantificação por concentrar a enzima). Outra sugestão é a de que o baiacu precisa ativar mais a enzima V-H⁺ATPase, pois pode migrar a ambientes estuarinos a partir da água do mar. Já a piracanjuba migra a águas estuarinas mais diluídas, porém possui uma quantidade da enzima suficiente para a captação de sal neste ambiente ou em água doce. O teleósteo baúna (acanthoptérigeo, diádromo) teve a menor intensidade de fluorescência para a V-H⁺ATPase, sendo similar apenas a intensidade da piracanjuba. Neste caso, pode-se sugerir que sua coleta e aclimatação em água do mar foram a causa da baixa imunofluorescência desta enzima.

A piracanjuba (ostariofíseo), teve uma maior atividade enzimática que a identificada em baiacu (acanthoptérigeo, marinho/estuarino). Este resultado sugere que esta metodologia é mais sensível, em um resultado quantitativo, do que a metodologia da imunofluorescência (quantificada através de pontos teciduais selecionados). Pode-se discutir este resultado conflitante, também pela relação entre a atividade funcional da enzima e a regulação da expressão da mesma. A atividade enzimática, ainda que aumente, pode não ter a proporção de aumento de regulação da expressão da respectiva enzima. Ou ainda, pode sugerir uma enzima inativa, ou seja, que possui a marcação (está expressa e translocada na membrana), mas não está funcional (WILSON,

2007). A relação entre a quantificação da imunofluorescência e a atividade enzimática de $V\text{-H}^+\text{-ATPase}$ foi maior nas médias dos acanthopterígeos (com menor atividade enzimática) em relação aos ostariófíseos. Provavelmente, a intensidade de fluorescência identificada em baiacu tenha contribuído para este resultado.

5.3.3 Em relação a NKA e $V\text{-H}^+\text{-ATPase}$

Em relação a quantificação de imunofluorescência, a diferença entre as duas enzimas foi identificada apenas nos teleósteos diádromos e marinhos/estuarinos acanthopterígeos, baúna e baiacu. Em baúna, a NKA teve uma intensidade de fluorescência maior que o dobro da intensidade de fluorescência da $V\text{-H}^+\text{ATPase}$. A baúna é uma espécie diádroma e foi coletada em água do mar. Portanto, a localização da $V\text{-H}^+\text{ATPase}$ dispersa, ao longo do filamento e das lamelas, sugere a importância da enzima para a captação de sal em água doce. Ademais, a baixa fluorescência desta enzima em água do mar sugere que embora com bastante quantidade, o funcionamento da enzima não é tão importante (ao menos na captação de sal) em água do mar quando comparado ao ambiente dulcícola.

Em baiacu, embora aparentemente com localização mais pontual (menos dispersa) que em baúna, a intensidade de fluorescência da $V\text{-H}^+\text{ATPase}$ foi quase o dobro da intensidade de fluorescência de NKA. Os baiacus foram coletados em estuário. É muito comum a coleta desta espécie em regiões estuarinas. Portanto, este resultado pode sugerir quatro causas. A primeira pode sugerir que por migrar a estuários a partir da água do mar, porém não migrar a ambientes dulcícolas, a espécie mantém uma distribuição menor da enzima $V\text{-H}^+\text{ATPase}$, ainda que esta seja mais ativa em menores salinidades. A segunda hipótese, que o tempo de aclimação em água do mar não é suficiente para diminuir a expressão da enzima $V\text{-H}^+\text{ATPase}$. Ou a terceira, que mesmo com esta aclimação em água do mar, a espécie mantém a expressão de enzimas necessária para quando migrar a regiões com menores concentrações de sais. Ou ainda, que a quantificação é bem evidente devido a concentração da enzima em determinado ponto do tecido branquial.

As espécies tilápia do Nilo (dulcícola/estuarina) e baiacu (marinho/estuarino), ambas do grupo dos acanthopterígeos, tiveram a atividade enzimática da NKA maior que a da V-H⁺-ATPase. Para a tilápia do Nilo, alguns estudos mostram distintos resultados para a atividade de NKA em água doce quando comparados a variações de salinidade (eg.: GÜNER et al., 2005; CERON et al., 2012). Em relação ao baiacu, este resultado conflita com o evidenciado para a quantificação de imunofluorescência. Como discutido acima, a quantificação analisa um ponto do tecido, e não é um método quantitativo tão confiável quanto a atividade enzimática. Os baiacus foram coletados em estuário, e isto sugere a localização da V-H⁺-ATPase com uma atividade enzimática menor do que o identificado para NKA.

5.4 Relação entre os resultados e possível história evolutiva dos teleósteos

Em uma revisão de FRIEDMAN (2015), salienta-se que a dificuldade em se estudar a filogenia inicial dos teleósteos se dá pela falta de conhecimento de como organizar os registros fósseis entre os grupos modernos e outro ancestral. Isto ocorre devido a estes registros serem amplamente ou exclusivamente restritos a grupos extintos. Algumas espécies de teleósteos diádromos ficaram restritos a água doce, com pouco ou nenhum contato com a água do mar, devido a formação de barreiras naturais a partir do último evento de deglaciação do Pleistoceno Superior (~18 milhões de anos). Neste exemplo, a necessidade de hiperregular fez com que estes teleósteos reajustassem mecanismos para conter o transporte passivo para a perda de íons e o ganho de água. Esta readaptação da plasticidade osmorregulatória pode ser acelerada devido a mudança abrupta e em longo prazo do ambiente, embora existam autores que considerem que este confinamento “natural” promova uma perda desta plasticidade. Estes extremos podem resultar ou sofrer a interferência do tempo de exposição da espécie a este novo ambiente (RUIZ-JARABO et al., 2016).

Esta lacuna contribui com a discussão para a origem (quando e onde – água doce ou marinha) exata dos teleósteos. Embora não seja conclusivo, a identificação dos padrões de marcação das enzimas estudadas (com a presença de V-H⁺-ATPase em teleósteos primários e secundários de água

doce), aliadas a leitura sobre a história evolutiva dos teleósteos reforça, na interpretação desta tese, a origem dulcícola destes organismos.

6 CONCLUSÕES

Os resultados permitiram identificar uma clara distinção entre a localização de NKA branquial entre representantes ostariofíseos (primários de água doce) e acanthopterígeos (Perciformes: Cichlidae, secundários de água doce e espécies aclimatadas em água do mar). Ostariofíseos, com seu estabelecimento há mais tempo em água doce, possuem uma maior distribuição da enzima, o que otimiza a captação de sal no organismo. Em relação a distribuição de V-H⁺-ATPase observa-se uma maior diferença entre os teleósteos diádromos e marinhos/estuarinos em relação aos dulcícolas, seja por uma menor intensidade de fluorescência ou localização mais pontual. Os resultados opostos entre imunofluorescência e atividade enzimática sugerem a marcação de uma enzima não ativa (não funcional, embora expressa). Através dos resultados podemos sugerir a ancestralidade dulcícola dos teleósteos, devido a presença de V-H⁺-ATPase em ambos os grupos.

Sugestão para estudos: 1) detecção de células pavimentares e MRC's, como feito em WITTERS *et al.* (1996) e GALVEZ *et al.* (2008) junto a marcação das enzimas 2) localização da NKA e V-H⁺-ATP-ase em espécies diádromas, aclimatando-as em água doce e água do mar 3) expressão destas enzimas em protocolos de transferência a variações de salinidade (gradual ou abrupto).

REFERÊNCIAS CAPÍTULO 2

ALBERT, J.S.; LOVEJOY, N.R.; CRAMPTON, W.G.R. Miocene tectonism and the separation of cis- and trans-Andean river basins: Evidence from Neotropical fishes. **Journal of South American Earth Sciences**. v. 21, pgs. 14-27, 2006.

ALLEN, R.D.; TOMINAGA, T. & NAITOH, Y. **The Contractile Vacuole Complex and Cell Volume Control in Protozoa**. In: EVANS, D.H. Osmotic and Ionic Regulation: cells and animals. CRC press, 2009.

ALLEN, P.J.; McENROE, M.; FOROSTYAN, T.; COLE, S. NICHOLL, M.N.; HODGE, B. & CECH JR, J.J. Ontogeny of salinity tolerance and evidence for seawater-entry preparation in

juvenile Green sturgeon, *Acipenser medirostris*. **Journal of Comparative Physiology**. v. 181, pgs. 1045-1062, 2011.

BERDAN, E.L. & FULLER, R.C. Interspecific divergence of ionoregulatory physiology in killifish: insight into adaptation and speciation. **Journal of Zoology**. v. 287, pgs. 283-291, 2012.

BETANCURT, R.; ORTÍ, G. & PYRON, R.A. Fossil-based comparative analyses reveal ancient marine ancestry erased by extinction in ray-finned fishes. **Ecology Letters**, v. 18, pgs. 441-450, 2015.

BUONERBA, L.; ZACCARA, S.; DELMASTRO, G.B.; LORENZONI, M. SALZBURGER, W. & GANTE, H.F. Intrinsic and extrinsic factors act at different spatial and temporal scales to shape population structure, distribution and speciation in Italian Barbus (Osteichthyes: Cyprinidae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**. v. 89, pgs. 115-129, 2015.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, pgs.248-254, 1976.

BRUSCA, G.J. & BRUSCA, R.J. **Invertebrados**. 1ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.

CABEROY, N.B. & QUINITIO, G.F. Changes in Na⁺, K⁺-ATPase activity and gill chloride cell morphology in the grouper *Epinephelus coioides* larvae and juveniles in response to salinity and temperature. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 23, pgs. 83-94, 2000.

CATCHES, J.S.; BURNS, J.M.; EDWARDS, S.L. & CLAIBORNE, J.B. Na⁺/H⁺ antiporter, V-H⁺-ATPase and Na⁺/K⁺-ATPase immunolocalization in a marine teleost (*Myoxocephalus octodecemspinosus*). **The Journal of Experimental Biology**. v. 209, pgs. 3440-3444, 2006.

CERON, F.J.M. **Plasticidade osmorregulatória de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) e o uso de estuários como pontes de dispersão de peixes eurihalinos**. (Dissertação). Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2012.

CHAKRABARTY, P. Cichlid biogeography: comment and review. **Fish and Fisheries**. v. 5, pgs. 97-119, 2004.

CHANG, I.C. & HWANG, P.P. Cl⁻ uptake mechanism in freshwater adapted tilapia (*Oreochromis mossambicus*). **Physiological and Biochemical Zoology**, v. 77, pgs. 406-414, 2004.

COLAUTTI, R.I.; GRIGOROVICH, I.A. & MacISAAC, H.J. Propagule pressure: a null model for biological invasions. **Biological Invasions**. v. 8, pgs. 1023-1037, 2006.

DAWSON, D.C. & LIU, X. **Osmoregulation: Some Principles of Water and Solute Transport. Osmotic and Ionic Regulation in Molluscs**. In: EVANS, D.H. Osmotic and Ionic Regulation: cells and animals. CRC press, 2009.

EVANS, D.H.; PERMARINI, P.M. & CHOE, KP. The multifunctional fish gill: dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation, and excretion of nitrogenous waste. **Physiological Reviews**, v. 85, pgs. 97-177, 2005.

EVANS, D.H. & CLAIBORNE, J.B. **Osmotic and Ionic Regulation in Fishes**. In: EVANS, D.H. (ed.). Osmotic and Ionic Regulation: cells and animals. CRC Press, 2009.

