SILVIA ROMÃO ZANETTI DA CRUZ

ADAPTAÇÕES MORFOFUNCIONAIS E REGULAÇÃO IÔNICA DO PEIXE ANTÁRTICO *Notothenia neglecta* NYBELIN (1951) SUBMETIDO A DECRÉSCIMO DE SALINIDADE

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Morfologia, do Departamento de Biologia Celular da Universidade Federal do Paraná, para a obtenção do Título de Mestre em Ciências Morfológicas, área de concentração Biologia Celular.

CURITIBA
1998

Julia, minha filha e ***Adauto***, meu amor:

Dedico este trabalho a vocês, pois apesar das horas de convívio roubadas, sempre estiveram ao meu lado, tornando o ambiente alegre e tranquilo.

AGRADECIMENTOS

Durante todo o decorrer deste trabalho sempre pude olhar para o lado e encontrar alguém vindo em meu auxílio. Este é o momento de agradecer todo o auxílio, assim como atenção e carinho recebidos, fazendo com que este caminho, tantas vezes árduo, fosse percorrido com tranquilidade.

Agradeço à Dra. Edith Fanta, por abrir as portas do seu laboratório para a estagiária de iniciação científica, por dar oportunidade à bióloga e orientar a pós-graduanda. Como minha orientadora esteve sempre presente com suas sugestões, porém de forma sutil, evitando que seu estilo influenciasse demasiadamente o trabalho proposto. Com isso foi possível um aprendizado bastante intenso, onde não faltaram horas de insegurança ou erros, para os quais esteve sempre atenta A você o meu muito obrigada

Agradeço à Dra. Carolina Arruda de Oliveira Freire, minha co-orientadora, por participar de forma bastante intensa no desenvolvimento e elucidação de aspectos fisiológicos deste trabalho. Agradeço também à Carolina, pelo companherismo e amizade.

Ao Laboratório de Impacto Ambiental. Neste momento falo, não da estrutura, mas do grupo formado pela professora Edith Fanta, que propiciou um amadurecimento mútuo de todos os seus componentes Ana Cristina Vianna, Ana Meyer, Ana Teresa Guimarães, Flavia Rios, Lucélia Donatti, Paula Nakayama, Patrícia Calil, Sandra Freiberger, Sonia Grötzner. Ao longo destes anos, nós aprendemos a nos conhecer umas às outras, a aceitar as diferenças e semelhanças e principalmente a aprender com isto. Vocês acompanharam de perto todo este trabalho, estando dispostas sempre a participar. Estiveram presentes nos momentos de maior necessidade, sem contudo precisar de um pedido de ajuda. Estes foram, sem dúvida, os melhores anos e as melhores experiências dentro do meu caminho profissional

Aos meus amigos Richard Zanetti da Cruz e Eloisa Wistuba por todo o incentivo, apoio e amor, que muitas vezes garantiram a realização deste trabalho.

A todos os amigos da Estação Antártica Comandante Ferraz, encontrados durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Departamento de Biologia Celular por todo o auxílio prestado durante a realização do trabalho.

Ao Centro de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal do Paraná, pelos auxílios prestados no preparo do material para análise em microscopia eletrônica de transmissão.

Ao Centro de Microscopia Eletrônica da Escola Paulista de Medicina, pelo auxílo no preparo do material para análise em microscopia eletrônica de varredura

Ao CNPq e a CAPES, por propiciar o financiamento para que o projeto pudesse ser realizado.

A Secirm, que propiciou todo o apoio logístico que garantiu a realização prática deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS E TABELAS ix

RESUMO xi

ABSTRACT xiii

1. INTRODUÇÃO 1

1.1. O Ambiente Antártico 1

1.2. A Fauna Ictiológica 3

1.3. Regulação Osmótica e Iônica 5

1.4. As Brânquias 9

1.5. Os Rins 20

2. OBJETIVOS 26

2.1. Objetivos Gerais 26

2.2. Objetivos Específicos 26

3. MATERIAIS E MÉTODOS 27

3.1. Local de Estudo 27

3.2. Local de Trabalho 27

3.3. Espécie Utilizada: *Notothenia neglecta* 28

3.4. Coleta de *Notothenia neglecta* 29

3.5. Aclimatação de *Notothenia neglecta* às Condições Laboratoriais 29

3.6. Arranjo Experimental: Decréscimo de Salinidade 30

3.7. Testes de Decréscimo de Salinidade de Longo-Prazo 30

3.8. Teste de Decréscimo de Salinidade de Curto-Prazo 31

3.9. Coleta de Amostra de Sangue 32

3.10. Dissecção das Brânquias 33

3.11. Coleta de Amostra de Urina da Bexiga 33

3.12. Dissecção dos Rins 33

3.13. Coleta de Tecido Branquial e Renal para Análise em Microscopia Óptica .. 34

3.14. Coleta de Tecido Branquial e Renal para Análise em Microscopia Eletrônica de Varredura 34

3.15. Coleta de Tecido Branquial e Renal para Análise em Microscopia Eletrônica de Transmissão **35**

3.16. Coleta de Tecido Branquial e Renal para Ensaio da Atividade da Na^+,K^+-ATPase **35**

3.17. Processamento dos Tecidos Branquial e Renal para Análise em Microscopia Óptica **36**

3.18. Processamento de Tecido Branquial e Renal para Análise em Microscopia Eletrônica de Varredura **37**

3.19. Processamento de Tecido Branquial e Renal para Análise em Microscopia Eletrônica de Transmissão **38**

3.20. Dosagem do Íon Cloreto no Soro e na Urina **38**

3.21. Dosagem do Íon Sódio no Soro e na Urina **39**

3.22. Dosagem do Íon Magnésio no Soro e na Urina **39**

3.23. Ensaio da Atividade Na^+,K^+-ATPase em Homogenizados dos Tecidos Branquial e Renal **40**

3.24. Dosagem de Proteínas Totais em Homogenizados dos Tecidos Branquial e Renal **40**

3.25. Análise Estatística **41**

4. RESULTADOS **42**

4.1. Morfologia e Ultraestrutura das Brânquias **42**

4.1.1. Descrição das Brânquias dos Animais Controle **42**

4.1.2. Alterações na Morfologia das Brânquias de Espécimes Expostos a Salinidade 17‰ **45**

4.2. Morfologia e Ultraestrutura dos Rins **46**

4.2.1. Descrição dos Rins dos Animais Controle **46**

4.2.2. Alterações Morfológicas dos Rins de Espécimes Expostos a Salinidade 17‰ **48**

4.3. Morfologia da Bexiga **48**

4.4. Concentrações de Cloreto **48**

4.4.1. Concentração de Cloreto no Soro **48**

4.4.2. Concentração de Cloreto na Urina **49**

4.5. Concentração de Sódio **50**

4.5.1. Concentração de Sódio no Soro 50
4.5.2. Concentração de Sódio na Urina 50
4.6. Concentração de Magnésio 51
4.6.1. Concentração de Magnésio no Soro 51
4.6.2. Concentração de Magnésio na Urina 51
4.7. Atividade da Na^+,K^+-ATPase 52
4.7.1. Atividade da Na^+,K^+-ATPase em Homogenizado das Brânquias 52
4.7.2. Atividade da Na^+,K^+-ATPase em Homogenizado dos Rins 52
5. DISCUSSÃO 88
6. CONCLUSÕES 105
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 107

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Mapa do Continente Antártico.....53
FIGURA 2: Mapa do Local de Estudo.....54
FIGURA 3: Limites do Congelamento do Mar e Aspecto do Degelo.....55
FIGURA 4: Localização da Estação Antártica Comandante Ferraz e Aspectos da Baía do Almirantado.....56
FIGURA 5: Material Biológico.....57
FIGURA 6: Coleta de *Notothenia neglecta*.....58
FIGURA 7: Local de Trabalho.....59
FIGURA 8: Coleta de Material para Análise.....60
FIGURA 9: Arco Branquial de *Notothenia neglecta*.....61
FIGURA 10: Lamelas Primária e Secundárias: Aspecto Geral.....62
FIGURA 11: Lamelas Primária e Secundárias: Aspecto Geral e Distribuição das Células de Muco.....63
FIGURA 12: Lamela Primária: Microssaliências.....64
FIGURA 13: Lamelas Primária e Secundárias: Células de Muco e Microssaliências.....65
FIGURA 14: Lamela Primária: Células de Muco.....66
FIGURA 15: Lamela Secundária: Células de Muco.....67
FIGURA 16: Lamela Primária: Distribuição Células de Cloreto.....68
FIGURA 17: Lamela Primária e Secundária: Distribuição das Células de Cloreto.....69
FIGURA 18: Lamela Secundária: Células de Cloreto.....70
FIGURA 19: Ultraestrutura da Célula de Cloreto.....71
FIGURA 20: Lamela Primária de Animais Expostos a Salinidade de 17°/$_{oo}$.....72
FIGURA 21: Gráfico da Densidade de Células de Cloreto.....73
FIGURA 22: Túbulos Renais: Aspecto Geral.....74
FIGURA 23: Túbulos Principais: Características Celulares.....75

FIGURA 24: Túbulos Principais : Características da Superfície da Luz Tubular....76
FIGURA 25 : Túbulos Principais: Características Ultraestruturais.....77
FIGURA 26: Túbulos Principais: Características Ultraestruturais.....78
FIGURA 27: Túbulos Intermediários: Características Celulares.....79
FIGURA 28: Túbulos Coletores: Características Celulares.....80
FIGURA 29: Túbulos Coletores: Secreção.....81
FIGURA 30: Bexiga: Camadas Celulares do Órgão.....82
FIGURA 31: Bexiga: Características do Epitélio.....83
FIGURA 32: Concentração de Cloretos no Soro e na Urina de Animais Controle e Expostos a Salinidade 17°/$_{oo}$.....84
FIGURA 33: Concentração de Sódio no Soro e na Urina de Animais Controle e Expostos a Salinidade 17°/$_{oo}$.....85
FIGURA 34: Concentração de Magnésio no Soro e na urina de Animais Controle e Expostos a Salinidade 17°/$_{oo}$.....86
FIGURA 38: Atividade Específica da Na^+,K^+-ATPase de Homogenizado Branquial e Renal de Animais Controle e Expostos a Salinidade 17°/$_{oo}$.....87

TABELA

TABELA 1: Número de Peixes e Análises Realizadas em Animais Controles e Experimentais Submetidos a Salinidade 17°/$_{oo}$.....32

RESUMO

Variações sazonais na temperatura causam congelamento da superfície do mar durante o inverno e degelo marinho ou costeiro durante o verão, na Antártica. Como conseqüência, há alterações na salinidade do mar, principalmente em regiões rasas e costeiras. Na Baía do Almirantado, Ilha Rei George, a influência do congelamento e do degelo afeta todas as espécies de peixes que ali vivem. Para adaptação ao decréscimo salino é necessário que ocorram ajustes morfológicos e fisiológicos nos órgãos responsáveis pela regulação osmótica e iônica, como brânquias, rins e bexiga. Uma das espécies dominantes nesta região é o nototeniídeo *Notothenia neglecta*. Suas brânquias mostram três tipos de células de cloreto: alongadas, dispostas na região interlamelar das lamelas primárias; piriformes, na região de inserção das lamelas secundárias, e largas e baixas nas lamelas respiratórias Na região de inserção das lamelas secundárias, ocorrem agregados de três ou mais células de cloreto O rim aglomerular se compõe de túbulos principais, seguidos dos túbulos intermediários e dos coletores. A bexiga é revestida por epitélio simples colunar, com intensa secreção celular. Através de testes em laboratório de curto e longo prazo, foi demonstrado que esta espécie sobrevive por 30 dias nas salinidades de 30 ‰, 17 ‰ e até 10 ‰, com comportamento e alimentação normais. A análise morfológica de espécimes expostos à salinidade de 17 ‰ durante 30 dias mostrou menor densidade de células de cloreto nas brânquias e ausência dos agregados de células de cloreto, mas nenhuma alteração morfológica nos rins. Entretanto, um leve abaixamento nos valores do Cl^- do soro de peixes mantidos em salinidade 17 ‰ por 10 dias foi observado, bem como uma diminuição significativa de Cl^- e Mg^{++} depois de 30 dias de exposição, assim como uma redução de Mg^{++} na urina. Não houve variação na atividade específica da Na^+,K^+-ATPase do homogenizado branquial, mas uma redução significativa da Na^+,K^+-ATPase renal de peixes mantidos por até 6 horas na salinidade 17 ‰, indicando que os rins participam dos mecanismos de regulação iônica. *N. neglecta* não tem necessidade de migrar, nas épocas de congelamento ou degêlo, para deixar as regiões costeiras onde vive, já que suporta as flutuações da salinidade ambiental por períodos prolongados, sendo capaz de regular a concentração interna de íons, sem danos à estrutura celular renal ou branquial

ABSTRACT

In Antarctica, freezing of the sea surface during winter and melting of sea ice or coastal ice during summer is caused by seasonal variation in the environmental temperature Therefore, changes in water salinity, mainly in coastal shallow regions, are observed. In the Admiralty Bay, King George Island, the influence of freezing and melting affects all fish that live there. For adaptation to salinity decrease, physiological and morphological adjustment will occur in those organs that are responsible for osmotic and ionic regulation, like kidneys, gills and bladder. One of the dominant species in this region is the nototheniid *Notothenia neglecta*. Their gills show three kinds of chloride cells: elongated ones at the inter-lamellar region of primary lamellae; pear-shaped cells at the region of insertion of the respiratory lamellae, and broad short cells at the secondary lamellae There are also aggregations of three or more chloride cells located at the region of insertion of the secondary lamellae The aglomerular kidneys show principal tubules, followed by intermediate and by collecting tubules. The bladder is lined by a simple columnar epithelium showing intense cellular secretion. Through short- and long-term tests in the laboratory it was shown that this species survives in salinities of 30 ‰ , 17 ‰ and even 10 ‰ at least for 30 days, behaving and feeding normally. The morphological analysis of specimens exposed to the salinity of 17‰ during 30 days indicated lower density of chloride cells in the gills and loss of chloride cell aggregations, but no morphological changes in the kidneys. However, a slight lowering of the Cl^- values of the serum of fish kept in salinity 17 ‰ for 10 days was observed, and a significant lowering of Cl^- and Mg^{--} after 30 days, as well as a reduction of Mg^{++} in the urine. No variation was observed in the specific activity of Na^+,K^+-ATPase of gills homogenate, but a significant reduction of Na^+,K^+-ATPase in the kidneys occurred in fish maintained for up to 6 hours in salinity 17 ‰, indicating that kidneys participate in the mechanisms of ionic regulation *N. neglecta* has no necessity to migrate, leaving the coastal regions where they occur, in seasons of freezing or melting, because they support well the natural fluctuation in environmental salinity, even for longer periods, being able to regulate the internal concentration of ions, without damage to kidney or gills cells

1. INTRODUÇÃO

1.1. O AMBIENTE ANTÁRTICO

O congelamento e isolamento do continente Antártico ocorreu há cerca de 38 milhões de anos atrás. A formação do Oceano Antártico e total isolamento do continente ocorreu há cerca de 25 milhões de anos, quando a passagem de Drake se abriu (EASTMAN, 1993) separando este oceano dos demais oceanos através de uma barreira natural denominada Convergência Antártica, localizada entre 50° e 60° de latitude Sul. A Convergência Antártica é caracterizada pelo encontro de águas mais quentes e menos densas dos Oceanos Atlântico, Pacífico e Índico com as águas geladas e mais densas do Oceano Antártico. Este encontro causa grande movimentação vertical da água (FOSTER, 1984; CAPOZOLI, 1991; CROSSLEY, 1995). O Oceano Antártico é caracterizado por um sistema circumpolar de correntes e frentes hidrográficas que causam um transporte de massa d'água na direção oeste para leste, mas um reduzido grau de troca na coluna d'água acima de 1000 metros de profundidade na direção norte-sul (EKAU, 1991).

A convergência Antártica é uma grande barreira para organismos pelágicos, com exceção de aves e mamíferos aquáticos. Para organismos bentônicos, o brusco aumento na profundidade do solo marinho forma uma fronteira na distribuição. Este isolamento hidrográfico e topográfico do continente Antártico resulta em uma alta porcentagem de endemismo em diferentes grupos taxonômicos (EKAU, 1991).

A variação das características físicas da água, únicas em combinação, tem certamente influenciado as adaptações evolutivas da fauna ictiológica do Oceano Sul (LUTJEHARMS, 1990; EASTMAN, 1993). A temperatura da água superficial do Oceano Antártico se situa próximo de 0°C e uma pequena diferença de 2°C pode ser encontrada entre as temperaturas de verão e inverno antártico (EASTMAN, 1993). A temperatura da água da plataforma continental pode encontrar-se próxima ou levemente abaixo do ponto de congelamento da água do mar, que é de -1,86°C. Este ponto de congelamento pode variar em décimos de graus Célsius de acordo

com a salinidade da água (EASTMAN, 1991a,b). Devido a esta estabilidade térmica do ambiente os peixes puderam adaptar seu metabolismo, tornando-o mais eficiente em baixas temperaturas (EVERSON, 1984).

O Oceano Antártico apresenta peculiaridades também em relação a outros fatores abióticos. A viscosidade da água a 0°C é duas vezes maior que a viscosidade da água a 25°C (EASTMAN, 1991a,b). A taxa de oxigênio dissolvido é inversamente proporcional à temperatura, sendo encontradas regiões do Oceano Antártico com até 105% de saturação de oxigênio (LITTLEPAGE, 1965 apud EASTMAN, 1993).

A salinidade e a densidade da água têm variações sazonal e local. Estas variações regulam a estabilidade da coluna d'água, que juntamente com o vento na superfície da água são importantes fatores que governam a mistura de águas do oceano (FOSTER, 1984). Durante o inverno uma grande parte do Oceano Antártico está recoberto por uma camada de gelo (LUTJEHARMS, 1990). O processo de formação do gelo a partir da água do mar resulta em um aumento da salinidade e densidade da água logo abaixo do gelo, devido a expulsão de cristais de sal para a água do mar. Este aumento da salinidade e densidade induz uma movimentação vertical da água (FOSTER, 1984; EASTMAN, 1993; HEMPEL, 1994) que termina por estabilizar a coluna d'água, não afetando significativamente a salinidade. A salinidade do oceano no inverno situa-se entre 33.8 e 34.2 $^{o}/_{oo}$ (LUTJEHARMS, 1990). A distribuição da salinidade no verão demonstra a influência do degelo da camada de gelo formada no inverno sobre a superfície da água (FOSTER, 1984) e dos rios de degelo formados a partir do gelo terrestre, assim como uma taxa de precipitação duas vezes maior do que a taxa de evaporação (EDMOND, 1975 apud LUTJEHARMS, 1990). A salinidade do Oceano Antártico no verão tende a ficar entre 33,5 e 34 $^{o}/_{oo}$ (LUTJEHARMS, 1990). A variação da salinidade tende a ser maior em regiões próximas à costa, principalmente em ambientes mais fechados e com menor circulação de água, como baías e enseadas. Segundo RAKUSA-SUSZCZEWSKI (1993), no verão há um decréscimo significativo da salinidade em regiões próximas à costa, sendo que a influência do

degelo atinge as camadas mais superficiais da água do mar, chegando a reduzir a salinidade da água até 75 m de profundidade.

1.2. FAUNA ICTIOLÓGICA

De aproximadamente 20.000 espécies de peixes modernos, por volta de 1% são encontradas ao sul da convergência Antártica. A maior parte destas espécies é encontrada exclusivamente nesta área (EVERSON, 1984). A ictiofauna compreende 274 espécies pertencentes a 49 famílias, sendo 88% das espécies e 76% dos gêneros endêmicos da região Antártica (EASTMAN, 1993) e marcadamente diferentes da fauna que a precedeu no tempo geológico (EASTMAN, 1991a,b). A fauna ictiológica antártica é exclusivamente marinha, menor e menos diversificada do que o esperado, considerando-se sua idade e a grande área do ecossistema (EASTMAN, 1991a,b; EASTMAN, 1993). A maioria das espécies restringe-se à plataforma continental ou à área da plataforma que contorna grupos de ilhas. Em geral, a profundidade da água dos habitats da plataforma continental é muito maior do que em outros oceanos (EVERSON, 1984).

Os peixes da subordem Notothenioidei (Ordem Perciformes) são elemento dominante da fauna antártica. São peixes bentônicos que irradiaram para vários habitats associados ao gelo ou à coluna d'água (EASTMAN, 1993). Para tanto desenvolveram adaptações morfológicas e fisiológicas que permitiram seu sucesso na exploração destes ambientes diversificados. Entre as adaptações mais importantes incluem-se: 1) baixo nível de ativação enzimática (SOMERO *et al.*, 1968; SOMERO 1991); 2) presença de glicoproteínas anticongelantes que previnem o congelamento do sangue e dos líquidos do corpo (DeVRIES, 1971 apud DeVRIES e EASTMAN, 1981; LOGSDON e DOOLITTLE, 1997); 3) rins aglomerulares que impedem a perda das moléculas anticongelantes pela urina (DOBBS *et al.*, 1975; EASTMAN e DEVRIES, 1986; EASTMAN, 1990); 4) flutuação neutra, apesar da ausência de bexiga natatória (EASTMAN, 1990); 5) reduzida concentração de glóbulos vermelhos no sangue, garantindo uma diminuição do gasto energético na

circulação devido a redução de sua viscosidade (EVERSON e TWELVES, 1977 apud DeVRIES e EASTMAN, 1981; EASTMAN 1990).

Os Notothenioidei compreendem seis famílias: Bovichtidae, Nototheniidae, Harpagiferidae, Artetidraconidae, Bathydraconidae e Channichthyidae, das quais a família Nototheniidae é a maior (EVERSON, 1984) e mais diversificada em relação à estrutura, habitat e distribuição (EASTMAN, 1991 a,b; KOCK, 1992; EASTMAN, 1993). São características da família um corpo de oblongo a alongado e fusiforme, sempre escamoso (KOCK, 1992). Há divergências entre os autores, havendo registros de 49 espécies para esta família, com 32 espécies ocorrendo no Oceano Antártico (DeWITT *et al.*, 1990), ou , 12 gêneros e 48 espécies, das quais 31 ocorrendo no Oceano Antártico (KOCK, 1992), ou ainda 17 gêneros e 50 espécies no total (EASTMAN, 1993).

Na Baía do Almirantado, Ilha Rei George, são encontradas 35 espécies de 24 gêneros, representantes de 10 famílias. A grande maioria destes peixes é encontrada em profundidades superiores a 100 m, uma tendência característica das águas Antárticas. De um modo geral ocorre uma alternância de dominância da população de peixes da Baía do Almirantado, onde *Notothenia rossi* (SKORA e NEYELOV, 1992) e *N. neglecta* (ZADRÓZNY, 1996) podem ser encontradas como espécies dominantes em profundidades de até 100 metros.

Notothenia neglecta Nybelin pertence à família Nototheniidae (FISCHER e HUREAU, 1985; KOCK, 1992). Alguns aspectos da biologia, distribuição, estrutura anatômica e histológica desta espécie já foram elucidados. Sua distribuição é circumpolar, sendo encontrada na costa do continente antártico, Península Antártica e em torno das ilhas Georgia do Sul, Sandwich do Sul, Shetland do Sul, Orkney do Sul, Bouvet e Peter I. Sua presença é questionável na costa do Pacífico e Índico (FISCHER e HUREAU, 1985). *N. neglecta* pode ser encontrada de 35 a 100 metros de profundidade (FISCHER e HUREAU, 1985) ou de 0 a 550 metros de profundidade segundo DeWITT *et al*, (1990), sendo particularmente abundante entre 10 a 15 metros de profundidade (SKORA e NEYELOV, 1992; ZADRÓZNY, 1996). Na Baía do Almirantado, *Notothenia neglecta* distribui-se em ambientes abertos e enseadas bastante fechadas e com influência de degelo de glaciares, como

na enseada Herve, onde é observada uma dominância absoluta desta espécie (ZADRÓZNY, 1996).

Notothenia neglecta é uma espécie bentônica (FISHER e HUREAU, 1985; DeWITT *et al*, 1990; KOCK, 1992) e sedentária, sendo que sua mobilidade restringe-se basicamente aos períodos de alimentação (RIOS, 1997; RIOS e FANTA, 1998). Trata-se de um predador bentônico (DeWITT *et al*, 1990), alimentado-se de invertebrados bentônicos e particularmente eufausiáceos e cefalopodos (FISCHER e HUREAU 1985). Peixes de diferentes espécies também são encontrados entre os ítens alimentares (RIOS e FANTA, 1998, FANTA e MEYER, 1998; FANTA 1998).

São características da espécie a presença de glicopeptídeos anti-congelantes no sangue e nos liquídos extracelulares, bem como o rim aglomerular (EASTMAN e DEVRIES, 1986). Possui o aparato branquial formado de quatro pares de arcos brânquiais. Aspectos relacionados com a distribuição de rastros branquiais e conteúdo estomacal foram estudados por RIOS (1997) e RIOS e FANTA (1998). Aspectos do comportamento alimentar e estrutura do estômago foram estudados por FREIBERGER (1996). *N. neglecta* não é explorada comercialmente, mas é de importância potencial para a pesca costeira (FISCHER e HUREAU 1985).

1.3. REGULAÇÃO OSMÓTICA E IÔNICA

Os seres vivos podem ser considerados como uma solução aquosa envolta por uma membrana, que é a superfície do corpo. O volume do organismo e a concentração dos solutos devem ser mantidos dentro de limites bastante estreitos. Invariavelmente a concentração interna é diferente da concentração do meio, havendo uma tendência à diminuição desta diferença por alteração do equilíbrio (SCHMIDT-NIELSEN, 1996). As formas de serem minimizadas as dificuldades que seriam impostas por esta tendência são: 1) diminuição da permeabilidade das superfícies do corpo; 2) diminuição o gradiente de concentração entre os fluidos corpóreos e o meio externo e 3) geração de um fluxo, que seja exatamente igual à

perda por difusão, para a qual é necessária energia metabólica (SCHMIDT-NIELSEN, 1996).

Todas as células de animais superiores são isosmóticas ao seu fluido extracelular. Efetores intracelulares presentes no tecido incluem solutos orgânicos e inorgânicos. Ambos são importantes para a regulação do volume das células e juntos são importantes para o equílibrio osmótico dos fluidos extracelulares. Os íons têm um papel na regulação do volume celular, porém sua participação é variável, dependendo da espécie (KING e GOLDSTEIN, 1983). Por exemplo, no peixe feiticeira *Myxine glutinosa* os íons são responsáveis por 35% da osmoralidade celular (ROBERTSON, 1966 apud KING e GOLDSTEIN, 1983). Em teleósteos marinhos a participação iônica é bem maior. Por exemplo, o teleósteo marinho, *Platichthys flesus* apresenta 68% da osmolaridade celular relacionada à concentração iônica celular (LANGE e FUGELLI, 1965 apud KING e GOLDESTEIN, 1983). Os principais constituintes iônicos do sangue dos vertebrados são sódio e cloretos, ambos em concentração de 100 a 300 mM (KIRSCHNER, 1993), o que cria um problema para os teleósteos marinhos. Estes animais são hiposmóticos e hipoiônicos à água do mar, havendo tendência à perda de água e aumento na concentração de sais no organismo (KIRSCHNER, 1993).

Em contraste, nos peixes elasmobrânquios marinhos a concentração osmótica é maior que a do ambiente pela adição de solutos orgânicos principalmente uréia e óxido de trimetilamina (TMAO) no sangue. A resolução do problema de perda de água pelos elasmobrânquios ocorre através de um gasto energético para a síntese e reabsorção dos osmólitos orgânicos sanguíneos (KIRSCHNER, 1993). Outro problema é a excreção de sal, que ocorre por via renal e pela glândula de sal retal (BURGER e HESS, 1960 apud KIRSCHNER, 1993), para o sangue ser mantido hipoiônico à água do mar.

Os peixes teleósteos mantêm suas concentrações osmóticas em torno de um quarto a um terço da concentração da água do mar. Os peixes marinhos apresentam concentrações de Na^+ e Cl^- um pouco acima das que ocorrem nos peixes de água doce (EVANS, 1993; KIRSCHNER, 1993). Peixes teleósteos antárticos apresentam-se hiposmóticos em relação ao meio mas possuem concentrações

osmóticas sanguíneas e urinárias superiores às encontradas em espécies temperadas (DOBBS e DeVRIES, 1975). A concentração osmótica do sangue está relacionada, principalmente, com a alta concentração de NaCl enquanto que a concentração osmótica na urina está relacionada com a concentração de cloreto de magnésio ($MgCl_2$) (DOBBS e DeVRIES, 1975).

Os teleósteos marinhos estão em constante risco de perder água do corpo para a água do mar mais concentrada, pois sua superfície corpórea e, especialmente, a grande área branquial, são permeáveis à água. Estes peixes necessitam compensar a inevitável perda osmótica de água e o fazem pela ingestão de água do mar (PHILLIPS, 1976; EVANS, 1993; HILDEBRAND, 1995; SCHMIDT-NIELSEN, 1996). Embora a ingestão de água recupere o conteúdo hídrico, grande quantidade de sais, principalmente NaCl, são também ingeridos e absorvidos no trato intestinal juntamente com a água, devendo ser excretados (PHILLIPS, 1976; FLETCHER, 1978; EVANS, 1993; HILDEBRAND, 1995; SCHMIDT-NIELSEN, 1996).

Dentro do mecanismo regulatório há dois pontos que requerem energia: 1) absorção de íons (e água por consequência) no trato digestivo e 2) secreção branquial do sal absorvido (KIRSCHNER, 1993). Para conseguir um ganho de água pela ingestão de água do mar, os sais devem ser excretados em concentração superior a da água do mar ingerida. O rim dos teleósteos não pode servir para este fim, pois não consegue produzir uma urina hiperosmótica em relação ao sangue (DOBBS e DeVRIES, 1975; SCHMIDT-NIELSEN, 1996). Parecem existir processos distintos de secreção de sais monovalentes e divalentes, sendo os sais divalentes excretados principalmente por via renal (HICKMAN e TRUMP, 1969; EVANS, 1993; SCHMIDT-NIELSEN, 1996) e os íons monovalentes excretados por via brânquial (PHILLPS, 1976; EVANS, 1993; HILDEBRAND, 1995; SCHMIDT-NIELSEN, 1996).

Como resultado da ação desses mecanismos os peixes são ditos osmorreguladores: mantém e regulam sua concentração osmótica apesar das alterações na concentração externa (SCHMIDT-NISLSEN, 1996), quando são eurihalinos. Peixes eurihalinos são capazes de suportar uma grande variação na salinidade do meio, sobrevivendo e adaptando-se a estas situações (PLAZA-

YGLESIAS, et al., 1988; ZADUNAISKY, 1996). A mudança entre ambientes salinos diferentes requer alterações profundas no processo de osmorregulação (SCHMIDT-NIELSEN, 1996). Peixes estenohalinos, como o peixe dourado *Carassius aureatus* de água doce, não são biologicamente preparados para aumentos na salinidade e não sobrevivem (ZADUNAISKY, 1996).

Alterações fisiológicas devido a mudanças salinas no meio podem ser bastante diversas. Com a redução da salinidade do meio a partir da água do mar foram encontradas alterações como: 1- aumento do hematócrito, aumento no número de eritrócitos, aumento da concentração de hemoglobina; 2- maior concentração de proteínas e glicogênio no músculo; 3- aumento da concentração lipídica no plasma (WOO e FUNG, 1981); 4- aumento da atividade da succinato desidrogenase nas brânquias, nos rins e no fígado (MANSURI e BHAN, 1978); 5- alterações morfológicas branquiais (MALLATT, 1985, LUVIZOTTO, 1994; FANTA, *et al.*, 1995); 6)- diminuição da concentração de NaCl no sangue (NORDLIE, 1987; PLAZA-YGLESIAS, *et al.*, 1988; BAUSTIAN *et al.*, 1997); 7)- variação na atividade da enzima Na^+,K^+ ATPase; 8)- diminuição da excreção de sódio (FLETCHER, 1978; VENTURINI *et al.*, 1992).

Considerando-se as adaptações relacionadas com tolerância à variação salina, *Eleginops maclovinus* é a única espécie da família Notothenidae indicada como eurihalina, sendo ainda, uma das duas únicas espécies da subordem Notothenioidei registradas como eurihalinas (EASTMAN, 1993). Porém, testes realizados anteriormente com três espécies de nototenióideos antárticos, *Trematomus borchgrevink*, *T. nicolai* e *T. bernacchii*, indicaram que estes peixes são osmorreguladores para valores entre 25% e 175% da salinidade normal da água do mar (O'GRADY e DeVRIES, 1982).

Os peixes da espécie *Notothenia neglecta* foram encontrados em regiões altamente influenciadas por glaciares (ZADRÓZNY, 1996), indicando que esta espécie deve possuir a capacidade de adaptar-se, mesmo que periodicamente, a uma variação salina. Como já foi mencionado, os mecanismos de regulação da concentração osmótica e iônica ocorrem principalmente através das brânquias na regulação da excreção de íons monovalentes e dos rins na regulação de íons

divalentes. Portanto análises destas duas estruturas são de grande importância no estudos da capacidade de uma espécie adaptar-se a variações salinas.

1.4. AS BRÂNQUIAS

A maioria dos vertebrados aquáticos possui brânquias, evaginações da superfície do corpo, nas quais ocorrem trocas gasosas (POUGH *et al.* 1993), trocas iônicas (HUGHES e UMEZAWA, 1983; EVANS, 1993; WOOD e MARSHALL, 1994; PERRY, 1997), regulação ácido-básica (EVANS, 1993; WOOD e MARSHALL, 1994; LIN e RANDALL, 1991; 1995; PERRY, 1997) e excreção de amônia e uréia (HIBIYA, 1982). O transporte de gases e íons ocorre através do contato da água com um epitélio especializado, que inclui diferentes tipos celulares supridos por um complexo sistema de vasos que sofre influência neural e humoral (LAURENT 1984).

Nos teleósteos a água é bombeada por ação muscular através das brânquias, numa determinada direção, em dois estágios: um primeiro estágio que expande a cavidade oro-faríngea e um segundo estágio que movimenta os ossos operculares (POUGH *et al.* 1993). Projeções internas, uma de cada lado da boca e outras duas mais posteriores localizadas na margem posterior da cavidade faríngea junto à cavidade opercular, funcionam como válvulas que direcionam o fluxo d'água no sentido que vai da cavidade faríngea para as cavidades operculares e daí para o meio externo (PHILLIPS, 1976; ROMER e PARSONS, 1985; POUGH *et al.* 1993). O refluxo da água de dentro da cavidade oral para fora da boca é prevenido por válvulas orais. A água passa para fora da cavidade opercular através da margem livre do opérculo. A cavidade opercular é fechada quando a margem livre do opérculo é mantida junto ao corpo (CHIASSON, 1966). O fluxo de sangue através da lamela secundária se dá em sentido contrário, porém paralelo ao fluxo da água do mar que banha a brânquia .(CHIASSON, 1966; HUGHES, 1966; HIBIYA, 1982, POUGH *et al.* 1993; HILDEBRAND, 1995). Este arranjo estrutural e funcional, conhecido como sistema de contracorrente, assegura o máximo de difusão do

oxigênio para dentro das brânquias (POUGH *et al.* 1993; HILDEBRAND, 1995;). A organização geral das brânquias está baseada em um sistema de subdivisão progressiva (HUGHES, 1984), possuindo localização e organização básica semelhante em todos os teleósteos (LAURENT, 1984; HOSSLER, *et al.*, 1986; MAINA, 1990; PERRY, 1997). As brânquias são encontradas na superfície aboral dos arcos branquiais e os raios branquiais são encontrados na superfície oral. Esta estrutura é coberta lateralmente pelo opérculo (CHIASSON, 1966).

Os teleósteos possuem quatro pares de arcos branquiais (LAURENT, 1984; MAINA, 1990; HILDEBRAND, 1995; RIOS, 1997). As brânquias estão ligadas a cada um dos 4 pares de arcos branquiais (CHIASSON, 1966; MAINA, 1990). Cada um dos arcos contêm duas fileiras de filamentos denominados holobrânquias e cada um dos filamentos das holobrânquias é denominado hemibrânquia (CHIASSON, 1966; LAURENT, 1984; HILDEBRAND, 1995). Nos teleósteos é encontrado, ainda, um par de arcos contendo uma única fileira de filamentos, as hemibrânquias, sendo este par denominado pseudobrânquia (CHIASSON, 1966; LAURENT, 1984; HILDEBRAND, 1995).

Os filamentos branquiais são também denominados de lamelas primárias (HUGHES e MITTAL, 1980; LAURENT, 1982; HUGHES, 1984). O papel dos filamentos é suprir de sangue as lamelas secundárias que estão dispostas espaçadamente (LAURENT, 1984), em formação semicircular ao longo dos dois lados dos filamentos branquiais (HIBIYA, 1982; MAINA 1990; HILDEBRAND, 1995). Estas lamelas são chamadas de lamelas secundárias ou respiratórias.

O sistema circulatório do filamento é composto de um sistema artério-arterial ou sistema vascular, também chamado respiratório, que conecta a aorta ventral com a aorta dorsal por capilares respiratórios pilares das lamelas (LAURENT e DUNEL 1980; LAURENT, 1984) ou espaços sanguíneos. O sangue que vem da aorta ventral prossegue pela artéria aferente e flui para dentro dos arcos branquiais e lamelas primárias, e daí para os espaços sanguíneos das lamelas respiratórias ou lamelas secundárias. Deste último local passa novamente pelos filamentos branquiais ou lamelas primárias, saindo das brânquias através de artérias branquiais eferentes, que canalizam o sangue vascular branquial para dentro da aorta dorsal, entre os arcos

branquiais dos lados opostos (CHIASSON, 1966, HIBIYA, 1982). O fluxo sanguíneo neste sistema é controlado por esfíncteres localizados nas lamelas primárias (LAURENT e DUNEL, 1980). Um segundo sistema irriga as brânquias. É um complexo sistema circulatório artério-venoso que origina-se de várias partes do sistema artério-arterial, principalmente das artérias eferentes branquiais e filamentares. Este sistema supre os tecidos branquiais e assume função de nutrição dos tecidos branquiais (LAURENT, 1984).

O epitélio filamentar é estratificado e contorna todo o filamento, incluindo as superfícies anterior e laterais dos arcos branquiais, com exceção das lamelas respiratórias (LAURENT 1982, 1984). É encontrado também entre lamelas adjacentes na região denominada cripta (HUGHES e MITTAL, 1980) ou epitélio filamentar interlamelar (LAURENT, 1984; HUGHES, 1984). Este epitélio é constituído por quatro tipos celulares: 1) células pavimentosas, 2) células indiferenciadas, 3) células de muco e 4) células de cloreto (LAURENT e DUNEL, 1980; MAINA, 1990; PERRY, 1997). Três outros tipos celulares têm sido citados com menor frequência neste epitélio: células neuroepiteliais, que têm sido identificadas no epitélio filamentar (DUNEL-ERB *et al.*, 1982 apud LAURENT, 1984). HUGHES e MITTAL (1980) sugerem ainda a presença de leucócitos na região do epitélio interlamelar e células com grânulos em bastonetes ("rodlet cells") tanto do epitélio filamentar ou primário como nas lamelas secundárias (MATTEY *et al.*, 1979 e LEINO 1982).

A camada mais externa do epitélio filamentar é recoberta pelas células pavimentosas (DUNEL-ERB e LAURENT, 1980, LAURENT, 1984; HOSSLER *et al.* 1985). Estas células são poligonais e medem de 3 a 10 μm de diâmetro (LAURENT, 1984). Possuem um complexo de Golgi conspícuo (LAURENT, 1984). Apresentam um complexo sistema de microssaliências na membrana plasmática externa (HUGHES e MONDOLFINO, 1983; LAURENT, 1984; FISHELSON, 1984; HOSSLER *et al.* 1985; HOSSLER *et al.* 1986). Muitas vezes os limites celulares não ficam claros quando vistos externamente, porém, em

algumas espécies, são claramente definidos devido às microssaliências que correm paralelas aos limites celulares (LAURENT, 1984).

As células de muco podem ser encontradas amplamente distribuídas no epitélio primário e em diferentes graus de concentração no epitélio secundário (LAURENT e DUNEL, 1980; CONTE, 1969 apud LAURENT, 1984; MAINA, 1990; PERRY, 1997).

As células de cloreto são encontradas no epitélio que cobre os componentes mesodérmicos da lamela primária: artéria aferente, cartilagem branquial axial e tecido conjuntivo (DUNEL-ERB e LAURENT, 1980; HOSSLER *et al.*, 1985; HOSSLER *et al.*, 1986). Em microscopia eletrônica de varredura pode-se ver que a região do epitélio primário que cobre a artéria eferente não apresenta as criptas características das células de cloreto (DUNEL-ERB e LAURENT, 1980). Contudo na truta, *Salmo trutta*, estas células foram encontradas somente no filamento eferente (BROWN, 1992).

As lamelas secundárias ou lamelas respiratórias apresentam aparentemente a mesma estrutura em quase todos os grupos de peixes, (HUGHES e UMEZAWA, 1983; HUGHES, 1984). O epitélio da lamela respiratória é o local onde ocorrem as trocas gasosas (HUGHES, 1966; HUGHES e DATTA MUNSHI, 1968; LAURENT, 1984; HUGHES, 1984). Há uma significativa diferença entre a estrutura da superfície das células epiteliais das lamelas respiratórias e aquela dos filamentos branquiais (HUGHES e MONDOLFINO, 1983). O epitélio das lamelas primárias e secundárias é bastante diferente em relação à espessura, tipos celulares e com relação ao sistema vascular (DUNEL-ERB e LAURENT, 1980).

A estrutura básica das lamelas respiratórias dos teleósteos consiste de duas camadas de células epiteliais pavimentosas apoiadas sobre a membrana basal e separadas pelos espaços sanguíneos delimitados pelas células pilares com suas flanges (HUGHES, 1966; HUGHES e GRIMSTONE, 1965; HUGHES e DATTA MUNSHI, 1968; LAURENT e DUNEL 1980; HUGHES e MITTAL, 1980; HIBIYA, 1982; HUGHES, 1982; HUGHES e UMEZAWA, 1983; HUGHES, 1984).

A estrutura do epitélio das lamelas secundárias é bastante variada. Em uma situação simples o epitélio é constituído por uma camada única de células pavimentosas mas, frequentemente, é composto por mais de uma camada celular, cujas células podem sobrepor-se ou interdigitar-se de maneira irregular e complexa (HUGHES e GRIMSTONE, 1965).

O epitélio que separa o sangue da água nas lamelas secundárias é composto por diferentes tipos celulares: 1) células epiteliais pavimentosas; 2) células mucosas; e 3) células de cloreto (HUGHES e DATTA-MUNSHI, 1968; LAURENT e DUNEL, 1980; DUNEL-ERB e LAURENT, 1980; HUGHES e UMEZAWA, 1983 e HUGHES e MONDOLFINO, 1983) e 4) células com grânulos em bastonetes ("rodlet cells") (LEINO, 1982) . Estes tipos celulares, contudo, não ocorrem em todas as espécies (BOYD *et al.*, 1980).

As células epiteliais pavimentosas apresentam, geralmente, núcleo grande e achatado, que ocupa grande parte do volume celular (HUGHES e GRIMSTONE, 1965). Apresentam um complexo sistema de Golgi e abundante retículo endoplasmático, grandes quantidades de vesículas e ainda mitocôndrias em determinadas regiões de célula (BOYD *et al.*, 1980). Estas características podem sugerir um envolvimento no processo de difusão de gases (HUGHES, 1966). Os núcleos destas células são frequentemente encontrados sobre os corpos das células pilares, sendo esta, provavelmente, uma característica adaptativa para trocas gasosas, diminuindo a espessura da barreira água/sangue (HUGHES e GRIMSTONE, 1965).

A membrana basal é uma estrutura de suporte e é contínua com a membrana basal do eixo principal do arco branquial (HUGHES, 1966). Apresenta-se espessada nas extremidades dos corpos das células pilares. Das margens destas regiões espessadas aparecem cordões de material da membrana basal, compostos de fibras colágenas e material pouco denso, que vão ligar-se à membrana basal do outro lado da lamela. Estes cordões são denominados colunas e estão inseridos em dobras da membrana das células pilares, provavelmente atuando como um sistema esquelético da célula afim de aumentar a resistência à distensão provocada pela circulação do sangue nos espaços sanguíneos (HUGHES e GRIMSTONE, 1965; BETTEX-

GALLAND e HUGHES, 1973; HUGHES e BYCZKOWSKA-SMYK, 1974; HUGHES, 1982; HUGHES e UMEZAWA, 1983). O espaço sanguíneo ocupa cerca de 70% do volume total das lamelas secundárias. Este espaço se conecta com pequenos vasos aferentes e eferentes que ocorrem ao longo de cada filamento branquial (HUGHES e GRIMSTONE, 1965), compondo o sistema circulatório já descrito anteriormente.

As células pilares apresentam-se aproximadamente em linha reta, em filas paralelas (HUGHES e GRIMSTONE, 1965).Nestas células observa-se um núcleo central circundado de um denso citoplasma contendo muitas mitocôndrias, prolongamentos citoplasmáticos ou "flanges" e matriz citoplasmática preenchida por finos filamentos. As "flanges" são formadas por prolongamentos laterais das margens superiores e inferiores da célula que se dispõe paralelamente à membrana basal. As flanges de células pilares adjacentes estão intimamente conectadas delimitando o espaço sanguíneo. (HUGHES e GRIMSTONE,1965; BETTEX-GALLAND e HUGHES, 1973). As flanges das células pilares da margem da lamela secundária curvam-se e juntam-se formando um canal periférico contínuo. Possivelmente este canal periférico é o caminho preferencial da circulação sanguínea (HUGHES e GRIMSTONE, 1965). Os filamentos presentes nas células pilares parecem ser responsáveis por um sistema contrátil (HUGHES e GRIMSTONE, 1965 e BETTEX-GALLAND e HUGHES, 1973). Contrações das células pilares geram a restrição da passagem do fluxo sanguíneo pela lamela secundária (HUGHES, 1982). A proximidade entre estes filamentos contráteis e as colunas de colágeno (BETTEX-GALLAND e HUGHES, 1973; HUGHES e BYCZKOWSKA-SMYK, 1974), reforçam a idéia de um mecanismo ativo de controle da circulação sanguínea nas lamelas. A dinâmica cárdio-vascular pode então ser alterada através de mudanças na estrutura destas células (BETTEX-GALLAND e HUGHES, 1973).

As células de muco podem ser encontradas nas lamelas secundárias e no epitélio basal (HIBIYA, 1982; SILVA, 1997), no epitélio das lamelas primárias, no epitélio interlamelar (HUGHES e MITTAL, 1980; SILVA, 1997) e nos rastros branquiais (HUGHES e MITTAL, 1980, RIOS, 1997). Na região dos rastros

branquiais de *Notothenia neglecta* foram encontradas células secretoras de muco individuais saciformes, piriformes ou globosas, assim como estruturas glandulares em locais onde o relevo é mais irregular (RIOS, 1997; RIOS e FANTA, 1998). Em *Poecilia vivipara* foram identificados 4 tipos de células de muco, conforme distribuição e características citoquímicas (SABÓIA-MORAES *et al.*, 1996). As populações de células de muco podem ser alteradas por mudanças na salinidade do meio (LAURENT, 1984; FANTA *et al*, 1995).

As células com grânulos em bastonetes "rodlet cells"estão presentes em epitélio de numerosos orgãos de teleósteos , onde são sugeridas como células secretoras, como parasitas ou como derivadas de granulócitos (LEINO, 1982). Nas brânquias estas células podem ser encontradas amplamente distribuídas no filamento branquial e nas lamelas secundárias (MATTEY *et al.*, 1979; LEINO, 1982). Possuem grânulos de glicoproteínas neutras ou mais complexas. O conteúdo destes grânulos difere dos produtos dos grânulos das células de muco e granulócitos, presumivelmente por possuírem diferentes funções (LEINO, 1982). As células com grânulos em bastonetes foram encontradas amplamente distribuídas no epitélio de revestimento do estômago de *Notothenia neglecta*. Houve um aumento de densidade desta população celular em espécimes submetidos a jejum, sugerindo função protetora do epitélio (FREIBERGER, 1996). São caracterizadas por apresentarem grânulos citoplasmáticos positivos ao Reativo de Shiff (PAS) (MATTEY *et al.*, 1979; FREIBERGER, 1996) e a Alcian Blue pH 2,5 (FREIBERGER, 1996). Por outro lado, segundo MATTEY *et al.* (1979) a reação a Alcian Blue pH2,5 é negativa. Em microscopia eletrônica de transmissão as principais características são a presença de uma cápsula fibrosa envolvendo o citoplasma intracelularmente e grânulos citoplasmáticos eletrodensos com pontos de menor eletrodensidade em seu interior (MATTEY *et al.*, 1979; LEINO, 1982; FREIBERGER, 1996).

As células de cloreto normalmente diferenciam-se a partir de células epiteliais pavimentosas do epitélio respiratório, durante o desenvolvimento das lamelas respiratórias. Assim sendo, estas células são mais numerosas nas brânquias em desenvolvimento do que nas brânquias do peixe adulto (BOYD *et al.*, 1980). São geralmente numerosas na superfície aferente dos filamentos branquiais, na região

interlamelar (HOSSLER, 1980; LAURENT e DUNEL, 1980; HIBIYA, 1982; LAURENT,1984; LAURENT, 1982; HWANG, 1988; FANTA *et al,* 1995; SILVA, 1997; PERRY, 1997) e pouco concentradas nas lamelas respiratórias (LAURENT e DUNEL, 1980; HIBIYA, 1982; HWANG, 1988; BROWN, 1992; SILVA, 1997; PERRY, 1997). Estas células são acidofílicas e aparecem principalmente em peixes marinhos e mais raramente em peixes de água doce (HIBIYA, 1982). Porém as células de cloreto são indicadas como estrutura básica das brânquias de peixes de água doce (LAURENT e DUNEL, 1980). Hoje são muitas as descrições de células de cloreto e suas funções em peixes de água doce (ZACCONE, 1981; SILVA, 1997; PERRY, 1997).

As células de cloreto apresentam núcleo alongado e levemente basal, apresentam um sistema de Golgi desenvolvido, são muito ricas em mitocôndrias, as quais aparecem em contato íntimo a um bem desenvolvido sistema tubular membranoso que se abre na membrana plasmática basolateral. São observados ainda um sistema vesículo-tubular citoplasmático e um bem desenvolvido retículo endoplasmático (LAURENT e DUNEL, 1980; PISAM, 1981; LAURENT, 1982; McCORMICK, 1995). Este sistema parece estar envolvido no transporte iônico, uma vez que é acentuadamente desenvolvido quando a salinidade do meio aumenta (PISAM, 1981). A superfície apical das células de cloreto apresenta-se com muitos microvilos, associados às células epiteliais adjacentes. Nesta região apical existe também um grande número de vesículas de vários tamanhos (LAURENT, 1982).

Em teleósteos marinhos ou adaptados à água do mar, a membrana apical das células de cloreto encontra-se mais ou menos profunda circundada pelas células epiteliais adjacentes. Em peixes de água doce, as células de cloreto, quando presentes, apresentam uma superfície mais exposta ao meio externo (LAURENT,1982). Foram descritas alterações na morfologia dos poros das células de cloreto devido a estresse salino (HOSSLER, 1980; HOSSLER *et al*, 1985). O significado funcional das mudanças nos poros apicais das células de cloreto não está completamente entendida. Em muitos casos tem-se visto preferencialmente que mudanças paralelas entre a morfologia dos poros e a atividade Na^+, K^+-ATPase são diferentes manifestações do mesmo processo, ou seja, a rápida adaptação das

células de cloreto para a função de excreção de íons. O aprofundamento e estreitamento dos poros em alguns modelos reforçam esta idéia. Em peixes marinhos, estas células podem, também, ser encontradas formando um complexo multicelular, onde as células de cloreto apresentam junções bastante características, ligando-as a outras células de cloreto ou a células acessórias (HUGHES e MITTAL, 1980; HWANG, 1988; EVANS, 1993).

Células acessórias foram encontradas exclusivamente em peixes marinhos, onde apresentam um processo citoplasmático interligado ao citoplasma apical das células de cloreto. As duas membranas formam um complexo com aspecto de mosaico. Para alguns autores, as células acessórias poderiam ser células de cloreto imaturas (HOOTMAN e PHILPOTT, 1980), contudo pouco se conhece sobre a sua dinâmica. Sabe-se que elas aparecem em peixes marinhos (LAURENT e DUNEL, 1980) ou quando peixes adaptados a água doce são transferidos para a água do mar (HUGHES, 1982) e desaparecem quando o peixe marinho é transferido para a água doce (LAURENT e DUNEL, 1980). Estas células apresentam-se menores que as células de cloreto, possuem numerosas mitocôndrias e mostram um sistema de túbulos derivados da membrana.. O labirinto membranoso das células acessórias não é reativo para Na^+,K^+-ATPase, enquanto que as células de cloreto apresentam grande concentração de produtos de reação sensíveis a ouabaína, inibidor da Na^+,K^+-ATPase (HOOTMAN e PHILPOTT, 1980). As zonulas de oclusão entre as células acessórias e as células de cloreto também aparecem menos extensas do que aquelas entre as células pavimentosas (HOOTMAN e PHILPOTT, 1980) e parecem estar envolvidas no desenvolvimento das funções de transporte iônico em peixes marinhos (ERNST *et al.*, 1980; EVANS, 1993).

A secreção de sal através do epitélio branquial precisa se dar através de um transporte ativo, pois ocorre de uma menor concentração na corrente sanguínea para uma maior concentração no meio circundante (SCHMIDT-NIELSEN, 1996). O modelo atual para o transporte de íons pelas células de cloreto na água do mar é uma modificação do modelo proposto por SILVA *et al.* (1977). A corrente secretora de Cl^- varia com a densidade das células de cloreto, que parecem ser responsáveis

pela secreção iônica nas brânquias e no epitélio opercular de peixes marinhos (EVANS, 1993; MARSHALL, 1995).

A atuação das células de cloreto envolve diferentes mecanismos na membrana da célula, entre eles o cotransporte Na^+-K^+-$2Cl^-$, a troca Na^+/H^+, a troca Cl^-/HCO^{-3} e os canais de cloro (WOOD e MARSHALL, 1994; ZADUNAISKI, 1996). A força de direcionamento da secreção de Cl^- é dada por um gradiente eletroquímico estabelecido pela Na^+, K^+-ATPase, localizada na membrana basolateral, no sistema tubular das células de cloreto. Na adição de ouabaína o transporte de íons é inibido rapidamente na região basal, mas não na região apical da membrana lateral (WOOD e MARSHALL, 1994; MARSHALL, 1995; McCORMICK, 1995). Na condição normal de funcionamente o Cl^- é acumulado intracelularmente, de tal forma que a saída de Cl^- ocorre a favor de um gradiente eletroquímico através de canais de Cl^- na membrana apical (MARSHALL, 1995). A secreção de Na^+ ocorre ao longo do seu gradiente eletroquímico por via paracelular (cátion seletiva), que está localizada entre as células de cloreto e células menores adjacentes (acessórias) (HOOTMAN e PHILPOTT, 1980; McCORMICK, 1995). Este modelo de transporte iônico nas células de cloreto é bastante aceito, porém alguns aspectos ainda não foram definitivamente demonstrados (EVANS, 1993).

Em peixes de água doce os mecanismos de captação de cloro e sódio são independentes e acontecem acoplados à regulação ácido-básica, onde Cl^-/HCO^-_3 e Na^+/H^+ estão correlacionados (EVANS, 1993; WOOD e MARSHALL, 1994; PERRY, 1997). Há controvérsias em relação à localização destes mecanismos ligados a regulação ácido-básica e captação iônica, havendo indícios de que ambos ocorrem nas células de cloreto (EVANS, 1993; WOOD e MARSHALL, 1994). Porém, segundo PERRY (1997), em peixes de água doce as células de cloreto são o principal local de influxo de Ca^{+2} e Cl^-, tendo papel integral na regulação ácido-básica através da troca Cl^-/HCO_3 sendo as células pavimentosas as responsáveis pela entrada de sódio através de troca dos H^+/Na^+ apical (PERRY, 1997).

A permeabilidade celular das células de cloreto é modificada de acordo com a salinidade do meio. Na água doce as células de cloreto absorvem pequenas

quantidades de eletrólitos mas, na água do mar, estas células são locais de intensa secreção iônica (PISAM, 1981; HWANG e HIRANO, 1985). Variações na salinidade do meio alteram o tamanho, o número de associações celulares, a área de membrana, o conteúdo de Na^+K^+-ATPase, além da morfologia do ápice das células de cloreto dos teleósteos marinhos (HOSSLER, 1980).

A adaptação da água salgada para a água doce é acompanhada por uma redução do número e tamanho das células de cloreto (MAINA, 1990). Em peixes eurialinos aclimatados a água salgada observa-se uma proliferação de células de cloreto e células acessórias mediada pelo hormônio cortisol (McENROE ,1987).

Na tainha *Mugil cephalus* foi observado que os poros das células de cloreto de peixes que foram transferidos da água salgada para doce aumentam de diâmetro e suas projeções celulares proeminentes passam de um nível abaixo da superfície do epitélio para acima da superfície epitelial (HOSSLER, 1980). No peixe *Fundulus heretoclitus*, o número de ápices das células de cloreto, em microscopia eletrônica de varredura, é menor, mais profundo e aparece em menor número quando o peixe está adaptado à água doce (HOSSLER *et al.*, 1985). Em larvas de "ayu" *(Plecoglossus altivelis)* foi observado um decréscimo do número de células de cloreto quando estas foram aclimatadas à água doce (HWANG, 1990). Segundo BROWN (1992), espécimes de truta (*Salmo trutta*) apresentam aumento do número de células de cloreto quando adaptadas à água doce. No salmão, *Oncorhynchus kisutch* foi observado que não há alteração no número de células de cloreto quando o animal é submetido a diferentes salinidades, porém há um aumento da atividade e densidade da Na^+,K^+-ATPase em espécimes aclimatados à água marinha. Este aumento da atividade da Na^+,K^+-ATPase foi relacionado com um aumento de tiroxina e prolactina plasmática (RICHMAN III *et al.*, 1987).

Existem diferenças na rapidez de respostas bioquímicas e morfológicas das células de cloreto, quando um peixe eurihalino é transferido entre água doce e água salgada. Quando a transferência ocorre da água doce para a água salgada, as modificações bioquímicas e morfológicas são mais rápidas, podendo ser completadas em 24 horas (HOSSLER, 1980). Quando o peixe é transferido da água salgada para a água doce, as alterações morfológicas e mesmo bioquímicas podem

ser bastante lentas e onde mudanças no fluxo iônico podem acontecer anteriormente a mudanças na atividade de Na^+,K^+- ATPase branquiais. Estas alterações do fluxo podem resultar de efeitos hormonais nas junções das células de cloreto adjacentes (EPSTEIN *et al.*, 1980) ou na redução da permeabilidade da membrana apical destas células de cloreto (EPSTEIN *et al.*, 1980; ZADUNAISKI, 1996). Estas alterações imediatas podem promover uma proteção contra a desmineralização (HOSSLER *et al.*, 1985). As alterações morfológicas, neste, caso podem levar de semanas (LORETZ, 1979; HOSSLER, 1980; ZADUNAISKI, 1996) ou mais (SHIRAI e UTIDA, 1970 apud HOSSLER *et al*, 1985) para serem completamente realizadas.

1.5. OS RINS

Os rins dos vertebrados apresentam três regiões estruturais básicas: uma estrutura proximal fechada, na qual entra líquido do corpo produzido por ultra-filtração livre de proteínas; um túbulo com circunvoluções, no qual se modifica a concentração salina e de água do filtrado, e por fim um órgão de armazenamento em seu extremo distal, o qual se abre para a superfície exterior do corpo (PHILLIPS, 1976).

Em teleósteos de água doce a principal função dos rins é excretar a grande quantidade de água que entra no corpo do peixe (HICKMAN e TRUMP, 1969; HIBIYA, 1982). A urina dos peixes de água doce é abundante e com baixa concentração de eletrólitos (HIBIYA, 1982). Em contraste, nos teleósteos marinhos há uma constante tendência à perda de água. Há a necessidade de retenção de água, sendo reduzido o volume de urina produzido (HIBIYA, 1982). A escassa urina excretada por teleósteos marinhos contém vários constituintes: eletrólitos di e tri-valentes tais como Ca^{+2}, Mg^{+2}, SO_4^{-2} e PO_4^{-3}, assim como produtos nitrogenados, tais como creatinina, creatina e óxido de trimetilamina (TMAO) (HIBIYA, 1982).

O rim dos teleósteos ocupa uma posição dorsal retroperitoneal, ao longo da maior parte do comprimento da cavidade do corpo (LIMA *et al.*, 1993). A forma

externa dos rins é, ainda variável de acordo com a espécie. Os rins de teleósteos consistem de rim cefálico ("head kidney") e rim do tronco ("trunk kidney") (HIBIYA, 1982), ou também denominado de região anterior ou cranial e região posterior, mesonefro, opistonefro, ou ainda rim excretor (LIMA *et al.*, 1993). Embriologicamente o rim cefálico deriva dos pronéfrons e o rim do tronco, do mesonefron. Em alguns peixes pode-se distinguir os dois rins, porém esta separação pode não estar presente. A região anterior do rim consiste de tecido linfóide. O rim tronco é composto de inúmeros nefrons e tecido intersticial linfóide (HICKMAN e TRUMP, 1969; HIBIYA, 1982).

O néfron dos teleósteos é dividido em corpúsculo renal e túbulo renal. O corpúsculo renal é composto de glomérulo e cápsula de Bowman e o túbulo renal é formado de segmento do pescoço, segmento convoluto proximal (segmento I e segmento II), segmento intermediário e segmento convoluto distal. O nefron é seguido por um túbulo coletor e ureter que leva a urina até a bexiga (OGAWA, 1962; HICKMAN e TRUMP, 1969; HIBIYA, 1982).

Algumas partes do rim podem estar reduzidas ou ausentes em algumas espécies. Isso ocorre principalmente em peixes marinhos, onde há uma redução do número ou ausência de glomérulos, assim como a ausência do segmento distal (HICKMAN e TRUMP, 1969; HIBIYA, 1982; ROMER e PARSONS, 1985; OGAWA e FUKUCHI, 1988; EVANS, 1993). A redução ou perda do corpúsculo renal tem como conseqüência a retenção de grande volume de água. A excreção de grande quantidade de resíduos através das brânquias compensa o decréscimo da função renal (ROMER e PARSONS, 1985; HILDEBRAND, 1995). A perda de glomérulos em teleósteos marinhos é um mecanismo de conservação de energia, pois ao evitar que íons e moléculas passem para os túbulos renais através do glomérulo, o animal economiza energia que seria utilizada para realizar a reabsorção destes componentes do filtrado (HICKMAN e TRUMP, 1969). Esta estrutura está relacionada com a limitada, porém essencial função dos rins na regulação hiposmótica, excretando magnésio e sulfatos (HICKMAN e TRUMP, 1969). Recentemente tem sido mostrado que os túbulos renais secretam NaCl através de um cotransporte de Na+Cl para dentro do túbulo em elasmobrânquios, assim como

em teleósteos de água doce e marinhos. A reabsorção ocorre ao nível de túbulos coletores ou bexiga urinária (EVANS, 1993).

Os teleósteos que não apresentam glomérulo são chamados aglomerulares e são descritos por muitos autores tanto em ambiente marinho (HICKMAN e TRUMP, 1969; DOBBS *et al.*, 1974; DOBBS e DeVRIES, 1975; DOBBS *et al.*, 1975; HIBIYA, 1982; EASTMAN e DeVRIES 1986; OGURI, 1989) quanto em ambiente de água doce (HICKMAN e TRUMP, 1969). Representam os teleósteos com maior grau de especialização renal, nos quais somente dois segmentos do néfron são capazes de cumprir com eficiência a remoção de magnésio e sulfatos (HICKMAN e TRUMP, 1969). Entre os peixes antárticos estudados, a maioria apresenta a característica de aglomerulismo (DOBBS *et al.*, 1974; DOBBS e DeVRIES, 1975; DOBBS *et al.*, 1975; EASTMAN e DeVRIES, 1986; OGAWA e FUKUCHI, 1988). A ausência de glomérulos nestes peixes tem sido relacionada com a conservação de moléculas glicoprotéicas anti-congelantes (DOBBS *et al.*, 1974; EASTMAN *et al*, 1979; EASTMAN e DeVRIES, 1986; EASTMAN, 1993).

A produção de urina nos peixes aglomerulares não envolve filtração glomerular, mas sim a secreção tubular (HICKMAN e TRUMP, 1969; DOBBS e DeVRIES, 1975; EVANS, 1993). Os túbulos renais de peixes aglomerulares consistem primariamente do segmento proximal II, o qual é secretor de magnésio e sulfatos (HICKMAN e TRUMP, 1969). Os túbulos renais de peixes antárticos secretam magnésio e cálcio contra um gradiente de concentração, prevenindo a excreção renal de significativas concentrações de sódio e potássio (DOBBS e DeVRIES, 1975). Em testes realizados com néfrons aglomerulares isolados, há indicações de que nem todos os néfrons apresentam atividade de secreção. Foi sugerida a presença de cotransporte Na^+-K^+-$2Cl^-$ na membrana basolateral das células epiteliais proximais, causando um acúmulo de cloro dentro da célula, que é posteriormente excretado pela membrana apical devido a uma diferença de potencial eletroquímico, tal como proposto para as células de cloreto branquiais (ZADUNAISKY, 1996). O sódio é secretado por um caminho paracelular devido a um acoplamento elétrico criado através da passagem transcelular de cloro. Propõe-

se que tal mecanismo seja utilizado para dirigir a secreção fluida para dentro do túbulo (BEYENBACH, 1995).

O magnésio é secretado no túbulo contra um potencial eletroquímico, sendo encontrado em maior concentração na luz do túbulo do que na região peritubular. Desta forma, o magnésio do túbulo exerce uma pressão osmótica retirando água do meio peritubular para o lúmen, gerando secreção de fluido (BEYENBACH, 1995). Segundo BABEKER e RANKIN (1979) um aumento da concentração de magnésio na região peritubular causa um aumento na taxa de produção urinária e parece existir uma relação direta entre a secreção de magnésio e a reabsorção de sódio em túbulos renais do peixe aglomerular *Lophius piscatorius.* Outro local de reabsorção não só de sódio como também de cloretos é a bexiga, na qual a composição iônica da urina é modificada antes de ser excretada (BEYENBACH e KIRSCHNER, 1975; MARSHALL, 1995).

O suprimento sangüíneo renal dos peixes aglomerulares antárticos é inteiramente venoso (DOBBS *et al.*, 1975; EVANS, 1993). São encontrados muitos capilares peritubulares e ocasionalmente ocorrem sinusoides contendo eritrócitos entre os túbulos renais (DOBBS *et al* , 1975).

Além do túbulo proximal, ou segmento principal altamente contorcido há túbulos coletores distribuídos por todo o rim, sendo envoltos por tecido linfomielóide ou hematopoiético (DOBBS *et al.*, 1975; OGURI, 1989). O túbulo principal é formado de células epiteliais colunares, com citoplasma eosinofílico e borda em escova na membrana apical, acompanhado de inúmeros capilares peritubulares. Da região basal até a altura do núcleo das células do segmento principal (túbulo proximal) são encontradas invaginações de membrana associadas a mitocôndrias. A região apical destas células contém inúmeras mitocôndrias, pequenas vesículas tubulares e muitos lisossomas (DOBBS *et al.*, 1975).

Após a região do segmento principal ocorrem células intermediárias, onde são encontradas células mucosas e multiciliares. Os túbulos e ductos coletores diferem do segmento principal por apresentarem-se envoltos por tecido muscular liso, sendo contínuos com os dutos mesonéfricos e bexiga urinária. Os túbulos e dutos coletores

apresentam-se levemente corados com eosina e a região apical das células apresenta glicoproteínas neutras e ácidas não sulfatadas (DOBBS *et al.*, 1975).

A urina é drenada dos rins por dois ductos mesonéfricos que saem do órgão na superfície ventral posterior, já fusionados, formando um duto (ureter). Uma dilatação deste duto forma a bexiga urinária, da qual a urina é excretada via papila urinária na região posterior do ânus (DOBBS *et al.*, 1975).

Testes realizados com o peixe-sapo aglomerular *Opsanus tau*, aclimatado a 10% da água do mar indicam que este peixe não têm a capacidade de excretar uma urina diluída e desta forma passa a excretar sódio para garantir a saída da água que está em excesso no organismo. Como resultado há uma diminuição da concentração osmótica do sangue, principalmente relacionada com a redução na concentração de sódio no sangue (BAUSTIAN *et al.*, 1997)

A bexiga é uma estrutura mediana posterior da cavidade abdominal formada por uma expansão da extremidade posterior dos ductos urinários (CHIASSON, 1966; HILDEBRAND, 1995). A bexiga dos peixes tende a ser de tamanho pequeno a moderado porque o ambiente aquático torna desnecessária uma longa retenção de urina (HILDEBAND, 1995). A bexiga urinária de teleósteos é um órgão acessório osmorregulatório dos rins em que a urina é retida por algum tempo, durante o qual a composição iônica é modificada (MARSHALL, 1995). Em peixes de água doce a bexiga reabsorve NaCl com um mínimo de acompanhamento de água por possuir baixa permeabilidade osmótica epitelial. A prolactina diminui a permeabilidade da bexiga e aumenta a taxa de reabsorção de Na^+ pela bexiga (UTIDA *et al.*, 1972 apud MARSHALL, 1995). Desta forma o animal retém o máximo de íons monovalentes e excreta uma urina muito diluída. Na água do mar ocorre um aumento na permeabilidade do epitélio da bexiga e uma tendência à reabsorção de NaCl, concentrando a urina com espécies iônicas não transportadas, particularmente Mg^{2+} e Ca^{2+} (BEYENBACH e KIRSCHNER 1975).

Em *Gillichthys mirabilis*, adaptado a água do mar, a urina é rica em Ca^{+2}, Mg^{+2} e SO_4^{-2} e tem uma osmolalidade maior que a urina de peixes de água doce, demonstrando um papel da bexiga na reabsorção de NaCl e água, enquanto excreta uma urina rica em sais divalentes (LORETZ e BERN, 1980 apud MARSHALL,

1995). No linguado *Pseudopleuronentes americanus* a bexiga urinária apresenta Na^+,K^+-ATPase localizada nas membranas basolaterais do epitélio, as quais garantem o transporte de íons e água através do tecido (RENFRO *et al.*, 1976 apud MARSHALL, 1995). Investigações ultraestruturais de *Gillichthys mirabilis* em diferentes salinidades sugerem uma diferença funcional entre os dois tipos de células que compõem o epitélio da bexiga, as células cúbicas e as colunares. As células colunares apresentam maior atividade e são responsáveis pelo transporte ativo de sódio que ocorre durante a adaptação deste peixe a ambiente hiposmótico. (NAGAHAMA *et al.*, 1975 apud OGAWA e FUKUCHI, 1988). A estrutura morfológica encontrada no epitélio da bexiga urinária de teleósteos antárticos sugere que *Pagothenia borchgrevinki* e *Trematomus bernacchii* podem viver ou penetrar na calota de gelo, estando aptos a regular íons até durante o degelo sazonal (OGAWA e FUKUCHI, 1988), devido a sua provável capacidade de reabsorver íons da urina na bexiga.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Descrição morfológica dos órgãos relacionados com a regulação iônica e análise bioquímica da capacidade de adaptação de *Notothenia neglecta* a decréscimo de salinidade, por períodos curtos ou prolongados, fenômeno característico do ambiente em que vive.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

a. Descrever e comparar morfológicamente os órgãos relacionados com a regulação iônica, (brânquias e rins) em salinidade ambiental (34-35 $^{o}/_{oo}$), considerada controle, e quando *N. neglecta* foi submetida à salinidade de $17^{o}/_{oo}$.

b. Determinar e analisar comparativamente a concentração de sódio, cloreto e magnésio no soro e na urina de *N. neglecta* em salinidade ambiental (34-35 $^{o}/_{oo}$), considerada controle, e quando submetida à salinidade de $17^{o}/_{oo}$.

c. Determinar a atividade da enzima Na^{+},K^{+}-ATPase em brânquias e rins de peixes controle ($34\text{-}35^{o}/_{oo}$) e submetidos à salinidade de $17^{o}/_{oo}$.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. LOCAL DE ESTUDO

O continente Antártico compreende uma área de 14 milhões de km^2 de terra, com cerca de 95% da área coberta por gelo, representando 90% de toda a água doce do planeta (Figura 1). Durante o período de inverno ocorre um aumento da camada de gelo que amplia a área do continente para 20 milhões de km^2 (Figura 3A)(EASTMAN, 1993).

A Ilha Rei George é a principal ilha do arquipélago das Shetlands do Sul, separado da Península Antártica pelo Estreito de Bransfield. A Ilha tem uma superfície de 1338 km , dos quais apenas 25 km^2 estão livres de gelo (CAPOZOLI, 1991; RAKUSA-SUSZCZEWSKI, 1993). A Baía do Almirantado, a maior baia da Ilha Rei George, é um vale pós-glacial com profundidade máxima de 530-540 m que se abre para o Estreito de Bransfield no lado sul da Ilha Rei George (Figura 2) (SKORA e NEYELOV, 1992). Nessa baía são encontradas regiões altamente influenciadas por glaciares que, com a intensificação do degelo no verão, formam ou aumentam pequenas enseadas (SICINSKI, *et al.*, 1996). Na sua extremidade nordeste, a Baía do Almirantado se bifurca, formando as enseadas Mackellar e Martel (Figura 3B e 4A).

3.2. LOCAL DE TRABALHO

A Estação Antártica Comandante Ferraz, localizada na Enseada Martel (Figura 4B), possui instalações climatizadas com condições de alojamento para 42 pessoas. As instalações disponíveis para a pesquisa biológica são: 1) um módulo de triagem com sistema de captação de água do mar, temperatura ambiente, contendo 4 tanques de 1000 litros e 4 tanques de 500 litros; 2) dois módulos de aquário contendo

sistema de captação de água do mar e temperatura controlável, o primeiro módulo contendo 3 tanques de 500 litros e bancadas para aquários e o segundo 3 tanques de 1000 litros e 2 tanques de 500 litros além de bancada para aquários; 3) três módulos de laboratório com temperatura entre 20 e 25°C, contendo bancadas, pias, geladeira, freezer, destilador e capela de exaustão de gases (Figura 7D).

Botes infláveis e uma lancha Oceanográfica ("Skua") estão disponíveis para coletas de organismos marinhos na região da Baía do Almirantado (Figura 6). Todo o trabalho de coleta e manutenção das instalações é apoiado por uma equipe (Grupo Base), constituído por 10 membros da Marinha Brasileira.

3.3. ESPÉCIE UTILIZADA: *Notothenia neglecta*

Notothenia neglecta Nybelin, 1951 e *Notothenia coriiceps* Richardson, 1844 são consideradas, por alguns autores, como sendo a mesma espécie (DeWITT, *et al* 1990; KOCK, 1992; ZADRÓZNY, 1996). Outros, contudo, acreditam que estas duas espécies são diferentes (FISCHER e HUREAU, 1985; SKORA e NEYELOV, 1992). As nomenclaturas *Notothenia (Notothenia) coriiceps neglecta* e *Notothenia (Notothenia) coriiceps coriiceps* foram adotadas por EVERSON (1984). Neste trabalho será adotada a nomenclatura *Notothenia neglecta* Nybelin, 1951 e as características para identificação foram baseadas nas descrições de FISHER e HUREAU (1985). As características morfológicas externas observadas foram: corpo largo, cabeça grande e levemente deprimida, coloração marrom escura possuindo manchas marrom claras, pretas ou esverdeadas, abdômen amarelo claro (Figura 5). Foram feitas medidas de distância no corpo, o número de raios das nadadeiras foi contado, a localização e o número de poros foi observada, assim como a posição da boca em relação aos olhos, a coloração e o número e posição das linhas laterais.

3.4. COLETA DE *Notothenia neglecta*

Os espécimes de *N. neglecta* utilizados neste trabalho foram coletados nos meses de Janeiro e Fevereiro de 1995, Dezembro de 1996 e Janeiro de 1997 e entre outubro de 1997 e Fevereiro de 1998 as coletas foram realizadas em profundidades de 10 a 100 metros, em diferentes pontos da Baía do Almirantado (figura 2 A).

Os métodos de coleta utilizados foram: 1) rede de espera tipo feiticeira e 2) linha e anzol (Figura 6A). Foram realizados inúmeros lançamentos de rede de espera em profundidades de 50 a 100 m em diferentes pontos da Enseada Martel (ponto 2 na Figura 2B). Nestas coletas o período entre o lançamento e o recolhimento da rede foi de 12 a 24 horas. As coletas com linha e anzol foram realizadas em profundidades de 10 a 30 metros em frente a Punta Plaza e em frente ao glaciar Ecology (pontos 1 e 3, na Figura 2B). Nestas coletas foram utilizados pedaços de carne bovina como isca. Os peixes coletados foram transportados em tanques com água para a Estação Antártica Comandante Ferraz, onde foram estocados no módulo de triagem em tanques de 1000 litros com água corrente, aeração constante e temperatura de 0 a 4°C (temperatura ambiente).

3.5. ACLIMATAÇÃO DE *Notothenia neglecta* ÀS CONDIÇÕES LABORATORIAIS

Dentre os peixes coletados foram separados espécimes adultos de comprimento padrão de 30 a 50 cm, sem distinção sexual entre eles. No total foram utilizados 82 peixes para os testes. Estes peixes foram aclimatados em tanques de 500 litros no módulo de aquário, a temperatura constante do ar de 0°C e da água de 0 a 1°C. A aeração e o fotoperíodo de 20 horas luz e 4 horas escuro foram mantidos constantes. Os parâmetros abióticos de pH e salinidade foram monitorados com a finalidade de mantê-los semelhantes aos ambientais. A água dos tanques foi

renovada diariamente através de um sistema de captação de água direto do mar. Estes peixes foram alimentados diariamente com Krill ou pedaços de peixe presos a uma haste de metal. Este último procedimento garantiu a alimentação de todos os indivíduos e impediu que o eventual excesso de alimento permanecesse no fundo, sujando a água do tanque. Estes peixes permaneceram, em média, 5 dias em aclimatação antes do início dos testes.

3.6. ARRANJO EXPERIMENTAL: DECRÉSCIMO DE SALINIDADE

Os experimentos foram montados no módulo aquário em temperatura de 0°C e fotoperíodo de 20 horas luz e 4 horas escuro. Os testes de decréscimo de salinidade foram realizados em diferentes etapas. Inicialmente foram realizados testes com quatro diferentes valores de salinidade, utilizados como pilotos para a observação da mortandade. Os valores testados foram: salinidade ambiental de 35 $^{o}/_{oo}$ e salinidades experimentais de 30 $^{o}/_{oo}$, 17 $^{o}/_{oo}$ e 10 $^{o}/_{oo}$ em períodos de exposição de 10, 20 e 30 dias. Nestes testes buscou-se observar a sobrevivência e aceitação de alimentos por parte dos peixes expostos ao decréscimo de salinidade. Em seguida foram realizados testes em salinidade de 17$^{o}/_{oo}$ para coleta de amostras de sangue, tecidos e urina para as diferentes análises. Foram testados 6 tempos de exposição ao decréscimo de salinidade, sempre acompanhados do respectivo grupo controle. Os experimentos foram divididos em: curto prazo (1, 3 e 6 horas) e longo prazo (10, 20 e 30 dias). O número de indivíduos, assim como as coletas realizadas estão descritos na Tabela 1.

3.7. TESTES DE DECRÉSCIMO DE SALINIDADE DE LONGO PRAZO

Os testes de longa duração (10, 20 e 30 dias) foram realizados em tanques de 500 litros, cada um contendo de 4 a 6 indivíduos da espécie *N. neglecta*. Acima dos tanques foram montados dois recipientes de 150 litros para armazenamento de água, onde, inicialmente, foi armazenada água de degelo (0$^{o}/_{oo}$) para possibilitar a

diluição gradual da água do mar do tanque de 500 litros. Realizou-se a diluição da água do mar permitindo-se a entrada de água de degelo diretamente nos tanques onde se encontravam os peixes. O fluxo foi mantido lento e constante até que a salinidade desejada fosse alcançada, após 4 ou 5 horas. Posteriormente o tanque de 150 litros foi utilizado para armazenar água do mar já diluída a 17‰ para a reposição diária de parte da água dos tanques experimentais. No tanque controle a reposição foi obtida por fluxo de água diretamente do mar. A renovação da água no tanque controle durou o mesmo tempo e com fluxo similar à do tanque experimental (Figura 7A). A alimentação dos peixes, tanto controle quanto experimentais, foi realizada diariamente, sendo oferecidos krill vivo ou pedaços de peixe presos à ponta de uma haste de metal. O número de indivíduos utilizados nos experimentos de longo prazo, assim como as variáveis analisadas são apresentados na Tabela 1.

3.8. TESTES DE DECRÉSCIMO DE SALINIDADE DE CURTO PRAZO

Os testes de curta duração foram realizados em arranjo diferente dos testes de longa duração devido ao longo período decorrido entre o início e o final do decréscimo da salinidade, o qual poderia influenciar nos resultados obtidos. Para os testes de curta duração foram utilizados tanques de 150 litros (Figura 7C). Cada animal foi transferido diretamente para o tanque com salinidade experimental ou controle, não havendo decréscimo gradual da salinidade da água do mar. A salinidade desejada (experimental : 17‰) foi obtida previamente por diluição da água do mar com água de degelo. O número de animais utilizados em experimentos a curto prazo e as variáveis analisadas podem ser vistas na Tabela 1.

TABELA 1

Número de peixes e Tipo de Análises Realizadas em Animais Controle e Experimentais Submetidos a Salinidade $17^{o}/_{oo}$

ANÁLISE	CONTROLE			EXPERIMENTAL $17^{o}/_{oo}$			
	curto prazo (1, 3 e 6 horas)	10 dias	30 dias	curto prazo (1, 3 e 6 horas)	10 dias	20 dias	30 dias
M.O.	2P e 2V	2P e 2V	3P	2P e 2V	2P e 2V	2P	4P
M.E.V.	-	2V	-	-	-	-	-
M.E.T.	-	2V	-	-	-	-	-
D.I.S.	2P e 12V	6V	3P	2P e 16V	2P e 12V	-	4P
D.I.U.	12V	4V	-	16V	11V	-	-
E.E.	6V	6V	-	10V	5V	-	-

M.O.: Microscopia Óptica, M.E V.: Microscopia Eletrônica de Varredura; M.E.T. Microscopia Eletrônica de Transmissão; D.I.S.: Dosagem Iônica do Soro; D.I.U.: Dosagem Iônica da Urina e E.E.: Ensaio Enzimático da Na^{+},K^{+}-ATPase; **P** (primavera): teste realizado entre os meses de Outubro e Novembro e **V** (verão): teste realizado entre os meses Dezembro, Janeiro e Fevereiro.