FENG, S-H.; LEU, J-H.; YANG, C-H.; FANG, M-J.; HUANG, C-J. & HWANG, P-P. Gene expression of Na⁺, K⁺-ATPase $\alpha 1$ e $\alpha 3$ subunits in gills of the teleost *Oreochromis mossambicus*, adapted to different environmental salinities. **Marine Biotechnology**. v. 4, pgs. 379-391, 2002.

FENWICK, J. C.; WENDERLAAR BONGA, S. E. & FLIK, G. In vivo bafilomycin-sensitive Na⁺ uptake in young freshwater fish. **Journal of Experimental Biology**. v. 202, pgs. 3659–3666, 1999.

FIKSEN, O.; & CARLOTTI, F. A model of optimal life history and diel vertical migration in *Calanus finmarchicus*. **Sarsia** v. 83, pgs. 129e147, 1998.

FINN, R.N. & KRISTOFFERSEN, B.A. Vertebrate vitellogenin gene duplication in relation to the “3R hypothesis”: correlation to the pelagic egg and the oceanic radiation of teleosts. **Plos One**. v. 2, DOI:10.1371/journal.pone.0000169, 2007.

FISH BASE – 2005. Disponível em <<http://www.fishbase.org.br>> Acesso em 08 de setembro de 2014.

FREIRE, C.A.; AMADO, E.M.; SOUZA, L.R.; VEIGA, M.P.T.; VITULE, J.R.S.; SOUZA, M.M. & PRODOCIMO, V. Muscle water control in crustaceans and fishes as a function of habitat, osmoregulatory capacity, and degree of euryhalinity. **Comparative Biochemistry and Physiology**. v. 149, pgs. 435-446, 2008a.

FREIRE, C.A.; ONKEN, H. & McNAMARA, J.C. A structure-function analysis of ion transport in crustacean gills and excretory organs. **Comparative Biochemistry and Physiology**. v. 151, pgs. 272-304, 2008b.

FREIRE, C.A. & PRODOCIMO, V. Special challenges to teleost fish osmoregulation in environmentally extreme or unstable habitats. *In: Fish Osmoregulation (eds. BALDISSEROTTO, B.; MANCERA, J.M. & KAPOOR, B.G.)*. Science Publishers, Enfield, pp. 249–276, 2007.

FRIEDMAN, M. Frontiers in palaeontology: The early evolution of ray-finned fishes. **Paleontology**. v. 58, pgs. 213-228, 2015.

GALVEZ, F.; REID, S.; HAWKINGS, G. & GOSS, G.G. Isolation and characterization of mitochondria-rich cell types from the gill of freshwater rainbow trout. **American Journal of Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**. v. 282, pgs. 658-668, 2002.

GALVEZ, F.; TSUI, T. & WOOD, C.M. Cultured trout gill epithelia enriched in pavement cells or in mitochondria-rich cells provides insights into Na⁺ and Ca²⁺ transport. **In Vitro Cellular Development Biology –Animal**. v. 44, pgs. 415–425, 2008.

GIBBS, A. & SOMERO, G.N. Pressure adaptation of Na⁺/K⁺-ATPase in gills of marine teleosts. **Journal of Experimental Biology**. v. 143, pgs. 475-492, 1989.

GOSS, G.; GILMOUR, K.; HAWKINGS G.; BRUMBACH, J.H.; HUYNH, M. & GALVEZ, F. Mechanism of sodium uptake in PNA negative MR cells from rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* as revealed by silver and copper inhibition. **Comparative Biochemistry and Physiology**. v. 159, v. 234-241, 2011.

GÜNER, Y.; ÖZDEN, O.; ÇAGIRGAN, H.; ALTUNOK M.; KIZAK, V. Effects of salinity on the osmoregulatory functions of the gills in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Turkey Journal of Veterinary and Animal Science**, v. 29, pgs. 1259-1266, 2005.

HAWKINGS, G.S.; GALVEZ, F. & GOSS, G.G. Seawater acclimation causes independent alterations in Na⁺/K⁺- and H⁺-ATPase activity in isolated mitochondria-rich cell subtypes of the rainbow trout gill. **The Journal of Experimental Biology**. v. 207, pgs. 905-912, 2004.

HICKMAN, C.P.Jr.; ROBERTS, L.S. LARSON, A. **Integrated principles of Zoology**. 11ed. Boston: McGraw-Hill, 2001.

HIROI, J.; KANEKO, T. & TANAKA, M. In vivo sequential changes in chloride cell morphology in the yolk-sac membrane of mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*) embryos and larvae during seawater adaptation. **Journal of Experimental Biology**. v. 202, pgs. 3485-3495, 1999.

HIROI, J. & McCORMICK, S.D. Variation in salinity tolerance, gill Na⁺/K⁺-ATPase, Na⁺/K⁺/2Cl⁻ cotransporter and mitochondria-rich cell distribution in three salmonids *Salvelinus namaycush*, *Salvelinus fontinalis* and *Salmo salar*. **Journal of Experimental Biology**, v. 210, pgs. 1015-1024, 2007.

HIROI, J.; McCORMICK, S.D.; OHTANI-KANEKO, R.; & KANEKO, T. Functional classification of mitochondrion-rich cells in euryhaline Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*) embryos, by means of triple immunofluorescence staining for Na⁺/K⁺-ATPase, Na⁺/K⁺/2Cl⁻ cotransporter and CFTR anion channel. **Journal of Experimental Biology**. v. 208, pgs. 2023-2036, 2005.

HIROI, J.; YASUMASU, S.; McCORMICK, S.D.; HWANG P-P. & KANEKO, T. Evidence for an apical Na–Cl cotransporter involved in ion uptake in a teleost fish. **Journal of Experimental Biology**. v. 211, pgs. 2584-2599, 2008.

HUANG, C-Y.; CHAO, P-L. & LIN, H-C. Na⁺/K⁺-ATPase and vacuolar-type H⁺-ATPase in the gills of the aquatic air-breathing fish *Trichogaster microlepis* in response to salinity variation. **Comparative Biochemistry and Physiology**. v. 155, pgs. 309-318, 2010.

HWANG, P-P. Ion uptake and acid secretion in zebrafish (*Danio rerio*). **Journal of Experimental Biology**, v. 212, pgs. 1745-1752, 2009.

HWANG, P.P.; FANG, M.J.; TSAI, J.C.; HUANG, C.J.; CHEN, T.S. Expression of mRNA and protein of Na⁺-K⁺-ATPase α subunit in gills of tilapia (*Oreochromis mossambicus*). **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 18, pgs. 363-373, 1998.

HWANG, P-P.; & LEE, T-H. New insights into fish ion regulation and mitochondrion-rich cells. **Comparative Biochemistry and Physiology** v. 148, pgs. 479-497, 2007.

HWANG, P.P.; LEE, T-H. & LIN, L-Y. Ion regulation in fish gills: recent progress in the cellular and molecular mechanisms. *American Journal Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, v. 302, pgs. R28-R47, 2011.

IP, Y.K.; LOONG, A.M.; KUAH, J.S.; SIM, E.W.L.; CHEN, X.L.; WONG, W.P.; LAM, S.H.; DELGADO, I.L.S.; WILSON, J.M. & CHEW, S.F. Roles of three branchial subunit Na⁺/K⁺-

ATPase isoforms in freshwater adaptation, seawater acclimation, and active ammonia excretion in *Anabas testudineus*. **American Journal of Physiology Regulation and Integrative Comparative Physiology**. v. 303, pgs. 112–125, 2012.

JENSEN, M.K.; MADSEN, S.S.; KRISTIANSEN, K. Osmoregulation and salinity effects on the expression and activity of Na⁺,K⁺-ATPase in the gills of european sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L.). **The Journal of Experimental Zoology**. v. 282, pgs. 290-300, 1998.

KANG, C-K.; LIU, F-C.; CHANG, W-B. & LEE, T-H. Effects of low environmental salinity on the cellular profiles and expression of Na⁺, K⁺-ATPase and Na⁺, K⁺, 2Cl⁻ cotransporter 1 of branchial mitochondrion-rich cells in the juvenile marine fish *Monodactylus argenteus*. **Fish Physiology and Biochemistry**. v. 38, pgs. 665–678, 2012.

KARNAKY, K.J.; ERNST, S.A. & PHILPOTT, C.W. Response of pupfish *Cyprinodon variegatus* gill Na⁺,K⁺-ATPase and chloride cell fine structure to various high salinity environments. **The Journal of Cell Biology**. v. 70, 1976.

KOLBADINEZHAD, S.M.; HAJIMORADLOO, A.; GHORBANI, R.; JOSHAGHANI, H. & WILSON, J.M. Effects of gradual salinity increase on osmoregulation in Caspian roach *Rutilus caspicus*. **Fish Biology**. v. 81, pgs. 125-134, 2012.

MAPLES, C.G. & ARCHER, A.W. The potential of Paleozoic nonmarine trace fossils for paleoecological interpretations. **Palaeogeography**. v. 73, pgs. 185-195, 1989.

LAIZ-CARRIÓN, R.L.; GUERREIRO, P.M.; FUENTES, J.; CANARIO, A.V.M.; DEL RIO, M.A.M. & MANCERA, J. Branchial osmoregulatory response to salinity in the Gilthead Sea Bream, *Sparus auratus*. **Journal of Experimental Zoology**. v. 303, pgs. 563–576, 2005.

LEE, T.H., FENG, S.H.; LIN, C.H.; HWANG, Y.H.; HUANG, C. L. & HWANG, P.P. Ambient salinity modulates the expression of sodium pumps in branchial mitochondria-rich cells of Mozambique tilapia, *Oreochromis mossambicus*. **Zoological Science**. v. 20, pgs. 29-36, 2003.

LÉVÊQUE, C.; OBERDORFF, T.; PAUGY, D.; STIASSNY, M.L.J & TEDESCO, P.A. **Global diversity of fish (Pisces) in freshwater**. In: BALIAN, E.V.; LÉVÊQUE, C.; SEGERS, H. & MARTENS, K. Freshwater animal diversity assessment. Springer: Netherlands, 2008.

LIN, Y.M. & LEE, T.H. The expression of gill Na, K-ATPase in milkfish, *Chanos chanos*, acclimated to seawater, brackish water and fresh water. **Comparative Biochemistry and Physiology**. v. 135, pgs. 489–497, 2003.

LIN, H. & RANDALL, D.J. H⁺-ATPase activity in crude homogenates of fish gill tissue: inhibitor sensitivity and environmental and hormonal regulation. **Journal of Experimental Biology**. v. 163, pgs. 163-174, 1993.

MARASCHI, A.C. **Avaliação dos mecanismos osmorregulatórios de espécies eurihalinas submetidas à variação de salinidade**. (Dissertação), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2014.

MARSHALL, W.S.; HOWARD J.A.; COZZI, R.R & LYINCH, E.M. NaCl and fluid secretion by intestine of teleost *Fundulus heteroclitus*: involvement of CFTR. **The Journal of Experimental Biology**, v. 205, pgs. 745 –758, 2002.

MARSHANSKY, V. & FUTAI, M. The V-type H⁺-ATPase in vesicular trafficking: targeting, regulation and function. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 20, pgs. 415–426, 2008.

MCCORMICK, S.D.; REGISH, A.M. & CHRISTENSEN, A.K. Distinct freshwater and seawater isoforms of Na⁺/K⁺-ATPase in gill chloride cells of *Atlantic salmon*. **The Journal of Experimental Biology**, v. 212, pgs. 3994-4001, 2009.