3.9. COLETA DE AMOSTRA DE SANGUE

Após os períodos determinados para cada teste foi realizada a coleta de 2 a 3 mL de sangue por punção da veia caudal com o auxílio de Vacun Tainer® sem anticoagulante (Figura 8A). A amostra de sangue foi centrifugada durante 30 minutos a 2500 rpm, para obtenção do soro. O soro foi então transferido para um tubo Eppendorf (1,5mL), identificado e armazenado a -20° C até o momento da realização das dosagens iônicas.

3.10. DISSECÇÃO DAS BRÂNQUIAS

Posteriormente à coleta de sangue, o animal foi sacrificado por secção medular e suas brânquias dissecadas. As brânquias estão localizadas na cavidade opercular, protegidas pelo opérculo. A região dos opérculos foi rebatida, as brânquias foram expostas e lavadas com a solução salina de Cortland (HUGHES, comunicação pessoal) e o segundo arco branquial de ambos os lados da cavidade foram retirados. Este material foi lavado novamente com solução salina de Cortland em placa de Petri.

3.11. COLETA DE AMOSTRA DE URINA DA BEXIGA

Após a retirada das brânquias, um corte longitudinal foi realizado ventralmente ao longo da cavidade abdominal no sentido antero-posterior, a partir da região do opérculo e terminando na região anal. Retirou-se primeiramente todos os órgãos viscerais, incluindo estômago, intestino e gônadas para a exposição da bexiga urinária. Após sua exposição, a urina foi coletada inserindo-se uma seringa de 3mL diretamente no órgão. O máximo de volume de urina foi retirado, sendo que o volume coletado variou de 10μL a 2mL. O volume total coletado foi transferido para tubos tipo Eppendorf (1,5mL), identificados e mantidos a -20°C até o momento da realização das dosagens iônicas.

3.12. DISSECÇÃO DOS RINS

Os rins localizam-se na região dorsal da cavidade abdominal longitudinalmente próximos à coluna vertebral. A cavidade foi lavada com solução salina de Cortland. A região posterior ou rim excretor, foi facilmente delimitada devido à sua largura reduzida em relação à região anterior ou rim cranial. A região

posterior do rim foi desprendida da parede da cavidade com o auxílio de uma tesoura (Figura 8B). Este tecido foi colocado em placa de Petri com solução salina de Cortland e foi dividido em pequenos fragmentos.

3.13. COLETA DE TECIDO BRANQUIAL E RENAL PARA ANÁLISE EM MICROSCOPIA ÓPTICA

Após a dissecção foram separados o segundo arco branquial direito e alguns fragmentos da região posterior dos rins. O arco branquial foi lavado ainda com solução salina de Cortland para retirada do excesso de sangue e muco. Foi então dividido em três regiões, sendo separada a região central para a análise morfológica. As amostras foram fixadas em líquido de Bouin (BÜCHERL, 1962; CULLING *et al.*, 1985) durante 8 horas em temperatura ambiente (20-25°C) , sendo então transferidas para álcool 70%, no qual foram transportadas para o Laboratório de Impacto Ambiental da Universidade Federal do Paraná.

3.14. COLETA DE TECIDO BRANQUIAL E RENAL PARA ANÁLISE EM MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

Para as análises em MEV, o segundo arco branquial esquerdo e fragmentos de rim de indivíduos controle (água do mar) foram fixados e mantidos em Solução de Karnowsky modificado (KARNOWSKY, 1965) à temperatura de 0 a 3°C (temperatura ambiente). A modificação realizada foi a substituição de tampão cacodilato 0,1 M para 0,2 M. As amostras foram transportadas no fixador para o Centro de Microscopia Eletrônica da Escola Paulista de Medicina onde foram processadas.

3.15. COLETA DE TECIDO BRANQUIAL E RENAL PARA ANÁLISE EM MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET)

Para MET as brânquias e rins de indivíduos controle foram cortados em pequenos fragmentos, que foram fixados em Solução de Karnowsky modificado durante 4 horas em temperatura ambiente (0 a 3°C). A modificação realizada foi a substituição de tampão cacodilato 0,1 M para 0,2M. Após a fixação as peças foram transferidos para tampão cacodilato 0,2M pH 7,2, onde foram mantidas até o momento da inclusão, no Laboratório de Biologia da Estação Antártica Comandante Ferraz.

3.16. COLETA DE TECIDO BRANQUIAL E RENAL PARA ENSAIO DA ATIVIDADE DA Na^+,K^+-ATPase

As coletas de material para os ensaios enzimáticos foram realizadas seguindo os mesmos procedimentos de dissecção acima descritos. Porém, a solução salina de Cortland foi substituída por tampão Imidazol 10 mM, pH 7,5, isto porque a solução salina possui íons que poderiam influenciar as reações subsequentes. Para a coleta das brânquias o procedimento foi: retirada do segundo arco branquial de ambos os lados da cavidade opercular e sua posterior lavagem em tampão Imidazol em placa de Petri. A região dos rastros foi retirada, liberando as lamelas primárias. Estas lamelas foram então transferidas para um homogenizador manual de adaptação frouxa ("loose-fitting") tipo Potter Elvehjem vidro-vidro mantido no gelo durante o processo de homogenização. Os rins foram também lavados em tampão Imidazol em placa de Petri, foram cortados em pequenos fragmentos e transferidos para um homogenizador mantido no gelo. O material homogenizado foi filtrado em gaze e passado em seringa de insulina para a retirada de material fibroso e particulado grosseiro, sendo então transferido para tubo tipo Eppendorf (1,5 mL) e mantido a -20°C até o momento da análise da atividade da enzima Na^+,K^+-ATPase e da

dosagem de proteínas totais, ambas realizadas no laboratório de biologia da Estação Antártica Comandante Ferraz.

3.17. PROCESSAMENTO DOS TECIDOS BRANQUIAL E RENAL PARA ANÁLISE EM MICROSCOPIA ÓPTICA

No laboratório de Impacto Ambiental da Universidade Federal do Paraná foram realizadas de 3 a 5 lavagens das amostras em álcool 70%, antes de ser iniciado o processo de inclusão do material, para assegurar a retirada do excesso de fixador. As brânquias foram preparadas para a inclusão com a retirada da região dos rastros branquiais, os quais foram descartados, e com a separação dos filamentos inferiores dos superiores. As lamelas primárias centrais do arco foram separadas em grupos de 3 ou 4 lamelas, sendo em seguida desidratadas em uma série alcoólica de etanol de concentrações crescentes. Foram diafanizadas em três banhos de xilol, deixadas em Paraplast Plus ® por duas horas em estufa a 58°C para a infiltração e por fim incluídas em Paraplast Plus ® , sendo retiradas da estufa para a solidificação dos blocos.

Foram realizados cortes de 3 μm de espessura em micrótomo Leitz. Estes cortes foram aderidos a lâminas de vidro com o auxílio de albumina de Meyer (CULLING *et al.*, 1985) e distendidos em placa aquecedora. As lâminas foram tratadas com diferentes substâncias corantes. Com a finalidade de observar primeiramente a morfologia geral dos órgãos, utilizou-se Hematoxilina de Delafield e Eosina (modificado a partir de CULLING *et al.*, 1985), Para evidenciar alguns aspectos particulares nos tecidos destes órgãos utilizou-se tratamento com Novelli (BEÇAK e VANRELL, 1970), que evidencia as mitocôndrias possibilitando a identificação das células de cloreto nas brânquias e túbulos principais nos rins. O tratamento com P.A.S. Ácido Periódico de Schiff (modificado a partir de CLARK, 1981), juntamente com Alcian Blue pH 2,5 (CLARK, 1981), contrastado com orange G (CULLING *et al.*, 1985) foi usado para evidenciar secreções mucosas e

(glicoproteínas) neutras positivas para PAS e ácidas positivas para Alcian Blue pH 2,5. Após a coloração os cortes foram desidratados em álcool 95 e 100%, diafanizados em xilol e as lâminas montadas em resina Polymont ® e lamínula. Estes cortes foram analisados e fotografados em Fotomicroscópio Olympus® PM 10AD no Laboratório de Impacto Ambiental da Universidade Federal do Paraná.

As células de cloreto vistas em Microscopia Óptica nos indivíduos controle e experimentais foram contadas segundo o seguinte procedimento: foi realizada a padronização da área a ser analisada desprezando-se as 20 primeiras lamelas secundárias a partir da base da lamela primaria e contando-se o número de células de cloreto presentes nos 15 espaços interlamelares seguintes. As primeiras lamelas foram desprezadas por apresentarem artefatos criados pela presença de tecido cartilaginoso

3.18. PROCESSAMENTO DE TECIDO BRANQUIAL E RENAL PARA ANÁLISE EM MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

Para análise através de MEV as amostras de tecido renal foram previamente congeladas em nitrogênio líquido, realizando-se a quebra do material tornando os túbulos renais expostos, possibilitando sua visualização sob diferentes ângulos. O tecido branquial foi retirado do fixador e as amostras foram lavadas em tampão cacodilato 0,2 M pH 7,2 para a retirada do excesso de fixador e em seguida foram tratadas, em sequência, por tetróxido de ósmio 2%, ácido tânico 2% e tetróxido de ósmio 2% para melhorar a condutividade dos eletróns através dos tecidos. Logo em seguida, as amostras foram lavadas em água destilada e desidratadas em série crescente de etanol, sendo completada a desidratação com CO_2 líquido através do método de Ponto Crítico alcançado em aparelho Balzers ® CPD 030 Posteriormente as amostras foram coladas em suporte adequado com cola de carbono e submetidas ao processo de metalização em aparelho Balzers ® SCD 050.

As amostras foram analisadas e micrografadas no microscópio eletrônico de varredura marca JEOL modelo JSM 53000 do Centro de Microscopia Eletrônica da Escola Paulista de Medicina.

3.19. PROCESSAMENTO DE TECIDO BRANQUIAL E RENAL PARA ANÁLISE EM MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET)

Para análise através de MET foram realizadas três lavagens do material em tampão cacodilato para garantir a retirada do excesso de fixador. Em seguida, as amostras foram pós-fixadas durante duas horas em solução de ósmio 2% em tampão cacodilato 0,2 M, pH 7,2, contrastadas em solução aquosa de uranila 2% durante 6 horas, desidratadas através de banhos em uma série de concentrações crescentes de acetona, pré-incluídas em acetona P.A. e resina Epon 812 em proporção 1:1 "overnight", à temperatura ambiente (20-25° C) e finalmente incluídas em Epon 812, conforme LUFT (1961). A polimerização da resina ocorreu em estufa a 60°C durante 72 horas.

As peças foram cortadas em ultramicrótomo, os cortes foram montados em tela de níquel, contrastados em solução de Reynolds (REYNOLDS, 1963) e solução de uranila. Os cortes foram analisados e fotografados em Microscópio Eletrônico JEOL, JEM 1200 EXII do Centro de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal do Paraná.

3.20. DOSAGEM DO ÍON CLORETO NO SORO E NA URINA

A dosagem de cloretos foi realizada através de método colorimétrico Labtest®, cujo princípio está baseado na reação dos íons cloreto com tiocianato de mercúrio, formando cloreto de mercúrio e íons tiocianato, os quais reagem com os íons férricos, produzindo solução de cor amarelada proporcional à concentração de

cloreto na amostra. Foi utilizado padrão com concentração 100 mM. Quando necessário, as amostras foram diluídas com água deionizada antes da realização das reações de dosagem. A concentração de cloreto nas amostras foi proporcional à absorbância determinada em comprimento de onda 470 nm em espectrofotômetro Metrolab M 330.

3.21. DOSAGEM DO ÍON SÓDIO NO SORO E NA URINA

As dosagens de sódio foram realizadas através de teste colorimétrico Doles® modificado de MARENZI (1942). O princípio têm como base a reação do íon sódio com uma solução de uranila, magnésio e zinco levando à formação de um complexo insolúvel de acetatos de sódio, uranila, magnésio e zinco, que se precipita. Os íons uranila, presentes no sobrenadante, formam um complexo alaranjado ao reagirem com tioglicolato de amônio. A diferença de absorbância entre amostras com e sem o íon sódio é proporcional à concentração de sódio. Foi utilizado padrão com concentração de 140 mM. A absorbância das amostras da reação foi determinada em comprimento de onda 410 nm em espectrofotômetro Metrolab M 330.

3.22. DOSAGEM DO ÍON MAGNÉSIO NO SORO E NA URINA

A dosagem da concentração de Magnésio foi realizada segundo método Labtest®, cujo princípio esta baseado na reação de íons magnésio com o magon sulfonado em meio alcalino, formando um complexo de cor rósea que é proporcional à quantidade dos íons magnésio na amostra. Foi utilizado padrão com concentração de magnésio 0,823 mM, sendo as amostras de soro dosadas sem diluição e as de urina com diluições diferenciadas de até 1:100, dependendo da amostra. A absorbância das amostras foi determinada em comprimento de onda 505 nm em espectrofotômetro Metrolab M 330.

3.23. DOSAGEM DE PROTEÍNAS TOTAIS EM HOMOGENIZADOS DOS TECIDOS BRANQUIAL E RENAL

Foi realizada dosagem de proteínas totais dos homogenizados de tecido utilizados para análise de atividade da Na^+,K^+-ATPase. As dosagens foram realizadas através de método colorimétrico (Biureto) da Labtest®. O princípio da metodologia é a reação das proteínas com biureto, desenvolvendo coloração roxa proporcional à concentração de proteínas na amostra. Foi utilizado padrão de proteína com concentração 40 mg/ml. A determinação da concentração foi realizada em espectofotômetro Metrolab M 330 em comprimento de onda 545 nm.

3.24. ENSÁIO DA ATIVIDADE DA Na^+,K^+-ATPase EM HOMOGENIZADOS DOS TECIDOS BRANQUIAL E RENAL

O ensaio da atividade da Na^+,K^+-ATPase (FREIRE *et al.*, 1995) foi realizado em amostras pré-incubadas com o detergente deoxicolato de sódio (0,1 mM por 20 minutos em gelo). Utilizou-se o detergente para quebrar fragmentos de membrana que tivessem formado vesículas, permitindo que o substrato Tris-ATP (3 mM) pudesse se ligar a todos os sítios de ATP, também em eventuais vesículas formadas com o lado citoplasmático para o interior ("Right-side-out"). A atividade enzimática foi detectada através do fosfato inorgânico liberado durante a reação da enzima sobre o substrato, em temperatura de 0°C durante 30 minutos. A concentração de fosfato liberado foi revelada através de reagente contendo ácido ascórbico 20%, molibdato de amônio 0,84% em H_2SO_4 2 N, utilizando-se como padrão uma solução de fosfato de sódio dibásico (NaH_2PO_4) 10 mM. A determinação da absorbância, proporcional à concentração de fosfato inorgânico, foi realizada em espectofotômetro Metrolab M 330, com comprimento de onda 830 nm (FISKE e SUBBAROW, 1925 apud FREIRE *et al.*, 1995),. A atividade da enzima Na^+K^+-

ATPase foi identificada através da porção sensível a ouabaína (2 mM ouabaína) da atividade ATPásica total: a atividade específica (Na^+K^+-ATPase) foi encontrada subtraindo-se o valor da atividade das amostras incubadas com 2 mM de ouabaína da atividade total (amostra sem ouabaína) e dividindo-se este valor pela concentração de proteínas totais da mesma amostra (μmol fosfato inorgânico.mg proteína^{-1}.h^{-1}).

3.25. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados com o auxílio de Teste T de Student, não pareado, pelo programa Sigma Plot, Jandel Corporation, sendo admitido significância quando $P \leq 0,05$.

4. RESULTADOS

Foi observada 100% de sobrevivência dos exemplares de *Notothenia neglecta* submetidos aos testes preliminares de decréscimo de salinidade realizados em salinidade $10^{o}/_{oo}$, $17^{o}/_{oo}$ e $30^{o}/_{oo}$ durante 30 dias. Os peixes mantiveram-se aparentemente saudáveis, com aceitação diária de alimento durante todo o período dos testes.

4.1. MORFOLOGIA E ULTRAESTRUTURA DAS BRÂNQUIAS

4.1.1. Descrição das Brânquias dos Animais Controle

A morfologia das brânquias de *Notothenia neglecta* apresenta padrão comum ao já descrito para outros teleósteos. Na região opercular de cada arco encontram-se as holobrânquias, compostas de duas fileiras de filamentos branquiais, uma anterior e outra posterior. Cada um dos filamentos branquiais apresenta duas fileiras de lamelas secundárias, também chamadas lamelas respiratórias, estruturas achatadas inseridas nas regiões superior e inferior do filamento (Figuras 9A e 9B).

O epitélio filamentar interlamelar apresenta-se como um epitélio estratificado composto de diferentes tipos celulares: 1) células epiteliais pavimentosas evidenciadas em Hematoxilina e Eosina (HE); 2) células de muco evidenciadas através coloração HE, Ácido Periódico e Reativo de Shiff (PAS) e Alcian Blue pH 2,5; 3) células de cloreto que podem ser observadas em HE coradas por eosina, devido à sua acidofilia e em Novelli, corado por fucsina ácida, evidenciando a alta concentração de mitocôndrias e 4) células com grânulos em bastonetes, evidenciados em Azul de Toluidina.

As células da superfície do epitélio são bastante irregulares, com formato variando de globosas a cúbico-pavimentosas, devido a pressão excercida pelas

células de muco (Figuras 10B e 14B). A superfície das células epiteliais do filamento branquial apresentam microssaliências quando observadas em microscopia eletrônica de varredura. Algumas destas microssaliências correm paralelamente aos limites celulares, individualizando, externamente cada uma das células (Figuras 12A e 12B). Na face externa do filamento são observadas ainda numerosas células de muco (Figura 11A). As células de muco também podem ser visualizadas em microscopia óptica tratadas com PAS (coloração rosa, identificando produção de substâncias mucosas neutras) e Alcian Blue pH 2,5 (coloração azul, identificando produção de substâncias mucosas ácidas) quando adquirem coloração intermediária entre rosa e azul. Localizam-se nas regiões interlamelares e nas laterais dos filamentos mostradas em corte oblíquo ao filamento (Figuras 11B, 14B e 14C). As células de cloreto foram observadas principalmente no epitélio interlamelar, situado entre duas lamelas secundárias, não sendo evidenciadas aberturas de células de cloreto no filamento nas regiões das artérias aferentes e eferentes tanto em microscopia eletrônica de varredura quanto em microscopia óptica (Figura 16). As células com grânulos em bastonetes foram evidenciadas em pequeno número na lamela primária em cortes corados com Hematoxilina e Eosina (Figura 14B).

N. neglecta apresenta lamela secundária caracterizada por um espaço sanguíneo sustentado por células pilares e recoberto por epitélio pavimentoso que encontra-se em contato com o meio externo (Figura 10A e 10C). Internamente oposta ao epitélio e em contato com as células pilares observa-se uma espessa membrana basal (Figura 15A).

No epitélio da lamela secundária, em corte semifino, pôde-se evidenciar claramente uma camada celular epitelial única (Figura 15C). Estas células apresentam microssaliências menos evidentes que as encontradas na superfície da lamela primária (Figura 13 e 19B). As células pilares apresentam prolongamentos citoplasmáticos ("flanges") que se unem aos prolongamentos citoplasmáticos de células pilares adjacentes (Figura 10C). Em cortes transversais dos filamentos evidenciou-se a disposição das células pilares em fileiras e as células sanguíneas circulando no espaço sangüíneo delimitado por este arranjo (Figura 10D). Em

lâminas tratadas com PAS e Alcian Blue pH 2,5 foram observadas as colunas ou prolongamentos da membrana basal, positivas ao PAS, compostos principalmente de colágeno e que atravessam de um lado a outro do espaço sanguíneo, dentro de dobras da membrana plasmática do corpo das células pilares, garantindo o suporte físico destas células para a delimitação do espaço sanguíneo (Figura 15B).

N. neglecta apresenta alta concentração de células de muco nas lamelas secundárias (Figuras 11B e 15). As células de cloreto também foram encontradas nas lamelas secundárias, porém estas representam um pequeno número (Figuras 17 e 19). Outro tipo celular encontrado nas lamelas secundárias de *N. neglecta* foram as células com grânulos em bastonetes ("rodlet cells") evidenciadas em corte semifino corados com Azul de Toluidina (Figura 15C).

As células de muco foram encontradas amplamente distribuídas em toda a extensão das lamelas primárias, secundárias e região interlamelar. Estas células extravasam seus conteúdos na superfície do epitélio (Figuras 11, 12, 14 e 15). Através de colorações específicas observou-se que uma mesma célula de muco de *N. neglecta* produz secreções mucosas neutras com reação positiva para PAS (coloração rosa) e secreções mucosas ácidas com reação positiva para Alcian Blue pH 2,5 (coloração azul) (Figuras 11B, 14C, 15A e 15B).

N. neglecta apresenta células de cloreto principalmente distribuídas na região interlamelar do filamento branquial ou lamela primária. Podem ser encontradas em menor concentração nas lamelas secundárias (Figuras 16C, 17 e 19).

Na região interlamelar as células de cloreto podem estar localizadas na intersecção entre a lamela primária e secundária ou no epitélio interlamelar, apresentando diferenças morfológicas conforme sua localização (Figura 17A). Quando presentes na região de interseção, as células de cloreto apresentam-se alongadas e piriformes. A região basal encontra-se em íntimo contato com o início do espaço sanguíneo da lamela secundária e a região apical abre-se entre as células na superfície do epitélio, na região da inserção das lamelas secundárias (Figura 17). Quando presentes no epitélio interlamelar, as células de cloreto são bastante alongadas, se estendendo da base do epitélio interlamelar até a superfície do epitélio. Estas células não têm contato com o espaço sanguíneo lamelar (Figura 17).

Quando presentes nas lamelas secundárias, as células de cloreto apresentam grande proximidade com as células pilares e com o espaço sanguíneo. São células curtas e alargadas, que se abrem para o meio externo entre as células epiteliais pavimentosas da lamela secundária (Figuras 17A e 19).

As células de cloreto apresentam padrão típico em relação a distribuição das mitocôndrias, críptas e localização nuclear. As mitocôndrias distribuem-se intensamente por toda a célula de cloreto, estando ausentes somente na região bem próxima ao ápice da célula. A região apical sem mitocôndria é facilmente evidenciada em coloração Novelli, apresentando reação negativa para fucsina ácida, em contraste com o restante do citoplasma da célula de cloreto (Figuras 17 e 19). A região apical representa a região da crípta da célula de cloreto, sendo caracterizada por ser bastante profunda e apresentar inúmeras projeções ou microvilosidades. O núcleo das células de cloreto localiza-se na região basal (Figuras 17B, 17C e 18).

Em qualquer de suas localizações nas lamelas primárias, as células de cloreto podem ser encontradas isoladas ou em complexos multicelulares. Neste último caso as regiões apicais das células que compõem o complexo encontram-se justapostas, formando uma cripta apical (Figuras 17A e 17B). Nestes complexos, geralmente identificados em grupos de três células de cloreto, no plano de corte. Não foram identificadas características diferenciadas entre as células, a nível de microscopia óptica. Estes complexos podem envolver células piriformes e células alongadas, porém não foram observados entre as células de cloreto das lamelas secundárias. A ultraestrutura das células de cloreto é bastante caracterítica, contendo inúmeras mitocôndrias e uma extensa rede de túbulos citoplasmáticos (Figura 18).

4.1.2. Alterações na Morfologia das Brânquias de Espécimes Expostos a Salinidade 17 $^{o}/_{oo}$

O epitélio do filamento branquial de *N. neglecta* não apresentou alterações quando os peixes foram submetidos a decréscimo da salinidade ($17^{o}/_{oo}$, até 30 dias). O epitélio da lamela secundária ou lamela respiratória, assim como o espaço sanguíneo também não apresentaram alterações. As células de muco apresentaram

distribuição normal em todos os períodos de testes. As alterações encontradas nas brânquias de *N. neglecta* expostos a salinidade 17‰ por até 30 dias foram observados apenas para células de cloreto. Em espécimes expostos a salinidade 17‰ em períodos de curto prazo (1 a 6 horas) e longo prazo (10 dias) não foram observadas alterações no padrão de distribuição destas células. Após 20 dias em água com salinidade 17‰ observou-se alteração na forma das células de cloreto, assim como no número de células com abertura para o meio externo, sem contudo haver alteração no número de células de cloreto por região interlamelar. Em coloração Novelli pôde-se observar uma concentração das mitocôndrias em regiões mais profundas do epitélio, quando comparados com os animais controles, não sendo evidenciado seu contato com a superfície do epitélio (Figura 20A). Em espécimes submetidos a salinidade 17‰ durante 30 dias houve uma significativa diminuição da população das células de cloreto, não ocorrendo evidência de complexos celulares (20B e 21).

4.2. MORFOLOGIA E ULTRAESTRUTURA DOS RINS

Não foram observados glomérulos nos rins de todos os espécimes de *N. neglecta* estudados. *N. neglecta* apresenta néfrons contendo características de túbulo contorcido proximal identificado como epitélio principal e um segmento de túbulo intermediário que o liga ao túbulo coletor. São encontrados também vasos sinusóides e inúmeros capilares entre os túbulos (Figura 22).

4.2.1. Descrição dos Animais Controle

Os túbulos proximais ou segmento principal, observados em microscopia óptica, apresentam células epiteliais cúbicas, com núcleo esférico central e microvilosidades apicais formando a característica borda em escova (Figura 23A). Em coloração de Novelli observou-se intensa reação destas células a fucsina ácida, indicando grande concentração de mitocôndrias (Figura 23B). Quando tratada com

PAS e Alcian Blue pH 2,5 esta região tubular não apresentou reação positiva, indicando ausência de secreção mucosa (Figura 23C).

Em microscopia eletrônica de varredura pôde-se observar a presença da borda em escova, assim como a presença de cílios nesta região (Figura 24). Em microscopia eletrônica de transmissão foram evidenciadas as junções de oclusão e a borda em escova. Foi observada ainda grande concentração de mitocôndrias na região basal e mediana apical das células e baixa concentração de mitocôndrias na região apical (Figuras 25 e 26). Na região basal destas células foram observadas invaginações profundas da membrana plasmática. Nestas invaginações encontra-se mitocôndrias, muitas vezes totalmente envolvidas por dobramentos da membrana da célula. Na região perinuclear observa-se um retículo endoplasmático rugoso bastante desenvolvido. A região apical destas células apresenta uma extensa rede tubular que resulta em intensa atividade de secreção de material homogêneo amorfo para a luz do túbulo (Figuras 25 e 26).

Os túbulos indicados como intermediários são encontrados sempre próximos aos túbulos coletores. Em microscopia óptica esta região do néfron foi identificada devido a características do diâmetro do lúmen tubular, da coloração das células e por sua proximidade com os túbulos coletores. Os túbulos intermediários apresentam diâmetro menor que o encontrado na região principal e nos túbulos coletores. As células epiteliais apresentam um volume citoplasmático menor que as células do túbulo principal, sendo mais basófilas, corando intensamente com hematoxilina. O núcleo é central e não foi observada borda em escova nestas células (Figuras 22 e 27). Em coloração Novelli estas células coram-se levemente, em contraste com uma intensa coloração dos túbulos principais, indicando pouca concentração de mitocôndrias (Figura 27A). Em colorações com PAS e Alcian Blue pH 2,5 não foi observada reação positiva, mostrando ausência de secreção de mucosa nesta região tubular (Figura 28A).

Os túbulos coletores são característicos por apresentarem células cúbicas a cilíndricas com núcleos basais, ausência de borda em escova. Em colorações como PAS e Alcian Blue pH 2,5 estes tubos são evidenciados devido à reação positiva tanto para PAS como para Alcian Blue pH 2,5 nas regiões apicais das células

epiteliais, indicando secreção mucosa (Figuras 28 e 29). Na região posterior do túbulo coletor é observada intensa secreção celular negativa para PAS e Alcian Blue pH 2,5, nos túbulos coletores, podendo ser visualizada mesmo em microscopia eletrônica de varredura e microscopia ótica (Figura 29).

4.2.2. Alterações Morfológicas dos Rins de Espécimes Expostos a Salinidade 17 $^{o}/_{oo}$

Os espécimes de *N. neglecta* submetidos a salinidade 17$^{o}/_{oo}$ não apresentaram alterações morfológicas, a nível de microscopia óptica, em relação ao padrão observado em espécimes controle .

4.3. MORFOLOGIA DA BEXIGA

O epitélio da bexiga de espécimes controle de *N. neglecta* apresenta-se como uma camada única de células cilíndricas altas, com núcleo basal, apostas a um tecido conjuntivo, apresentando ainda duas camadas musculares circulares bem desenvolvidas, uma longitudinal e outra tranversal ao plano de corte (Figura 30A). Em microscopia eletrônica de varredura pôde-se observar inúmeras dobras do epitélio e grande quatidade de microvilosidades e secreção celular neste epitélio (Figuras 30 e 31). Não foi observada a bexiga de animais expostos a decréscimo de salinidade.

4.4. CONCENTRAÇÕES DE CLORETO

4.4.1. Concentração de Cloreto no Soro

A concentração de Cl^- no soro de *N. neglecta* mostrou-se bastante estável nos três grupos controle analisados: controle curto prazo com 186,4 ± 3,2 mM, n=11 (média ± erro padrão da média, n = tamanho da amostra); controle longo (prazo 10

dias) com 189,1 ± 4,5 mM, n=6 e controle longo prazo 30 dias com 182,4 ± 9,2 mM, n = 3.

A concentração de Cl^- no soro de *N. neglecta* no grupo experimental curto prazo, não foi diferente do respectivo grupo controle, com valores de 184,5 ± 2,8 mM, n=15, teste t de Student com P=0,743. O grupo experimental longo (prazo 10 dias) apresentou 178,8 ± 2,8mM, n=2, teste t com P=0,061, não sendo também distinto do seu grupo controle. A concentração deste último grupo ficou em níveis mais baixos que os encontrados nos espécimes controles, porém a redução não foi significativa. O grupo experimental longo prazo (30 dias) de exposição a água de salinidade 17‰, apresentou redução significativa da concentração de Cl^- no soro. Foram observados valores de 155,4 ± 6,1 mM, n=4, com teste t P=0,050 (Figura 32).

4.4.2. Concentração de Cloreto na Urina

Na urina a concentração de Cl^- foi bastante variável (grande valor de erro padrão da média) nos dois grupos controles analisados, onde o grupo curto prazo apresentou 94,5 ± 16,4 mM, n=12 e o grupo longo prazo (10 dias) de 103,7 ± 49,6 mM, n = 4.

Observou-se grande variação da concentração de cloreto na urina, mesmo entre espécimes submetidos ao mesmo nível salino (grande valor de erro padrão da média), não sendo observandas alterações significativas em nenhum dos períodos de teste, quando os experimentais foram comparados com os controles. As amostras experimentais apresentaram os seguintes valores: grupo experimental curto prazo 135,7 ± 17,1 mM, n=16, com teste t P=0,103 quando comparado com seu controle e no grupo longo prazo (10 dias), os valores foram de 107,3 ± 18,1 mM, n=6, teste t com P=0,938 (Figura 32).

4.5. CONCENTRAÇÃO DE SÓDIO

4.5.1. Concentração de Sódio no Soro

N. neglecta em água do mar apresentou concentração de sódio no soro com valor médio 178,5 ± 13,8 mM, n=5. Para as dosagens de Na^+ foi utilizado um único grupo controle para comparar com os diferentes períodos de teste. Esta decisão foi tomada com base na estabilidade dos dados encontrados para as dosagens de Cl^- e Mg^{++}. Em contraste com o observado para a concentração de Cl^-, não foram observadas alterações significativas nas concentrações de Na^+ nos grupos experimentais quando comparados com o grupo controle. Os valores obtidos foram: grupo experimental curto prazo 156,3 ± 5,7 mM, n=4, teste t com P=0,218; grupo experimental longo prazo (10 dias) 161,4 ± 15,0 mM, n=4, teste t com P=0,430 e grupo experimental (30 dias) 149,6 ± 5,4 mM, n=3, teste t com P=0,175 (Figura 33).

4.5.2. Concentração de Sódio na Urina

A concentração de Na^+ na urina de espécimes controle de *N. neglecta* apresentou valor médio 107,7 ± 17,5 mM, n=6. Assim como para concentração de Na^+ no soro, para concentração de Na^+ na urina também foi utilizado um único grupo controle. Não foi observada variação significativa na concentração de sódio nos grupos experimentais, cujos valores foram: grupo experimental curto prazo 92,8 ± 40,4 mM, n=5, teste t com P=0,730 e o grupo experimental longo prazo (10 dias) com 137,0 ± 9,64 mM n=2, teste t com P=0,400 (Figura 33).

4.6. CONCENTRAÇÃO DE MAGNÉSIO

4.6.1. Concentração de Magnésio no Soro

Os três grupos de espécimes de *N. neglecta* controles analisados apresentaram concentração de Mg^{++} bastante estável, tal como apresentado para concentração de Cl^- no soro, seção 4.4.1. O grupo controle curto prazo apresentou 1,03 ± 0,13 mM, n=4. O grupo controle longo prazo (10 dias) 0,90 ± 0,05 mM, n=6 e o grupo controle longo prazo (30 dias) 0,95 ± 0,12 mM, n=4. Esta observação apóia a utilização do grupo único controle para concentração de Na^+ no soro como referência para todos os experimentos como descrito na seção 4.5.1.

A concentração de Mg^{++} no soro de animais experimentais manteve-se estável nos dois primeiros grupos: experimental curto prazo 1,04 ± 0,05 mM, n=16, teste t com P=0,930 e experimental longo prazo (10 dias) 0,84 ± 0,07 mM, n=14, teste t com P=0,613. Houve, contudo, uma redução significativa da concentração de Mg^{++} no soro de animais experimentais do grupo longo prazo 30 dias, cujos valores foram: 0,55 ± 0,018 mM, n=4, teste t com P=0,016 (Figura 34).

4.6.2. Concentração de Magnésio na Urina

A concentração de magnésio na urina de espécimes controle de *N. neglecta* apresentou-se bastante variável nos dois grupos analisados. Os valores obtidos foram: controle curto prazo (1 a 6 horas) 189,7 ± 67,0 mM, n=6 e controle longo prazo (10 dias) 152,6 ± 52,3 mM, n=3. Em experimentais curto prazo (1 a 6 horas) não foi observada alteração significativa da concentração de Mg^{++} na urina, com 162,5 ± 39,8 mM, n=14, teste t com P=0,720. Em experimentais expostos a salinidade $17^{o}/_{oo}$ longo prazo (10 dias) foi observada uma redução significativa da concentração de Mg^{++} na urina, 34,0 ± 9,0 mM, n=11, teste t com P=0,002 (Figura 34).

4.7. ATIVIDADE DA Na^+,K^+-ATPase

4.7.1. Atividade da Na^+, K^+- ATPase em Homogenizado das Brânquias

A atividade da Na^+,K^+-ATPase para peixes controles curto prazo foi de 0,992 ± 0,082 $\mu mol.mg^{-1}.h^{-1}$, n=6. No grupo de indivíduos controle longo prazo (10 dias) a atividade foi 0,476 ± 0,057 $\mu mol.mg^{-1}.h^{-1}$, n = 6.

A atividade da Na^+,K^+-ATPase não apresentou alteração significativa em brânquias de *N. neglecta* submetidos a salinidade 17‰ durante curto prazo, com 0,893 ± 0,061 $\mu mol.mg^{-1}.h^{-1}$, n=10 e teste t com P=0,343, ou longo prazo (10 dias) com 0,521 ± 0,062 $\mu mol.mg^{-1}.h^{-1}$, n=5 e teste t com P=0,613 em relação aos respectivos grupos controle (Figura 35).

4.7.2. Atividade da Na^+,K^+-ATPase em Homogenizado dos Rins

Em tecido renal de indivíduos controle curto prazo a atividade da Na^+,K^+-ATPase foi de 0,796 ± 0,104 $\mu mol.mg^{-1}.h^{-1}$, n = 6 e no grupo longo prazo os valores foram de 0,525 ± 0,082 $\mu mol.mg^{-1}.h^{-1}$, n = 5.

Observou-se redução significativa da atividade da Na^+,K^+-ATPase em rim de *N. neglecta* submetido a salinidade 17 ‰ durante curto prazo, com 0,559 ± 0,043 $\mu mol.mg^{-1}.h^{-1}$, n=10 e teste t com P=0,028. Porém a alteração na atividade da Na^+,K^+-ATPase não foi significativa para peixes submetidos à salinidade 17 ‰ durante longo prazo (10 dias) em relação aos seus controles, onde os valores obtidos para o experimetno foram de 0,430 ± 0,075 $\mu mol.mg^{-1}.h^{-1}$, n=5 e teste t com P=0,414 (Figura 35).

FIGURA 1

Mapa do Continente Antártico indicando: Península Antártica (↓), o Arquipélago das Shetlands do Sul, onde encontra-se a Ilha Rei George (*). Na mesma figura observa-se esquema mostrando a localização do Continente Antártico em relação aos continentes vizinhos: América do Sul (**a**), África (**b**) e Oceania (**c**).

Fonte: CROSSLEY, 1995

FIGURA 1

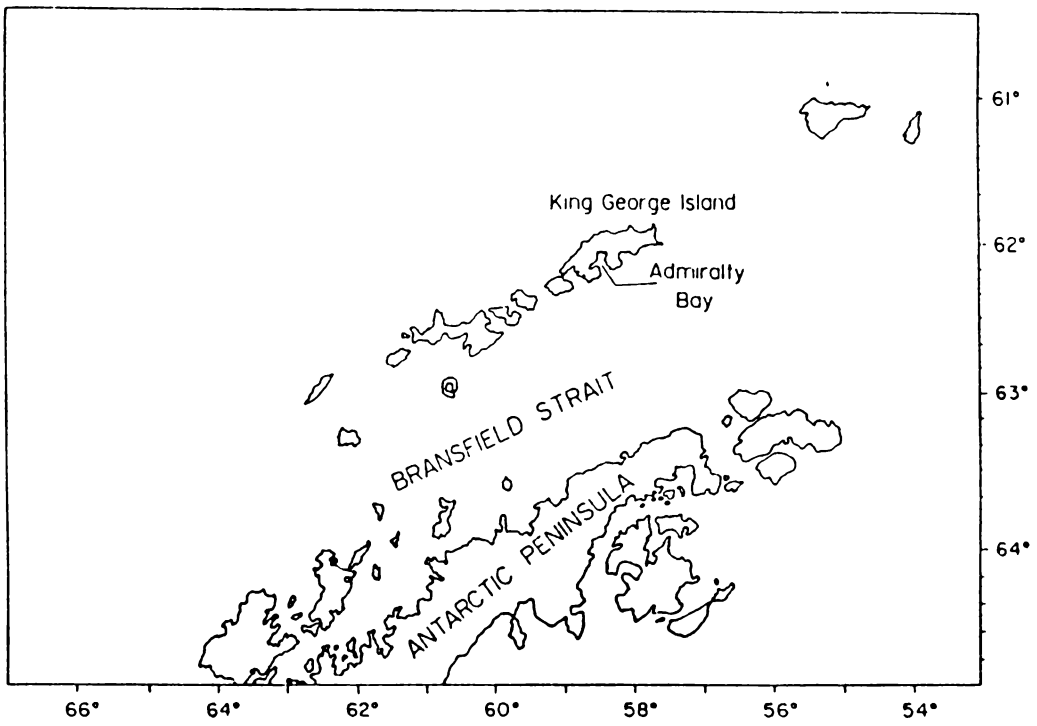
SOUTHERN OCEAN
HAAKON VII SEA
Orcadas (Argentina)
Signy (UK)
South Orkney Is
Sanae (South Africa)
Georg Von Neumayer (Germany)
Maitri (India)
Novolazarevskaya (Russia)
Asuka (Japan)
Syowa (Japan)
Molodezhnaya (Russia)
Amundsen Bay
Cook Ann
Proclamation I
Elephant I
South Shetland Is
ANTARCTIC PENINSULA
WEDDELL SEA
DRONNING MAUD LAND
ENDERBY LAND
Law Promontory
Halley (UK)
COATS LAND
Belgrano II (Argentina)
KEMP LAND
FRAMNES MTNS
Mawson (Australia)
Palmer (USA)
Anvers I
Faraday (UK)
Larsen Ice Shelf
San Martin (Argentina)
Filchner Ice Shelf
MAC. ROBERTSON LAND
Mt Menzies 3355
PRINCE CHARLES MTNS
Cape Darnley
Mackenzie Bay
Amery Ice Shelf
Adelaide I
Rothera (UK)
PALMER LAND
Berkner I
Alexander I
RONNE ICE SHELF
Charcot I
Zhongshan (PRC)
Davis (Australia)
WESTFOLD HILLS
PRINCESS ELIZABETH LAND
West Ice Shelf
BELLINGSHAUSEN SEA
Vinson Massif 4897
ELLSWORTH MTNS
South Pole
Amundsen – Scott (USA)
EAST ANTARCTICA
DAVIS SEA
TRANSANTARCTIC MOUNTAINS
WILHELM II LAND
Mirny (Russia)
ELLSWORTH LAND
WEST ANTARCTICA
QUEEN MARY LAND
Thurston I
Vostok (Russia)
Mawson I
Shackleton Ice Shelf
QUEEN MAUD MTNS
BUNGER HILLS
MARIE BYRD LAND
AMUNDSEN SEA
Mt Markham 4262
Cape Herlacher
Carney I
Vincennes Bay
Casey (Australia)
Law Dome
Cape Poinsett
WILKES LAND
ROSS ICE SHELF
EDWARD VII LAND
Siple I
Getz Ice Shelf
Roosevelt I
Scott Base (NZ)
McMurdo (USA)
Ross I
Bay of Whales
ROSS SEA
VICTORIA LAND
TERRE ADÉLIE
Cape Goodenough
Porpoise Bay
Terra Nova Bay
OATES LAND
GEORGE V LAND
Cape Adare
Dumont d'Urville (France)
South Magnetic Pole (1994)
Cape Hudson
Balleny Is
Commonwealth Bay
DUMONT D'URVILLE SEA
Scott I
a
b
c
ANTARCTICA

FIGURA 2

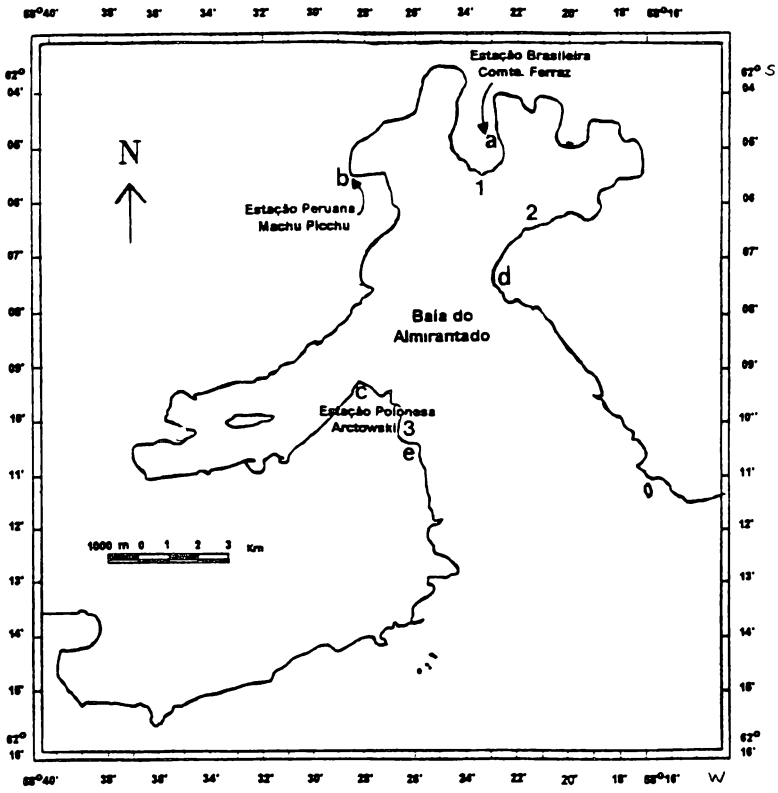
A: Mapa mostrando a Península Antártica e o Arquipélago das Shetland do Sul, onde encontra-se a Ilha Rei George. A Península Antártica e o Arquipélago das Shetlands do Sul estão separados pelo Estreito de Bransfield.

B: Mapa da Baía do Almirantado localizada na Ilha Rei George. No mapa estão indicadas as Estações de Pesquisa localizadas na Baía: Estação Brasileira (Estação Antártica Comandante Ferraz - EACF) (**a**); Estação Peruana Machu Picchu (**b**); Estação Polonesa Henryk Arctowski (**c**); Estação Equatoriana (**d**); Estação Americana Pieter Jennie (**e**). Este mapa mostra ainda os locais de coleta de *Notothenia neglecta*: ponto **1**, Punta Plaza; ponto **2**, localizado na Enseada Martel e ponto **3** localizado em frente ao Glaciar Ecology.

FIGURA 2


King George Island
Admiralty Bay
BRANSFIELD STRAIT
ANTARCTIC PENINSULA
61°
62°
63°
64°
66°
64°
62°
60°
58°
56°
54°

A


Estação Brasileira
Comte. Ferraz
N
Estação Peruana
Machu Picchu
Baía do
Almirantado
Estação Polonesa
Arctowski
1000 m 0 1 2 3 Km

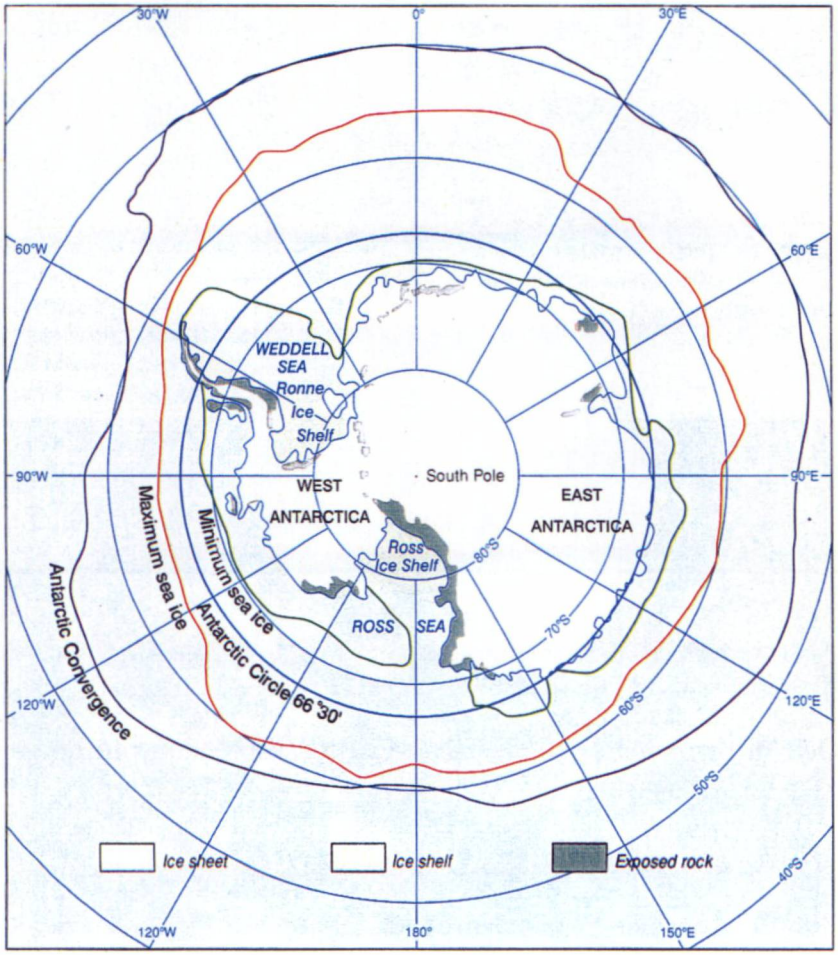
B

FIGURA 3

A: Mapa do Continente Antártico mostrando a localização da Convergência Antártica (linha azul), limite máximo do congelamento da superfície do mar durante o inverno antártico (linha vermelha) e limite mínimo do congelamento da superfície do mar durante o verão (linha verde).
Camada de gelo permanente sobre o continente (em branco), camada de gelo permanente sobre o mar (em cinza); rochas expostas (em verde)

B Foto da Enseada Martel mostrando um rio de degelo desembocando no mar (➧) e grande quantidade de gelo na praia (✻)

FIGURA 3


30°W
0°
30°E
60°W
60°E
90°W
90°E
120°W
120°E
150°E
180°
WEDDELL SEA
Ronne Ice Shelf
WEST ANTARCTICA
South Pole
EAST ANTARCTICA
Ross Ice Shelf
ROSS SEA
Maximum sea ice
Minimum sea ice
Antarctic Circle 66°30'
Antarctic Convergence
60°S
70°S
50°S
40°S
Ice sheet
Ice shelf
Exposed rock

A

*
B

FIGURA 4

A: Geleira próxima a EACF, mostrando o desprendimento de gelo no mar (★).

B: Estação Antártica Comandante Ferraz (➢).

FIGURA 4

FIGURA 5

A: Mapa mostrando a distribuição de *N. neglecta* (região achurada). Os pontos de interrogação indicam os locais onde não foi confirmada sua presença.
Fonte: FISHER e HUREAU (1985)

B: Espécime adulto de *Notothenia neglecta* fotografada em aquário.

FIGURA 5

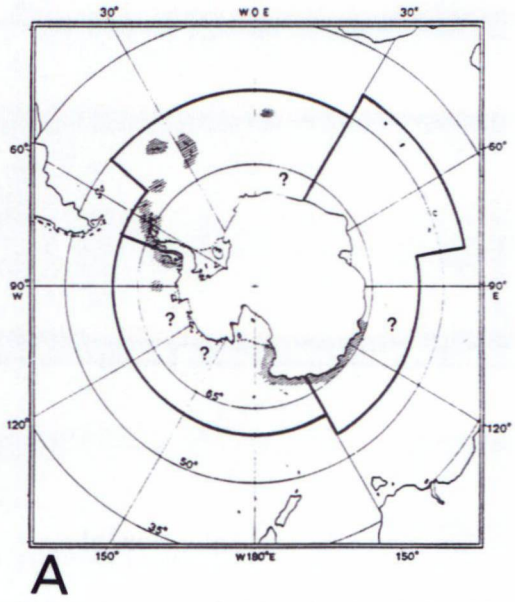


FIGURA 6

A: Pesca de *Notothenia neglecta* com linha e anzol.

B: Lancha Oceanográfica "Skua", utilizada para coleta de organismos aquáticos.

C: Bote inflável utilizado para coleta de organismos aquáticos.

FIGURA 6

FIGURA 7

A: Arranjo experimental para teste de longo prazo: montado no módulo aquário, utilizado para a exposição de *N. neglecta* ao decréscimo de salinidade. Tanque de 500 litros com indivíduos controles (**a**), Tanque de 500 litros com indivíduos experimentais (**b**), recipientes utilizados para armazenar água de degelo e água a 17°/$_{oo}$ (**c**).

B: Módulo de triagem utilizado para a estocagem de peixes em tanques de 1000 litros e para coleta do material para análises.

C: Arranjo experimental para teste a curto prazo (✻) , montado no módulo aquário para a exposição de *N. neglecta* à decréscimo de salinidade 17 ‰, em tanques de 150 litros.

D: Ensaio da Na^+, K^+-ATPase sendo realizado no laboratório de biologia da EACF.

FIGURA 7

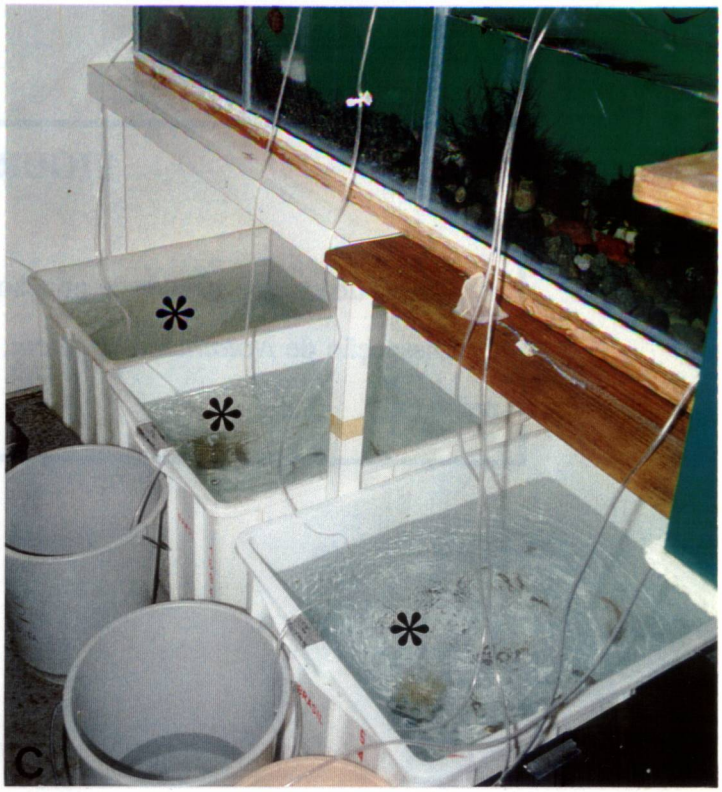


FIGURA 8

A: Coleta de sangue através de punção da veia caudal.

B: Dissecção de *Notothenia neglecta*, indicando localização dos rins do peixe ( ).

FIGURA 8

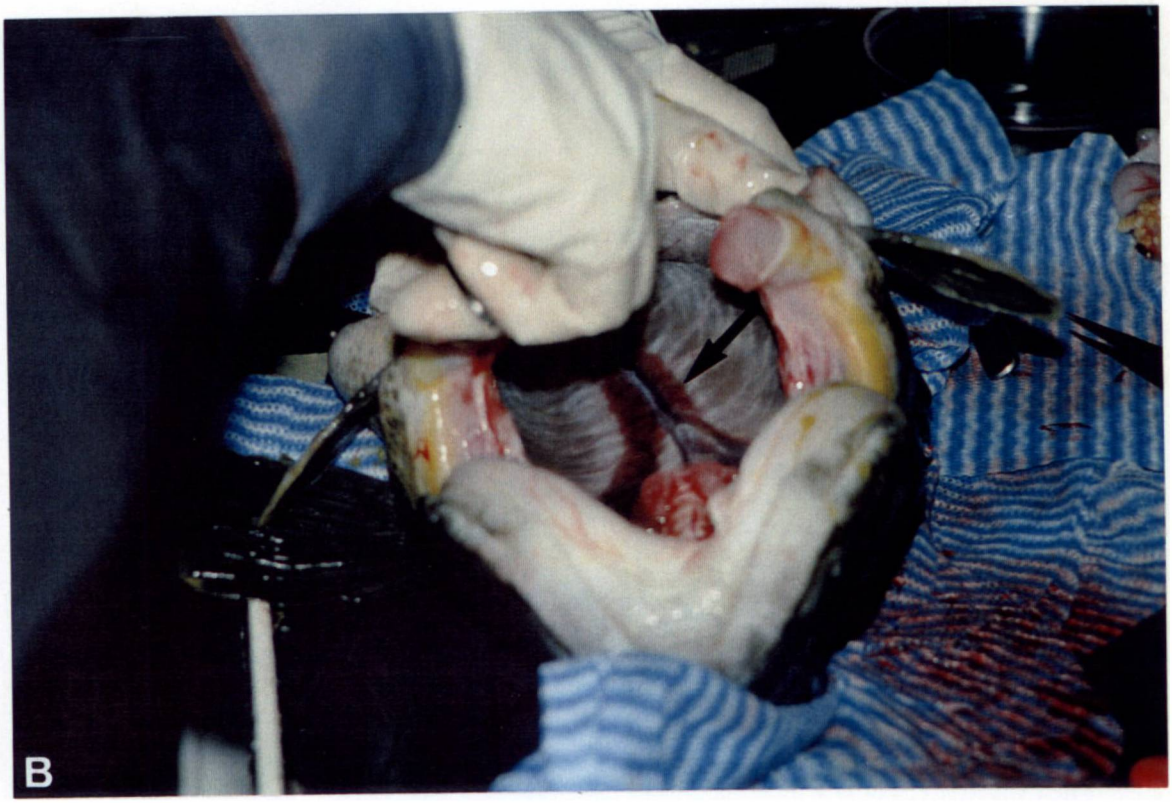


FIGURA 9

A: Segundo e terceiro arcos branquiais de *Notothenia neglecta* indicando rastros branquias (➧), filamentos branquias ou lamelas primárias (✱) e localização das lamelas secundárias projetando-se dos dois lados do filamento (►).

B: Corte longitudinal de um filamento ou lamela primária, mostrando a região da lamela primária (**a**) e as projeções encontradas de cada lado da lamela primária, denominadas de lamelas secundárias (**b**).

Coloração: Hematoxilina e Eosina.

Escala: 50 μm

FIGURA 9

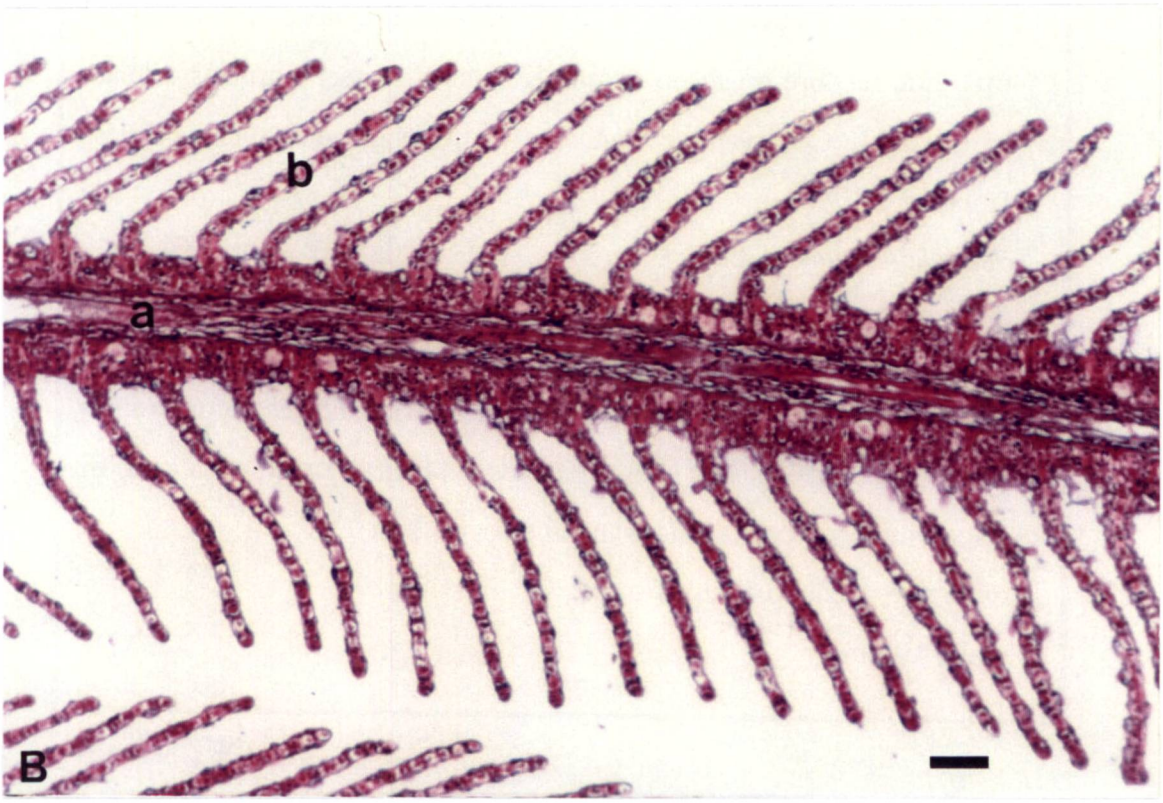


FIGURA 10

A: Lamelas branquiais mostrando epitélio estratificado interlamelar da lamela primária (**ee**), onde são encontradas células epiteliais (**eg**), células de muco (**m1**) e células de cloreto (**cc**); epitélio simples pavimentoso das lamelas secundárias (**ep**), onde são identificadas também as células de muco (**m2**), o espaço sanguíneo (**es**) e as células pilares (**cp**).
Coloração: Hematoxilina e Eosina
Escala: 50 μm

B: Corte transversal de uma lamela primária mostrando o epitélio estratificado interlamelar da lamela primária, onde observa-se as células epiteliais mais ou menos globosas, mesmo na camada superficial (**eg**). São ainda evidenciadas as células de cloreto indo da base à superfície do epitélio estratificado (**cc**).
Coloração : Hematoxilina e Eosina
Escala: 10 μm

C: Detalhe da lamela secundária mostrando o epitélio pavimentoso (**ep**) que recobre o espaço sanquíneo (**es**), sustentado pelas células pilares (**cp**). Observam-se também os prolongamentos das células pilares (➢).
Coloração : Hematoxilina e Eosina
Escala: 10 μm

D: Corte transversal de uma lamela secundária, indicando o arranjo espacial das células pilares mais ou menos em fileira (**cp**) delimitando o espaço sanguíneo com células sanguíneas (**es**).
Coloração : Hematoxilina e Eosina
Escala: 10 μm

FIGURA 10

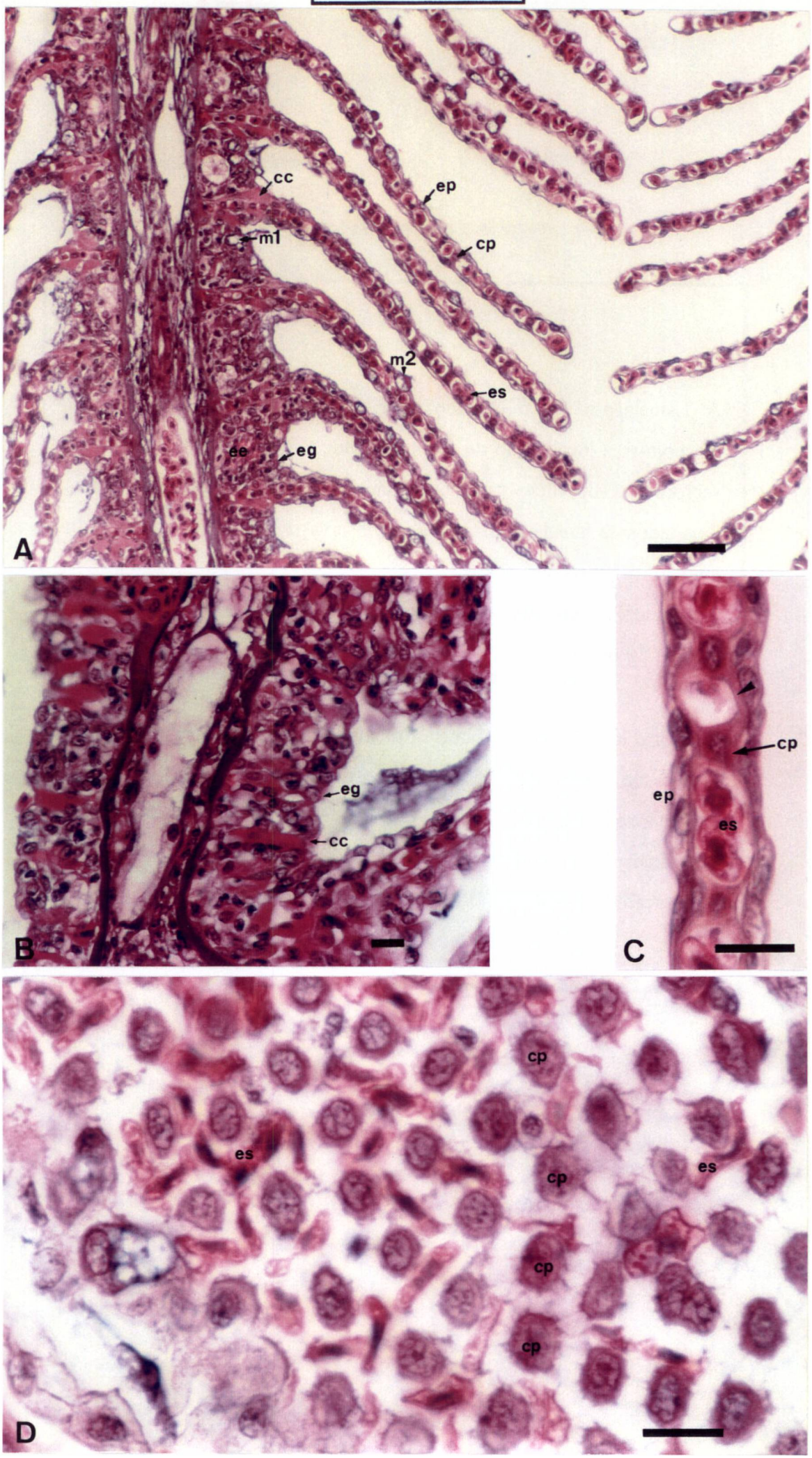


FIGURA 11

A: Lamela primária mostrando a superfície epitelial da mesma (★). Observa-se a localização de células de muco através de seu produto de secreção na superfície (↓) e as lamelas secundárias projetando-se dos dois lados da lamela primária (✻). Observa-se o aspecto enrugado do epitélio da lamela secundária.

Microscopia eletrônica de varredura

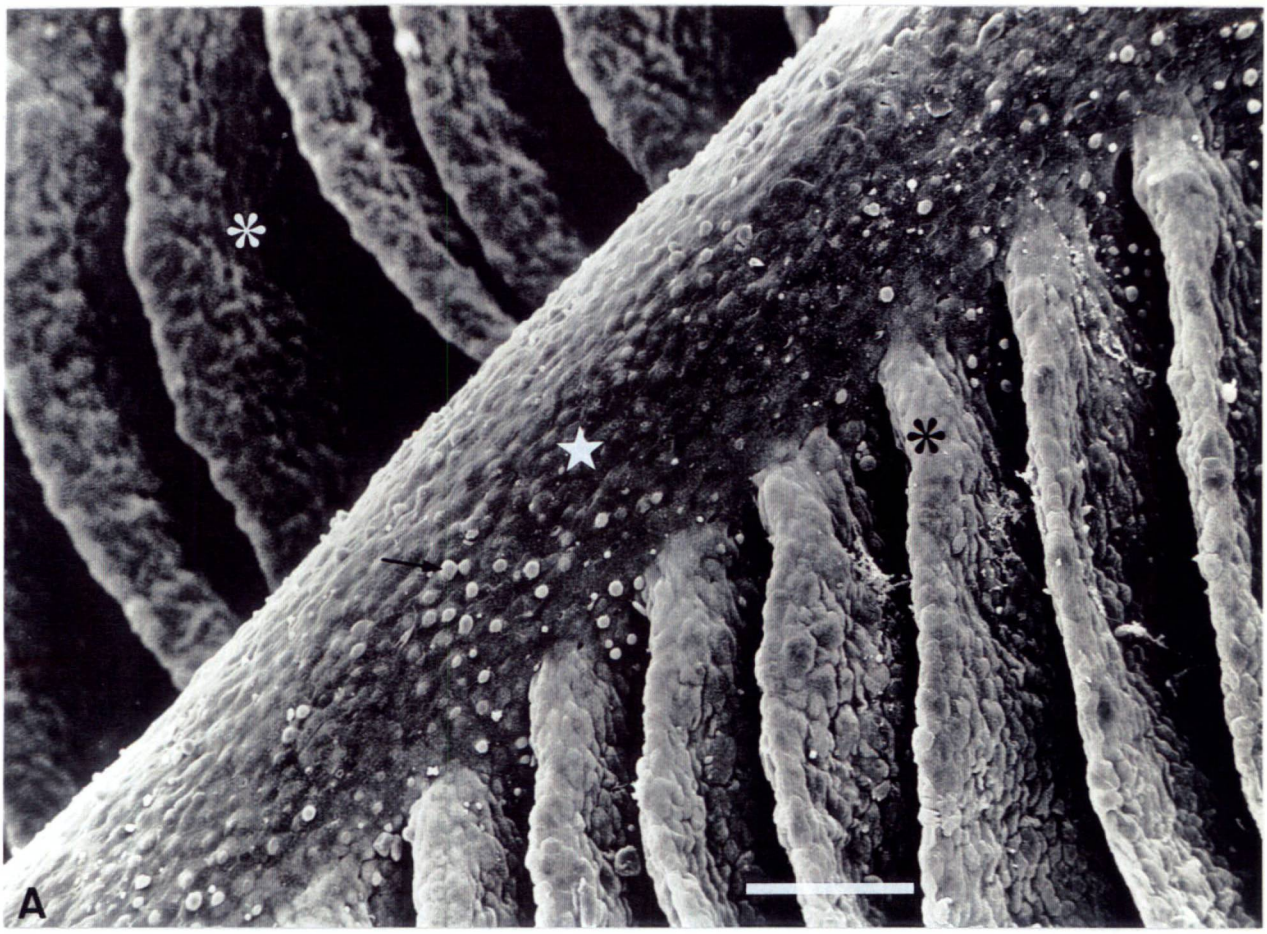
Escala: 50 μm

B: Corte longitudinal da lamela primária indicando as células de muco através da reação positiva ao Reativo de Shiff e Alcian Blue pH 2,5. Observa-se ampla distribuição destas células na região do epitélio interlamelar e lamelas secundárias (↓).

Coloração: PAS e Alcian Blue pH 2,5.

Escala: 10 μm

FIGURA 11



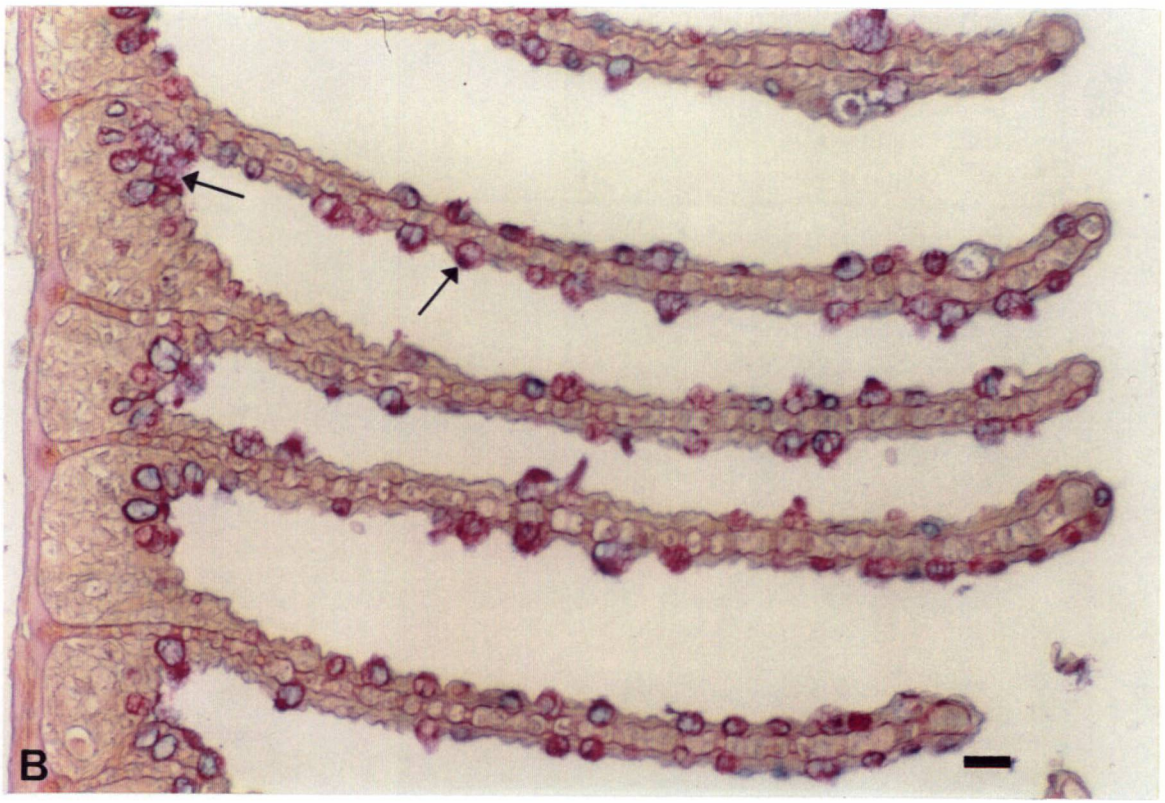


FIGURA 12

A: Superfície da lamela primária. Observa-se as microssaliências da superfície das células epiteliais (✻). As microssaliências apresentam padrão variado, porém todas as células parecem possuir microssaliências correndo paralelas aos limites celulares, delimitando cada célula epitelial (➧). Observa-se também a saída de muco, identificando a localização das células de muco (▼).

Microscopia eletrônica de varredura

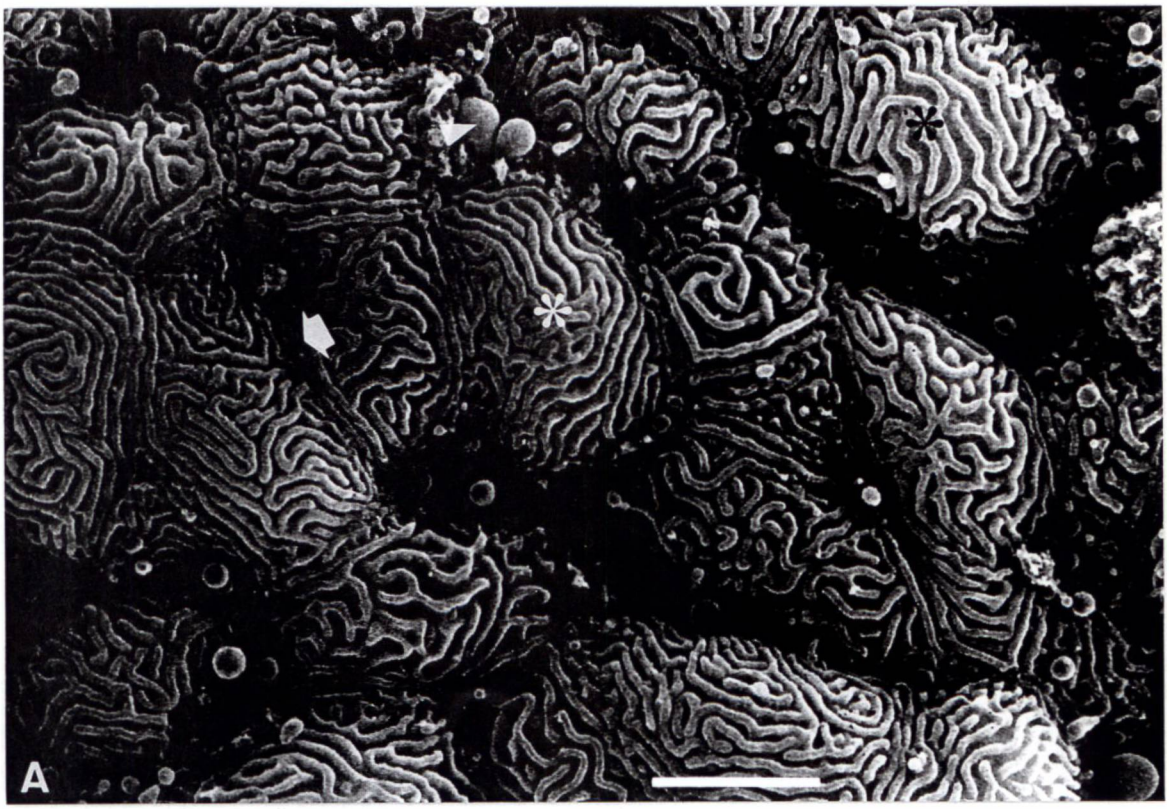
Escala: 5 μm

B: Superfície da lamela primária na região do epitélio interlamelar, mostrando a presença de microssaliências (➧) e células de muco (★).

Microscopia eletrônica de varredura

Escala: 5 μm

FIGURA 12



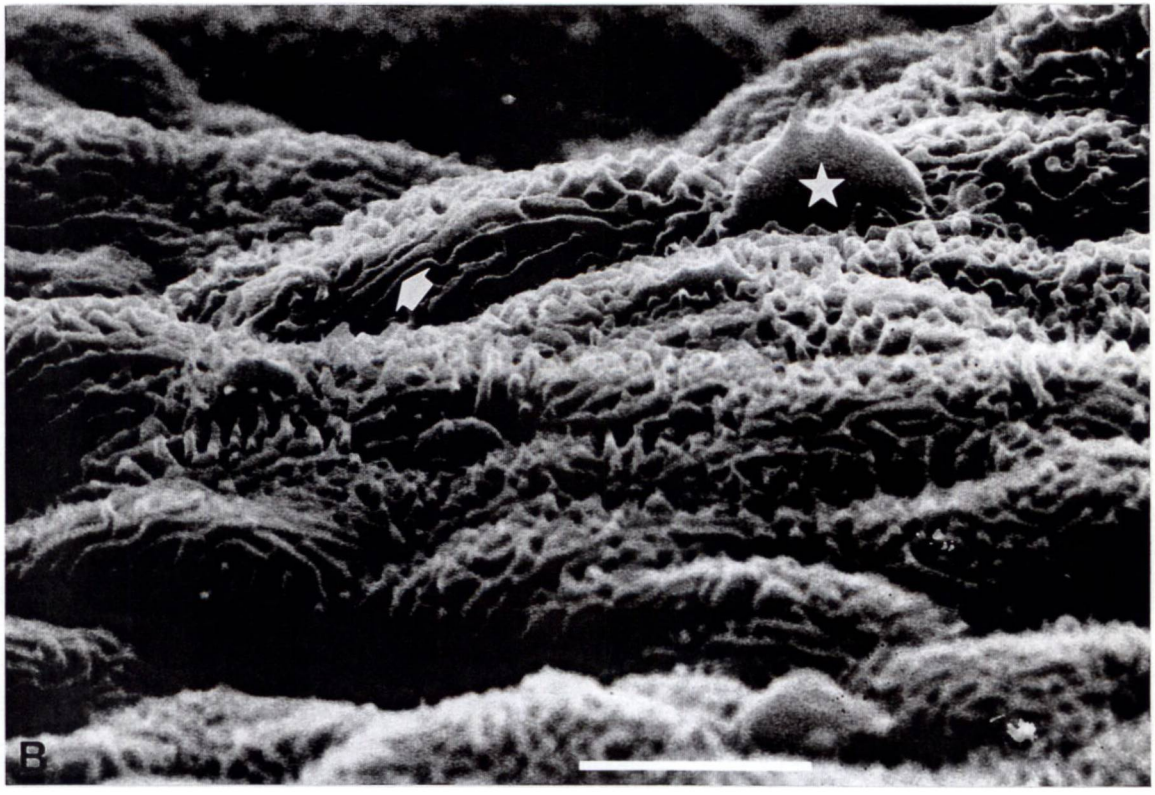


FIGURA 13

A: Lamela primária (✻), região de inserção das lamelas secundárias (★). Nas lamelas secundárias podem ser observadas microssaliências (✹).

Microscopia eletrônica de varredura

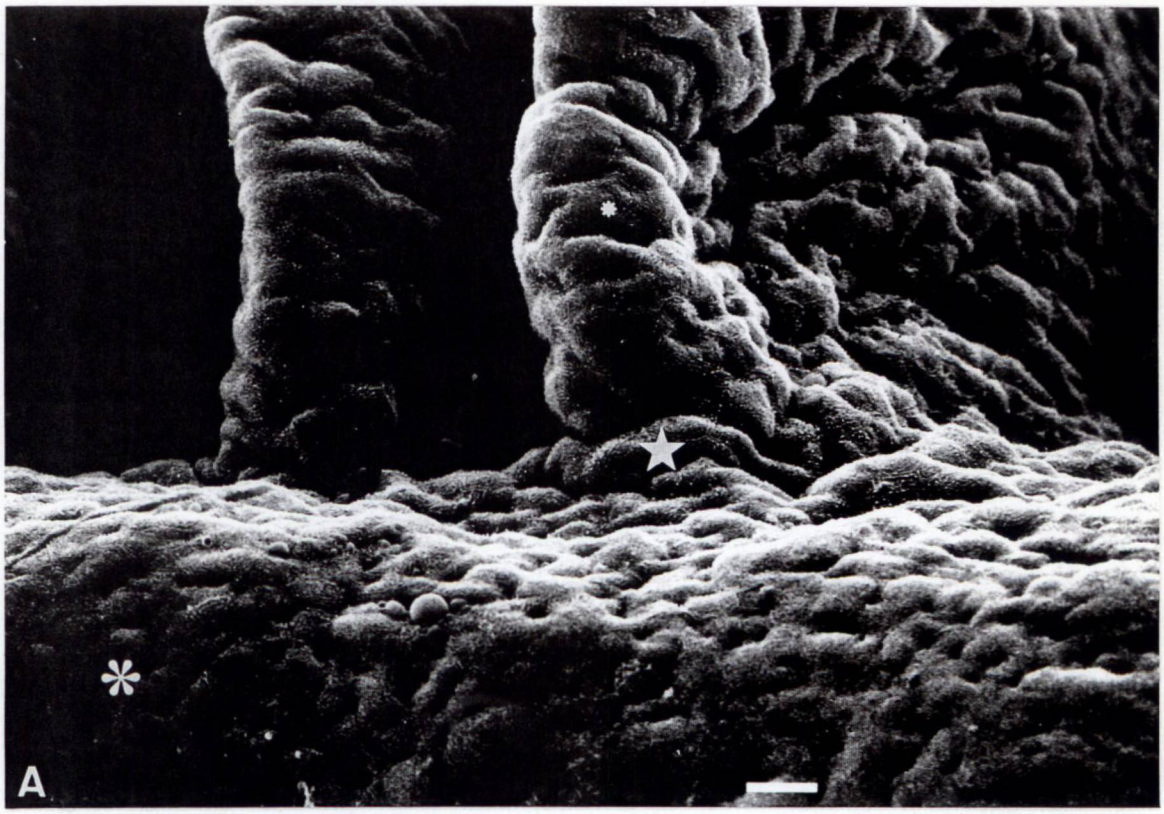
Escala: 10 μm

B: Microssaliências das células epiteliais da região de inserção das lamelas secundárias (★), mostrando padrão bastante diferente do encontrado nas lamelas primárias, não sendo possível evidenciar o limite celular.