MIR, I.H.; CHANNA, A.; NABI, S. Chloride and pavement cells in the gills of snow trout, *Schizothorax curvifrons* Heckel (Teleost, Cypriniformes, Cyprinidae). **Cytologia**. v. 76, pgs. 439-444, 2011.

MIWA, A.C.P.; FALCO, P.B. & CALIJURI, M.C. Avaliação de métodos espectrofotométricos para determinação de proteína em amostras de lagoas de estabilização. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 13, pgs. 236-242, 2008.

MOYES, C.D.; SCHULTE, P.M. **Principles of Animal Physiology**. 2ª edição. British Columbia, 2009.

NELSON, J.S. **Fishes of the World**. [S.l.]: John Wiley & Sons, Inc, 2006.

NISHI, T. & FORGAC, M. The Vacuolar (H⁺)-ATPases – Nature's Most Versatile Protons Pumps. **Nature Review**, v. 3, pgs 94-103, 2002.

OUATTARA, N'G.; BODINIER, C.; NÈGRE-SADARGUES, G.; D'COTTA, H.; MESSAD, S.; CHARMANTIER, G.; PANFILLI, J. & BAROILLER, J.F. Changes in gill ionocyte morphology and function following transfer from fresh to hypersaline waters in the tilapia *Sarotherodon melanotheron*. **Aquaculture**, v. 290, pgs. 155-164, 2009.

PARKS, S.K.; TRESGUERRES, M.; GALVES, F. & GOSS, G.G. Intracellular pH regulation in isolated trout gill mitochondrion-rich (MR) cell subtypes: evidence for Na⁺/H⁺ activity. **Comparative Biochemistry and Physiology**. v. 155, pgs. 139-145, 2010.

PERRY, S.F.; SHAHSAVARANI, A.; GEORGALIS, T.; BAYAA, M.; FUROMSKY, M.; THOMAS, S.L.Y. Channels, pumps, and exchangers in the gill and kidney of freshwater fishes: their role in ionic and acid–base regulation. *The Journal of Experimental Zoology*, v. 300A, pgs. 53–62, 2003.

POUGH, F.H.; HAVIS, C.M. & HEISER, J.B. **A vida dos vertebrados**. 4ª edição. São Paulo: Atheneu, 2006.

RICHARDS, J.G.; SEMPLES, J.W.; BYSTRIANSKY, J.S. & SCHULTE, P. Na⁺/K⁺-ATPase α -isoform switching in gills of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during salinity transfer. **The Journal of Experimental Biology**. v. 206, pgs. 4475-4486, 2003.

RUIZ-JARABO, I.; GONZÁLEZ-WEVAR, C.A.; OYARZÚN, R.; FUENTES, J.; POULIN, E.; BERTRÁN, C. & VARGAS-CHACOFF, L. Isolation driven divergence in osmoregulation in *Galaxias maculatus* (Jenyns, 1848) (Actinopterygii: Osmeriformes). **Plos One**. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0154766>, 2016.

SAÉZ, A.G.; LOZANO, E. & ZALDÍVAR-RÍVERON, A. Evolutionary history of Na,K-ATPases and their osmoregulatory role. **Genetica**. v. 136, pgs. 479-490, 2009.

SAITOH, K.; MYIA, M.; INOUE, J.G.; ISHIGURO, N.B. & NNISHIDA, M. Mitochondrial genomics of Ostariophysan fishes: perspectives on phylogeny and biogeography. **Journal of Molecular Evolution**. v. 56, pgs. 464-472, 2003.

SALA-BOZANO, M. & MARIANI, S. Life history variation in a marine teleost across a heterogeneous seascape. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, n. 92, pgs. 555-563, 2011.

SANTINI, F. & TYLER, J.C. A phylogeny of the families of fossil and extant tetraodontiform fishes (Acanthomorpha, Tetraodontiformes), upper Cretaceous to recent. **Zoological Journal of the Linnean Society**. v. 139, pgs. 565-617, 2003.

SAOUD, I.P.; KREYDYEH, S.; CHALFOUN, A. & FAKIH M. Influence of salinity on survival, growth, plasma osmolality and gill $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ activity in the rabbitfish *Siganus rivulatus*. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**. v. 348, pgs. 183-190, 2007.

SFERCO, E.; LÓPEZ-ARBARELLO, A. & BÁEZ, A.M. Phylogenetic relationships of †*Luisiella feruglioi* (Bordas) and the recognition of a new clade of freshwater teleosts from the Jurassic of Gondwana. **BMC Evolutionary Biology**. v. 15, pg. 268-283, 2015.

SHIKANO, T. & FUJIO, Y. Immunolocalization of Na^+ , $\text{K}^+\text{-ATPase}$ and morphological changes in two types of chloride cells in the gill epithelium during seawater and freshwater adaptation in a euryhaline teleost, *Poecilia reticulata*. **Journal of Experimental Zoology**. v. 281, pgs. 80-89, 1998.

SIMONATO, J.D.; FERNANDES, M.N. & MARTINEZ, C.B.R. Physiological effects of gasoline on the freshwater fish *Prochilodus lineatus* (Characiformes: Prochilodontidae). **Neotropical Ichthyology**. v.11, 2013.

TANG, C-H.; HWANG, L-Y.; SHEN, I-D.; CHIU, Y-H. & LEE, T-H. Immunolocalization of chloride transporters to gill epithelia of euryhaline teleosts with opposite salinity-induced $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{-ATPase}$ responses. **Fish Physiology and Biochemistry**. v. 37, pgs. 709-724, 2011.

TIPSMARK, C.K.; MADSEN, S.S. SEIDELIN, M.; CHRISTENSEN, A.S.; CUTLER, P. & CRAMB, G. Dynamics of $\text{Na}^+,\text{K}^+,\text{2Cl}^-$ cotransporter and Na^+,K^+ ATPase expression in the branchial epithelium of brown trout (*Salmo trutta*) and Atlantic salmon (*Salmo salar*). **Journal of Experimental Zoology**. v. 293, pgs. 106–118, 2002.

VEGA, G.C. & WIENS, J.J. Why are there so few fish in the sea? **Proceeding of the Royal Society of London**. v. 282, pgs. 1-7, 2012.

VIZE, P.D. A Homeric view of kidney evolution: A reprint of H.W. Smith's classic essay with a new introduction. **The Anatomical Record** v. 277, pgs 344-354, 2004.

WEAKLEY, J.C.; CLAIBORNE, J.B.; HYNDMAN, K.A. & EDWARDS, S.L. The effect of environmental salinity on H^+ efflux in the euryhaline barramundi (*Lates calcarifer*). **Aquaculture**. v. 338, pgs. 190-196, 2012.

WILLMER, P.; STONE, G. & JOHNSTON, I. **Environmental physiology of animals**. 2nded. Blackwell Science, Oxford, U.K., 2005.

WILSON, J.; LAURENT, P.; TUFTS, B.L.; BENOS, D.J.; DONOWITZ, M.; VOGL, A.W. & RANDALL, D.J. NaCl uptake by the branchial epithelium in freshwater teleost fish: na

immunological approach to ion-transport protein localization. **Journal of Experimental Biology**. v. 203, pgs. 2279-2296, 2000.

WITTERS, H.; BERCKMANS, P. & VANGENECHTEN, C. Immunolocalization of Na⁺, K⁺-ATPase in the gill epithelium of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. **Cells Tissue Research**. v. 283, pgs: 463-468, 1996.

WOOD, C.M.; KELLY, S.P.; ZHOU, B.; FLETCHER, M.; O'DONELL, M.; ELETTI, B. & PÄRT, P. Cultured gill epithelia as models for the freshwater fish gill. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1566, pgs. 72-83, 2002.

YANG, W-K.; KANG, C-K.; CHEN, T-Y.; CHANG, W-B. & LEE, T-H. Salinity-dependent expression of the branchial Na⁺/K⁺/2Cl⁻ cotransporter and Na⁺/K⁺-ATPase in the sailfin molly correlates with hypoosmoregulatory endurance. **Journal of Comparative Physiology**. v. 181, pgs. 953-964, 2011.

YAO K., AHOUSI, A.F.A.; Survie du Tilapia du Nil (*Oreochromis niloticus*) en eaux salées durant un transfert direct et progressif. **Livestock Research for Rural Development**, v. 20, 2008.

YOUNG, G.C. Placoderms (Armored Fish): dominant vertebrates of the Devonian Period. **Annual Review of Earth and Planetary Sciences**. v. 38, pgs.523-550, 2010.

CONCLUSÕES GERAIS

- A transferência gradual é a mais utilizada em protocolos de variações de salinidade;
- Espécies diádromas das ordens Perciformes e Salmoniformes são as mais utilizadas em protocolos de transferência a diferentes salinidades;
- Transferência a aumentos de salinidade são mais utilizados do que de reduções de salinidade;
- Em teleósteos dulcícolas submetidos a aumentos de salinidade, a transferência gradual permite um maior tempo de tolerância na salinidade limite;
- Não há interferência entre as variáveis transferência x salinidade x tempo em teleósteos estuarinos ou marinhos submetidos a aumentos de salinidade ou diluições de salinidade;
- Em transferência gradual ou abrupta, a osmolalidade é maior em maiores salinidades, a atividade branquial de V-H⁺-ATPase é maior em salinidades mais baixas e a atividade branquial de NKA varia, mas em geral é maior em maiores salinidades;

- Na transferência gradual a diferentes salinidades, percebe-se a manutenção do teor hídrico tecidual e um maior tempo (dias) para alteração da expressão de proteínas osmorregulatórias;
- O fator tempo, na avaliação de uma resposta osmorregulatória, pode interferir na discussão sobre o grau de eurihalidade de um teleósteo;
- A localização da NKA nos ostariófiseos é diferente das de acanthopterígeos (ou seja, NKA se difere conforme a história evolutiva);
- A localização da V-H⁺-ATPase foi diferente conforme os ambientes aquáticos;
- A imunofluorescência da NKA foi maior do que da V-H⁺-ATPase em baúna, e menor em baiacu. Neste, sugere-se que a concentração pontual da enzima V-H⁺-ATPase caracterizou esta quantificação;
- A atividade enzimática da NKA foi maior do que da V-H⁺-ATPase em tilápia e baiacu. Neste, foi o oposto do resultado da imunofluorescência;
- A atividade enzimática da V-H⁺-ATPase foi maior em piracanjuba (ostariófiseo, primário de água doce) do que em baiacu (acanthopterígeo, marinho), oposto do resultado da imunofluorescência;
- Os resultados conflitantes entre os protocolos de imunofluorescência e atividade enzimática podem ser devido a metodologia e relação entre atividade funcional e expressão de proteínas;
- Sugere-se, com os resultados da V-H⁺-ATPase em acanthopterígeos, além dos dados da literatura, a origem dulcícola dos teleósteos.

Pode-se concluir, a partir da análise dos resultados desta tese, que **as proteínas osmorregulatórias, constitutivas ou potencialmente reguladas, que diferencia a localização ou atividade de proteínas osmorregulatórias, é relacionada com os diferentes ambientes e histórias evolutivas dos teleósteos, podendo interferir no grau de tolerância fisiológica destes organismos, em meio “natural” ou diante uma submissão a variação de salinidade experimental.**

REFERÊNCIAS

AL-AMOUDI, M.M. Acclimation of commercially cultured *Oreochromis* species to sea water – an experimental study. **Aquaculture**. v. 65, pgs. 333-342, 1987.

ALBERT, J.S.; LOVEJOY, N.R.; CRAMPTON, W.G.R. Miocene tectonism and the separation of cis- and trans-Andean river basins: Evidence from Neotropical fishes. **Journal of South American Earth Sciences**. v. 21, pgs. 14-27, 2006.

AL-JANDAL, A.J. & WILSON, R.W. A comparison of osmoregulatory responses in plasma and tissues of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) following acute salinity challenges. **Comparative Biochemistry and Physiology**. v. 159, pgs. 175-181, 2011.

ALLEN, P.J.; McENROE, M.; FOROSTYAN, T.; COLE, S. NICHOLL, M.N.; HODGE, B. & CECH JR, J.J. Ontogeny of salinity tolerance and evidence for seawater-entry preparation in juvenile Green sturgeon, *Acipenser medirostris*. **Journal of Comparative Physiology**. v. 181, pgs. 1045-1062, 2011.

ALLEN, P.J.; MITCHELL, Z.A.; DeVRIES, R.J.; ABOAGYE, D.L.; CIARAMELLA, M.A.; RAMEE, S.W.; STEWART. H.A. & SHARTAU. R.B. Salinity effects on Atlantic sturgeon (*Acipenser oxyrinchus oxyrinchus* Mitchill, 1815) growth and osmoregulation. **Journal of Applied Ichthyology**. v. 30, pgs. 1229-1236, 2014.

ALLEN, R.D.; TOMINAGA, T. & NAITOH, Y. **The Contractile Vacuole Complex and Cell Volume Control in Protozoa**. In: EVANS, D.H. Osmotic and Ionic Regulation: cells and animals. CRC press, 2009.

ARJONA, F.J.; VARGAS-CHACOFF, L.; RUÍZ-JARABO, I.; MARTÍN-DEL RÍO, M.P. & MANCERA, J.M. Osmoregulatory response of Senegalese sole (*Solea senegalensis*) to changes in environmental salinity. **Comparative Biochemistry and Physiology**. v.148, pgs. 413-421, 2007.

ÁRNASON, T.; MAGNADÓTTIR, B.; BJÖRNSSON, B.; STEINARSSON, A. & BJÖRNSSON, B.T. Effects of salinity and temperature on growth, plasma ions, cortisol and immune parameters of juvenile Atlantic cod (*Gadus morhua*). **Aquaculture**. v. 380-383, pgs. 70-79, 2013.

BALDISSEROTTO, B.; MIMURA, O.M. & SALOMÃO, L.C. Urophyseal control of plasma ionic concentration in *Oreochromis mossambicus* (PISCES) exposed to osmotic stress. **Ciência e Natura**. v. 16, pgs. 39-50, 1994.

BATH, R.N. & EDDY, F.B. Salt and water balance in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) rapidly transferred from freshwater to seawater. **Journal of Experimental Biology**. v. 83, pgs. 193-202, 1979.

BAYSOY, E. ATLI, G. & CANLI, M. The Effects of salinity and salinity+metal (chromium and lead) exposure on ATPase activity in the gill and intestine of Tilapia *Oreochromis niloticus*. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**. v. 64, pgs. 291-300, 2013.

BERDAN, E.L. & FULLER, R.C. Interspecific divergence of ionoregulatory physiology in killifish: insight into adaptation and speciation. **Journal of Zoology**. v. 287, pgs. 283-291, 2012.

BETANCURT, R.; ORTÍ, G. & PYRON, R.A. Fossil-based comparative analyses reveal ancient marine ancestry erased by extinction in ray-finned fishes. **Ecology Letters**, v. 18, pgs. 441-450, 2015.

BODINIER, C.; LORIN-NEBEL, C.; CHARMANTIER, G. & BOULO, V. Influence of salinity on the localization and expression of the CFTR chloride channel in the ionocytes of juvenile *Dicentrarchus labrax* exposed to seawater and freshwater. **Comparative Biochemistry and Physiology** v. 153, pgs. 345-351, 2009.

BOLLINGER, R.J.; MADSEN, S.S.; BOSSUSL, M.C. & TIPSMARKI, C.K. Does Japanese medaka (*Oryzias latipes*) exhibit a gill Na^+/K^+ -ATPase isoform switch during salinity change?. **Journal of Comparative Biology**. v. 186, pgs. 485-501, 2016.

BREVES, J.P.; WATANABE, S.; KANEKO, T.; HIRANO, T. & GRAU, G. Prolactin restores branchial mitochondrion-rich cells expressing Na^+/Cl^- cotransporter in hypophysectomized Mozambique tilapia. **American Physiological Society**. v. 99, pgs. 702-710, 2010.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, pgs.248-254, 1976.

BROWN, J.A & TYTLER, P. Hypoosmoregulation of larvae of the turbot, *Scophthalmus maximus*: drinking and gut function in relation to environmental salinity. **Fish Physiology and Biochemistry**. v. 10, pgs. 475-483, 1993.

BROWN, C.A.; GALVEZ, F. & GREEN, C.C. Embryonic development and metabolic costs in Gulf killifish *Fundulus grandis* exposed to varying environmental salinities. **Fish Physiology and Biochemistry**. v. 38, pgs. 1071-1082, 2012.

BRUSCA, G.J. & BRUSCA, R.J. **Invertebrados**. 1ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.

BUCKUP, P.A. Sistemática e biogeografia de peixes de riachos. **Oecologia Australis**. v. 6, 1999.

BUONERBA, L.; ZACCARA, S.; DELMASTRO, G.B.; LORENZONI, M. SALZBURGER, W. & GANTE, H.F. Intrinsic and extrinsic factors act at different spatial and temporal scales to shape population structure, distribution and speciation in Italian Barbus (Osteichthyes: Cyprinidae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**. v. 89, pgs. 115-129, 2015.

BYSTRIANSKY, J.S.; SCHULTE, P.M. Changes in gill H^+ -ATPase and Na^+/K^+ -ATPase expression and activity during freshwater acclimation of Atlantic salmon (*Salmo salar*). **Journal of Experimental Biology**. v. 214, pgs. 2435-2442, 2011.

CABEROY, N.B. & QUINITIO, G.F. Changes in Na^+ , K^+ -ATPase activity and gill chloride cell morphology in the grouper *Epinephelus coioides* larvae and juveniles in response to salinity and temperature. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 23, pgs. 83-94, 2000.

CATALDI, E.; GARIBALDI, L.; CROSETTI, D.; LEONI, C. & CATAUDELLA, S. Variations in renal morphology during adaptation to salinities in tilapias. **Environmental Biology of Fishes**. v. 31, pgs. 101-106, 1991.

CATCHES, J.S.; BURNS, J.M.; EDWARDS, S.L. & CLAIBORNE, J.B. Na⁺/H⁺ antiporter, V-H⁺-ATPase and Na⁺/K⁺-ATPase immunolocalization in a marine teleost (*Myoxocephalus octodecemspinosus*). **The Journal of Experimental Biology**. v. 209, pgs. 3440-344, 2006.

CERON, F.J.M. **Plasticidade osmorregulatória de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) e o uso de estuários como pontes de dispersão de peixes eurihalinos. (Dissertação)**. Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2012.

CHAKRABARTY, P. Cichlid biogeography: comment and review. **Fish and Fisheries**. v. 5, pgs. 97-119, 2004.

CHANG, I.C. & HWANG, P.P. Cl⁻ uptake mechanism in freshwater adapted tilapia (*Oreochromis mossambicus*). **Physiological and Biochemical Zoology**, v. 77, pgs. 406-414, 2004.

CHOI, K.; COPE, W.G.; HARMS, C.A. & LAW, J.M. Rapid decreases in salinity, but not increases, lead to immune dysregulation in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). **Journal of Fishes Diseases**. v. 36, pgs. 389-399, 2013.

COLAUTTI, R.I.; GRIGOROVICH, I.A. & MacISAAC, H.J. Propagule pressure: a null model for biological invasions. **Biological Invasions**. v. 8, pgs. 1023-1037, 2006.

DABORN, K.; COZZI, R.R.F. & MARSHALL, W.S. Dynamics of pavement cell-chloride cell interactions during abrupt salinity change in *Fundulus heteroclitus*. **Journal of Experimental Biology**, v. 204, pgs. 1889-1899, 2001.

DAWSON, D.C. & LIU, X. **Osmoregulation: Some Principles of Water and Solute Transport. Osmotic and Ionic Regulation in Molluscs**. In: EVANS, D.H. Osmotic and Ionic Regulation: cells and animals. CRC press, 2009.

DIMAGGIO, M.A.; OHS, C.L. & PETTY, B.D. Salinity tolerance of the Seminole killifish, *Fundulus seminolis*, a candidate species for marine baitfish aquaculture. **Aquaculture**, v. 293, pgs. 74-80, 2009.

ENGEL, D.W.; HETLER, W.F.; COSTON-CLEMENTS, L. & HOSS, D.E. Effects of abrupt salinity changes on the osmoregulatory abilities of the Atlantic menhaden *Brevoortia tyrannus*. **Comparative Biochemistry and Physiology**. v. 86, pgs. 723-727, 1987.

EVANS, D.H.; PERMARINI, P.M. & CHOE, KP. The multifunctional fish gill: dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation, and excretion of nitrogenous waste. **Physiological Reviews**, v. 85, pgs. 97-177, 2005.

EVANS, D.H. & CLAIBORNE, J.B. **Osmotic and Ionic Regulation in Fishes**. In: EVANS, D.H. (ed.). Osmotic and Ionic Regulation: cells and animals. CRC Press, 2009.

FENG, S-H.; LEU, J-H.; YANG, C-H.; FANG, M-J.; HUANG, C-J. & HWANG, P-P. Gene expression of Na⁺, K⁺-ATPase α 1 e α 3 subunits in gills of the teleost *Oreochromis mossambicus*, adapted to different environmental salinities. **Marine Biotechnology**. v. 4, pgs. 379-391, 2002.

FENWICK, J. C.; WENDERLAAR BONGA, S. E. & FLIK, G. In vivo bafilomycin-sensitive Na⁺ uptake in young freshwater fish. **Journal of Experimental Biology**. v. 202, pgs. 3659-3666, 1999.

FIKSEN, O.; & CARLOTTI, F. A model of optimal life history and diel vertical migration in *Calanus finmarchicus*. **Sarsia** v. 83, pgs. 129e147, 1998.

FINN, R.N. & KRISTOFFERSEN, B.A. Vertebrate vitellogenin gene duplication in relation to the “3R hypothesis”: correlation to the pelagic egg and the oceanic radiation of teleosts. **Plos One**. v. 2, DOI:10.1371/journal.pone.0000169, 2007.

FIOL, D.F. & KÜLTZ, D. Osmotic stress sensing and signaling in fishes. **Journal of Federation of European Biochemical Societies**. v. 274, pgs. 5790-5798, 2007.

FISH BASE – 2005. Disponível em <<http://www.fishbase.org.br>> Acesso em 08 de setembro de 2014.

FLEMMER, A.W.; MONETTE, M.Y.; DJURISIC, M.; DOWD, B.; DARMAN, R.; GIMENEZ, I. & FORBUSH, B. Phosphorylation state of the Na⁺-K⁺-Cl⁻ cotransporter (NKCC1) in the gills of Atlantic killifish (*Fundulus heteroclitus*) during acclimation to water of varying salinity. **The Journal of Experimental Biology**. v. 213, pgs. 1558-1566, 2010.