Microscopia eletrônica de varredura

Escala: 5 μm

FIGURA 13



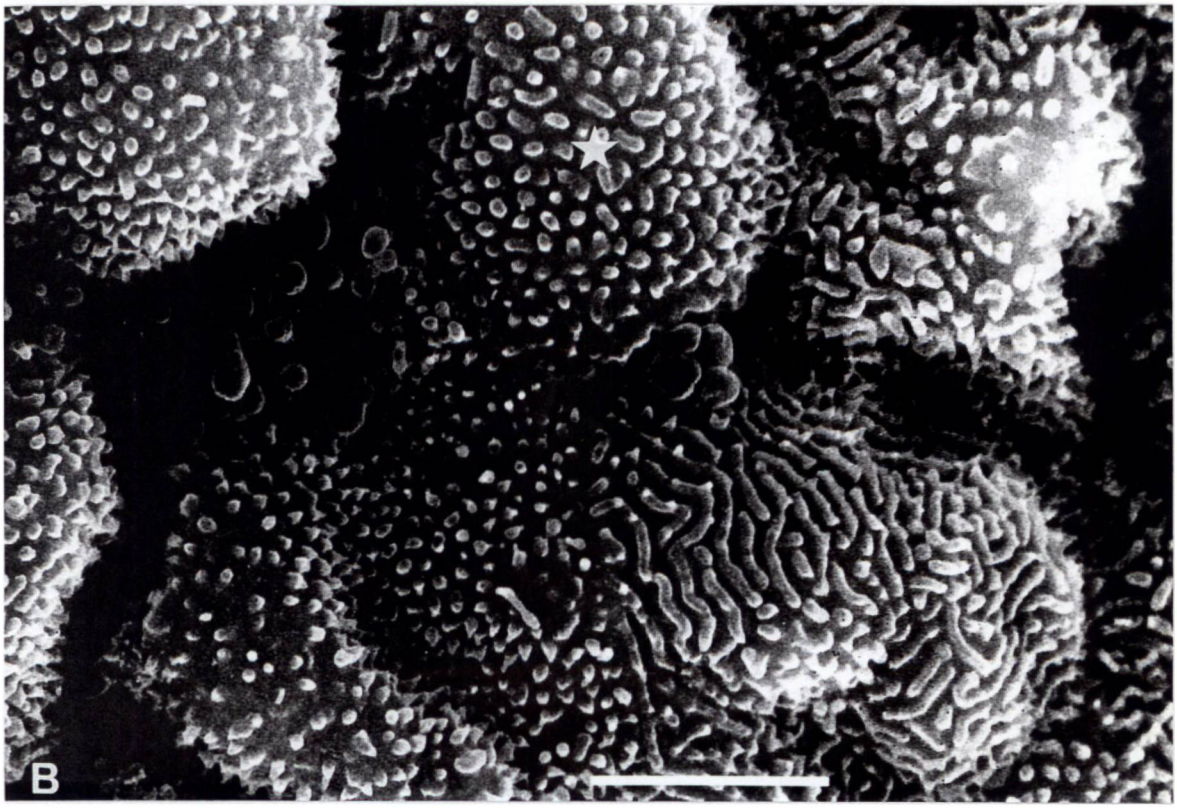


FIGURA 14

A: Superfície do epitélio da lamela primária evidenciando a localização das células de muco (★).

Microscopia eletrônica de varredura

Escala: 5 μm

B: Epitélio da lamela primária onde se observa células epiteliais superficiais (*), células de muco (✻) e célula com grânulo em bastonete "rodlet cells"(★).

Coloração: Hematoxilina e Eosina

Escala: 10 μm

C: Corte oblíquo ao epitélio da lamela primária evidenciando as células de muco através de reação positiva ao Reativo de Shiff e Alcian Blue pH 2,5 (↓).

Coloração: PAS e Alcian Blue pH 2,5

Escala: 10 μm

FIGURA 14

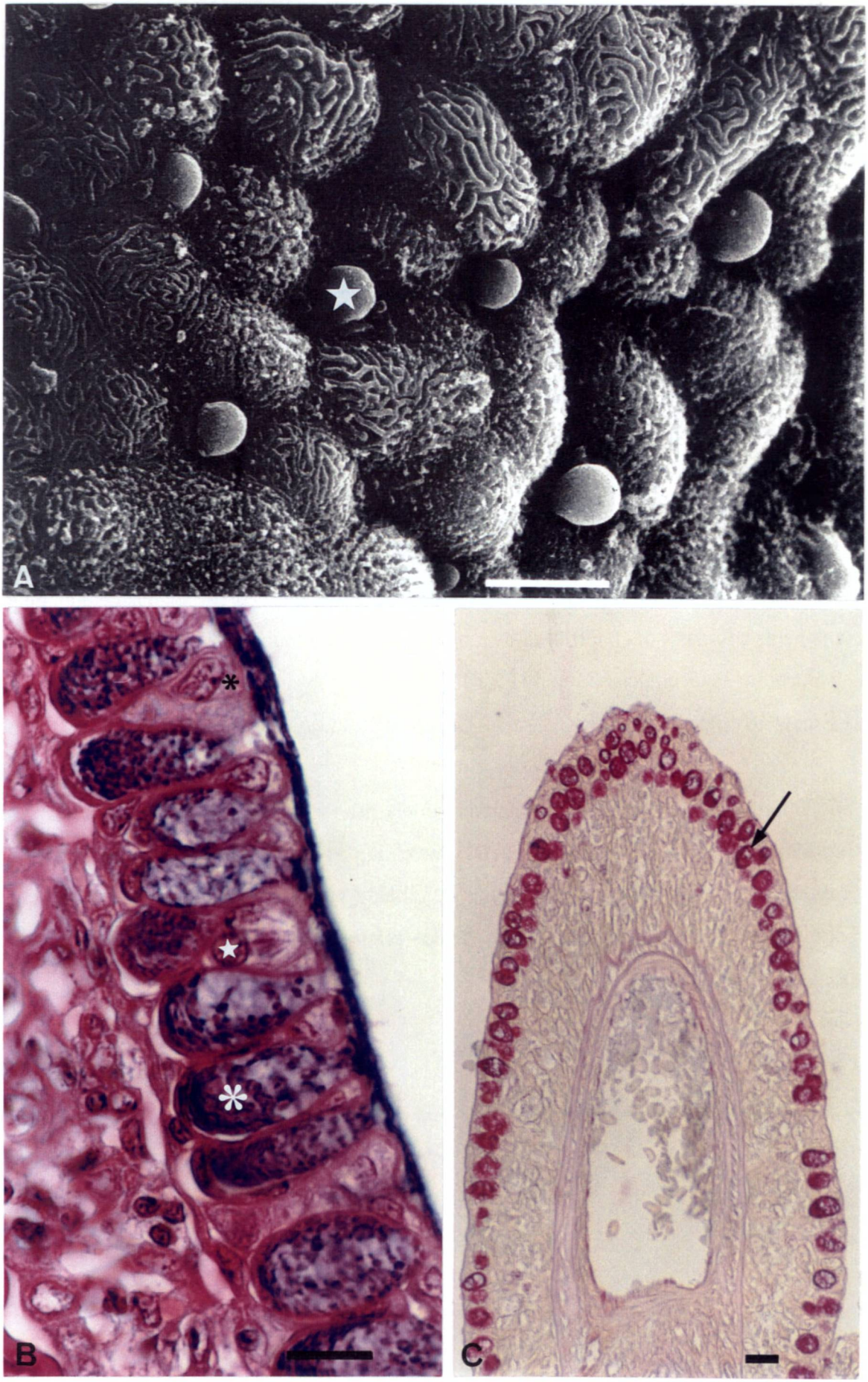


FIGURA 15

A: Corte longitudinal da lamela secundária. Evidencia-se células de muco pela reação positiva ao Reativo de Shiff e Alcian Blue pH 2,5 (**m2**). Observa-se a localização da membrana basal pela reação positiva ao Reativo de Shiff (**mb**). Observar também o epitélio pavimentoso (**ep**), células pilares (**cp**), espaço sanguíneo (**es**) e célula sanguínea (**cs**).
Coloração: PAS e Alcian Blue pH 2,5
Escala: 10 μm

B: Corte transversal da lamela secundária, identificando os corpos das células pilares (**cp**) e as colunas (**cl**). Observa-se também células de muco (**m2**).
Coloração: PAS e Alcian Blue pH 2,5
Escala: 10 μm

C: Observa-se a região interlamelar da lamela primária, onde estão evidenciadas células epiteliais (**eg**), células de muco (**m1**) e células de cloreto (**cc**). Na região da base da lamela secundária observam-se células epiteliais (**ep**), células de muco (**m2**), células com grânulos em bastonetes (**cg**), células pilares (**cp**) e espaço sangüíneo contendo células sanguíneas (**es**).
Coloração: Azul de toluidina
Escala: 10 μm

FIGURA 15

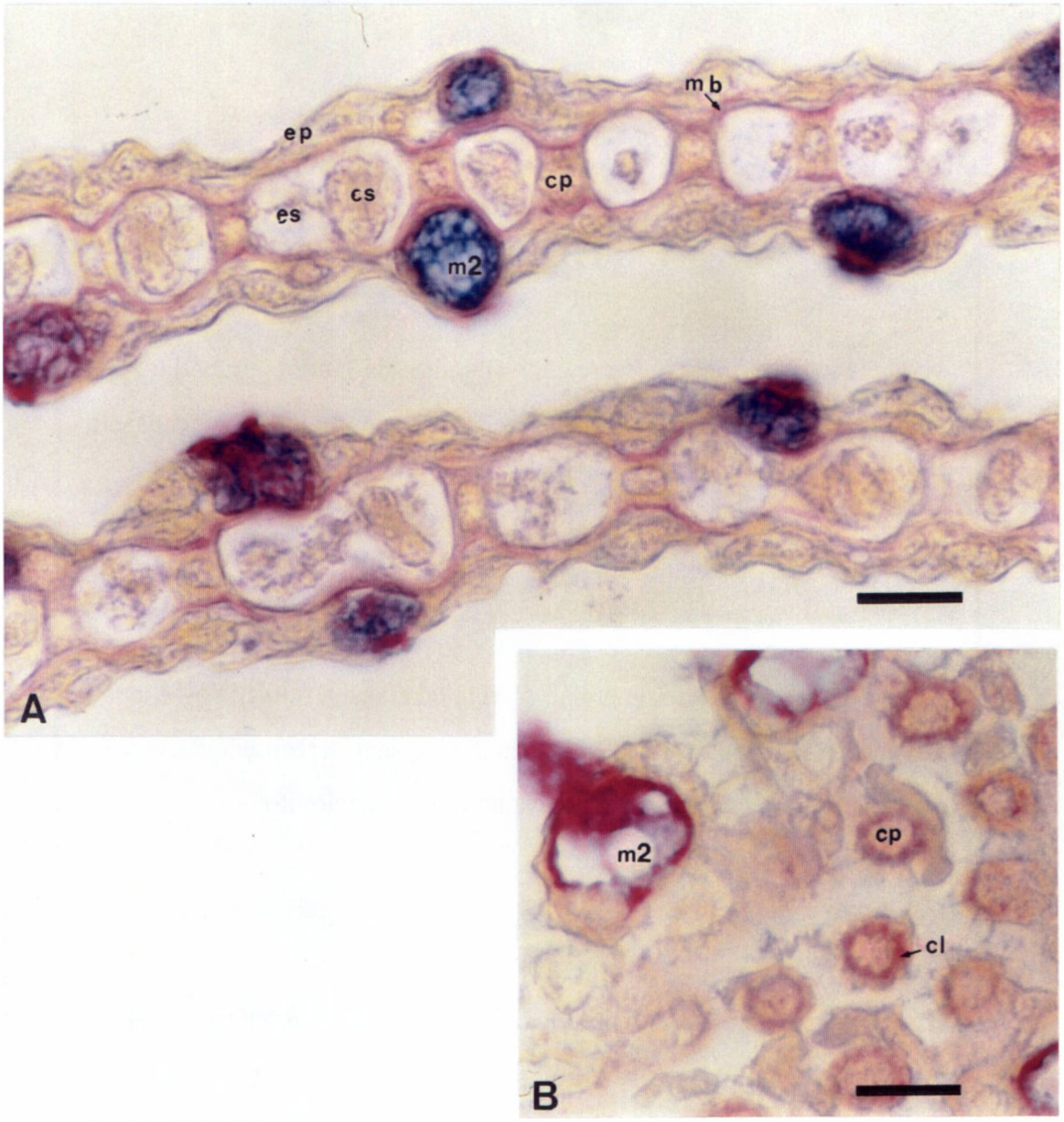


FIGURA 16

A: Epitélio estratificado da região aferente da lamela primária (✻) onde são evidenciadas as células epiteliais da superfície (↓) e células de muco (●), não sendo observada a presença de células de cloreto.
Coloração: Hematoxilina e Eosina
Escala: 10 μm

B: Epitélio estratificado da região eferente da lamela primária (✻), onde são evidenciadas as células de muco (●), sem ser observada reação diferenciada que indicaria a presença de células de cloreto.
Coloração: Novelli
Escala: 10 μm

C: Epitélio estratificado interlamelar da lamela primária (✻), evidenciando células epiteliais (↓) e células de cloreto (➧). Observa-se localização da artéria eferente, onde pode ser vista a comunicação da lamela secundária com a artéria (★).
Coloração: Novelli
Escala: 10 μm

D: Esquema da lamela primária indicando a localização do epitélio aferente (**eaf**), da artéria aferente (**aa**), cartilagem branquial (**cb**), epitélio interlamelar (**ei**), lamela secundária (**ls**), artéria eferente (**ea**) e epitélio eferente (**eef**).

FIGURA 16

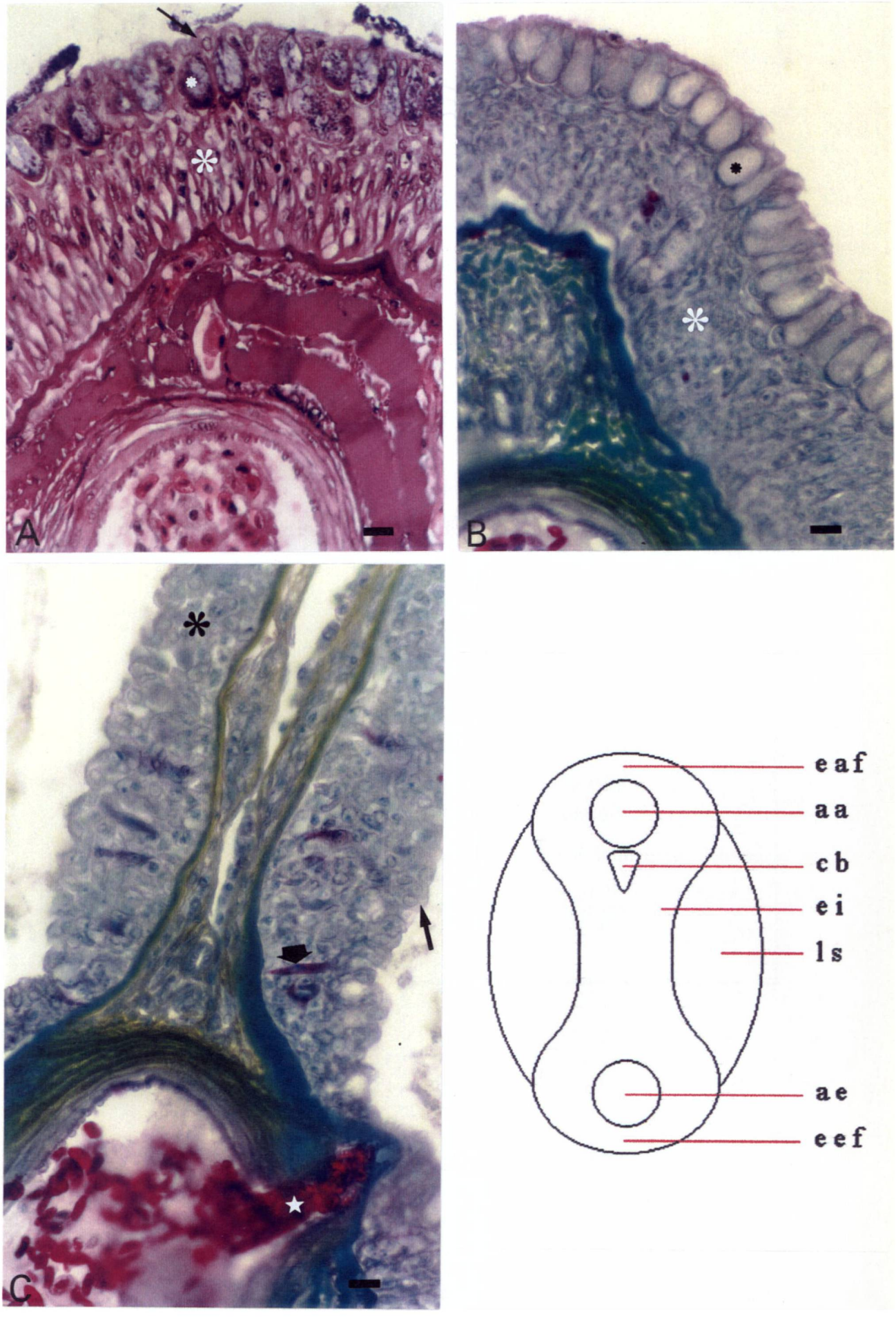


FIGURA 17

A: Distribuição das células de cloreto na lamela primária ( ), na inserção da lamela secundária ( ) e nas lamelas secundárias ( ).

Coloração: Novelli

Escala: 10 μm

B: Detalhe da região interlamelar da lamela primária mostrando célula de cloreto do epitélio interlamelar ( ) e da região de inserção das lamelas secundárias ( ). Observar que as regiões apicais dessas células encontram-se lado a lado, formando uma cripta única ( ).

Coloração: Novelli

Escala: 10 μm

C: Células de cloreto da região do epitélio interlamelar ( ), da inserção da lamela secundária ( ) e da lamela secundária ( ).

Coloração: Azul de toluidina

Escala: 10 μm

FIGURA 17

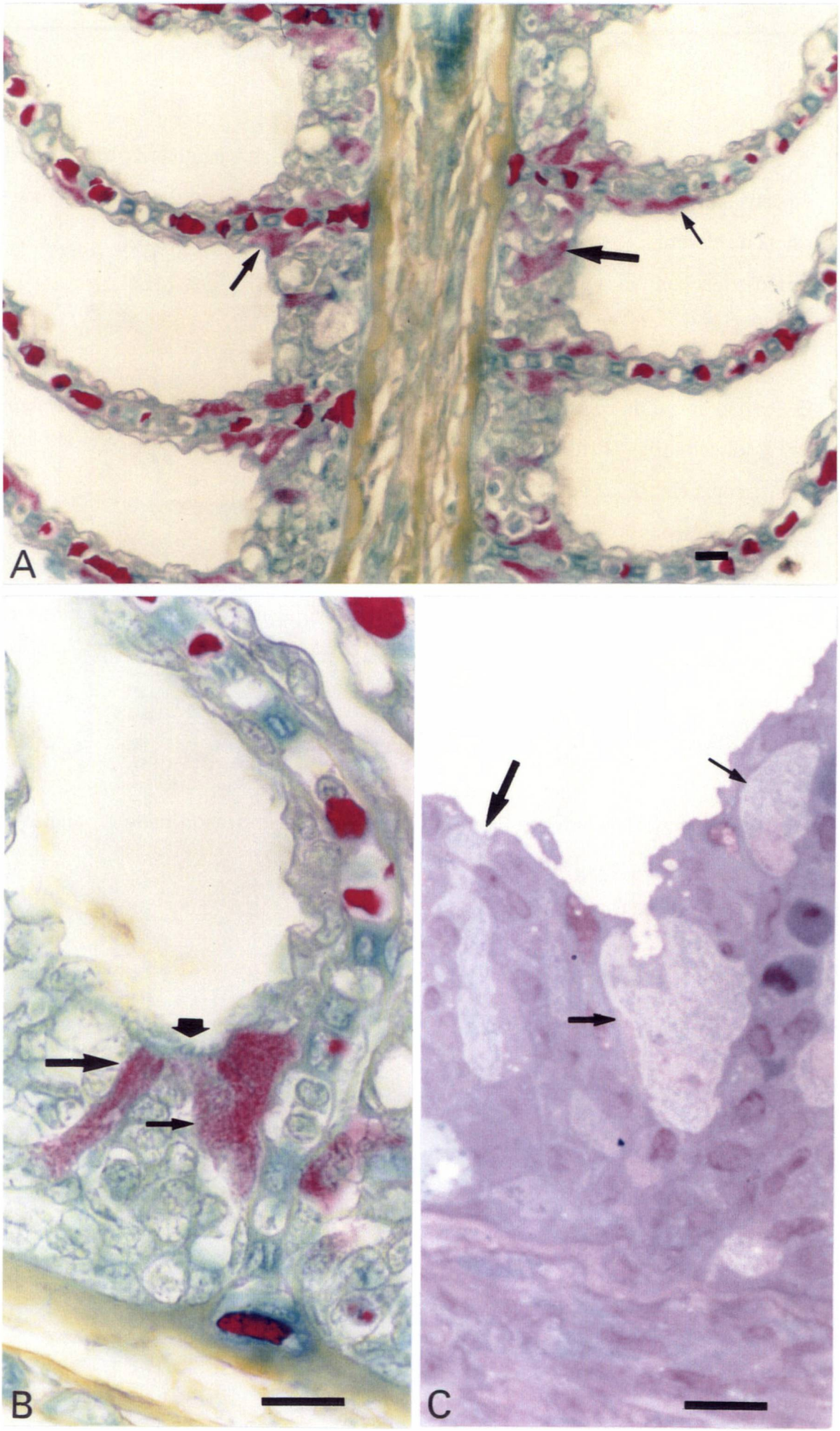


FIGURA 18

A: Célula de cloreto (**cc**), célula pilar (**cp**) e células sangüíneas (**cs**), dentro dos espaços sangüíneos. Note-se a grande quantidade de mitocôndrias (**mi**) presentes na célula de cloreto.
Microscopia eletrônica de transmissão
Escala: 2 μm

B: Região apical da célula de cloreto (**cc**), identificando-se as junções celulares apicais (➢), mitocôndrias (**mi**) e rede de túbulos (**t**).
Microscopia eletrônica de transmissão
Escala: 0,5 μm

C: Região perinuclear superior da célula de cloreto, identificando mitocôndrias (**mi**), retículo endoplasmático granular (**r**) e rede de túbulos (**t**), núcleo (**n**).
Microscopia eletrônica de transmissão
Escala: 0,5 μm

D: Região perinuclear inferior da célula de cloreto, identificando parte do núcleo (**n**) mitocôndrias (**mi**) e rede de túbulos (**t**).
Microscopia eletrônica de transmissão
Escala: 0,5 μm

E: Região basal da célula de cloreto, identificando íntimo contato com o espaço sanguíneo (**es**). Também são evidenciadas mitocôndrias (**mi**) e rede de túbulos (**t**).
Microscopia eletrônica de transmissão
Escala: 0,5 μm

FIGURA 18

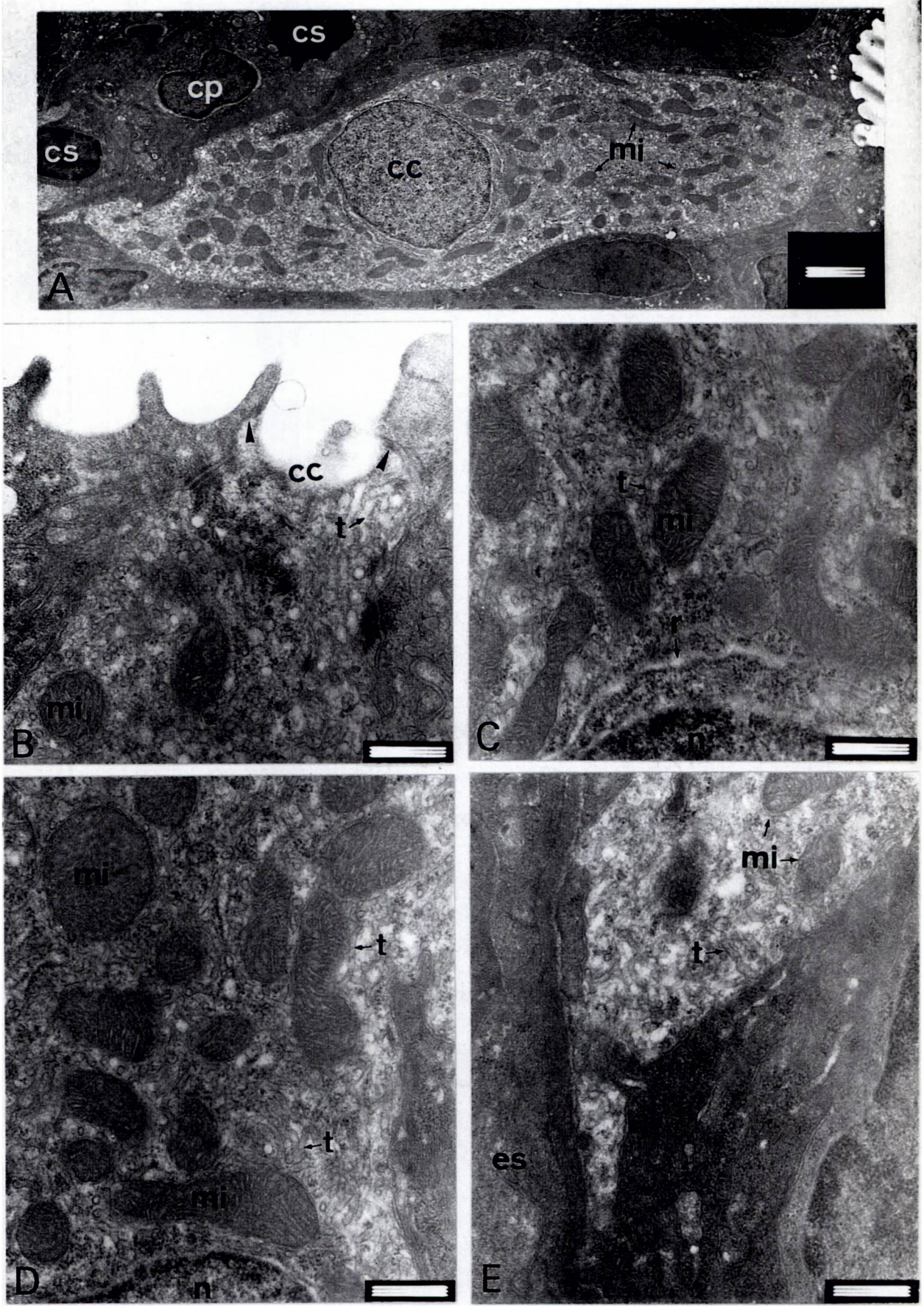


FIGURA 19

A: Células de cloreto da lamela secundária, identificando região da cripta (**cr**), região mediana com mitocôndrias (**mi**) e o núcleo na região basal (**n**). Note-se a proximidade da base da célula de cloreto com o espaço sangüíneo (**es**).
Coloração: Novelli
Escala: 10 μm

B: Célula de cloreto da lamela secundária (**cc**) e células de muco (**m2**).
Coloração: Azul de toluidina
Escala: 10 μm

C: Vista geral da superfície do epitélio da lamela secundária, identificando-se microssaliências das células epiteliais (**ms**), abertura das células de muco (**m2**) e cripta da célula de cloreto (**cc**).
Microscopia eletrônica de varredura
Escala: 10 μm

D: Detalhe da cripta da célula de cloreto (➧), na lamela secundária.
Microscopia eletrônica de varredura
Escala: 1 μm

FIGURA 19

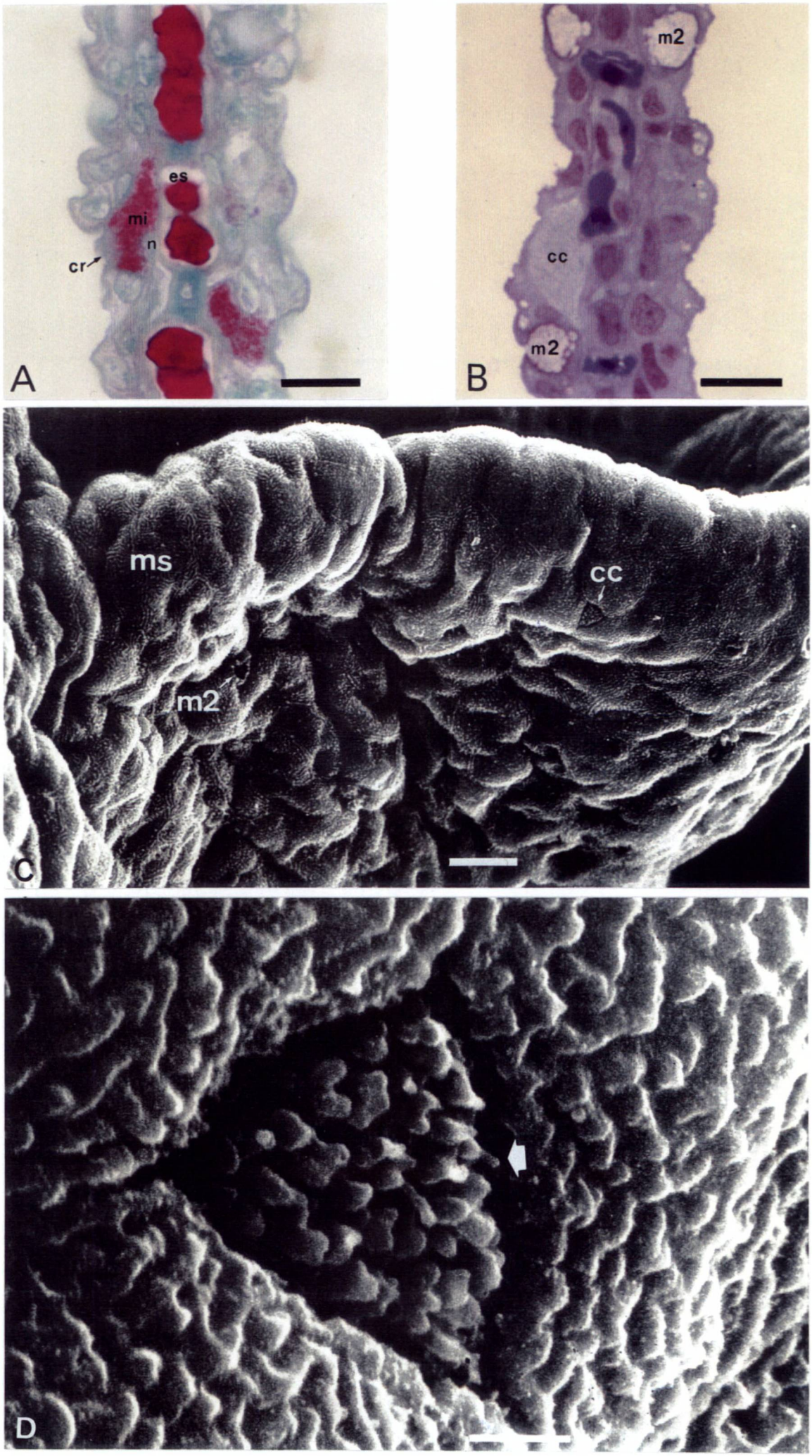


FIGURA 20

A: Epitélio interlamelar da lamela primária de *Notothenia neglecta* exposto a salinidade de 17 $^{o}/_{oo}$ por 20 dias. Observam-se células epiteliais (**eg**) e células de cloreto (**cc**).

Coloração: Novelli

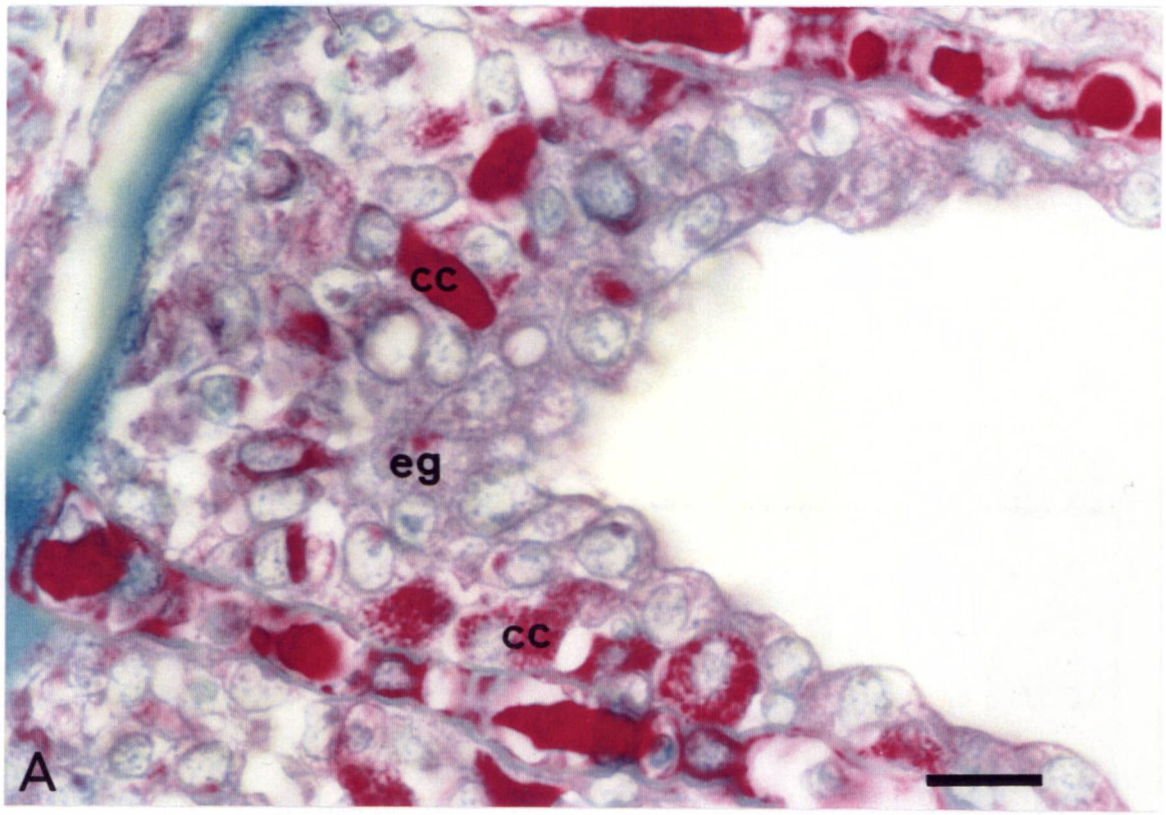
Escala: 10 μm

B: Epitélio interlamelar da lamela primária de *N. neglecta* exposta a salinidade $17^{o}/_{oo}$, longo prazo 30 dias, observando-se células epiteliais (**eg**), células de cloreto (**cc**) e célula de muco (**m1**).

Coloração: Novelli

Escala: 10 μm

FIGURA 20



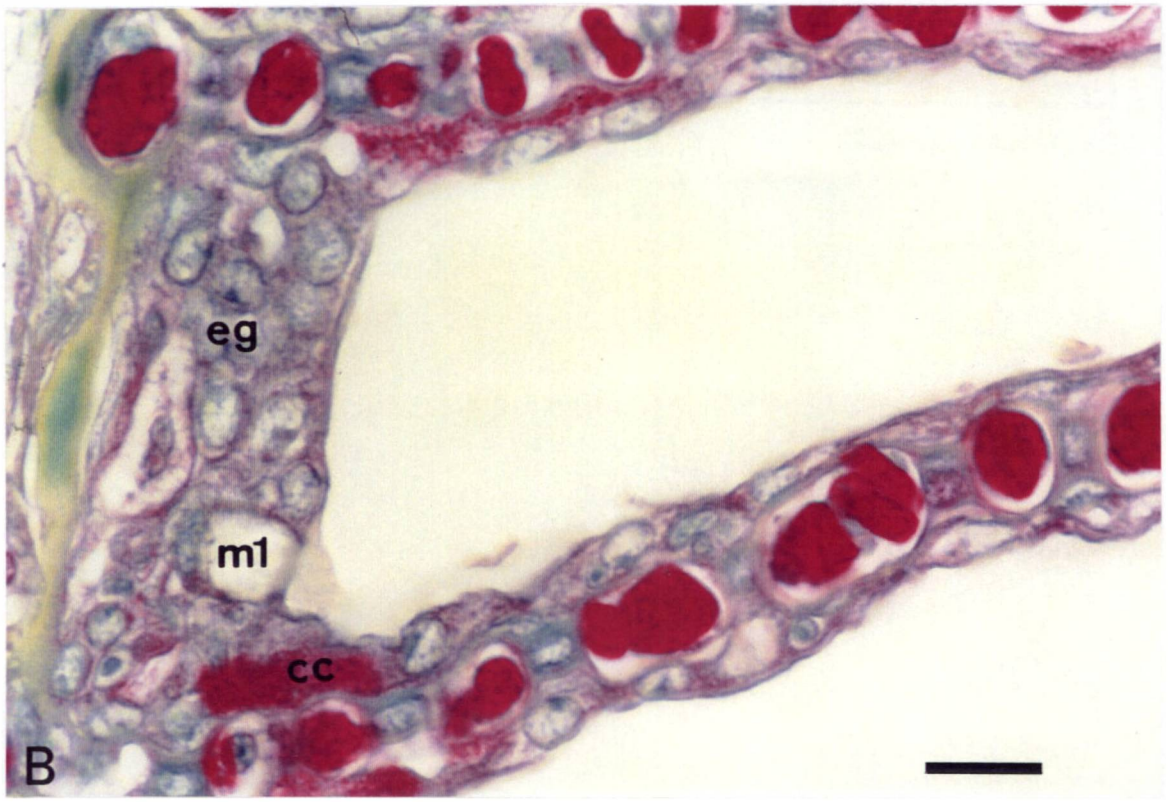


FIGURA 21

Gráfico da densidade de células de cloreto (número de células em um plano de corte histológico) em animais controle (água do mar) e experimentais expostos a salinidade 17 ‰. Os valores são média $\pm$ erro padrão da média, o número de animais está entre parênteses sobre cada barra (n). O asterisco indica diferença significativa em relação ao respectivo controle, sendo significativo valores de $P \leq 0,05$.

FIGURA 21

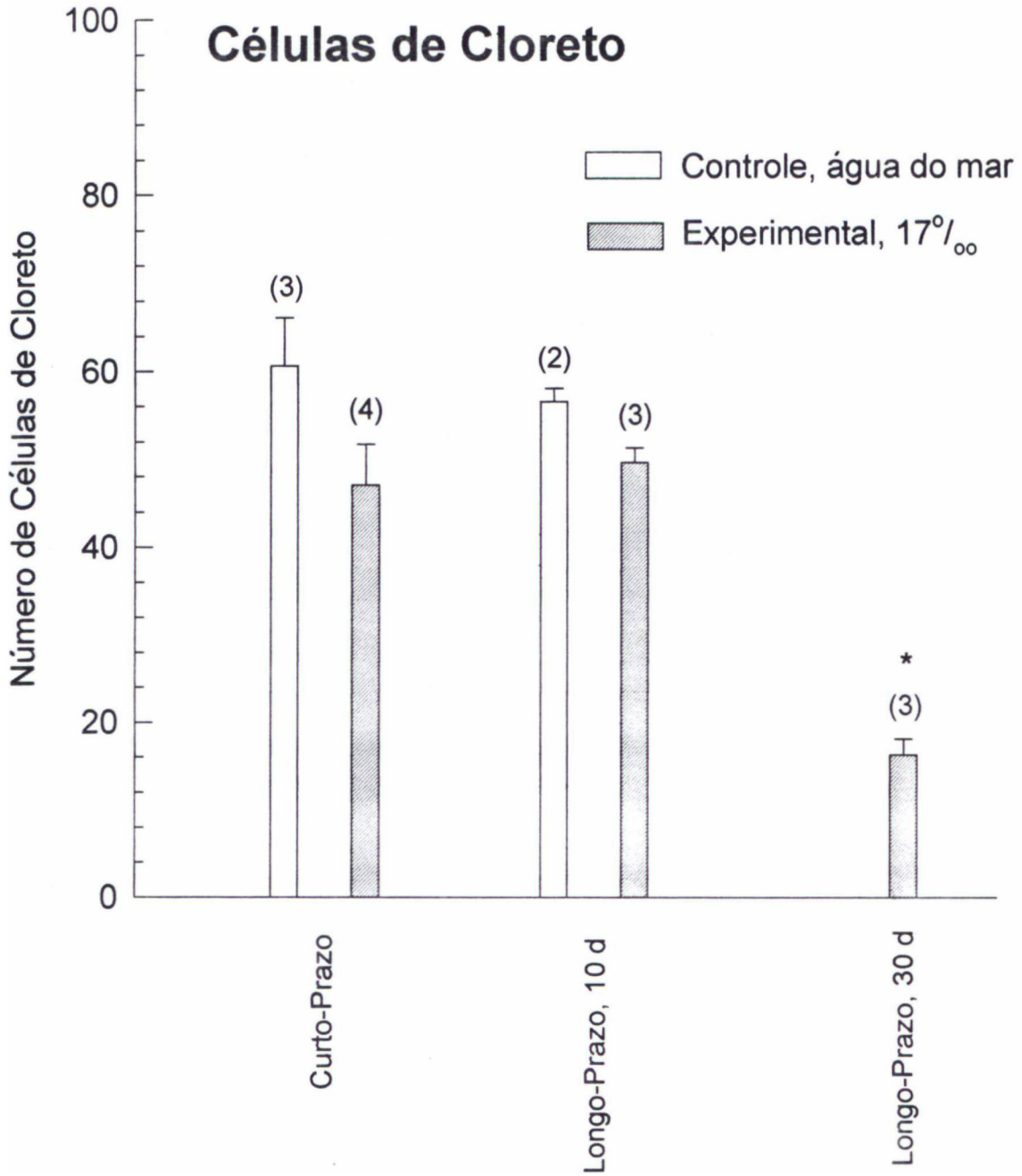

Células de Cloreto
Controle, água do mar
Experimental, 17°/oo
Número de Células de Cloreto
100
80
60
40
20
0
(3)
(4)
(2)
(3)
*
(3)
Curto-Prazo
Longo-Prazo, 10 d
Longo-Prazo, 30 d

FIGURA 22

A: Corte da região do rim posterior, identificando-se túbulos principais (**p**), túbulos intermediários (**i**) e túbulos coletores (**c**). Observa-se também vasos sinusóides (**s**).