FONTAINHAS-FERNANDES, A.; GOMES, E.; REIS-HENRIQUES, M.A. & COIMBRA, J. Efeito da suplementação da dieta com NaCl no crescimento de tilápia *Oreochromis niloticus* cultivada em diferentes salinidades. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 54, pgs. 204-211, 2002.

FREIRE, C.A.; AMADO, E.M.; SOUZA, L.R.; VEIGA, M.P.T.; VITULE, J.R.S.; SOUZA, M.M.; & PRODOCIMO, V. Muscle water control in crustaceans and fishes as a function of habitat, osmoregulatory capacity, and degree of euryhalinity. **Comparative Biochemistry and Physiology**. v. 149, pgs. 435-446, 2008.

FREIRE, C.A.; ONKEN, H. & McNAMARA, J.C. A structure-function analysis of ion transport in crustacean gills and excretory organs. **Comparative Biochemistry and Physiology**. v. 151, pgs. 272-304, 2008b.

FREIRE, C.A. & PRODOCIMO, V. Special challenges to teleost fish osmoregulation in environmentally extreme or unstable habitats. In: Fish Osmoregulation (eds. BALDISSEROTTO, B.; MANCERA, J.M. & KAPOOR, B.G.). **Science Publishers, Enfield**, pp. 249–276, 2007.

FRIEDMAN, M. Frontiers in palaeontology: The early evolution of ray-finned fishes. **Paleontology**. v. 58, pgs. 213-228, 2015.

GALVEZ, F.; REID, S.; HAWKINGS, G. & GOSS, G.G. Isolation and characterization of mitochondria-rich cell types from the gill of freshwater rainbow trout. **American Journal of Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**. v. 282, pgs. 658-668, 2002.

GALVEZ, F.; TSUI, T. & WOOD, C.M. Cultured trout gill epithelia enriched in pavement cells or in mitochondria-rich cells provides insights into Na⁺ and Ca²⁺ transport. **In Vitro Cellular Development Biology –Animal**. v. 44, pgs. 415–425, 2008.

GARCIA, B.A.; PARTRIDGE, G.J.; FLIK, G.; ROQUES, J.A.C. & ABBINK, W. Ambient salinity and osmoregulation, energy metabolism and growth in juvenile yellowtail kingfish (*Seriola lalandi* Valenciennes 1833) in a recirculating aquaculture system. **Aquaculture Research**. v. 46, pgs., 2789-2797, 2015.

GAUMET, F.; BOEUF, G.; SEVERE, A.; LE ROUX, A. & MAYER-GOSTANT. Effects of salinity on the ionic balance and growth of juvenile turbot. **Journal of Fish Biology**. v. 47, pgs. 865-876, 1995.

GENZ, J. & GROSELL, M. *Fundulus heteroclitus* acutely transferred from seawater to high salinity require few adjustments to intestinal transport associated with osmoregulation. **Comparative Biochemistry and Physiology**. v. 160, pgs. 156-165, 2011.

GIBBS, A. & SOMERO, G.N. Pressure adaptation of Na⁺/K⁺-ATPase in gills of marine teleosts. **Journal of Experimental Biology**. v. 143, pgs. 475-492, 1989.

GILMOUR, K.M.; PERRY, S.F.; ESBAUGH, A.J.; GENZ, J.; TAYLOR, J.R. & GROSELL, M. Compensatory regulation of acid–base balance during salinity transfer in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Journal of Comparative Physiology**. v. 182, pgs. 259-274, 2012.

GOSS, G.; GILMOUR, K.; HAWKINGS G.; BRUMBACH, J.H.; HUYNH, M. & GALVEZ, F. Mechanism of sodium uptake in PNA negative MR cells from rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* as revealed by silver and copper inhibition. **Comparative Biochemistry and Physiology**. v. 159, v. 234-241, 2011.

GREGÓRIO, S.F.; CARVALHO, E.S.; ENCARNÇÃO, S.; WILSON, J.M.; POWER, D.M.; CANÁRIO, A.V. & FUENTES, J. Adaptation to different salinities exposes functional specialization in the intestine of the sea bream (*Sparus aurata* L.). **The Journal of Experimental Biology**. v. 216, pgs. 470-479, 2013.

GUI, L.; ZHANG, P.; LIANG, X.; SU, M.; WU, D. & ZHANG, J. Adaptive responses to osmotic stress in kidney-derived cell lines from *Scatophagus argus*, a euryhaline fish. **Gene**. v. 583, pgs. 134-140, 2016.

GÜNER, Y.; ÖZDEN, O.; ÇAGIRGAN, H.; ALTUNOK M.; KIZAK, V. Effects of salinity on the osmoregulatory functions of the gills in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Turkey Journal of Veterinary and Animal Science**, v. 29, pgs. 1259-1266, 2005.

GUTIERRE, S.M.M. **Ferramentas fisiológicas para avaliação do potencial invasor de peixes dulcícolas**. (Dissertação) Universidade Federal do Paraná, 73 p., 2011.

HASWELL, M.S.; RAFFIN, J-P & LERAY, C. An investigation of the carbonic anhydrase inhibitor in eel plasma. **Comparative Biochemistry and Physiology**. v. 74, pgs. 175-177, 1983.

HAWKINGS, G.S.; GALVEZ, F. & GOSS, G.G. Seawater acclimation causes independent alterations in Na⁺/K⁺-ATPase and H⁺-ATPase activity in isolated mitochondria-rich cell subtypes of the rainbow trout gill. **The Journal of Experimental Biology**. v. 207, pgs. 905-912, 2004.

HERRERA, M.; VARGAS-CHACOFF, L.; HACHERO, I.; RUÍZ-JARABO, I.; RODILES, A.; NAVAS, J.I. & MANCERA, J.M. Osmoregulatory changes in wedge sole (*Dicologlossa cuneata* Moreau, 1881) after acclimation to different environmental salinities. **Aquaculture Research**. v. 40, pgs. 762-771, 2009.

HICKMAN, C.P.Jr.; ROBERTS, L.S. LARSON, A. **Integrated principles of Zoology**. 11ed. Boston: McGraw-Hill, 2001.

HIROI, J.; KANEKO, T. & TANAKA, M. In vivo sequential changes in chloride cell morphology in the yolk-sac membrane of mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*) embryos and larvae during seawater adaptation. **Journal of Experimental Biology**. v. 202, pgs. 3485-3495, 1999.

HIROI, J.; McCORMICK, S.D.; OHTANI-KANEKO, R.; & KANEKO, T. Functional classification of mitochondrion-rich cells in euryhaline Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*) embryos, by means of triple immunofluorescence staining for Na⁺/K⁺-ATPase, Na⁺/K⁺/2Cl⁻ cotransporter and CFTR anion channel. **Journal of Experimental Biology**. v. 208, pgs. 2023-2036, 2005.

HIROI, J. & McCORMICK, S.D. Variation in salinity tolerance, gill Na⁺/K⁺-ATPase, Na⁺/K⁺/2Cl⁻ cotransporter and mitochondria-rich cell distribution in three salmonids *Salvelinus namaycush*, *Salvelinus fontinalis* and *Salmo salar*. **Journal of Experimental Biology**, v. 210, pgs. 1015-1024, 2007.

HIROI, J.; YASUMASU, S.; McCORMICK, S.D.; HWANG P-P. & KANEKO, T. Evidence for an apical Na–Cl cotransporter involved in ion uptake in a teleost fish. **Journal of Experimental Biology**. v. 211, pgs. 2584-2599, 2008.

HORISBERGER, J-D.; LEMAS, V.; KRAEHENBIHL, J-P. & ROSSIER, B.C. Structure-function relationship of Na,K-ATPase. **Annual Review of Physiology**. v.53, pgs. 565-584, 1991.

HUANG, C-Y.; CHAO, P-L. & LIN, H-C. Na⁺/K⁺-ATPase and vacuolar-type H⁺-ATPase in the gills of the aquatic air-breathing fish *Trichogaster microlepis* in response to salinity variation. **Comparative Biochemistry and Physiology**. v. 155, pgs. 309-318, 2010.

HWANG, P.P. Tolerance and ultrastructural responses of branchial chloride cells to salinity changes in the euryhaline teleost *Oreochromis mossambicus*. **Marine Biology**. v. 94, n. 4, p. 643-649, 1987.

HWANG, P-P. Ion uptake and acid secretion in zebrafish (*Danio rerio*). **Journal of Experimental Biology**, v. 212, pgs. 1745-1752, 2009.

HWANG, P.P.; FANG, M.J.; TSAI, J.C.; HUANG, C.J.; CHEN, T.S. Expression of mRNA and protein of Na⁺-K⁺-ATPase α subunit in gills of tilapia (*Oreochromis mossambicus*). **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 18, pgs. 363-373, 1998.

HWANG, P.P & HIRANO, R. Effects of environmental salinity on intercellular organization and junctional structure of chloride cells in early stages of teleost development. **Journal of Experimental Zoology**, v. 236, pgs. 115-126, 1985.

HWANG, P-P.; & LEE, T-H. New insights into fish ion regulation and mitochondrion-rich cells. **Comparative Biochemistry and Physiology** v. 148, pgs. 479-497, 2007.

HWANG, P.P.; LEE, T-H. & LIN, L-Y. Ion regulation in fish gills: recent progress in the cellular and molecular mechanisms. *American Journal Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, v. 302, pgs. R28-R47, 2011.

HWANG, P-P.; SUN, C-M. & WU, S-M. Changes of plasma osmolality, chloride concentration and gill Na⁺-K⁺-ATPase activity in tilapia *Oreochromis mossambicus* during seawater acclimation. **Marine Biology**, v. 100, pgs. 295-299, 1989.

IP, Y.K.; LOONG, A.M.; KUAH, J.S.; SIM, E.W.L.; CHEN, X.L.; WONG, W.P.; LAM, S.H.; DELGADO, I.L.S.; WILSON, J.M. & CHEW, S.F. Roles of three branchial subunit Na⁺/K⁺-ATPase isoforms in freshwater adaptation, seawater acclimation, and active ammonia excretion in *Anabas testudineus*. **American Journal of Physiology Regulation and Integrative Comparative Physiology**. v. 303, pgs. 112–125, 2012.

JENSEN, M.K.; MADSEN, S.S.; KRISTIANSEN, K. Osmoregulation and salinity effects on the expression and activity of Na⁺,K⁺-ATPase in the gills of european sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L.). **The Journal of Experimental Zoology**. v. 282, pgs. 290-300, 1998.

JORGENSEN, P.L.; HÅKANSSON, K.O. & KARLISH, S.J.D. Structure and mechanism of Na⁺,K⁺-ATPase: Functional sites and their interactions. **Annual Review of Physiology**. v.65, pgs. 817-849, 2003.

KAMMERER, B. D.; CECH JR., J. J.; KÜLTZ, D. Rapid changes in plasma cortisol, osmolality, and respiration in response to salinity stress in tilapia (*Oreochromis mossambicus*). **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 157, pgs. 260–265, 2010.

KANG, C-K.; LIU, F-C.; CHANG, W-B. & LEE, T-H. Effects of low environmental salinity on the cellular profiles and expression of Na⁺, K⁺-ATPase and Na⁺, K⁺, 2Cl⁻ cotransporter 1 of branchial mitochondrion-rich cells in the juvenile marine fish *Monodactylus argenteus*. **Fish Physiology and Biochemistry**. v. 38, pgs. 665–678, 2012.

KANG, C.K.; TSAI, S.C.; LEE, T.H. & HWANG, P.P. Differential expression of branchial Na⁺/K⁺-ATPase of two medaka species, *Oryzias latipes* and *Oryzias dancena*, with different salinity tolerances acclimated to fresh water, brackish water and seawater. **Comparative Biochemistry and Physiology**. v.151, pgs. 566-575, 2008.

KARNAKY, K.J.; ERNST, S.A. & PHILPOTT, C.W. Response of pupfish *Cyprinodon variegatus* gill Na⁺,K⁺-ATPase and chloride cell fine structure to various high salinity environments. **The Journal of Cell Biology**. v. 70, 1976.

KARSI, A.; YAVUZCAN YILDIZ, H. Secondary stress response of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, after direct transfer to different salinities. **Tarim Bilimleri Dergisi**. v. 11, pgs. 139-141, 2005.

KATOH, F; HYODO, S & KANEKO, T. Vacuolar-type proton pump in the basolateral plasma membrane energizes ion uptake in branchial mitochondria-rich cells of killifish *Fundulus heteroclitus*, adapted to a low ion environment. **Journal of Experimental Biology**. v. 206, pgs. 793-803, 2003.

KOLBADINEZHAD, S.M.; HAJIMORADLOO, A.; GHORBANI, R.; JOSHAGHANI, H. & WILSON, J.M. Effects of gradual salinity increase on osmoregulation in Caspian roach *Rutilus caspicus*. **Fish Biology**. v. 81, pgs. 125-134, 2012.

KUBITZA, F. **Tilápia: tecnologia e planejamento na produção comercial**. F. Kubitza, Jundiaí., 2000.

KUBITZA, F. Tilápia em água doce e salgada. **Revista Panorama de Aquicultura**. v. 15, 2005.

KÜLTZ, D.; BASTROP, R.; JÜRSS, K. & SIEBERS, D. Mitochondria-rich (MR) cells and the activities of the Na^+/K^+ - ATPase and carbonic anhydrase in the gill and opercular epithelium of *Oreochromis mossambicus* adapted to various salinities. **Comparative Biochemistry and Physiology**. v. 102, pgs. 293-301, 1992.

LAIZ-CARRIÓN, R.L.; GUERREIRO, P.M.; FUENTES, J.; CANARIO, A.V.M.; DEL RIO, M.A.M. & MANCERA, J. Branchial osmoregulatory response to salinity in the Gilthead Sea Bream, *Sparus auratus*. **Journal of Experimental Zoology**. v. 303, pgs. 563–576, 2005.

LEADEM, T.P.; CAMPBELL, R.D. & JOHNSON, D.W. Osmoregulatory responses of DDT and varying salinities in *Salmo gairdneri* I. Gill Na^+/K^+ -ATPase. **Journal of Comparative Biochemistry and Physiology**. v. 49, pgs. 197-203, 1974.

LEE, T.H., FENG, S.H.; LIN, C.H.; HWANG, Y.H.; HUANG, C. L. & HWANG, P.P. Ambient salinity modulates the expression of sodium pumps in branchial mitochondria-rich cells of Mozambique tilapia, *Oreochromis mossambicus*. **Zoological Science**. v. 20, pgs. 29-36, 2003.

LEE, K.M.; KANEKO, T. & AIDA, K. Low-salinity tolerance of juvenile fugu *Takifugu rubripes*. **Fisheries Science**. v. 71, pgs. 1324-1331, 2005.

LEGUEN, I.; PRUNET, P. Effect of hypotonic shock on cultured pavement cells from freshwater or seawater rainbow trout gills. **Comparative Biochemistry and Physiology**. v. 137, pgs. 259-269, 2004.

LEMARIÉ G., BAROILLER, J.F.; CLOTA, F.; LAZARD, J. & DOSDAT, A. A simple test to estimate the salinity resistance of fish with specific application to *O. niloticus* and *S. melanotheron*. **Aquaculture**, v. 240, pgs. 575-584, 2004.

LÉVÊQUE, C.; OBERDORFF, T.; PAUGY, D.; STIASSNY, M.L.J & TEDESCO, P.A. **Global diversity of fish (Pisces) in freshwater**. In: BALIAN, E.V.; LÉVÊQUE, C.; SEGERS, H. & MARTENS, K. Freshwater animal diversity assessment. Springer: Netherlands, 2008.

LI, J.; WANG, J.; YANG, L.; CHEN, Y. & YANG, Z. Changes in plasma osmolality and Na^+/K^+ ATPase activity of juvenile obscure puffer *Takifugu obscurus* following salinity challenge. **Biochemical Systematics and Ecology**. v. 56, pgs. 111-117, 2014.

LIKONGWE, J.S.; STECKO, T.D.; STAUFFER, J.R. & CARLINE, R.F. Combined effects of water temperature and salinity on growth and feed utilization of juvenile Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (Linnaeus). **Aquaculture**. v. 146, pgs. 37-46, 1996.

LIN, Y.M. & LEE, T.H. The expression of gill Na^+ , K^+ -ATPase in milkfish, *Chanos chanos*, acclimated to seawater, brackish water and fresh water. **Comparative Biochemistry and Physiology**. v. 135, pgs. 489–497, 2003.

LIN, H. & RANDALL, D.J. H^+ -ATPase activity in crude homogenates of fish gill tissue: inhibitor sensitivity and environmental and hormonal regulation. **Journal of Experimental Biology**. v. 163, pgs. 163-174, 1993.

LIN, C.H.; TSAI, R.S. & LEE, T.H. Expression and distribution of Na, K-ATPase in gill and kidney of the spotted green pufferfish, *Tetraodon nigroviridis*, in response to salinity challenge. **Comparative Biochemistry and Physiology**. v. 138, pgs. 287-295, 2004.

LISBOA, V.; BARCAROLLI, I.F.; SAMPAIO, L.A. & BIANCHINI, A. Effect of salinity on survival, growth and biochemical parameters in juvenile Lebranch mullet *Mugil liza* (Perciformes: Mugilidae). **Neotropical Ichthyology**. v. 13, pgs. 447-452, 2015.

LORIN-NEBEL, C.; AVARRE, J.C.; FAIVRE, N.; WALLON, S.; CHARMANTIER, G. & DURAND, J.D. Osmoregulatory strategies in natural populations of the black-chinned tilapia *Sarotherodon melanotheron* exposed to extreme salinities in West African estuaries. **Journal of Comparative Physiology**. v. 182, pgs. 771-780, 2012.

MADSEN, S.S.; McCORMICK, S.D.; YOUNG, G.; ENDERSEN, J.S.; NISHIOKA, R.S. & BERN, H.A. Physiology of seawater acclimation in the striped bass, *Morone saxatilis* (Walbaum). **Fish Physiology and Biochemistry**. v. 13, pgs. 1-11, 1994.

MAPLES, C.G. & ARCHER, A.W. The potential of Paleozoic nonmarine trace fossils for paleoecological interpretations. **Palaeogeography**. v. 73, pgs. 185-195, 1989.

MARASCHI, A.C. **Avaliação dos mecanismos osmorregulatórios de espécies eurihalinas submetidas à variação de salinidade**. (Dissertação), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2014.

MARSHALL, W.S. Na⁺, Cl⁻, Ca²⁺ and Zn²⁺ transport by fish gills: retrospective review and prospective synthesis. **The Journal of Experimental Zoology**, v. 293, pgs. 264–283, 2002.

MARSHALL, W.S.; EMBERLEY, T.R.; SINGER, T.D.; BRYSON, S.E. & McCORMICK, S.D. Time course of salinity adaptation in a strongly euryhaline estuarine teleost, *Fundulus heteroclitus*: a multivariable approach. **Journal of Experimental Biology**. v. 202, pgs. 1535–1544, 1999.

MARSHANSKY, V. & FUTAI, M. The V-type H⁺-ATPase in vesicular trafficking: targeting, regulation and function. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 20, pgs. 415–426, 2008.

MARTÍNEZ-ÁLVAREZ, R.M. Physiological changes of sturgeon *Acipenser naccarii* caused by increasing environmental salinity. **The Journal of Experimental Biology**. v. 205, pgs. 3699–3706, 2002.

MARSHALL, W.S. & GROSELL, M. Ion transport, osmoregulation, and acid-base balance. In: Evans DH & Claiborne JB (Eds). **The Physiology of Fishes**, Taylor & Francis, 2006.

MARSHALL, W.S.; HOWARD J.A.; COZZI, R.R. & LYINCH, E.M. NaCl and fluid secretion by intestine of teleost *Fundulus heteroclitus*: involvement of CFTR. **The Journal of Experimental Biology**, v. 205, pgs. 745 –758, 2002.

McCORMICK, S.D. & BRADSHAW, D. Hormonal control of salt and water balance in vertebrates. **General and Comparative Endocrinology**. v. 147, pgs. 3-8, 2006.

McCORMICK, S.D.; REGISH, A.M. & CHRISTENSEN, A.K. Distinct freshwater and seawater isoforms of Na⁺/K⁺-ATPase in gill chloride cells of *Atlantic salmon*. **The Journal of Experimental Biology**, v. 212, pgs. 3994-4001, 2009.

McCORMICK, S.D.; SUNDELL, K.; BJÖRNSSON, B.T.; BROWN, C.L. & HIROI, J. Influence of salinity on the localization of Na⁺/K⁺-ATPase, Na⁺/K⁺/2Cl⁻ cotransporter (NKCC) and CFTR anion channel in chloride cells of the Hawaiian goby (*Stenogobius hawaiiensis*). **Journal of Experimental Biology**. v. 206, pgs. 4575-4583, 2003.

MIR, I.H.; CHANNA, A.; NABI, S. Chloride and pavement cells in the gills of snow trout, *Schizothorax curvifrons* Heckel (Teleost, Cypriniformes, Cyprinidae). **Cytologia**. v. 76, pgs. 439-444, 2011.

MIWA, A.C.P.; FALCO, P.B. & CALIJURI, M.C. Avaliação de métodos espectrofotométricos para determinação de proteína em amostras de lagoas de estabilização. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 13, pgs. 236-242, 2008.

MOORMAN, B.P.; LERNER, D.T.; GRAU, E.G. & SEALE, A. The effects of acute salinity challenges on osmoregulation in Mozambique tilapia reared in a tidally changing salinity. **Journal of Experimental Biology**. v. 218, pgs. 731-739, 2015.

MORGAN, J.D.; SAKAMOTO, T.; GRAU, E.G. & IWAMA, G.K. Physiological and respiratory responses of the Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*) to salinity acclimation. **Comparative Biochemistry and Physiology**. v. 117, pgs. 391-398, 1997.

MORGAN, J.D. & IWAMA, G.K. Salinity effects on oxygen consumption, gill Na⁺, K⁺-ATPase and ion regulation in juvenile coho salmon. **Journal of Fish Biology**. v. 53, pgs. 1110-1119, 1998.

MOYES, C.D.; SCHULTE, P.M. **Principles of Animal Physiology**. 2ª edição. British Columbia, 2009.

NAKKRASAE, L-I.; WISSETDEE, K.; CHAROENPHANDHU, N. Osmoregulatory adaptations of freshwater air-breathing snakehead fish (*Channa striata*) after exposure to brackish water. **Journal of Comparative Biology**, v. 185, pgs. 527-537, 2015.

NELSON, J.S. **Fishes of the World**. [S.I.]: John Wiley & Sons, Inc, 2006.

NISHI, T. & FORGAC, M. The Vacuolar (H⁺)-ATPases – Nature's Most Versatile Protons Pumps. **Nature Review**, v. 3, pgs 94-103, 2002.