Coloração: Hematoxilina e Eosina

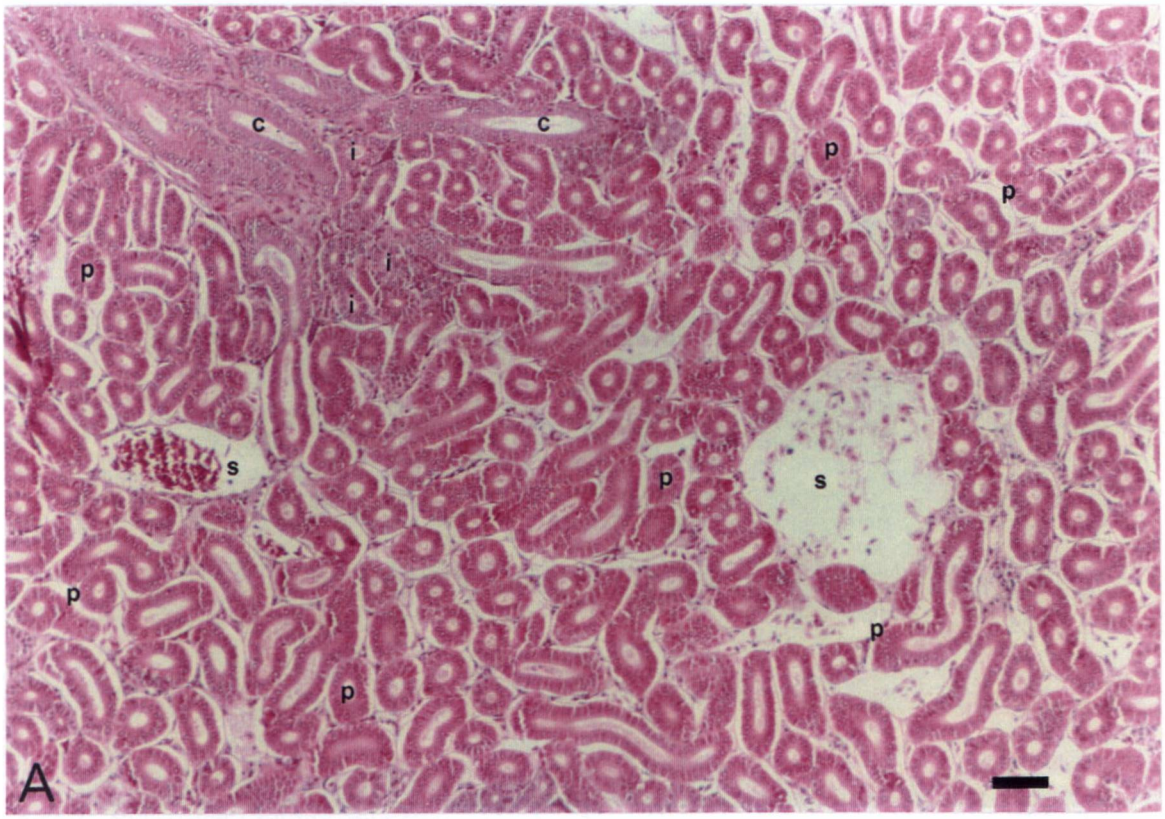
Escala: 50 μm

B: Túbulos principais (**p**), túbulos intermediários (**i**) e túbulos coletores (**c**). Evidencia-se grande quantidade de capilares sanguíneos entre os túbulos principais (↓).

Coloração: Hematoxilina e Eosina

Escala: 50 μm

FIGURA 22



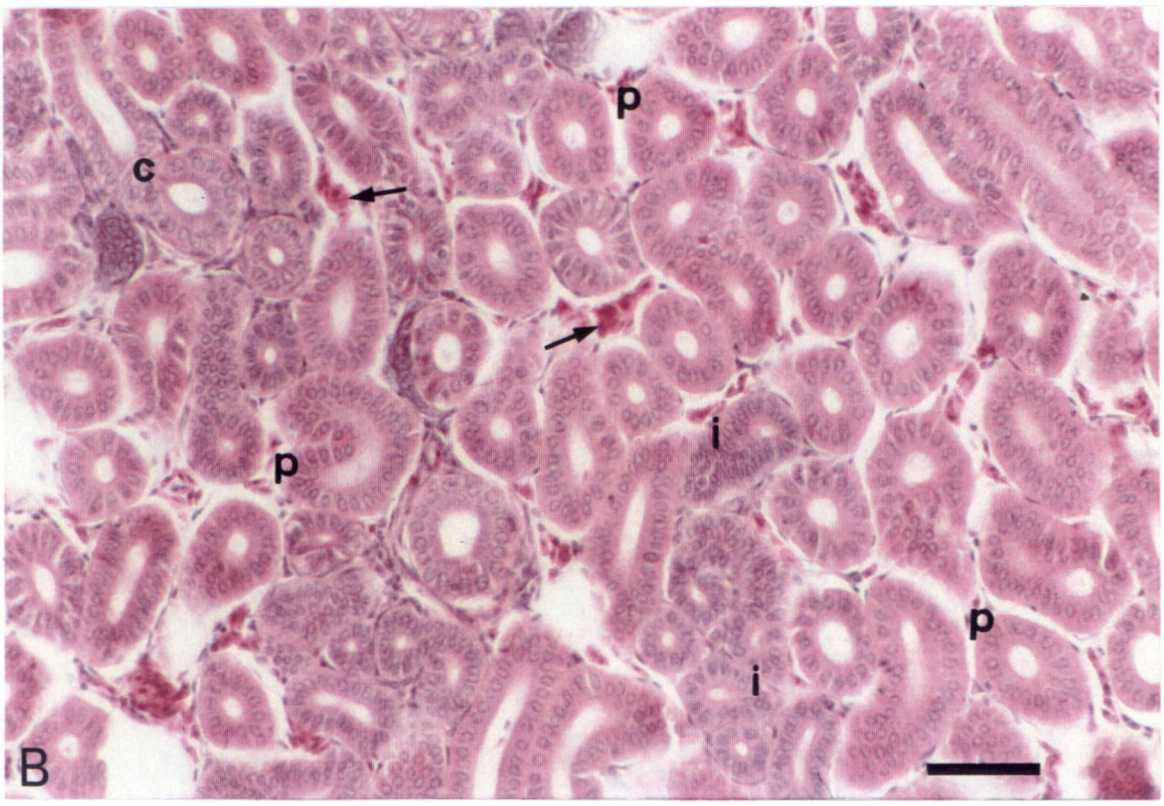


FIGURA 23

A: Túbulos principais onde observa-se núcleos centrais (**n**), borda em escova (**b**), capilar sanguíneo entre os tubulos (**cs**).
Coloração: Hematoxilina e Eosina
Escala: 10 μm

B: Túbulos principais identificando-se grande quantidade de mitocôndrias (**mi**), devido à reação positiva para fucsina ácida.
Coloração: Novelli
Escala: 10 μm

C: Túbulos principais identificando-se borda em escova (**b**).
Coloração: PAS/ Verde Luz
Escala: 10 μm

FIGURA 23

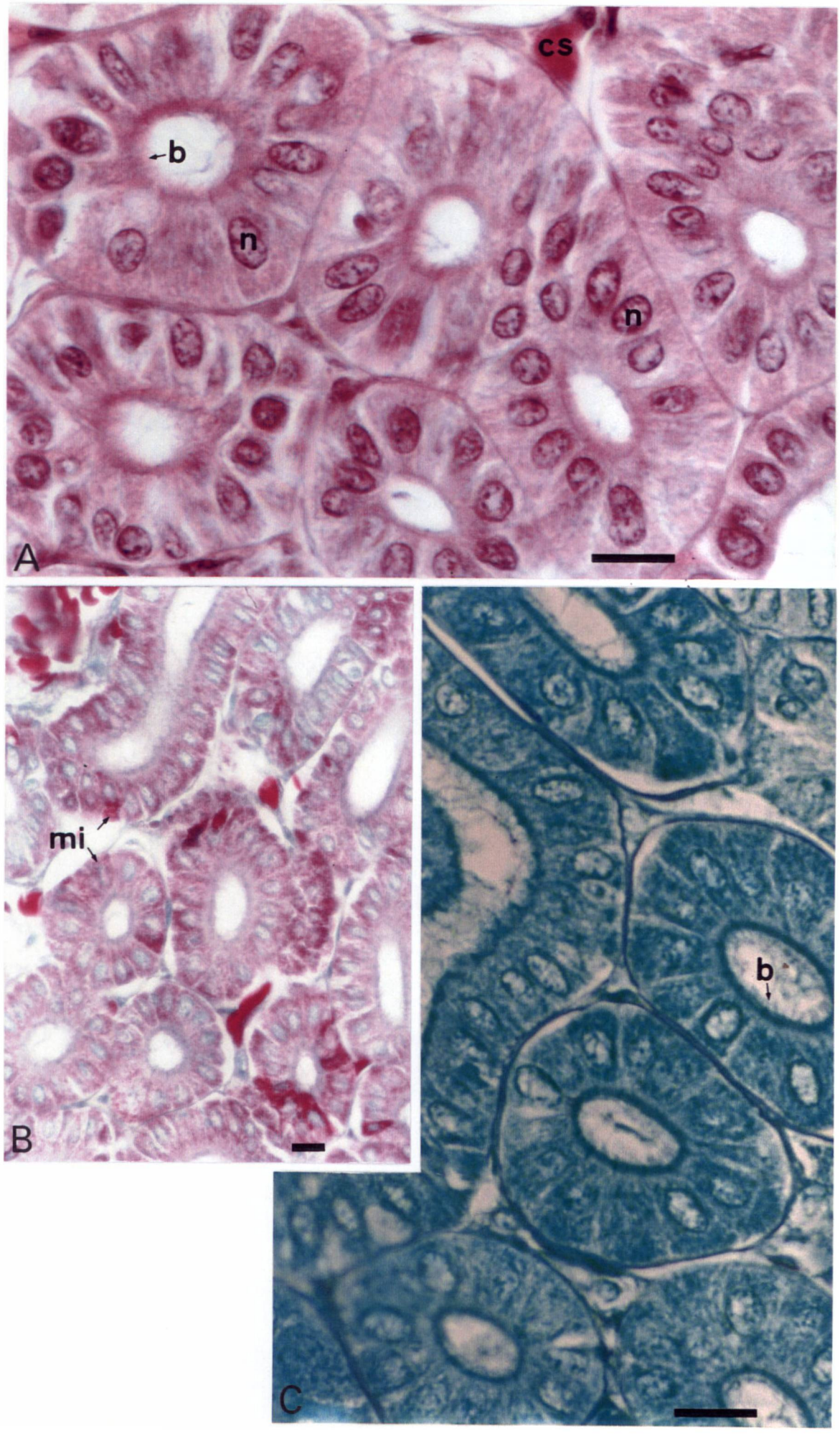


FIGURA 24

A: Túbulos principais identificando-se a borda em escova (**b**).

Microscopia eletrônica de varredura

Escala: 10 μm

B: Detalhe da luz do túbulo principal evidenciando-se borda em escova (**b**) e cílios (**ci**).

Microscopia eletrônica de varredura

Escala: 1 μm

C: Corte longitudinal do túbulo principal identificando-se borda em escova (**b**) e cílios (**ci**).

Microscopia eletrônica de varredura

Escala: 1 μm

D: Túbulo principal onde é observado apenas borda em escova (**b**).

Microscopia eletrônica de varredura

Escala: 10 μm

FIGURA 24

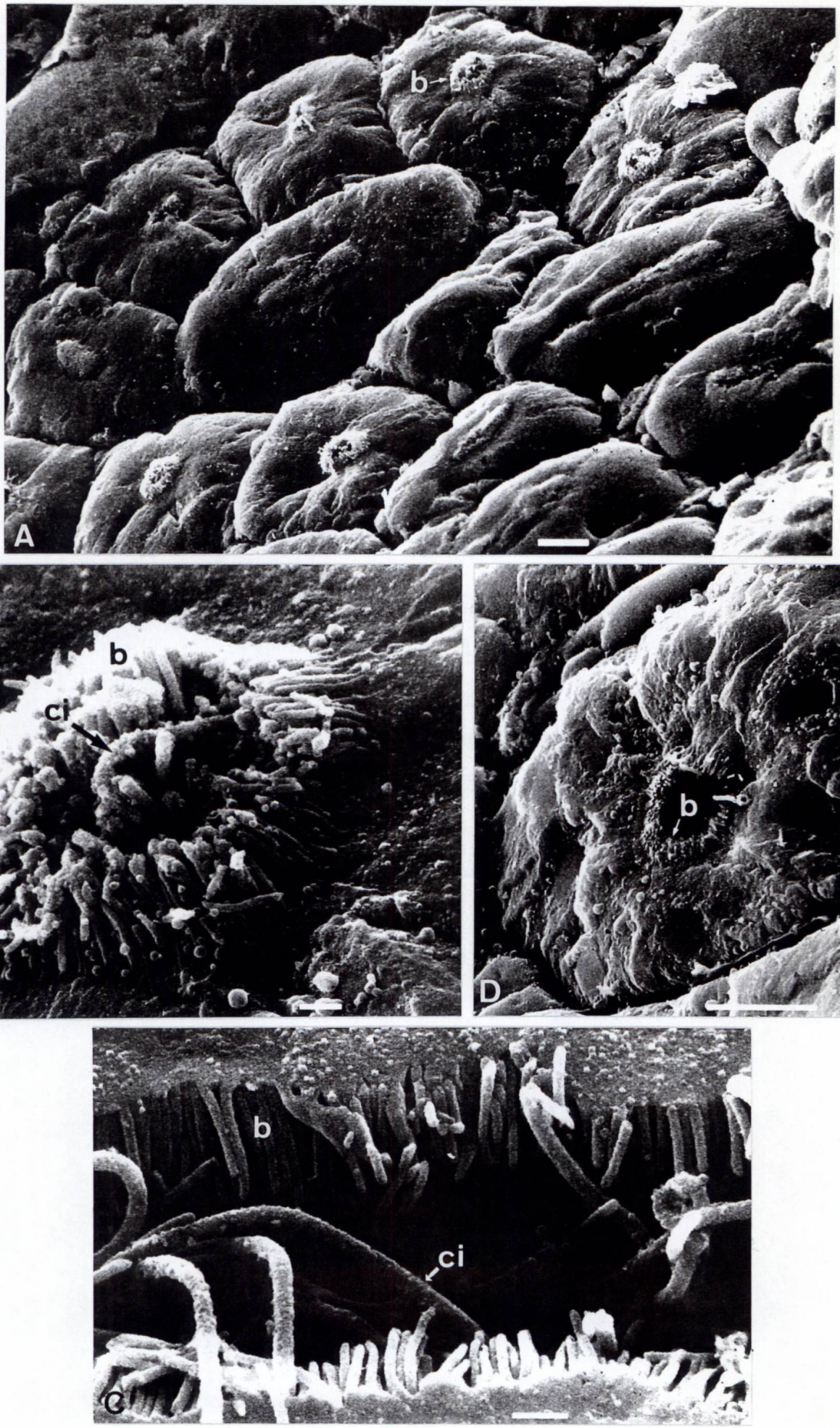
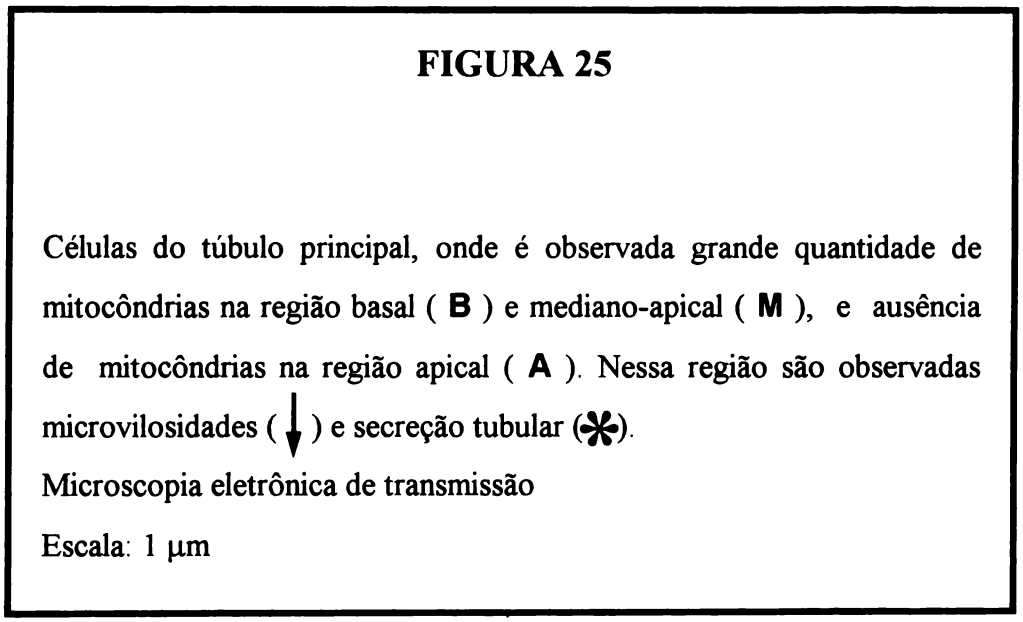


FIGURA 25



Células do túbulo principal, onde é observada grande quantidade de mitocôndrias na região basal (**B**) e mediano-apical (**M**), e ausência de mitocôndrias na região apical (**A**). Nessa região são observadas microvilosidades (↓) e secreção tubular (✱).

Microscopia eletrônica de transmissão

Escala: 1 μm

FIGURA 25

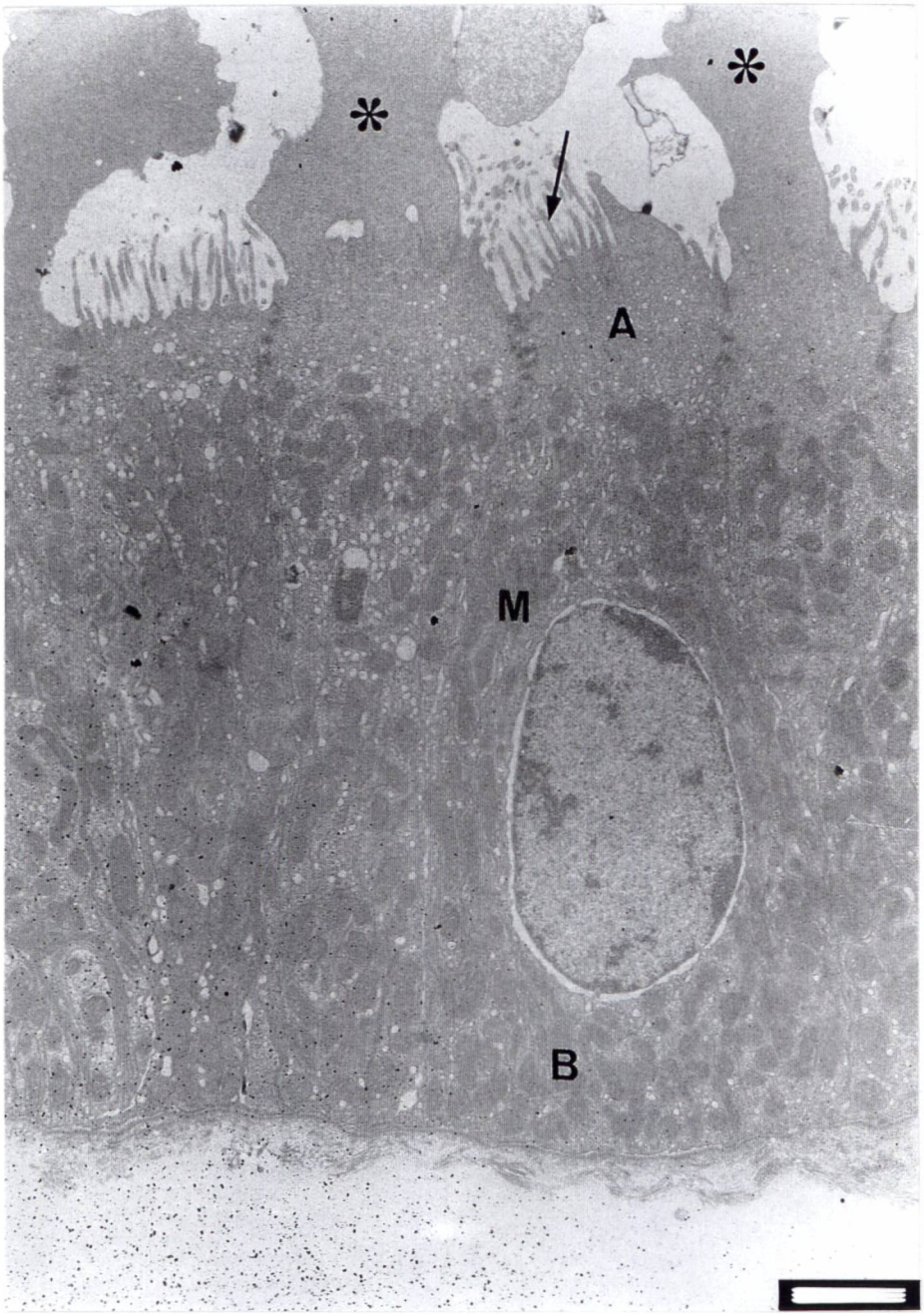


FIGURA 26

A: Região apical de uma célula do túbulo principal, mostrando complexo juncional (**cj**) seguido de dois desmossomas ponto (**dp**). No citoplasma é observado um sistema de vesículas (**v**) e uma região de substância amorfa, indicando secreção celular (✱).
Microscopia eletrônica de transmissão
Escala: 0,5 μm

B: Região perinuclear superior de uma célula do túbulo principal, indicando retículo endoplasmático rugoso (**rr**) e mitocôndrias (**mi**).
Microscopia eletrônica de transmissão
Escala: 0,2 μm

C: Região basal, onde se observa grande quantidade de mitocôndrias (**mi**) envoltas por dobras da membrana plasmática basal (→). São observadas ainda vesículas nesta região (**v**).
Microscopia eletrônica de transmissão
Escala: 0,5 μm

FIGURA 26

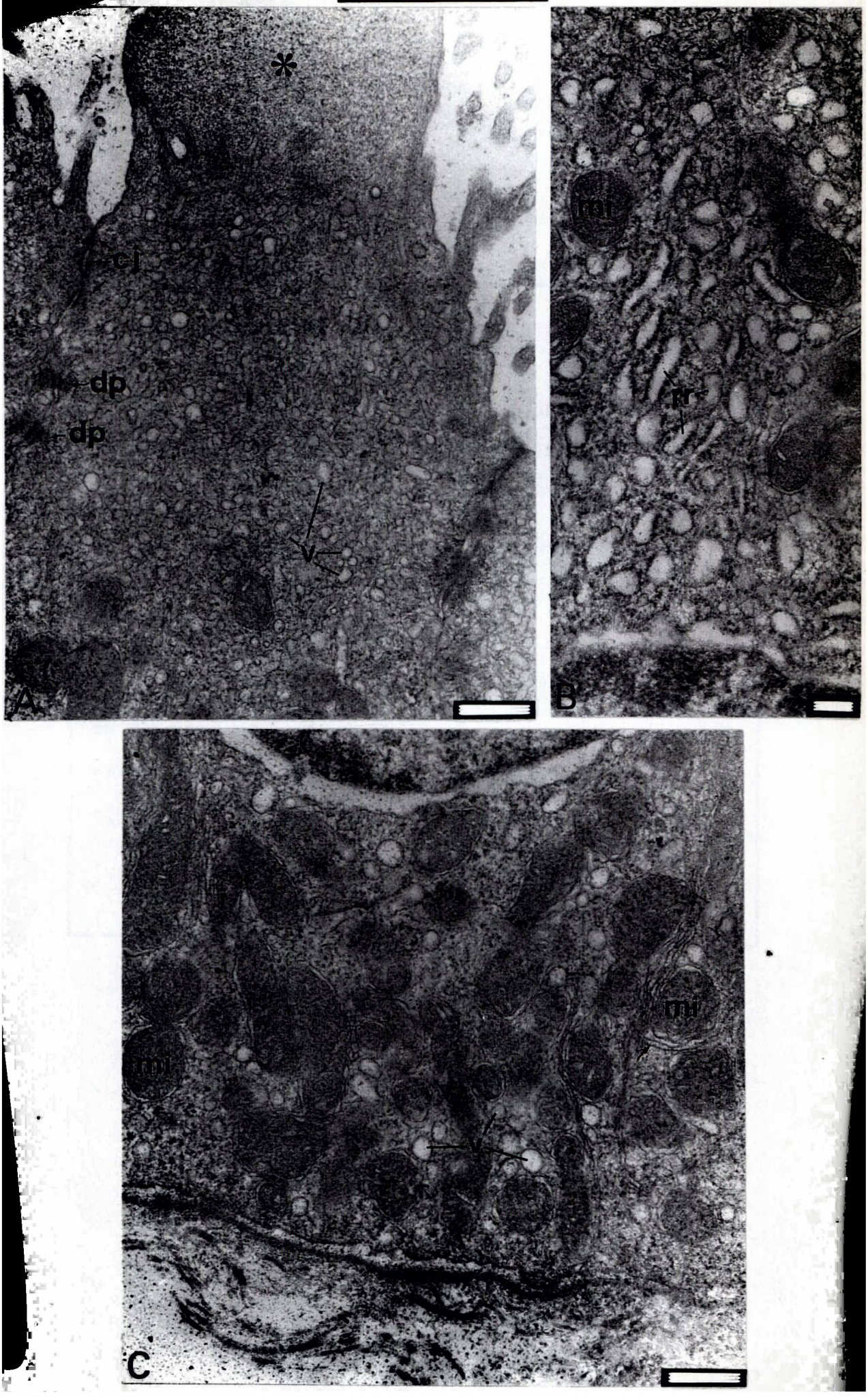


FIGURA 27

A: São observados túbulos principais (**p**) evidenciados por grande quantidade de mitocôndrias (**mi**), túbulos intermediários com pequena quantidade de mitocôndrias (**i**) e túbulos coletores (**c**) com pequena quantidade de mitocôndrias, envoltos por uma fina camada celular.

Coloração: Novelli

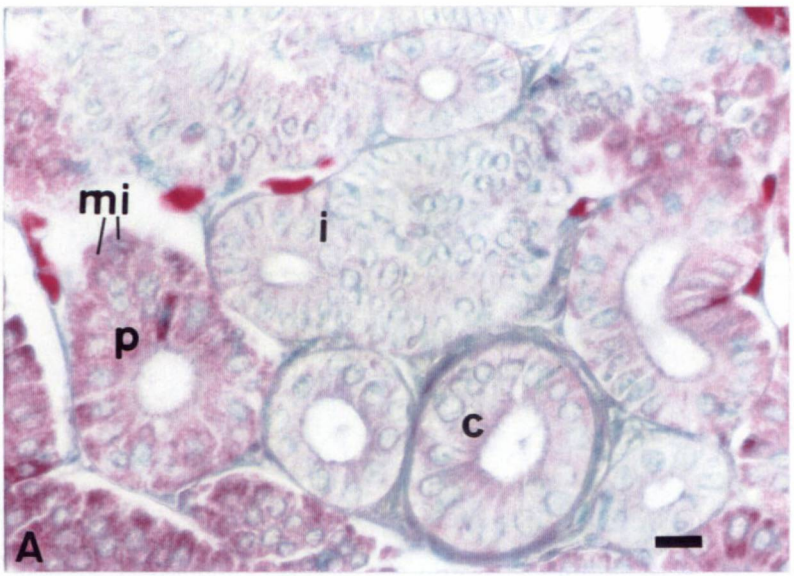
Escala: 10 μm

B: São obervados túbulos principais devido a borda em escova (**b**) e túbulo intermediário (**i**) diferenciado pela ausência de borda em escova e pequeno diâmetro da luz.

Microscopia eletrônica de varredura

Escala: 10 μm

FIGURA 27



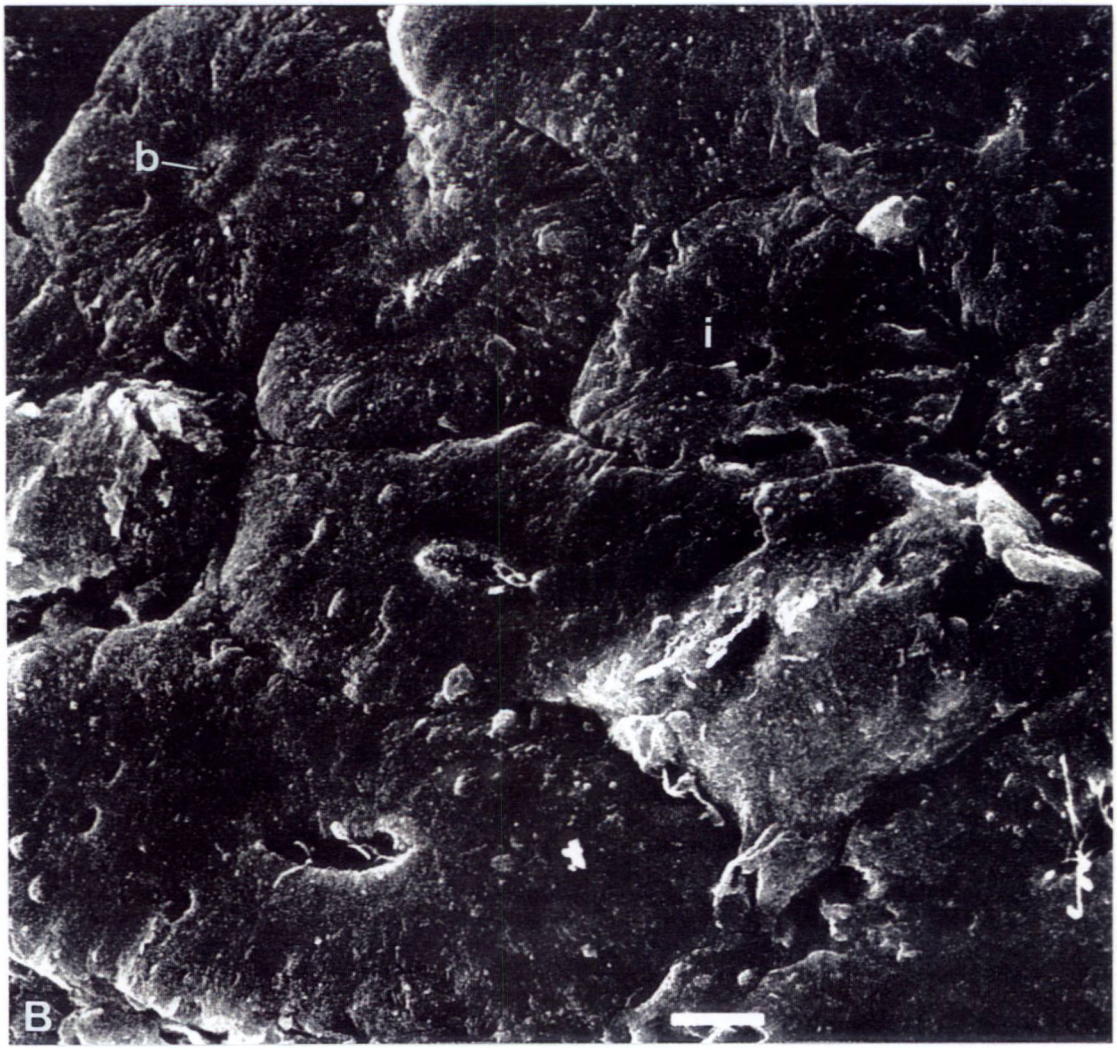


FIGURA 28

A: São observados túbulos principais (**p**), túbulo intermediário (**i**) e túbulos coletores (**c**). Nota-se produção de glicosaminoglicanas neutras na região apical do túbulo coletor, evidenciado pela reação positiva ao reativo de Shiff (↓).

Coloração: PAS

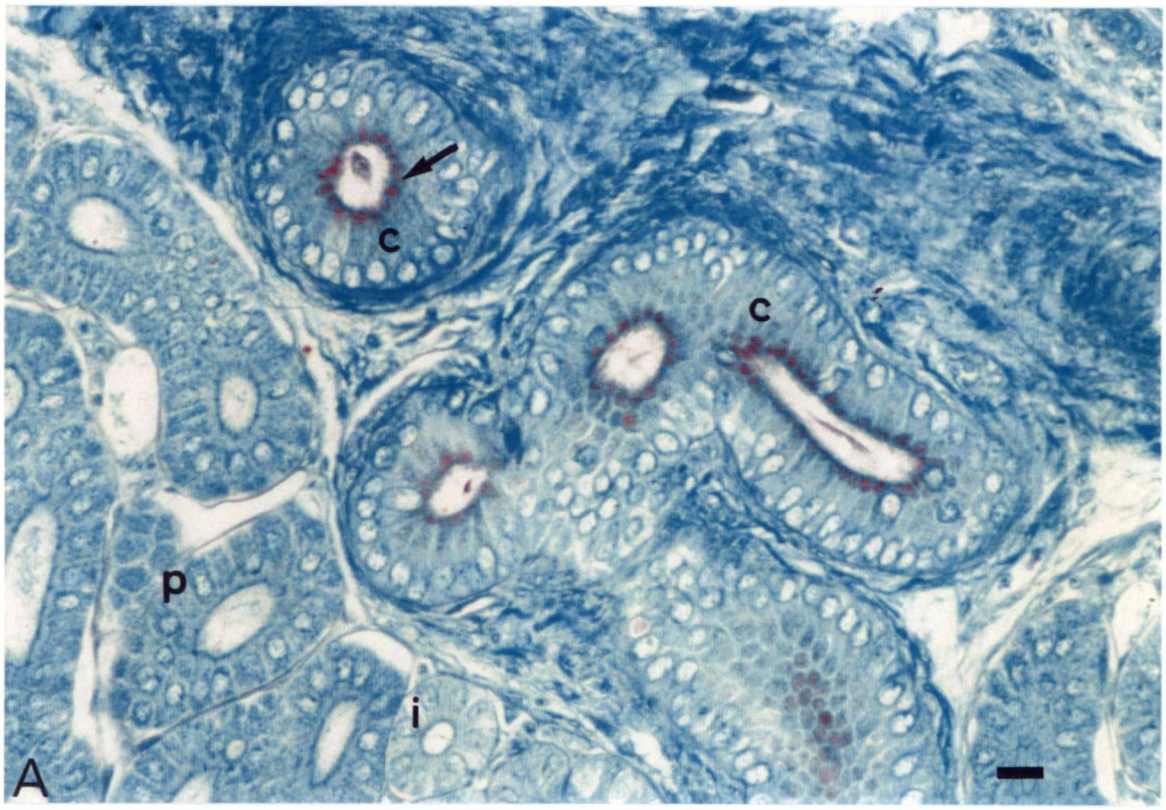
Escala: 10 μm

B: Túbulo coletor evidenciado pela posição basal do núcleo e reação positiva ao Alcian Blue pH 2,5 (↓).

Coloração: Alcian Blue pH 2,5

Escala: 10 μm

FIGURA 28



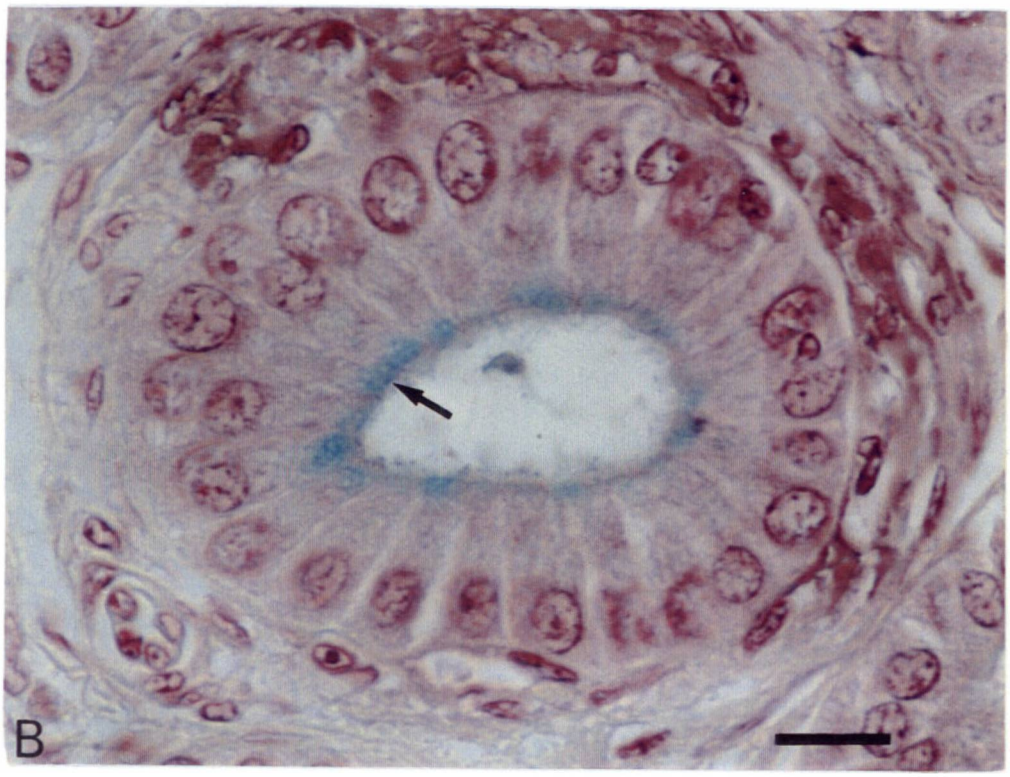


FIGURA 29

A: Túbulo coletor evidenciando secreção tubular (➧).

Microscopia eletrônica de varredura

Escala: 10 μm

B: Detalhe do epitélio do túbulo coletor, com células colunares (✻), núcleo basal (★) e secreção na região apical (➧).

Coloração: Hematoxilina e Eosina

Escala: 10 μm

C: Epitélio do túbulo coletor evidenciando células com produção de glicosaminoglicanas neutras na região apical (↓) e células com secreção de outra natureza (➧).