NOLAN, D.T.; OP'T VELD, R.L.J.M.; BALM, P.H.M. & WENDELAAR BONGA, S.E. Ambient salinity modulates the response of the tilapia, *Oreochromis mossambicus* Peters), to net confinement. **Aquaculture**. v. 177, pgs. 297-309, 1999.

NORMAN, J.D.; DANZMANN, R.G.; GLEBE, B. & FERGUSON, M.M. The genetic basis of salinity tolerance traits in Arctic charr (*Salvelinus alpinus*). **BMC genetics**. v. 12, pgs. 81, 2011.

NUGON JR, R.W. **Salinity tolerance of juveniles of four varieties of tilapia**. (Tese), Louisiana State University and Aquaculture and Mechanical College, 76 p., 2003.

OIKARI, A. Aspects of osmotic and ionic regulation in two Baltic teleosts: Effects of salinity on blood and urine composition. **Marine Biology**. v. 44, pgs. 345-355, 1978.

OSTRENSKY, A.; FARIAS, H. & GOMES, E. **Tilapia (*Oreochromis niloticus*) production in marine shrimp ponds in Guaraquecaba Bay, Parana, Brazil**. In: Proceedings, Fifth International Symposium on Tilapia in Aquaculture. 2000.

OUATTARA, N'G.; BODINIER, C.; NÈGRE-SADARGUES, G.; D'COTTA, H.; MESSAD, S.; CHARMANTIER, G.; PANFILLI, J. & BAROILLER, J.F. Changes in gill ionocyte morphology and function following transfer from fresh to hypersaline waters in the tilapia *Sarotherodon melanotheron*. **Aquaculture**, v. 290, pgs. 155-164, 2009.

PAPAKOSTAS, S.; GI, A.; VÄHÄ, J.-P.; HIMBERG, M. PEIL, L. & PRIMMER, C.R. A proteomics approach reveals divergent molecular responses to salinity in populations of European whitefish (*Coregonus lavaretus*). **Molecular Ecology**. v. 21, pgs. 3516-3530, 2012.

PARKS, S.K.; TRESGUERRES, M.; GALVES, F. & GOSS, G.G. Intracellular pH regulation in isolated trout gill mitochondrion-rich (MR) cell subtypes: evidence for Na⁺/H⁺ activity. **Comparative Biochemistry and Physiology**. v. 155, pgs. 139-145, 2010.

PATTERSON, J.; BODINIER, C. & GREEN, C. Effects of low salinity media on growth, condition, and gill ion transporter expression in juvenile Gulf killifish *Fundulus grandis*. **Comparative Biochemistry and Physiology**. v. 161, pgs. 415-421, 2012.

PÉREZ-ROBLES, J.; DIAZ, F.; IBARRA-CASTRO, L.; GIFFARD-MENA, I.; RE, A.D.; IBARRA, L.E.R. & SOTO, J.A.I. Effects of salinity on osmoregulation during the embryonic development of the bullseye puffer (*Sphoeroides annulatus* Jenyns 1842). **Aquaculture Research**. v. 47, pgs. 838-846, 2016.

PEREZ-VELASQUEZ, M.; URQUIDEZ-BEJARANO, P.; GONZÁLEZ-FÉLIX, M.L. & MINJAREZ-OSORIO, C. Evidence of euryhalinity of the Gulf Corvina (*Cynoscion othonopterus*). **Physiological Researches**. v. 63, pgs. 659-666, 2014.

PERRY, S.F.; SHAHSAVARANI, A.; GEORGALIS, T.; BAYAA, M.; FUROMSKY, M.; THOMAS, S.L.Y. Channels, pumps, and exchangers in the gill and kidney of freshwater fishes: their role in ionic and acid–base regulation. *The Journal of Experimental Zoology*, v. 300A, pgs. 53–62, 2003.

PIECHNIK, C.A. **Atividade da Na⁺, K⁺-ATPase e alterações histológicas nas brânquias do peixe *Bathygobius soporator* Valenciennes (Gobiidae) após exposição a diferentes salinidades**. (Tese). Universidade Federal do Paraná, 2006.

POUGH, F.H.; HAVIS, C.M. & HEISER, J.B. **A vida dos vertebrados**. 4ª edição. São Paulo: Atheneu, 2006.

PRODOCIMO, V.; GALVEZ, F.; FREIRE, C.A. & WOOD, C.M. Unidirectional Na⁺ and Ca⁺ fluxes in two euryhaline teleost fishes, *Fundulus heteroclitus* and *Oncorhynchus mykiss*, acutely submitted to a progressive salinity increase. **Journal of Comparative Physiology**. v. 177, pgs. 519-528, 2007.

PRODOCIMO, V.; SOUZA, C.F.; PESSINI, C.; FERNANDES, L.C. & FREIRE, C.A. Metabolic substrates are not metabolized from the osmoregulatory organs (gills and kidney) of the estuarine pufferfishes *Sphoeroides greeleyi* and *S. testudineus* upon shortterm salinity reduction. **Neotropical Ichthyology**. v. 6, pgs. 613-620, 2008.

RICHARDS, J.G.; SEMPLER, J.W.; BYSTRIANSKY, J.S. & SCHULTE, P. Na⁺/K⁺-ATPase α -isoform switching in gills of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during salinity transfer. **The Journal of Experimental Biology**. v. 206, pgs. 4475-4486, 2003.

RUIZ-JARABO, I.; GONZÁLEZ-WEVAR, C.A.; OYARZÚN, R.; FUENTES, J.; POULIN, E.; BERTRÁN, C. & VARGAS-CHACOFF, L. Isolation driven divergence in osmoregulation in *Galaxias maculatus* (Jenyns, 1848) (Actinopterygii: Osmeriformes). **Plos One**. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0154766>, 2016.

SAÉZ, A.G.; LOZANO, E. & ZALDÍVAR-RÍVERON, A. Evolutionary history of Na,K-ATPases and their osmoregulatory role. **Genetica**. v. 136, pgs. 479-490, 2009.

SAITOH, K.; MYIA, M.; INOUE, J.G.; ISHIGURO, N.B. & NNISHIDA, M. Mitochondrial genomics of Ostariophysan fishes: perspectives on phylogeny and biogeography. **Journal of Molecular Evolution**. v. 56, pgs. 464-472, 2003.

SAKAMOTO, T.; KOZAKA, T.; TAKAHASHI, A.; KAWAUCHI, H. & ANDO, M. Medaka (*Oryzias latipes*) as a model for hypoosmoregulation of euryhaline fishes. **Aquaculture**, v. 193, pgs. 347-354, 2001.

SALA-BOZANO, M. & MARIANI, S. Life history variation in a marine teleost across a heterogeneous seascape. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, n. 92, pgs. 555-563, 2011.

SAMPAIO, L.A. & BIANCHINI, A. Salinity effects on osmoregulation and growth of the euryhaline flounder *Paralichthys orbignyanus*. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**. v. 269, pgs. 187-196, 2002.

SANTINI, F. & TYLER, J.C. A phylogeny of the families of fossil and extant tetraodontiform fishes (Acanthomorpha, Tetraodontiformes), upper Cretaceous to recent. **Zoological Journal of the Linnean Society**. v. 139, pgs. 565-617, 2003.

SAOUD, I.P.; KREYDYEH, S.; CHALFOUN, A. & FAKIH M. Influence of salinity on survival, growth, plasma osmolality and gill Na⁺-K⁺-ATPase activity in the rabbitfish *Siganus rivulatus*. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**. v. 348, pgs. 183-190, 2007.

SARDELLA, B.A.; MATEY, V.; COOPER, J.; GONZALEZ, R.J. & BRAUNER, C.J. Physiological, biochemical and morphological indicators of osmoregulatory stress in California/Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus* × *O. urolepis hornorum*) exposed to hypersaline water. **Journal of Experimental Biology**. v. 207, pgs. 1399-1413, 2004.

SCHOFIELD, P.J.; PETERSON, M.S.; LOWE, M.R.; BROWN-PETERSON, N.J.; SLACK, W.T. (2010) Effects of temperature and salinity on survival, growth and reproduction of non-native Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) established in southern Mississippi, USA. Disponível em: http://fl.biology.usgs.gov/projects/tilapia_salinity.html. Acesso em dezembro de 2011.

SCHULTZ, E.T. & McCORMICK, S.D. **Eurihalinity in an evolutionary context**. Department of Ecology and Evolutionary Biology, University of Connecticut, 2013.

SFERCO, E.; LÓPEZ-ARBARELLO, A. & BÁEZ, A.M. Phylogenetic relationships of †*Luisiella feruglioi* (Bordas) and the recognition of a new clade of freshwater teleosts from the Jurassic of Gondwana. **BMC Evolutionary Biology**. v. 15, pg. 268-283, 2015.

SHIKANO, T. & FUJIO, Y. Immunolocalization of Na⁺, K⁺-ATPase and morphological changes in two types of chloride cells in the gill epithelium during seawater and freshwater

adaptation in a euryhaline teleost, *Poecilia reticulata*. **Journal of Experimental Zoology**. v. 281, pgs. 80-89, 1998.

SIMONATO, J.D.; FERNANDES, M.N. & MARTINEZ, C.B.R. Physiological effects of gasoline on the freshwater fish *Prochilodus lineatus* (Characiformes: Prochilodontidae). **Neotropical Ichthyology**. v.11, 2013.

SOUZA-BASTOS, L. R. & FREIRE, C. A. The Handling of salt by the neotropical cultured freshwater catfish *Rhamdia quelen*. **Aquaculture**, 289, pgs. 167-174, 2009.

STERZELECKI, F.C.; RODRIGUES, E.; FANTA, E. & RIBEIRO, C.A.O. The effect of salinity on osmoregulation and development of the juvenile fat snook, *Centropomus parallelus* (POEY). **Brazilian Journal of Biology**. v. 73, pgs. 609-615, 2013.

STEWART, H.A.; NOAKES, D.L.G.; COGLIATI, K.M.; PETERSON, J.T.; IVERSEN, M.H. & SCHRECK, C.B. Salinity effects on plasma ion levels, cortisol, and osmolality in Chinook salmon following lethal sampling. **Comparative Biochemistry and Physiology**. v. 192, pgs. 38-43, 2016.

STRANGE, K. Cellular volume homeostasis. **Advances in Physiology Education**. v. 28, pgs.155–159, 2004.

SUÁREZ-BATISTA, B.J. & RODRÍGUEZ-FORERO, A. Ionregulation in juvenile swordspine snook (*Centropomus ensiferus*, Poey, 1860) in relation to environmental salinity. **Journal of Applied Ichthyology**. v. 31, pgs. 900-904, 2015.

TANG, C.H.; CHANG, I.C.; CHEN, C.H.; LEE, T.H. & HWANG, P.P. Phenotypic changes in mitochondrion-rich cells and responses of Na⁺/K⁺-ATPase in gills of tilapia exposed to deionized water. **Zoological Science**. v. 25, pgs. 205-211, 2008.

TANG, C-H.; HWANG, L-Y.; SHEN, I-D.; CHIU, Y-H. & LEE, T-H. Immunolocalization of chloride transporters to gill epithelia of euryhaline teleosts with opposite salinity-induced Na⁺/K⁺-ATPase responses. **Fish Physiology and Biochemistry**. v. 37, pgs. 709-724, 2011.

TANG, C-H.; TZENG, C-S.; HWANG, L-Y.; LEE T-H. Constant muscle water content and renal HSP90 expression reflect osmotic homeostasis in euryhaline teleosts acclimated to different environmental salinities. **Zoological Studies**, v. 48, pgs. 435-441, 2009.

TANG, C-H & LEE, T-H. Morphological and ion-transporting plasticity of branchial mitochondrion-rich cells in the euryhaline spotted green pufferfish, *Tetraodon nigroviridis*. **Zoological Studies**. v. 50, pgs. 31-42, 2011.

TERANISHI, K.; MEKUCHI, M. & KANEKO, T. Expression of sodium/hydrogen exchanger 3 and cation-chloride cotransporters in the kidney of Japanese eel acclimated to a wide range of salinities. **Comparative Biochemistry and Physiology**. v. 164, pgs. 333-343, 2013.

TIMM, A.; HALLERMAN, E.; DOLLOF, C.A.; HUDY, M. & KOLKA, R. Identification of a barrier height threshold where brook trout population genetic diversity, differentiation, and relatedness are affected. **Environmental Biology of Fishes**. v. 99, pgs. 195-208, 2016.

TIPSMARK, C.K.; MADSEN, S.S. SEIDELIN, M.; CHRISTENSEN, A.S.; CUTLER, P. & CRAMB, G. Dynamics of Na⁺,K⁺,2Cl⁻ cotransporter and Na⁺,K⁺ ATPase expression in the

branchial epithelium of brown trout (*Salmo trutta*) and Atlantic salmon (*Salmo salar*). **Journal of Experimental Zoology**. v. 293, pgs. 106–118, 2002.

UCHIDA, K.; KANEKO, T.; MIYAZAKI, H.; HASEGAWA, S.; HIRANO, T. Excellent salinity tolerance of Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*): elevated chloride cell activity in the branchial and opercular epithelia of the fish adapted to concentrated seawater. **Zoological Science**, v. 17, pgs. 149-160, 2000.

UNIVALI – Universidade do Vale do Itajaí. Disponível em: <<http://www.univali.com.br>>. Acesso em 05 de outubro de 2009.

VARGAS-CHACOFF, L.; SAAVEDRA, E.; OYARZÚN, R.; MARTÍNEZ-MONTAÑO, E.; PONTIGO, J.P.; YÁÑEZ, A.; RUIZ-JARABO I.; MANCERA, J.M.; ORTIZ, E. & BERTRÁN, C. Effects on the metabolism, growth, digestive capacity and osmoregulation of juvenile of Sub-Antarctic Notothenioid fish *Eleginops maclovinus* acclimated at different salinities. **Fish Physiology and Biochemistry**. v. 41, pgs. 1369-1381, 2015.

VEGA, G.C. & WIENS, J.J. Why are there so few fish in the sea? **Proceeding of the Royal Society of London**. v. 282, pgs. 1-7, 2012.

VILLEGAS, C.T. Evaluation of salinity tolerance of *Oreochromis mossambicus*, *O. niloticus*, and their F1 hybrids. **Aquaculture**. v. 85, n. 281, pgs. 282, 287, 1990.

VIZE, P.D. A Homeric view of kidney evolution: A reprint of H.W. Smith's classic essay with a new introduction. **The Anatomical Record** v. 277, pgs 344-354, 2004.

VONCK, A.P.M.A.; BONGA, S.E. & FLIK, G. Sodium and calcium balance in Mozambique tilapia, *Oreochromis mossambicus*, raised at different salinities. **Comparative Biochemistry and Physiology**. v. 119, pgs. 441-449, 1998.

ZHAO, F.; WANG, Y.; ZHANG, L.; ZHUANG, P. & LIU, J. Survival, growth, food conversion efficiency and plasma osmolality of juvenile *Siganus guttatus* (Bloch, 1787): experimental analyses of salinity effects. **Fish Physiology and Biochemistry**. v. 39, pgs. 1025-1030, 2013.

ZHAO, F.; WU, B.; YANG, G.; ZHANG, T.; ZHUANG, P. Adaptive alterations on gill Na⁺, K⁺-ATPase activity and mitochondrion-rich cells of juvenile *Acipenser sinensis* acclimated to brackish water. **Fish Physiology and Biochemistry**. v. 42, pgs., 749-756, 2016.

WANG, P-J.; LIN, C-H.; HWANG, L-Y.; HUANG, C-H.; LEE, T-H.; HWAG, P.P. Differential responses in gills of euryhaline tilapia, *Oreochromis mossambicus*, to various hyperosmotic shocks. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*, v. 152, pgs. 544-551, 2009.

WATANABE, W.O.; KUO, C-M. & HUANG, M.C. Salinity tolerance of Nile tilapia fry (*Oreochromis niloticus*), spawned and hatched at various salinities. **Aquaculture**: v.48, pgs. 159-176, 1985.

WATANABE, S.; ITOH, K. & KANEKO, T. Prolactin and cortisol mediate the maintenance of hyperosmoregulatory ionocytes in gills of Mozambique tilapia: Exploring with an improved gill incubation system. **General and Comparative Endocrinology**. v. 232, pgs. 151-156, 2016.

WATSON, C.J.; NORDI, W.M. & ESBAUGH, A.J. Osmoregulation and branchial plasticity after acute freshwater transfer in red drum, *Sciaenops ocellatus*. **Comparative Biochemistry and Physiology**. v. 178, pgs. 82-89, 2014.

WEAKLEY, J.C.; CLAIBORNE, J.B.; HYNDMAN, K.A. & EDWARDS, S.L. The effect of environmental salinity on H⁺ efflux in the euryhaline barramundi *Lates calcarifer*. **Aquaculture**. 338, 190-196, 2012.

WEDDERBURN, S.D.; BAILEY, C.P.; DELEAN, S. & PATON, D.C. Population and osmoregulatory responses of a euryhaline fish to extreme salinity fluctuations in coastal lagoons of the Coorong, Australia. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**. v. 168, pgs. 50-57, 2016.

WEHNER, F.; OLSEN, H.; TINEL, H.; KINNE-SAFFRAN, E. & KINNE, R.K.H. Cell volume regulation: osmolytes, osmolyte transport, and signal transduction. **Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology**. v. 148, pgs.1-80, 2003.

WENG, C-F.; CHIANG, C-C.; GONG, H-Y.; CHEN, M. H-C.; LIN, C. J-F.; HUANG, W-T.; CHENG, C-Y.; HWANG, P.P. & WU, J-L. Acute changes in gill Na⁺-K⁺-ATPase and creatine kinase in response to salinity changes in the euryhaline teleost, tilapia (*Oreochromis mossambicus*). **Physiological and Biochemical Zoology**, v. 75, pgs. 29-36, 2002.

WILLMER, P.; STONE, G. & JOHNSTON, I. **Environmental physiology of animals**. Second edition. Blackwell Science, Oxford, U.K. 2005.

WILSON, J.M. **The use of immunochemistry in the study of branchial ion transport mechanisms**. In: BALDISSEROTTO, B.; ROMERO, J.M.M. & KAPOOR, B.G. (eds). Fish Osmoregulation. CRC Press, 2007.

WILSON, J.; LAURENT, P.; TUFTS, B.L.; BENOS, D.J.; DONOWITZ, M.; VOGL, A.W. & RANDALL, D.J. NaCl uptake by the branchial epithelium in freshwater teleost fish: an immunological approach to ion-transport protein localization. **Journal of Experimental Biology**. v. 203, pgs. 2279-2296, 2000.

WITTERS, H.; BERCKMANS, P. & VANGENECHTEN, C. Immunolocalization of Na⁺, K⁺-ATPase in the gill epithelium of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. **Cells Tissue Research**. v. 283, pgs: 463-468, 1996.

WOOD, C.M. Rapid regulation of Na⁺ and Cl⁻ flux rates in killifish after acute salinity challenge. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**. v. 409, pgs. 62-69, 2011.

WOOD, C.M. & GROSELL, M. A critical analysis of transepithelial potential in intact killifish (*Fundulus heteroclitus*) subjected to acute and chronic changes in salinity. **Journal of Comparative Physiology**. v. 178, pgs. 713-727, 2008.

WOOD, C.M.; KELLY, S.P.; ZHOU, B.; FLETCHER, M.; O'DONELL, M.; ELETTI, B. & PÄRT, P. Cultured gill epithelia as models for the freshwater fish gill. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1566, pgs. 72-83, 2002.

WOOD, C.M. & LAURENT, P. Na⁺ versus Cl⁻ transport in the intact killifish after rapid salinity transfer. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1618, pgs. 106-119, 2003.

WOOD, C.M. & PÄRT, P. Cultured branchial epithelia from freshwater fish gills. **The Journal of Experimental Biology**, v. 200, pgs. 1047-1059, 1997.

YANG, W.K.; HSEU, J.R.; TANG, C.H.; CHUNG, M.J.; WU, S.M. & LEE, T. H. Na⁺,K⁺-ATPase expression in gills of the euryhaline sailfin Molly, *Poecilia latipinna*, is altered in response to salinity challenge. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**. v. 375, pgs. 41-50, 2009.

YANG, W.K.; KANG, C.K.; CHEN, T.Y.; CHANG, W.B. & LEE, T.H. Salinity-dependent expression of the branchial Na⁺/K⁺/2Cl⁻ cotransporter and Na⁺/K⁺-ATPase in the sailfin molly correlates with hypoosmoregulatory endurance. **Journal of Comparative Physiology**. v. 181, pgs. 953-964, 2011.

YAO K., AHOUSI, A.F.A.; Survie du Tilapia du Nil (*Oreochromis niloticus*) en eaux salées durant un transfert direct et progressif. **Livestock Research for Rural Development**, v. 20, 2008.

YOUNG, G.C. Placoderms (Armored Fish): dominant vertebrates of the Devonian Period. **Annual Review of Earth and Planetary Sciences**. v. 38, pgs.523-550, 2010.

ANEXO



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Comissão de Ética no Uso de Animais
(CEUA)



Nº 775

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, instituído pela PORTARIA Nº 787/03-BL, de 11 de junho de 2003, com base nas normas para a constituição e funcionamento da CEUA, estabelecidas pela RESOLUÇÃO Nº 01/03-BL, de 09 de maio de 2003 e considerando o contido no Regimento Interno da CEUA, **CERTIFICA** que os procedimentos utilizando animais no projeto de pesquisa abaixo especificado, estão de acordo com os princípios éticos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e exigências estabelecidas em "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)".

CERTIFICATION

The Ethics Animal Experiment Committee of the Setor de Ciências Biológicas of the Federal University of Paraná, established by the DECREE Nº 787/03-BL on June 11th 2003, based upon the RESOLUTION Nº 01/03-BL from May 9th 2003, and upon the CEUA internal regiment, CERTIFIES that the procedures using animals in the research project specified below are in agreement with the ethical principals established by the Experimental Animal Brazilian Council (COBEA), and with the requirements of the "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)".

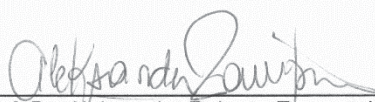
PROCESSO: 23075.055045/2013-76

APROVADO: 24/04/2014 – R.O. 03/2014

TÍTULO: Osmorregulação e regulação de volume celular: contribuição à caracterização dos mecanismos envolvidos na ocupação de diversos ambientes aquáticos

AUTORES: Carolina Arruda de Oliveira Freire, Fátima Juliane Machado Ceron

DEPARTAMENTO: Fisiologia


Prof. Dr. Aleksander Roberto Zamprônio
Coordenador da CEUA