Coloração: PAS

Escala: 10 μm

FIGURA 29

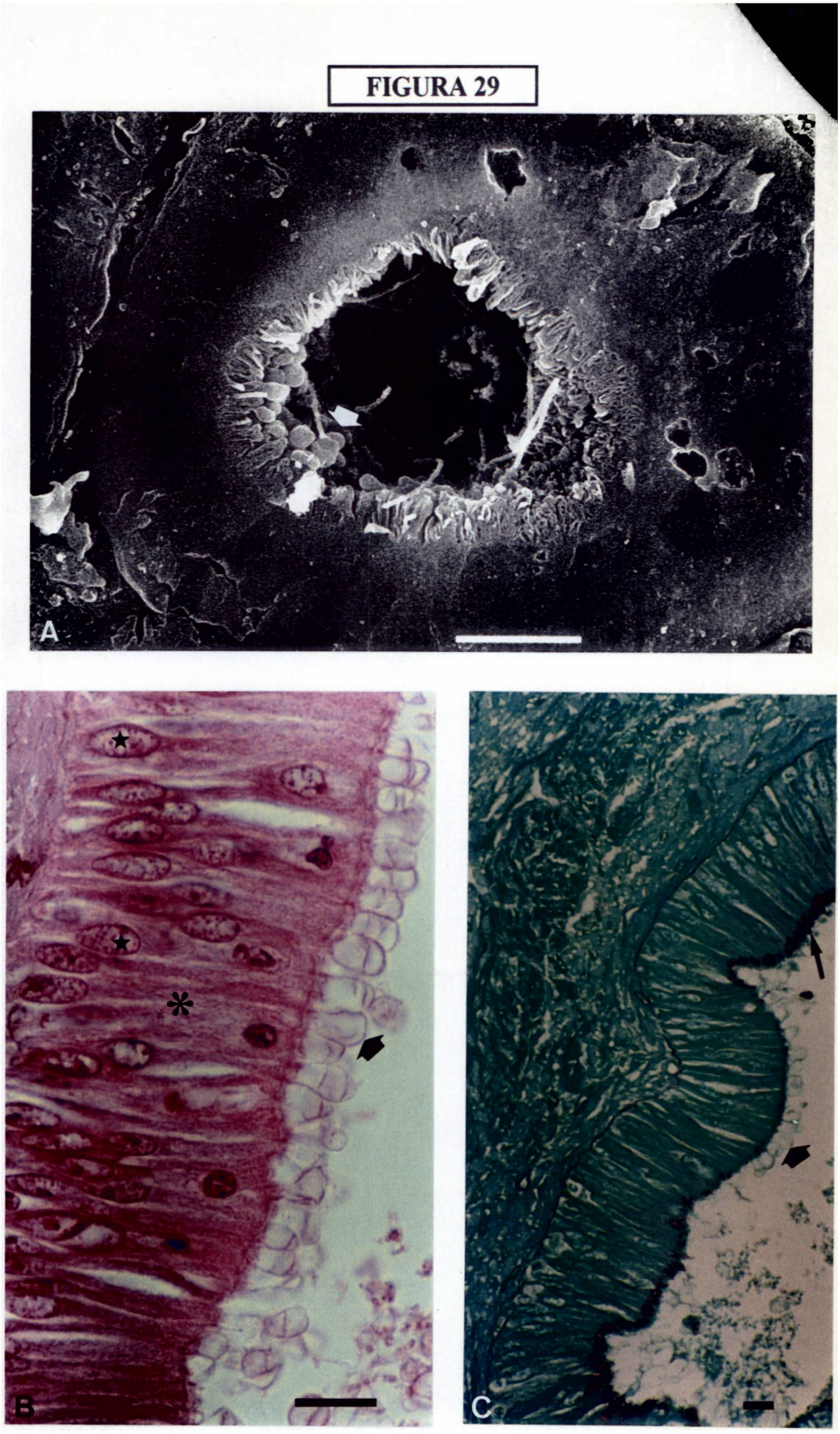


FIGURA 30

A: Corte da bexiga urinária onde observa-se camada epitelial (**e**), camada conjuntiva (**co**) seguida de uma camada muscular longitudinal ao corte (**ml**) e uma camada muscular transversal ao corte (**mt**). Notar as vilosidades no epitélio da luz da bexiga.
Coloração: Hematoxilina e Eosina
Escala: 10 μm

B: Epitélio da luz da bexiga evidenciando as vilosidades do órgão, e grande secreção celular (**sc**).
Microscopia Eletrônica de Varredura
Escala: 100 μm

FIGURA 30

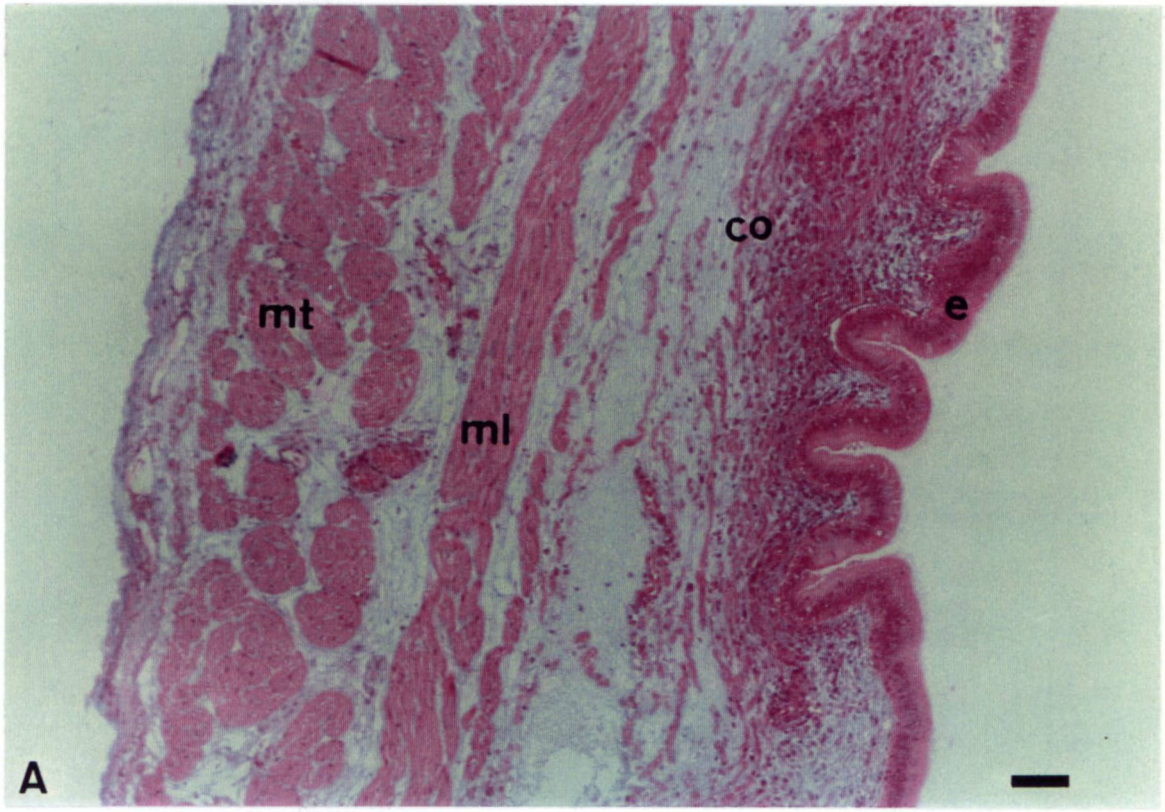


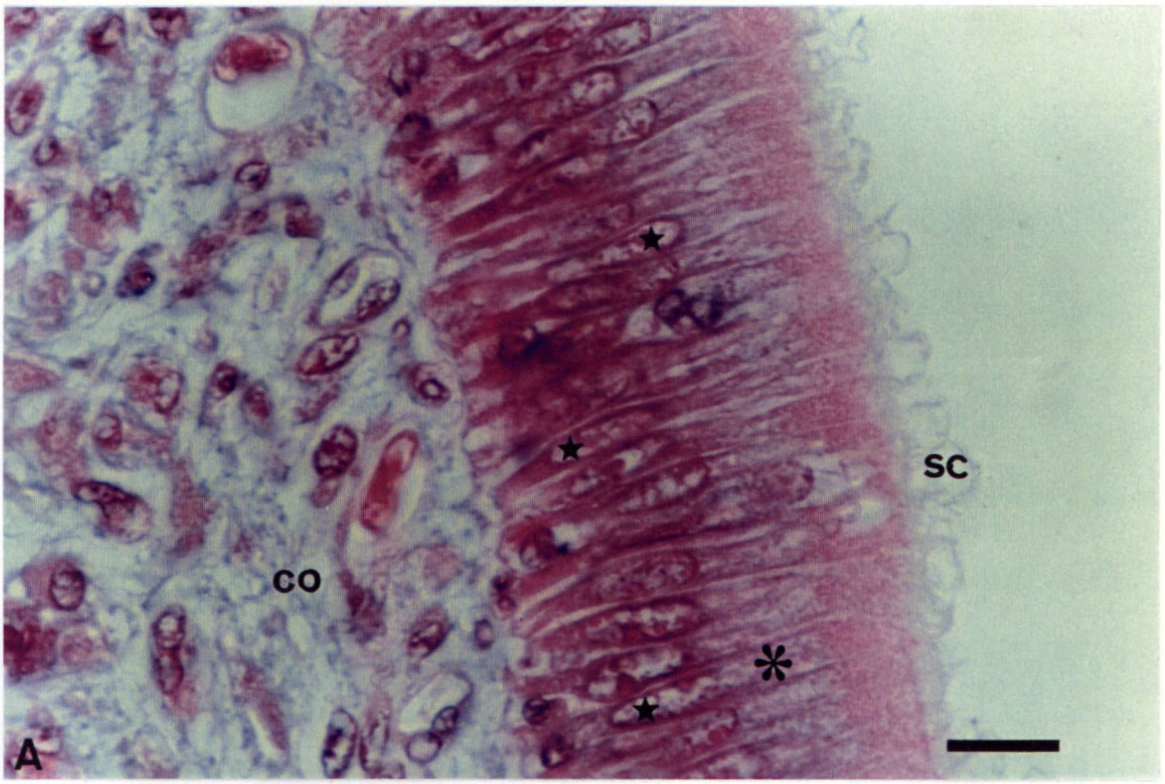
FIGURA 31

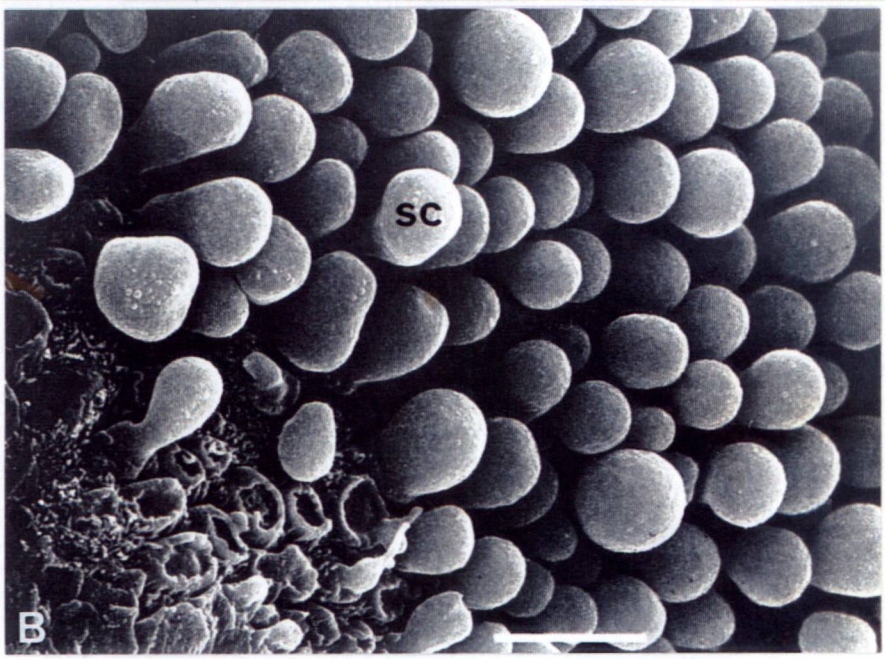
A: Epitélio da luz da bexiga identificando-se as células colunares (✻) com núcleos mediano-basais (★) e secreção celular (**sc**). Abaixo desse epitélio observa-se um tecido conjuntivo com grande irrigação sangüínea (**co**).
Coloração: Hematoxilina e Eosina
Escala: 10 μm

B: Superfície do epitélio da bexiga, evidenciando grande secreção celular (**sc**).
Microscopia eletrônica de varredura
Escala: 10 μm

C: Superfície do epitélio da bexiga, mostrando microvilosidades (➧) e secreção celular (**sc**).
Microscopia eletrônica de varredura
Escala: 1 μm

FIGURA 31





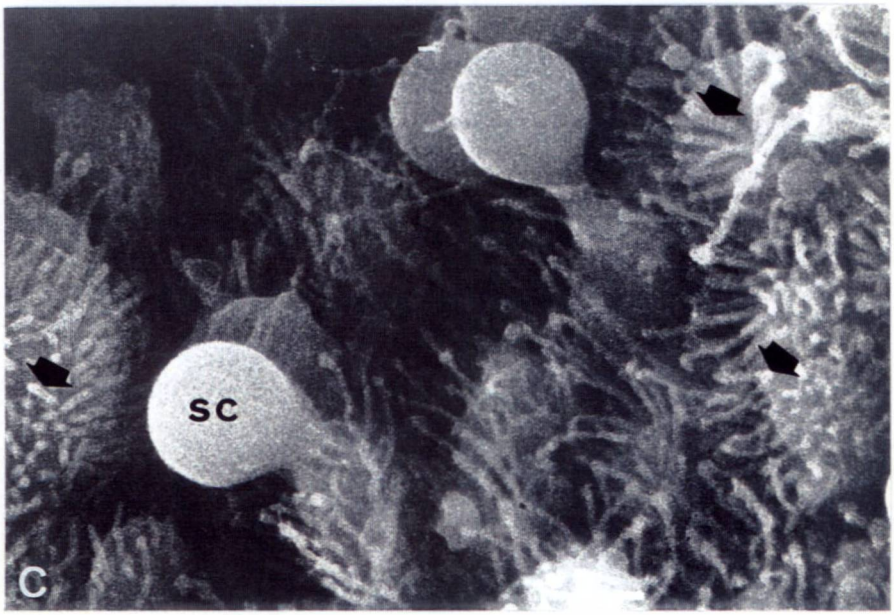


FIGURA 32

Gráfico da concentração de cloreto em soro e urina (nM) de animais expostos a salinidade 17‰ curto-prazo (1 a 6 horas), longo-prazo (10 dias) e longo-prazo (30 dias). Os valores são média $\pm$ erro padrão da média, o número de animais está entre parênteses sobre cada barra (n). O asterisco indica diferença significativa em relação ao respectivo controle, sendo significativo valores de $P \leq 0,05$.

FIGURA 32

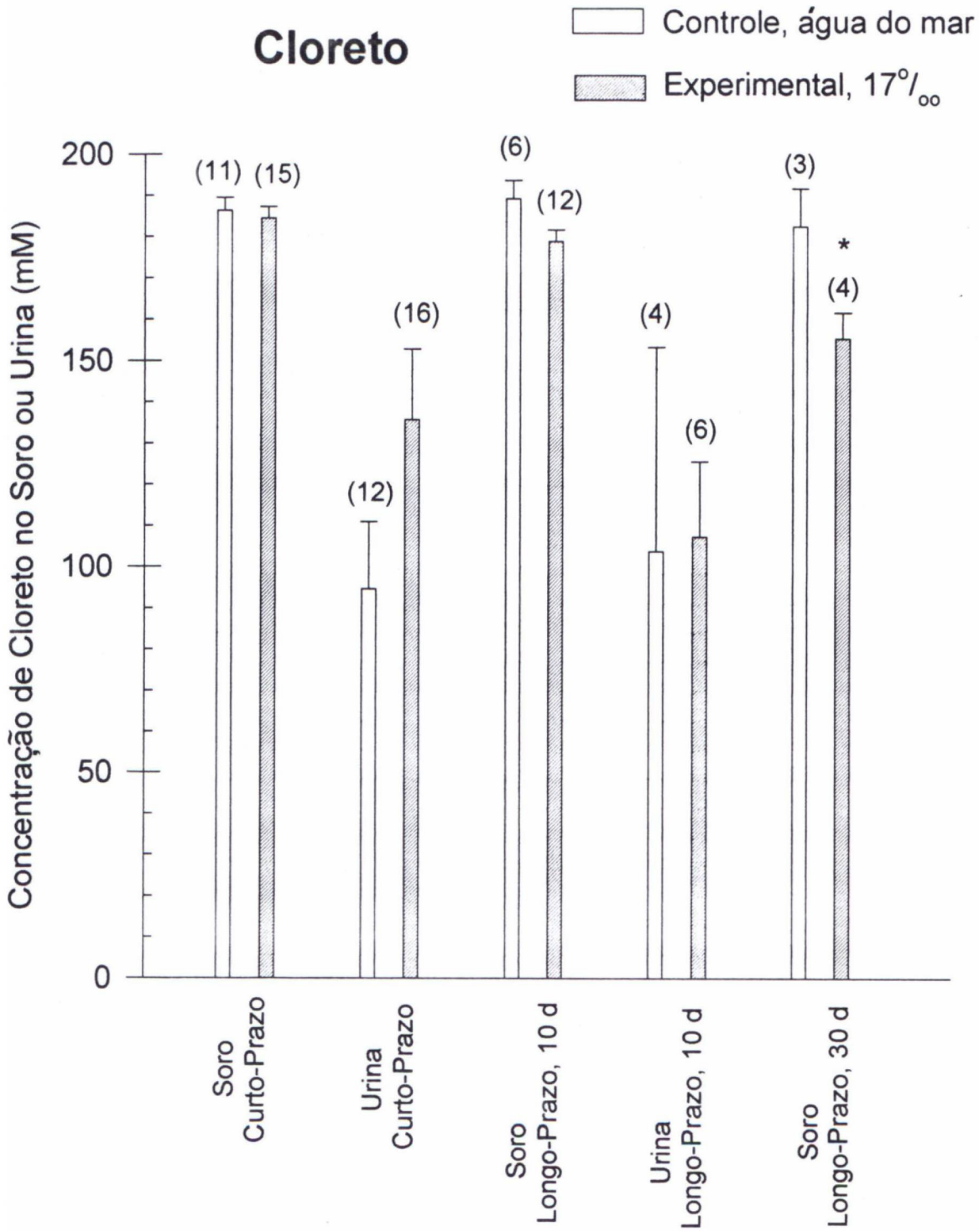

Cloreto
Controle, água do mar
Experimental, 17°/oo
Concentração de Cloreto no Soro ou Urina (mM)
200
150
100
50
0
(11)
(15)
(12)
(16)
(6)
(12)
(4)
(6)
(3)
*
(4)
Soro Curto-Prazo
Urina Curto-Prazo
Soro Longo-Prazo, 10 d
Urina Longo-Prazo, 10 d
Soro Longo-Prazo, 30 d

FIGURA 33

Gráfico da concentração de sódio em soro e urina (mM) de animais expostos a salinidade de 17‰ curto-prazo (1 a 6 horas), longo-prazo (10 dias) e longo-prazo (30 dias). Os valores são média ± erro padrão da média, o número de animais está entre parênteses sobre cada barra (n).

FIGURA 33

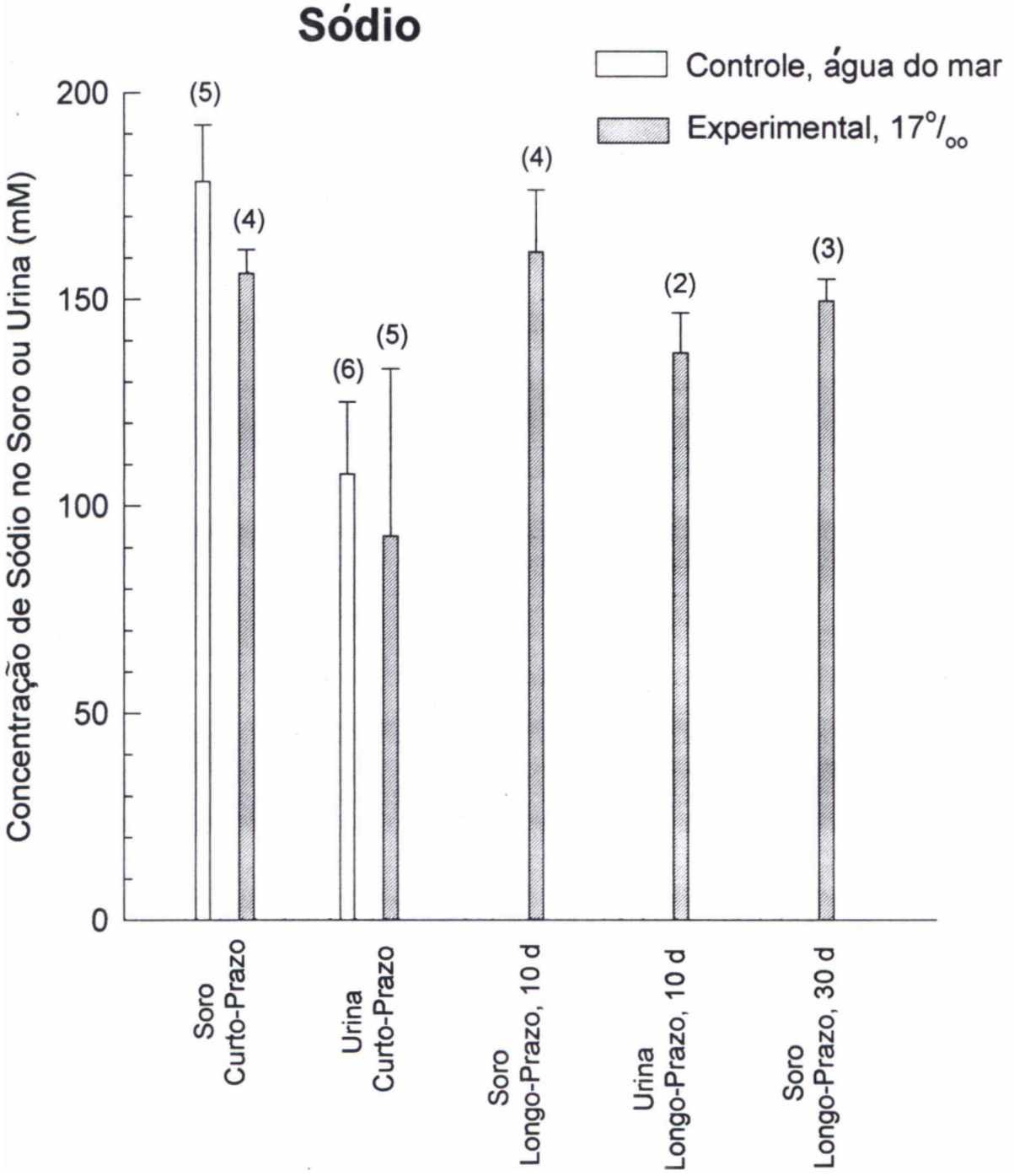

Sódio
Controle, água do mar
Experimental, 17°/oo
Concentração de Sódio no Soro ou Urina (mM)
200
150
100
50
0
(5)
(4)
(6)
(5)
(4)
(2)
(3)
Soro Curto-Prazo
Urina Curto-Prazo
Soro Longo-Prazo, 10 d
Urina Longo-Prazo, 10 d
Soro Longo-Prazo, 30 d

FIGURA 34

Gráfico da concentração de magnésio em soro e urina (mM) de animais expostos a salinidade de 17‰ curto-prazo (1 a 6 horas), longo-prazo (10 dias) e longo-prazo (30 dias). Os valores são média $\pm$ erro padrão da média, o número de animais está entre parênteses sobre cada barra (n). O asterisco indica diferença significativa em relação ao respectivo controle, sendo significativo valores de $P \leq 0,05$.

FIGURA 34

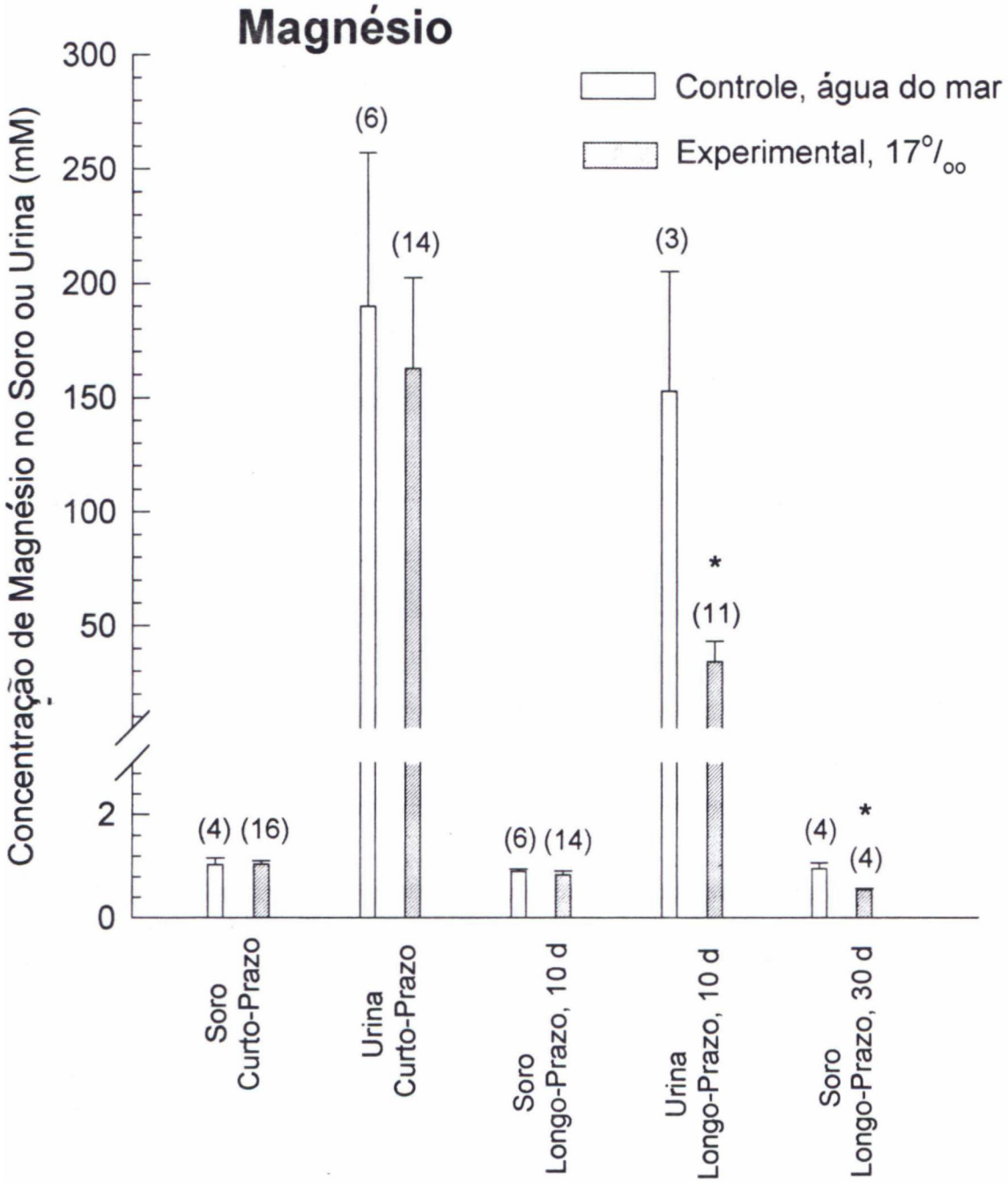
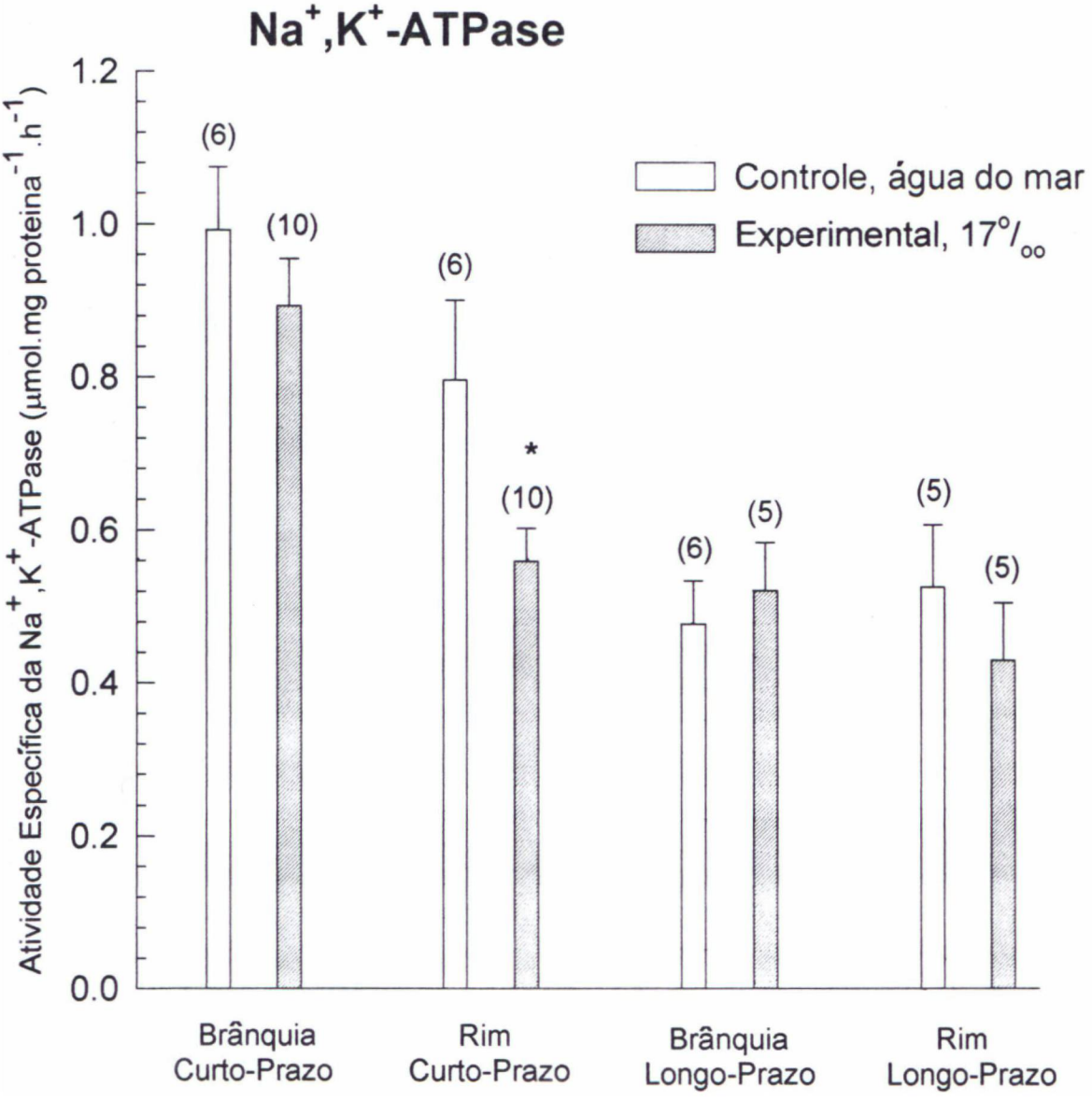

Magnésio
Controle, água do mar
Experimental, 17°/oo
Concentração de Magnésio no Soro ou Urina (mM)
300
250
200
150
100
50
2
0
(4) (16)
(6)
(14)
(6) (14)
(3)
(11)
*
(4)
(4)
*
Soro Curto-Prazo
Urina Curto-Prazo
Soro Longo-Prazo, 10 d
Urina Longo-Prazo, 10 d
Soro Longo-Prazo, 30 d

FIGURA 35

Gráfico da atividade específica da enzima Na^{+}, K^{+}-ATPase (μmol.mg proteína^{-1}.h^{-1}) em homogenizado branquial e renal de animais controle (água do mar) e experimentais (salinidade 17‰) a curto-prazo (1 a 6 horas) e longo-prazo (10 dias). Os valores são média ± erro padrão da média, o número de animais está entre parênteses sobre cada barra (n). O asterisco indica diferença significativa em relação ao respectivo controle, sendo significativo valores de $P \leq 0,05$.

FIGURA 35


Na+,K+-ATPase
Atividade Específica da Na+,K+-ATPase (µmol.mg proteina-1.h-1)
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
(6)
(10)
(6)
*
(10)
(6)
(5)
(5)
(5)
Controle, água do mar
Experimental, 17°/oo
Brânquia Curto-Prazo
Rim Curto-Prazo
Brânquia Longo-Prazo
Rim Longo-Prazo

5. DISCUSSÃO

O número de gêneros e espécies de Notothenioidei na Antártica varia de acordo com os autores, com as recentes descrições de novas espécies, assim como com problemas sistemáticos dentro dos gêneros. Como exemplo pode citar-se a questão da espécie *Notothenia neglecta*, que aparentemente é a mesma espécie que *Notothenia coriiceps*, sendo apenas encontradas em áreas distintas. Assim, consideramos a espécie deste trabalho como *Notothenia neglecta* Nybelin, 1951, de acordo com a descrição apresentada por FISHER e HUREAU (1985).

O decréscimo da salinidade no oceano Antártico está relacionado com o intenso degelo que ocorre durante o verão. As alterações no oceano são amenas devido à grande movimentação da água, porém oscilações maiores podem ser observadas em regiões rasas, próximas à costa, principalmente em baías ou enseadas com alta influência de glaciares e menor circulação d'água. Na Baía do Almirantado estas oscilações podem fazer a salinidade chegar a níveis bastante baixos. Em camadas superficiais próximas à margem, a salinidade pode flutuar entre 16,4 e 34,16 $^{o}/_{oo}$. No centro da baía foram realizadas medidas em profundidades de até 400 m, onde foram encontrados valores de até 32$^{o}/_{oo}$ (RAKUSA-SUSZCZEWSKI, 1993). O peixe *Notothenia neglecta* pode ser encontrado em regiões bem próximas à costa (ZADRÓSNY, 1996), indicando a possibilidade de que esta espécie realmente enfrenta decréscimo de salinidade no seu ambiente natural, com a capacidade de adaptar-se à estas variações temporárias de salinidade. Este fato poderia explicar por que *N. neglecta* é uma das espécies dominantes em ambientes mais rasos. Estas informações prévias foram o motivo pelo qual a espécie *N. neglecta* foi escolhida para a realização deste trabalho.

Peixes eurihalinos têm a capacidade de sobreviver à variação de salinidade enquanto peixes ditos estenohalinos não sobrevivem às variações salinas (SCHMIDT-NIELSEN, 1996). Dentro da definição de peixes eurihalinos pode-se encontrar inúmeras faixas de atuação, ou seja, faixas de salinidade em que estes peixes podem realizar as mudanças necessárias no mecanismo de regulação iônica e osmótica para garantir sua sobrevivência. A faixa de variação salina na qual um

peixe tem a capacidade de adaptar-se depende da espécie (WOO e FUNG, 1981; NORDLIE, 1987; PLAZA-YGLESIAS *et al.*, 1988; VENTURINE *et al*, 1992). Dentro da faixa de salinidade em que uma determinada espécie pode realizar a regulação iônica e osmótica, esta regulação pode ocorrer totalmente (sem alteração da concentração iônica) ou parcialmente (a concentração iônica fica dentro de uma faixa fisiologicamente viável para a espécie). *Notothenia neglecta* mostrou-se apta a suportar grandes variações de salinidade ($10^{o}/_{oo}$, 17 $^{o}/_{oo}$ e $30^{o}/_{oo}$) durante períodos relativamente longos (30 dias). Observou-se um pequeno grau de estresse já que os espécimes mantiveram seu comportamento alimentar inalterado. Desta forma pôde-se identificar *N. neglecta* como um peixe eurihalino dentro dos valores salinos e dos períodos testados. Baseado nos valores osmóticos médios encontrados na literatura para peixes antárticos notothenideos em salinidade ambiental (384-656 mOsm/L) e nos valores osmóticos da água do mar (1016-1032 mOsm/L) (DOBBS e DeVRIES, 1975), os valores salinos adotados nos testes com *N. neglecta* podem ser considerados hiposmótico ($30^{o}/_{oo}$-877 mOsm/L), aproximadamente isosmótico ($17^{o}/_{oo}$-497 mOsm/L) e hiperosmótico ($10^{o}/_{oo}$- 292 mOsm/L) do animal em relação à água de teste. Peixes como a espécie *Chrysophrys major* têm a capacidade de realizar regulação osmótica e iônica quando hiperosmóticos ou isosmóticos ao ambiente, porém não sobrevivem quando hiposmóticos (WOO e FUNG, 1981). Segundo EASTMAN (1993) apenas uma espécie de peixe da família Notothenidae, *Eleginops maclovinus*. é reconhecida como eurihalina, não sendo esta, entretanto, uma espécie antártica. Porém, testes realizados com três espécies de peixes antárticos da família Nototheniidae indicam que estes peixes são osmorreguladores, sobrevivendo a variações de salinidade entre 25% e 175% da salinidade normal da água do mar (O'GRADY e DeVRIES, 1982).

Os principais mecanismos que *N. neglecta* poderia utilizar para adaptar-se a um decréscimo de salinidade podem estar ligados: 1) a alterações bioquímicas e/ou morfológicas nas células de cloreto, reduzindo seu nível de excreção de sal; 2) a ajuste da osmolalidade interna através de osmólitos não iônicos, e 3) a um aumento da captação de íons aliado à excreção de urina diluída. Assim foram estudados parâmetros morfológicos das brânquias e rins, e foram feitas dosagens iônicas (Cl^{-},

Na^+ e Mg^+) no soro e na urina, sendo também determinada a atividade de Na^+, K^+-ATPase em homogenizado de rins e brânquias de animais do grupo controle e do grupo experimental submetido a decréscimo da salinidade por curto e longo prazo. Buscou-se identificar alterações nestes parâmetros que indicassem ligação com a capacidade de regulação osmótica desta espécie.

Para identificar os diferentes mecanismos que *N. neglecta* utiliza para garantir sua sobrevivência em salinidade reduzida procurou-se trabalhar com uma única salinidade, garantindo-se que esta estivesse longe do limite de sobrevivência da espécie. Assim, as análises morfológicas e bioquímicas foram realizadas em salinidade $17^o/_{oo}$ em testes de curto prazo (1 a 6 horas), nos quais buscou-se detectar se *N. neglecta* apresenta algum mecanismo de ação rápida para garantir a sua adaptação. Os testes de longo prazo (10 e 30 dias), foram efetuados na tentativa de serem evidenciados mecanismos de ação mais tardios que pudessem ser utilizados para garantir sua adaptação à nova condição imposta experimentalmente.

As brânquias de *N. neglecta* apresentam padrão já descrito para teleósteos marinhos (HUGHES e GRIMSTONE, 1965; HUGHES, 1966 e 1984; HUGHES, e BYCZKOWSKA-SMYK, 1974; HUGHES e DATTA-MUNSHI, 1968; LAURENT e DUNEL, 1980; BOYD *et al.*, 1980; HIBIYA, 1982; LAURENT, 1982 e 1984; HUGHES e MONDOLFINO, 1983; HUGHES e UMEZAWA, 1983; LAURENT e DUNEL-ERB, 1984; MAINA, 1990; PERRY, 1997). Em *N. neglecta* são encontrados quatro pares de arcos branquiais, cada um deles contendo duas fileiras de filamentos branquiais, os quais possuem duas fileiras de lamelas secundárias ou lamelas respiratórias, que se projetam nas regiões superior e inferior do filamento.

Foi observado que o epitélio do filamento branquial de *N. neglecta* é estratificado, mas a camada superficial do epitélio é formada por células bastante irregulares que variam de cúbico-pavimentosas a globosas. Esta forma é provavelmente criada pela presença de grande quantidade de células de muco que se abrem para a superfície por entre as células epiteliais, pressionando a região basal destas células. As células superficiais do epitélio foram descritas como pavimentosas por inúmeros autores, para outras espécies (HUGHES e GRIMSTONE, 1965; HUGHES e DATTA-MUNSHI, 1968; LAURENT e DUNEL,

1980; DUNEL-ERB e LAURENT, 1980; HUGHES e UMEZAWA, 1983 e HUGHES e MONDOLFINO, 1983), porém não foi o padrão identificado para *N. neglecta*. Nesta espécie as células superficiais possuem núcleo esférico e não achatado e seu citoplasma projeta-se em direção a região basal do epitélio, entre as células de muco adjacentes. As células epiteliais que formam a superfície do epitélio apresentam inúmeras microssaliências, observadas em microscopia eletrônica de varredura. Estas microssaliências foram descritas por vários autores (HUGHES e MONDOLFINO, 1983; LAURENT, 1984; HOSSLER *et al.*, 1985; HOSSLER *et al.*, 1986) e diferem em forma e tamanho entre as espécies (LAURENT, 1984). O padrão da distribuição das microssaliências é espécie-específico, podendo ser utilizados como característica toxonômica (FISHELSON, 1984). O espaço entre as microssaliências pode aparecer preenchido por muco. A retenção deste muco entre as microssaliências parece ser uma de suas funções (HUGHES, 1982; HOSSLER *et al.*, 1985). Outras funções sugeridas são o aumento da área respiratória e a criação de um local de turbulência da água (HOSSLER *et al.*, 1985). Segundo WHITEAR (1990), as microssaliências não possuem funções específicas, mas sim resultam do processo de secreção da célula epitelial, sendo as vesículas de secreção inseridas na membrana. As microssaliências não foram estudadas em animais experimentais, portanto, não se tem dados sobre possíveis alterações destas microssaliências em espécimes expostos à salinidade $17^{o}/_{oo}$. Porém não foram encontradas alterações destas estruturas em testes de variação de salinidade realizados com outras espécies de teleósteos (HOSSLER, 1980; HOSSLER *et al.*, 1985).

Entre as células epiteliais de *N. neglecta* foram ainda observadas aberturas das células de muco nas duas margens do filamento. Esta distribuição foi encontrada como padrão para teleósteos (HUGHES e MITTAL, 1980; LAURENT, 1984; SABÓIA-MORAES *et al.*, 1996; SILVA 1997). As células de muco apresentaram-se coradas simultaneamente por PAS (secreção mucosa geral) e Alcian Blue (secreção mucosa ácida). Desta forma pode-se concluir que esta célula produz simultaneamente secreção mucosa neutra e ácida.

As lamelas secundárias de *N. neglecta* apresentaram estrutura típica de teleósteos, com a organização de microssaliências na superfície externa das células

epiteliais, como previamente descrito (LAURENT e DUNEL, 1980; HUGHES e MONDOLFINO, 1983; LUVIZOTTO, 1994). A organização da lamela secundária ou respiratória com suas células pilares envoltas por uma membrana basal e uma camada epitelial novamente confirma o padrão descrito para teleósteos (HUGHES e GRIMSTONE, 1965; BETTEX-GALLAND e HUGHES, 1973; HUGHES e BYCZKOWSKA-SMYK, 1974). O epitélio da lamela secundária de *N. neglecta* é formado por uma única camada celular. O epitélio da lamela secundária pode ser simples ou estratificado, dependendo da espécie. Alguns exemplos podem ser citados: no peixe-rã o epitélio é simples (HUGHES e UMEZAWA, 1983), no peixe-gelo ("ice fish") *Chanocephalus aceratus* (HUGHES E BYCZKOWSKA-SMYK, 1974), em *Barbus sapor* (HUGHES e MITTAL, 1980) e no linguado *Pseudopleuronectes americanus* (BOYD *et al.*, 1980) encontram-se duas camadas de células epiteliais. Em *Anabas testudines*, peixe que possui uma membrana respiratória e placas labirintais ("labirinthine plates") como órgãos auxilares para trocas gasosas, observou-se uma barreira água/sangue mais espessa do que o padrão devido ao epitélio estratificado (HUGHES e DATTA-MUNSHI, 1968). Em cortes transversais das células pilares foram identificados pontos de reação positiva ao PAS. Em microscopia óptica tem-se a impressão de que estes pontos estariam no citoplasma celular. Porém, sua localização sugere que estes pontos identificados em microscopia óptica representam os feixes de colágeno das colunas da membrana basal que foram identificados através de microscopia eletrônica de transmissão (HUGHES e GRIMSTONE, 1965; BETTEX-GALLAND e HUGHES, 1973; HUGHES e BYCZKOWSKA-SMYK, 1974; HUGHES e UMEZAWA, 1983). Estas colunas são projeções da membrana basal, que atravessam o espaço sanguíneo inseridas em dobramentos da membrana plasmática das células pilares. Esta estrutura provavelmente atua como um sistema esquelético da célula para resistir à distensão provocada pela circulação do sangue nos espaços sangüíneos, tendo em vista que o sangue que passa pelas brânquias é diretamente bombeado do coração (HUGHES e GRIMSTONE, 1965; BETTEX-GALLAND e HUGHES, 1973; HUGHES e BYCZKOWSKA-SMYK, 1974; HUGHES e UMEZAWA, 1983).

Não foi observada alteração na estrutura das lamelas respiratórias em animais expostos à salinidade $17^{o}/_{oo}$. De fato em nenhum dos casos de transferência de diferentes espécies para água diluída, onde foram estudados aspectos da estrutura branquial, foram relatadas alterações no plano básico da estrutura das lamelas secundárias (HOSSLER, 1980; LAURENT e DUNEL, 1980; HOSSLER *et al.*, 1985; McENROE, 1987; HWANG, 1990; MAINA, 1990; BROWN, 1992).

Foi observada grande concentração de células de muco, com produção simultanea de secreção mucosa neutra e ácida, na lamela respiratória. Este padrão também foi identificado para o peixe antártico *Chaenocephalus aceratus* (HUGHES e BYCZKOWSKA-SMYK, 1974) e contrário ao padrão encontrado para o peixe antártico *Nototheniops nudifrons* (LUVIZOTTO, 1994), onde é observada pequena concentração de células de muco no epitélio da lamela secundária. Segundo LAURENT (1984), as populações de células de muco podem sofrer variações durante exposição à salinidade alterada, porém as populações de células de muco apresentaram grandes variações dentro de animais de um mesmo grupo, controles ou experimentais, não sendo possível traçar um padrão para análise comparativa entre indivíduos controles e experimentais.

As células com grânulos em bastonetes foram identificadas nas lamelas secundárias de *N. neglecta*. Uma das sugestões quanto à função destas células é de que seus grânulos apresentem enzimas ou produtos tóxicos que podem ser lançados na superfície do epitélio, no sistema vascular ou nas cavidades do corpo, tendo função antibiótica (LEINO, 1982). FEARNHEAD e FABIAN (1971) apud MATTEY *et al.* (1979), sugerem que as células com grânulos em bastonetes têm função na osmorregulação, pois o número destas células é substancialmente diminuído em brânquias de *Monodactylus argenteus* quando estes peixes são adaptados à água doce em relação aos peixes adaptados à água marinha. Em *N. neglecta* o número destas células é bastante pequeno, não sendo possível afirmar se houve diminuição da população em animais expostos a decréscimo de salinidade. Porém, MATTEY *et al.* (1979) sugerem que a diminuição das células com grânulos em bastonetes pode estar relacionada com um mecanismo de estimulação da secreção por mudanças na pressão osmótica do ambiente, havendo uma ausência

virtual destas células quando o animal está em água diluída. No estômago de *N. neglecta* estas células encontram-se amplamente distribuídas e seu número aumentou, em condição de jejum. Estas células tem sido relacionadas com proteção do epitélio (FREIBERGER, 1996).

As células de cloreto foram localizadas principalmente no epitélio interlamelar, aparecendo também, porém em menor número, nas lamelas secundárias ou lamelas respiratórias. Esta distribuição encontrada para *N. neglecta* segue o padrão descrito por LAURENT e DUNEL (1980), HIBIYA (1982) para teleósteos em geral, por HWANG (1988) para *Plecoglossus altivelis*, por SILVA (1997) para peixes de água doce *Solminus maxillosus* e *Prochilodus scrofa*, assim como para o peixe antártico *Nototheniops nudifrons* (LUVIZOTTO, 1994), *Gobionotothen gibberifrons* e *Trematomus newnesi* (FANTA *et al.*, 1995).

As células de cloreto do filamento branquial são banhadas por uma circulação sinovial venosa, a qual irriga a parte interna do filamento branquial. As células de cloreto das lamelas secundárias são banhadas pela circulação capilar lamelar que dirige o sangue da artéria aferente filamentar para a artéria eferente filamentar. As células de cloreto filamentares localizadas na base das lamelas secundárias estão em contato com ambas as circulações (HWANG, 1988). Assim, em *N. neglecta* as células de cloreto podem possuir irrigação tanto venosa como arterial.

As principais características observadas para as células em microscopia óptica foram a acidofilia, salientada pela intensa coloração com eosina e a grande concentração de mitocôndrias, identificadas através da coloração Novelli, onde estas células aparecem intensamente coradas com fucsina ácida. Em microscopia eletrônica de transmissão identificou-se a ultraestrutura básica destas células, caracterizada por alta concentração de mitocôndrias e uma extensa rede de túbulos (LAURENT e DUNEL, 1980; PISAM, 1981; LAURENT, 1982; McCORMICK, 1995). Na região do epitélio interlamelar foi observada formação de complexo multicelular, sugerindo que *N. neglecta* apresente células acessórias, anteriormente descritas para outras espécies de teleósteos marinhos (HUGHES e MITTAL, 1980; ERNST *et al.*, 1980; HOOTMAN e PHILPOTT, 1980; LAURENT e DUNEL, 1980; HWANG, 1988; EVANS, 1993). Contudo, não foi possível identificar

diferenças entre estas células ao nível de microscopia óptica. As junções entre as células acessórias e as de cloreto são junções curtas. Nesta região as duas membranas se juntam em um breve contato e formam junções comunicantes. Estas junções não estão presentes nas células pavimentosas, sendo exclusivas entre células de cloreto adjacentes ou entre células de cloreto e células acessórias (LAURENT e DUNEL, 1980; DUNEL-ERB e LAURENT, 1980; ERNST *et al.*, 1980; HOOTMAN e PHILPOTT, 1980; EVANS, 1993). Estas células estão envolvidas no desenvolvimento das funções de transporte iônico em peixes (ERNST *et al.*,1980; EVANS 1993; WOOD e MARSHALL, 1994; MARSHALL, 1995; McCORMICK, 1995).

Foi observada variação na densidade e na morfologia das células de cloreto em animais expostos à salinidade $17^{o}/_{oo}$ quando comparado com o padrão descrito para espécimes controle. Observou-se uma diminuição significativa na densidade das células de cloreto em indivíduos expostos à salinidade $17^{o}/_{oo}$ durante 30 dias, já que não foram identificados complexos celulares. Estes dados são compatíveis com as funções sugeridas para este complexo multicelular, onde a ausência destes complexos celulares causa uma diminuição ou completo impedimento de excreção de sódio, o que seria esperado em água do mar diluída ($17^{o}/_{oo}$). Em testes realizados com espécies de teleósteos eurihalinos, estes complexos multicelulares formados entre células de cloreto ou entre células de cloreto e células acessórias aparecem em peixes marinhos ou peixes de água doce aclimatados a água do mar (McENROE, 1987) e desaparecem em peixes marinhos aclimatados à água doce (LAURENT e DUNEL, 1980). Outros autores não diferenciam a formação de complexos celulares, porém indicam também a diminuição do número das células de cloreto em peixes aclimatados a água do mar diluída (HOSSLER, 1980; HOSSLER *et al.*, 1985; HWANG, 1990; MAINA, 1990). Contudo, existem registros de situações onde não ocorre alteração no número de células de cloreto (RICHMAN III *et al.*, 1987) e situações como em espécimes de truta (*Salmo trutta*) que apresentam aumento do número de células de cloreto quando adaptados a água doce (BROWN, 1992). Aparentemente as alterações encontradas nas brânquias em relação às células de

cloreto estão envolvidas no mecanismo de adaptação de *N. neglecta* ao decréscimo da salinidade, sendo compatíveis com a maior parte dos dados da literatura.

Os rins de *N. neglecta* foram já registrados como aglomerulares (EASTMAN e DeVRIES, 1986). Esta ausência de glomérulo foi confirmada nos espécimes estudados. A estrutura renal encontrada para *N. neglecta* segue o padrão descrito por DOBBS *et al.* (1975) para rins aglomerulares de peixes antárticos, onde é encontrada uma única região do néfron, denominada túbulo principal seguida de uma região intermediária tubular e túbulos coletores. Não foram observadas alterações morfológicas nos rins de *N. neglecta* expostos a decréscimo de salinidade por curto ou longo-prazo. Porém, não pode ser descartada sua participação no mecanismo de regulação iônica destes peixes, pois alterações fisiológicas não detectáveis morfologicamente são suficientes para aumentar a capacidade de secreção ou reabsorção tubular com consequente aumento da produção urinária ou produção de uma urina mais diluída.

As concentrações iônicas de Na^+, Cl^- e Mg^{++} no soro de *N. neglecta* mostraram-se bastante estáveis em indivíduos controle, o que pode ser verificado pelo pequeno erro padrão da média dos grupos e pela semelhança entre os valores médios dos diferentes grupos controles, tanto para a concentração de Cl^- quanto para Mg^{++}. Os valores médios encontrados para cloreto (186 ± 3 mM, 189 ± 4 mM e 182 ± 9 mM) ficaram abaixo dos valores encontrados por DOBBS e DeVRIES (1975) para outras espécies da peixes antárticos aglomerulares da família Notothenidae em água do mar: *Trematomus bernacchii* (252 ± 2 mM); *T. hansoni* (253 ±3 mM); *T. loennbergii* (238 ± 4 mM). Para a concentração de sódio, 178 ± 13 mM em *N. neglecta*, também os valores foram mais baixos do que os encontrados por DOBBS e DeVRIES (1975) : *Trematomus bernacchii* (283 ± 2 mM); *T. hansoni* (271 ± 3 mM); *T. loennbergii* (256 ± 3 mM). Em relação à concentração de magnésio no sangue, as concentrações encontradas para *N. neglecta* em água do mar (1,03 ± 0,13 mM, 0,90 ± 0,05 mM e 0,95 ± 0,12 mM), nos diferentes grupos controle, foram semelhantes aos valores encontrados por DOBBS e DeVRIES (1975) para as outras espécies de peixe da família Notothenidae acima citadas. A

regularidade e estabilidade dos valores obtidos para as concentrações séricas dos vários íons dosados confere confiabilidade ao método de dosagem.

Não foi observada variação significativa na concentração iônica do sangue de exemplares de *N. neglecta* expostos à salinidade 17°/$_{oo}$ em curto prazo e longo prazo (10 dias). A ausência de variação iônica no soro indica que *N. neglecta* possui um eficiente mecanismo de regulação iônica. Foram observadas reduções significativas nas concentrações de Cl^- e Mg^{++} em espécimes expostos por 30 dias a salinidade 17°/$_{oo}$, porém não foi observada nenhuma morte. Além disso os indivíduos se alimentaram diariamente, não sendo observado nenhum comportamento alterado por parte destes espécimes. A redução da concentração de Cl^- no sangue de *N. neglecta* foi de 25% e da concentração de Mg^{++} foi de 48%. Segundo PLAZA-YGLESIAS *et al.* (1988), o peixe eurihalino da espécie *Eugerres plumieri* pode ser aclimatado, durante 72 horas, em uma faixa de salinidade de 6% (2°/$_{oo}$) a 85% (30°/$_{oo}$) da água do mar, apresentando variação de 30% da concentração iônica de Na^+ e Cl^- entre estes dois extremos. BAUSTIAN *et al.* (1997), em estudos de adaptação do peixe aglomerular eurihalino *Opsanus tau* a decréscimo de salinidade, observaram que espécimes expostos a salinidade de 10% da água do mar apresentaram decréscimo gradativo da concentração de sódio e cloreto no sangue durante os primeiros 20 dias de teste, chegando a redução de cerca de 44% da concentração destes dois íons, sendo que esta concentração passou a ser estável após os 20 dias, até os 60 dias de teste. Isto indica que apesar de ocorrer redução na concentração iônica sangüínea, quando o animal é aclimatado a água de salinidade reduzida, o mecanismo de regulação iônica é utilizado para garantir que esta variação não ultrapasse o limite de concentração vital para o organismo. Quando o limite da faixa de concentração iônica é ultrapassado, ocorre um desequilíbrio iônico interno, impedindo que este indivíduo sobreviva em um meio que para ele tornou-se hostil. O fato de que os espécimes *de N. neglecta* mantiveram-se aparentemente saudáveis após 30 dias em salinidade 17°/$_{oo}$, assim como em salinidade 10°/$_{oo}$, sugere que o mecanismo de regulação iônica foi eficiente para garantir que a concentração iônica do líquido extracelular fosse mantida acima do limite mínimo necessário para manter as

funções vitais do organismo, apesar das reduções das concentrações de Cl^- e Mg^{++} em seu sangue.

A bexiga de *N. neglecta* apresenta células epiteliais colunares. Este tipo celular é descrito como altamente ativo no processo de regulação iônica de peixes (NAGAHAMA *et al.*, 1975 apud OGAWA e FUKUCHI, 1988). Segundo OGAWA e FUKUCHI (1988), peixes antárticos que possuem bexiga urinária com epitélio de revestimento formado de células colunares possuem capacidade de explorar ambientes sob efeito do degelo. Em relação às concentrações iônicas na urina, é importante ressaltar que por ter sido coletada amostra de urina da bexiga, sem ter havido medida do fluxo urinário, houve grande variabilidade nas concentrações urinárias. Foram encontradas elevadas concentrações de Na^+ (107,7 ± 17,5 mM) e Cl^- (94,5 ± 16,4 mM e 103,7 ± 49,6 mM) na urina coletada da bexiga urinária dos indivíduos controle. Os valores variaram muito, como vistos pelos grandes EPM, e as médias foram semelhantes. Segundo EVANS (1993), em teleósteos ocorre secreção de Na^+ e Cl^- via túbulo renal, sendo que a regulação da excreção destes íons deve ocorrer a nível de túbulos coletores ou bexiga urinária.

Comparando-se estes dados com os valores encontrados por DOBBS e DeVRIES (1975) observa-se que as concentrações de Na^+ e Cl^- na urina de *N. neglecta* mantêm-se dentro de uma mesma faixa, sendo que para as outras espécies de peixes antárticos foram encontradas concentrações maiores de Cl^- e menores de Na^+na urina. Por exemplo, *Trematomus bernacchii* apresentou 262 ± 9 mM de Cl^- e 52 ± 12 mM de Na^+, contrário ao padrão de concentração destes íons encontrado no sangue de peixes antárticos, indicação da secreção preferencial de Cl^- acompanhado por outro(s) cátion(s) e da reabsorção de Na^+ para o sangue. Esta tendência não é clara para *N. neglecta* em água do mar.

A grande variação encontrada na concentração de Na^+ e Cl^- na urina de indivíduos controle sugere que existe um mecanismo de regulação destes íons após sua secreção a nível renal e que as coletas foram realizadas em diferentes momentos da ação do mecanismo de regulação destes íons pelo epitélio da bexiga. De fato, coletando-se amostra de urina da bexiga sem o conhecimento do tempo de

permanência desta urina na bexiga não é possível fazer inferências sobre o grau de processamento do fluido secretado, tanto pelo túbulo quanto pela própria bexiga. Estudos realizados em relação a excreção iônica indicam que peixes teleósteos marinhos reabsorvem NaCl pelo epitélio da bexiga (MARSHALL, 1995), sendo este um local de regulação osmótica e iônica (NAGAHAMA *et al*, 1975 apud OGAWA E FUKUCHI, 1988).

A concentração de Mg^{++} na urina apresentou valores muito mais altos do que os encontrados no sangue (189,73 ± 67,03 mM e 152,6 ± 52,3 mM). MARSHALL (1995) indica a bexiga como o local de concentração de Mg^{++} antes que este seja excretado. DOBBS e DeVRIES (1975) encontraram valores de Mg^{++} na urina de diferentes espécies de peixes antárticos na mesma faixa de concentração encontrada para *N. neglecta.* A alta concentração de Mg^{++} na urina confirma a indicação de que a sua excreção é principalmente renal (HICKMAN e TRUMP, 1969; DOBBS e DeVRIES, 1975). Aparentemente os três íons estudados tem papel importante na formação da urina. A secreção de Mg^{++}, assim como de Na^{++} e Cl^- garantem a formação de um fluxo para dentro do túbulo renal (BABEKER e RANKIN 1979; BEYENBACH, 1995). Na^+ e Cl^-, porém, tendem a ser reabsorvidos, enquanto o Mg^{++} tende a ser excretado (DOBBS e DeVRIES, 1975; BABEKER e RANKIN 1979; MARSHALL, 1995), tendo sua concentração aumentada devido à reabsorção de água junto com Na^+ e Cl^-.

Em animais expostos a salinidade $17^o/_{oo}$ não foram encontradas alterações significativas nas concentrações de Na^+ e Cl^- na urina, porém foi observada uma redução significativa na concentração de Mg^{++} após 10 dias. BAUSTIAN *et al.* (1997) em estudo da adaptação do peixe aglomerular *Opsanus tau* à salinidade de 10% da água do mar, seguindo a mesma metodologia de coleta de urina utilizada para *N. neglecta* (urina na bexiga), porém utilizando adicionalmente espécimes com catéteres inseridos diretamente na bexiga urinária, encontraram um aumento da concentração de Na^+ e uma diminuição na concentração de Cl^- e Mg^{++} na urina. Os autores concluíram que estes peixes não têm a capacidade de excretar uma urina diluída, devido à incapacidade da bexiga de regular a permeabilidade a água. Dessa

forma esta espécie excreta grandes quantidades de Na^+, que garantem a excreção de grande quantidade de água em consequência. Provavelmente este peixe possui um mecanismo extrarenal para compensar a perda destes solutos.

Os ensaios de atividade da Na^+,K^+-ATPase foram realizados com incubação a 0°C, sendo encontrados valores bastante altos da atividade, indicando o alto grau de adaptação desta enzima para atuar em temperatura de 0°C ou levemente abaixo de 0°C. Os testes de variação de salinidade foram realizados em diferentes etapas, sendo que em todas as etapas foram utilizados grupos controle expostos a condições semelhantes às dos espécimes experimentais, tendo como única variável o decréscimo da salinidade. Este procedimento foi importante principalmente na realização dos ensaios da atividade da Na^+,K^+-ATPase, onde foi observada variação da atividade da enzima dentro do grupo controle, quando comparadas as duas etapas de testes, curto prazo e longo prazo (10 dias). Foi observada uma maior atividade da Na^+,K^+-ATPase em homogenizado tanto de brânquias (0,99 ± 0.08 $\mu mol.mg^{-1}.h^{-1}$) quanto dos rins (0,79 ± 0.06 $\mu mol.mg^{-1}.h^{-1}$) nos indivíduos controle do grupo curto-prazo, em relação aos respectivos grupos controle longo-prazo: brânquia 0,48 ± 0,05 $\mu mol.mg^{-1}.h^{-1}$ e rins 0,52 ± 0,08 $\mu mol.mg^{-1}.h^{-1}$. Em indivíduos experimentais foi observado igualmente um valor maior da atividade da enzima em brânquias 0,89 ± 0,06 $\mu mol.mg^{-1}.h^{-1}$ e rins 0,56 ± 0,04 $\mu mol.mg^{-1}.h^{-1}$ de indivíduos do grupo curto prazo em relação a brânquias 0,52 ± 0,06 $\mu mol.mg^{-1}.h^{-1}$ e rins 0,43 ± 0,07 $\mu mol.mg^{-1}.h^{-1}$ do grupo longo prazo 10 dias. Esta maior atividade da enzima foi atribuída ao estresse gerado pela manipulação do animal em testes de curto-prazo. Estas flutuações terminaram por mascarar o possível efeito específico do decréscimo de salinidade. Não foi observada variação na concentração de Na^+ e Cl^- entre os dois grupos controle, isto indica que conclusões com relação a regulação iônica não podem ser feitas a partir de simples análise da atividade da enzima Na^+,K^+,-ATPase, pois outros fatores ou mecanismos de regulação iônica podem estar envolvidos, ou mesmo a atividade medida deve se relacionar com outras finalidades que não especificamente a regulação destes íons no sangue.

A atividade da Na^+,K^+-ATPase em homogenizado de brânquias de *N. neglecta* experimentais não apresentou variação em relação aos respectivos controles nos períodos de teste examinados. Dentro dos estudos da atividade da Na^+, K^+-ATPase em indivíduos expostos a variação da salinidade foram observados diferentes padrões de comportamento da enzima. EPSTEIN *et al.* (1980) observou decréscimo da excreção de Na^+ e Cl^- sem a redução da atividade da Na^+,K^+-ATPase branquial. VENTURINI *et al.* (1992) não encontraram uma correlação entre a concentração de Na^+ e Cl^- no soro e a atividade da Na^+,K^+-ATPase nas brânquias do peixe *Dicentrarchus labrax*. STUENKEL e HILLYARD (1980), relataram um aumento da atividade da Na^+,K^+-ATPase no peixe eurihalino, *Cyprinodon salinus*, adaptado a água doce ou marinha em relação à atividade quando adaptado a 50% da água do mar, concluindo que a Na^+,K^+-ATPase seria utilizada no processo de captação de sódio na água doce e na extrusão do íon na água do mar, porém neste trabalho não foram realizadas medidas da concentrações séricas destes íons. RICHMAN III *et al.* (1987) encontraram um aumento da atividade e densidade da Na^+,K^+-ATPase branquial em espécimes do salmão, *Oncorhynchus kisutch* aclimatados a água do mar. Com este quadro de variabilidade tornou-se difícil traçar um padrão de correlação entre a capacidade de regulação osmótica e iônica do animal e o papel da Na^+,K^+-ATPase nesta função. Aparentemente a atividade da Na^+,K^+-ATPase branquial não está diretamente envolvida na capacidade adaptativa de *N. neglecta* de suportar variações salinas ambientais.

As medidas de atividade da Na^+,K^+-ATPase em homogenizado de rins de *N. neglecta* indicam que houve uma diminuição da atividade desta enzima nos rins de indivíduos expostos à salinidade $17^o/_{oo}$ por algumas horas, retornando a valores normais de atividade após 10 dias de exposição. VENTURINI *et al.* (1992) observaram um aumento da atividade da Na^+,K^+-ATPase em rins e esôfago de *Dicentrarchus labrax*, peixe eurihalino, quando submetido a salinidade diminuída, concluindo que estes órgãos apresentam função na regulação osmótica. Apesar do sentido da variação da atividade da Na^+,K^+-ATPase ter sido oposto para *N. neglecta* exposto a decréscimo de salinidade, a indicação de relação com um mecanismo imediato de regulação iônica parece válida, subsidiada por iguais antagonismos nas

respostas de atividade branquial relatados acima. A redução na atividade pode impedir que ocorra desmineralização do organismo enquanto não realizou as alterações fisiológicas necessárias que serão mantidas ativas durante o restante do período do teste. Pode ainda significar redução na reabsorção de NaCl para permitir aumento no fluxo urinário.

As concentrações de Na^+, Cl^- e Mg^{++} no sangue foram estáveis em indivíduos mantidos durante 10 dias em salinidade 17‰ , sendo que neste mesmo período foi observada uma redução significativa do Mg^{++} na urina. As concentrações estáveis de Na^+ e Cl^- no sangue podem indicar que estes dois íons deixaram de ser excretados pelas brânquias, isto apesar de não ter sido observada variação na atividade da Na^+,K^+-ATPase branquial. Segundo EPSTEIN *et al* (1980), quando um peixe é transferido da água salgada para a água doce, as alterações morfológicas e mesmo bioquímicas podem ser bastante lentas, e mudanças no fluxo iônico podem acontecer anteriormente a mudanças na atividade de Na^+,K^+-ATPase branquiais. Esta alteração do fluxo iônico pode resultar de efeitos hormonais sobre as junções das células de cloreto adjacentes ou sobre a redução da permeabilidade da membrana apical destas células de cloreto. ZADUNAISKY (1996) indica que as alterações no fluxo de excreção de Na^+ e Cl^- estão relacionadas com a redução da permeabilidade ao Cl^- da membrana apical das células de cloreto. O fato de não encontrarmos alterações nas concentrações de Na^+ e Cl^- mas redução na concentração de Mg^{++} na urina, pode não estar relacionado diretamente com a taxa de secreção destes íons, mas sim com suas taxas de secreção em proporção à excreção de água. A redução significativa na concentração de Mg^{++} na urina vista após 10 dias em salinidade reduzida não foi acompanhada de alteração na atividade da Na^+,K^+-ATPase renal, por ter havido redução nos próprios controles em água do mar. Assim, supõe-se que Na^+ e Cl^- passaram a ser secretados com maior intensidade na urina (após 10 dias), dirigindo, com isso, um aumento proporcional na excreção de água. Este aumento da excreção de água não pôde ser medido, por não ter sido medido o fluxo urinário. Neste modelo de regulação iônica a secreção de Mg^{++} manteve-se constante, fazendo com que este íon passasse a ser encontrado em menor concentração na urina, simplesmente pela maior presença da água na

urina. É possível que mesmo que Na^+ e Cl^- tenham sido secretados com maior intensidade a nível de túbulos renais, estes possam ter sido reabsorvidos a nível de bexiga, impedindo com isso que houvesse uma diminuição de suas concentrações no sangue. Dessa forma *N. neglecta* não se vale da secreção de Mg^{++} para gerar aumento da produção urinária. Esta função seria assumida pelo Na^+ e pelo Cl^-, que passaria a ter os papéis principais na formação da urina em meio diluído, suplementando a ação do Mg^{++} nos indivíduos controles. Na^+ e Cl^- apresentam-se como principais osmólitos de peixes teleósteos (DOBBS e DeVRIES, 1975). Desta forma é necessária a reabsorção, impedindo que haja grande excreção deste íons junto com a urina, prevenindo uma diminuição de sua concentração sangüínea. Contudo para *N. neglecta* aparentemente não houve dissociação entre o papel do Na^+ e do Cl^- na urina. Comparando-se a bexiga urinária de *N. neglecta* com o padrão descrito por OGAWA e FUKUCHI (1988) para peixes antárticos com capacidade de realizar regulação osmótica através da bexiga urinária, pode-se sugerir que *N. neglecta* reabsorve Na^+ e Cl^- através do epitélio da bexiga urinária. Este padrão de regulação iônica proposto para *N. neglecta* tem pontos de similaridade com o padrão encontrado para o peixe aglomerular eurihalino *Opsanus tau* por BAUSTIAN *et al.* (1997), onde foram encontrados aumento de fluxo urinário, diminuição da concentração de Mg^{++} na urina, e ausência de variação significativa na concentração de Cl^- na urina. Como discrepância em relação ao modelo aqui proposto houve uma diminuição da concentração de Na^+ e Cl^- no sangue, um aumento significativo na concentração de Na^+ e diminuição significativa de sulfetos na urina. No caso dos íons sulfetos, não foram realizadas medidas para *N. neglecta*, o que não descarta a possível participação de outros ânions.

Em resumo, *Notothenia neglecta* tem capacidade de adaptar-se a variações da salinidade ambiental, mantendo as concentrações iônicas internas dentro de limites seguros para sua sobrevivência. As brânquias, os rins e a bexiga deste peixe parecem estar envolvidos com sua capacidade de regulação iônica. Torna-se importante o estudo das estruturas branquiais e renais, buscando elucidar qual o papel de cada um destes órgãos na regulação iônica. Foram observadas adaptações morfológicas branquiais, evidenciadas pela diminuição da densidade de células de

cloreto, quando em ambiente diluído, após 30 dias. Possivelmente teria sido detectada alguma redução na atividade da Na^+,K^+-ATPase branquial se esta tivesse sido medida após 30 dias de estresse salino. Esta adaptação impede a excreção desnecessária de sal. Os rins de *N. neglecta* são aglomerulares. Pouco se sabe sobre a estrutura e fisiologia deste órgão em peixes aglomerulares, tornando-se necessários estudos a nível morfológico e fisiológico, que busquem identificar qual o real mecanismo de ação dos rins destes peixes. Pouco se sabe também sobre a estrutura e função da bexiga urinária, pois este órgão é visto como pouco importante dentro das funções vitais de organismo aquáticos.

6. CONCLUSÕES

- O peixe antártico *Notothenia neglecta* sobrevive em ambiente hiposmótico, isosmótico e hiperosmótico.

- *N. neglecta* regula a concentração iônica interna ao ser exposto à salinidade de 17‰, quando proveniente da água do mar de salinidade de 34‰ por um período de até 30 dias.

- As brânquias de *N. neglecta* apresentam o padrão básico descrito para teleósteos.

- As brânquias possuem células de muco, que produzem simultaneamente substâncias mucosas neutras e ácidas, amplamente distribuídas nos epitélios das lamelas primárias e secundárias.

- *N. neglecta* apresenta células com grânulos em bastonetes nas lamelas primárias e secundárias.

- As brânquias possuem células de cloreto distribuídas na região do epitélio branquial interlamelar da lamela primária e no epitélio da lamela secundária, estando ausentes no epitélio das regiões dos vasos aferente e eferente das lamelas primárias, estando envolvidas no mecanismo de regulação iônica.

- A diminuição da população das células de cloreto nas brânquias caracteriza uma diminuição da função de excreção de sódio e cloreto, quando os peixes permanecem por 30 dias em água de salinidade reduzida.

- Os rins aglomerulares de *N. neglecta* apresentam néfrons compostos de uma única região tubular denomidada segmento principal, seguido de uma região intermediária e de túbulos do sistema coletor.

- Os rins de *N. neglecta* expostos a salinidade $17^{o}/_{oo}$ não apresentam alterações morfológicas.

- Os rins estão envolvidos na regulação iônica através da regulação da concentração iônica da urina, garantindo um aumento da concentração de Na^{+} e Cl^{-}, carreando a água através da pressão osmótica exercida por estes íons dentro da luz dos túbulos renais.

- A atividade da enzima Na^{+},K^{+}-ATPase branquial não foi alterada pela exposição de *N. neglecta* a decréscimo de salinidade, mostrando que a resposta adaptativa branquial para enfrentar o estresse osmótico não envolve alteração significativa na atividade desta enzima.

- A atividade da enzima Na^{+},K^{+}-ATPase dos rins foi diminuída na exposição ao decréscimo de salinidade a curto-prazo, indicando possível resposta renal de diminuição na reabsorção tubular de sal e água, para produzir urina mais abundante, ou ainda diminuição na secreção tubular de NaCl para prevenir perda excessiva de sal..

- *N. neglecta* não tem necessidade de migrar para outras regiões em épocas de congelamento ou degelo, saindo das regiões rasas e costeiras. Esta espécie suporta bem a variação de salinidade ambiental, sendo capaz de regular sua concentração iônica interna, sem sofrer danos morfológicos, mesmo em períodos de exposição prolongada.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BABEKER, M.M.; RANKIN, J.C. Factors regulating the functioning of the *in vitro* perfused aglomerular kidney of the anglerfish. *Lophius piscatorius L.* **Comp. Biochem. Physiol.**, Oxford, v.62[A], p. 989-993, 1979.

BAUSTIAN, M.D.; WANG, S.Q. and BEYENBACH, K.W., Adaptative responses of aglomerular toadfish to dilute sea water. **J. Comp. Physiol. B,** Berlin, v. 167, p. 61-70, 1997.

BEÇAK, W.Y.; VANRELL, J. P. **Técnicas de citologia e histologia.** São Paulo: Nobel, 1970. 470 pp.

BETTEX-GALLAND, M., HUGHES, G.M. Contractile Filamentous Material in the Pillar Cells of Fish Gills, **J. Cell Sci.**, Cambridge, v. 13, p. 359-370, 1973.

BEYENBACH, K.W. Secretory eletrolyte transport in renal proximal tubules of fish. In:WOOD, M.C.; SHUTTLEWORTH, T.J., **Cellular and Molecullar Approaches to Fish Ionic Regulation**, Academic Press, pp.85-103, New York, 1995.

BEYENBACH, K.M.; KIRSCHNER, L.B. Kidney and Urinary Bladder Functions of the Rainbow Trout in Mg and Na excretion. **Am. J. Physiol**, Bethesda, v. 229, p. 389-393, 1975.

BOYD, R.B.; DeVRIES, A.L.; EASTMAN, J.T.; PIETRA, G.G. The Secondary Lamellae of the Gills of Cold Water (High Latitude) teleosts. A comparative light and electron microscopy study. **Cell Tissue Res.**, Berlin, v. 213, p. 361-367, 1980.

BROWN, P. Gill choride Cell Surface-area is Greater in Freshwater-adapted Adult Sea Trout (Solmo trutta, L.) than those Adapted to Seawater. **J. Fish Biol.**, London, v. 40, p. 481-484, 1992.

BÜCHERL, W. **Técnica microscópica.** São Paulo: Polígono, 1962. 164p.

BURGER, W.; HESS, W.N. Function of the Rectal Gland in the Spiny Dogfish. **Science (Washington D C)**, v. 131, p. 670-671, 1960.

CAPOZOLI, U. **Antártida - A Última Terra**. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 1991.

CHIASSON, R.B. **Laboratory Anatomy of the Perch**. WM. C. Brown Company Publishers, Dubuque, Iowa 1966, 53p.

CLARK, G. [Ed]. **Staining procedures**. 4 Ed. Baltimore: The Willians & Wilkins Company, 1981. 512 p

CROSSLEY, L. **Explore Antarctica**. Cambridge University Press: Melbourne. Australian Antartic Foundation, 1995, 112p.

CULLING, C.F.A.; ALLISON, R.T.; BARR, W.T. **Cellular pathology technique.** 4Ed., London: Butterworth, 1985. 642 p.

DeVRIES, A.L.; EASTMAN, J.T. Physiology and Ecology of Notothenioid Fishes of the Ross Sea. **J. R. Soc. N. Z.**, Wellington, v. 11, n. 4, p. 329-340, 1981.

DeWITT, H.H.; HEEMSTRA, P.C.; GON, O. Notothenidae. In: GON, O.; HEEMSTRA, P. C. **Fish of the Southern Ocean**, J. L. B. Smith Institute of Ichthyology, 1990, p. 279-331.

DOBBS, G.H ; LIN, Y.; DeVRIES, A.L. Aglomerulism in Antarctic Fish. **Science (Washington DC)**, v. 185, n. 4152, 1974.

DOBBS, G.H.; DeVRIES, A.L. Renal function in antarctic teleost fishes: serum and urine composition. **Mar. Biol.**, New York, v. 29, p. 59-70, 1975.

DOBBS, G.H.; LIN, Y.; DeVRIES, A.L. (A). The aglomerular nephron of Antarctic teleosts: A light and Electron Microscopic study. **Tissue Cell**, Edinburgh, v. 7, n.1, p. 159-170, 1975.

DUNEL-ERB, S.; LAURENT, P. Ultrastructure of Marine Teleost Gill Epithelia: SEM and TEM Study of the Chloride Cell Apical Membrane. **J. Morphol.**, New York, v. 165, p. 175-186, 1980.

EASTMAN, I. The Biology and Phisiological Ecology of Natothenioid Fishes. In: GON, O.; HEEMSTRA, P.C. **Fishes of the Southern Ocean**. J. L. B. Smith Institute of Ichthyology, 1990. p.34-51

EASTMAN, J. The Fossil and Modern Fish Faunas of Antarctica· Evolution and Diversity. In: PRISCO, G.; MARESCA, B.; TOTA, B.(Eds) **Biology of Antarctic Fish**. Berlim: Springer-Verlag, 1991. P. 116-130.

EASTMAN, J. A Evolution and Diversification of Antactic Notothenioid Fishes. **Am. Zool.**, Lawrence, v. 31, p. 93-109, 1991

EASTMAN, J. **Antarctic Fish Bilogy** : Evolution in a Unique Environment. San Diego: Academic Press, Inc., 1993. 322p.

EASTMAN, J.; DeVRIES, A.L. Renal Glomerular Evolution in Antarctic Notothenioid fish. **J. Fish Biol.**, London, v. 29, p. 649-662, 1986.

EASTMAN, J.; DeVRIES, A.L.; COALSON, R.E.; NORDQUIST, R.E.; BOYD, R.B. Renal Conservation of Antifreeze Peptide in Antarctic Eelpout Rhigophila dearboni. **Nature**, London, vol. 282, 1979.

EKAU, W. Morphological Adaptations and Mode of Life in High Antarctic Fish. In: PRISCO, G.; MARESCA, B.; TOTA, B. (Eds) **Biology of Antarctic Fish**, Berlim: Springer-Verlag, 1991. P. 23-39.

EPSTEIN, F.H.; SILVA, P.; KORMANIK, G. Role of Na-K-ATPase in chloride cell function. **Am. Physiol.**, Bethesda, v. 238, n.3, p. 246-250, 1980.

ERNST, S.A.; DODSON, W.C.; KARNAKY, K.J. Strutural Diversity of Occluding Junctions in the Low Resistence Chloride Secreting Opercular Epithelium of Seawater Adapted Killifish (Fundulus heteroclitus). **J. Cell Biol.**, New York, v. 87, p. 488-497, 1980.

EVANS Osmotic and Ionic Regulation. In: EVANS, D.H. **The, Phisiology of Fishes,** Marine Science Series, 1993.

EVERSON, I. Fish. In: LAWS, R.M., **Antarctic Ecology** Volume 2, Academic Press INC., London, 1984, p 491-531.

FANTA, E. Laboratory tests on feeding interations of some antarctic fish from Admiralty Bay (King George Island, South Shetlands). **Polish Polar Research**, Warsovia, 1998 (*no prelo*)

FANTA, E.; LUVIZOTTO, M.F.; MEYER, A.A. Gill struture of the fishes Notothenia (Gobionotothen) gibberifrons and Trematomus newnesi, Nototheniidae stressd by salinity changes and some behavioral consequences. **Antarct. Record**, Tokyo, v.39, n.1, p.25-39, 1995.

FANTA, E.; MEYER, A.A. Behavioural strategies for feeding of the antarctic fishes *Notothenia neglecta, Notothenia coriiceps, Trematomus bernachii, Pagothenia borchgrewincki, Lepidonotothen nudifrons* and *Pleuragramma antarcticum* (Pisces, Nototheniidae). **Antarct. Record**, Tokyo, 1998. (*no prelo*).

FEARNHEAD, E.A.; FABIAN, B C. The ultrastructure of the gill of *Monodactylus argenteus* (an euryhaline teleost fish) with particular reference to morphological changes associated with changes in salinity. **S. Afr.Mar.Res.Oceanogr.Res. Inst. Investigational Report**. v. 26, p. 39, 1971.

FISCHER, W.; HUREAU, J.C. [Ed]. **FAO species identification sheets for fishery purposes.** Southern Ocean. Vol. II. Rome: Food and Agriculture Organization of United Nation, Rome, 1985.

FISHELSON, L. A Comparative Study of Ridge-mazes on Surface Epithelial Cell-membranes of Fish Scale (Pisces, Teleostei). **Zoomorphologie**, Berlin, v. 104, p. 231-238, 1984.

FLETCHER, C.R. Osmotic and ionic regulation in the cod (*Gadus callarias* L.) II. Salt Balance. **J. Comp. Physiol.**, Berlin, v. 124, p.157-168, 1978.

FOSTER, T.D. The Marine Enviroment, In: LAWS, R.M. **Antarctic Ecology**. v. 2, London: Academic Press Inc.,1984 p 345-371

FREIBERGER, S. **Estudo histológico e ultraestrutural do estomago e aspectos do comportamento alimentar do peixe antártico Notothenia neglecta Nybelin, 1951 submetido a períodos de jejum.** Curitiba, 1996, 135p. Tese (Mestrado em Ciências Morfológicas). Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

FREIRE, C.A.; KINNE-SAFFRAN, E.; BEYENBACH, K.W.; KINNE, R.K.H. Na-D-glucose cotransport in renal brush-border membrane vesicles of na early teleost (Oncorhynchus mykiss). **Am. J. Physiol.**, Bethesda, 269: R592-R602, 1995.

HEMPEL, G. **Antactic Science Global Concerns**. Berlim: Springer-Verlag, 1994.

HIBIYA, T. **Atlas of Fish Histology. Normal and Pathological Feature**. Tokyo: Kodansha Ltda , 1982, 147p.

HICKMAN, C.P.; TRUMP, B.F. The Kidney. In: In: HOAR, W. S. ; RANDALL, D. J., **Fish Phisiol.** Academic Press, New York, p. 91-239, 1969.

HOOTMAN, S. R.; PHILPOTT, C. W. Accessory Cells in Teleost Branchial Epithelium. **Am. J. Physiol.**, Bethesda, 238, R199-R206, 1980.

HOSSLER, F. E. Gill arch of the Mullet, Mugil cephalus III. Rate of response to salinity change. **American Physiological Society**. v .238, p.160-164, 1980.

HOSSLER, F.E.; HARPOLE, J.H.; KING, J. A. The Gill Arch of the Striped bass, Morone saxatilis. I. Surface Ultrastruture. **J. Submicrosc. Cytol.**, Bologna, v. 18, n.3, p. 519-528, 1986.

HOSSLER, F.E.; MUSIL, G.; KARNAKY, K. J ; EPSTEIN, F.H. Surface Ultraestructure of the Gill Arch of the Killifish, Fundulus heteroclitus, from Seawater and Freshwater of Apical Crypts of Chloride Cells. **J. Morphol.**, New York, v 185, p. 377-386, 1985

HUGHES, G. M. Species Variation in Gas Exchange. **Royal Society of Medicine**, v. 59, n. 6, p. 494-500, 1966.

HUGHES, G.M. An introduction to the study of gills. In: HOULIHAN, D.F.; RANKIN, J.C.; SHUTTLEWORTH, T.J. **Gills**. New York: Cambridge University Press, 1982.

HUGHES, G. M. General Anatony of the gills. In: HOAR, W. S. ; RANDALL, D. J., **Fish Phisiology.** v. XA. Orlando: Academic Press Inc., 1984.

HUGHES, G.M.; BYCZKOWSKA-SMYK, W. Ultrastructure of the secondary gill lamella of the icefish, Chaenocephalus aceratus. **J. Zool.**, London, v.174, p. 79-87, 1974.

HUGHES, G.M.; DATTA MUNSHI, J.S. Fine Structure of the Respiratory Surface of na Air-Breathing fish, the Clinbing Perch Anabas testudines (Bloch). **Nature**, London, v.219, n. 5161, p.1382-1384, 1968.

HUGHES, G.M.; GRIMSTONE, A. V., The Fine Structure of the Secundary Lamellae of the Gills of *Gadus pollachius* . **Quart. J. Micros. Sci.,** Cambridge, v.106, n.4, p. 343-353, 1965.

HUGHES, G.M.; MITTAL, A.K. Structure of the Gills of *Barbus sophor* (Han), a Cyprinid with Tertiary lamellae. **J. Fish Biol.,** London, v. 16, p. 461-467, 1980.

HUGHES, G.M.; MONDOLFINO, R.M. Scanning Electron Microscopy of the Gills of *Trachurus mediterraneous* , **Experientia (Basel),** v.39, p. 518-519, 1983.

HUGHES, G.M.; UMEZAWA, S. Gill Structure of the Yellowtail and Frogfish, **Jpn. J. Ichthyol.,** Tokyo, v. 30, n. 2, 1983.

HWANG, P P ; HIRANO, R. Effects of Enviromental salinity on intercellular organization and junctional structure of chloride cells in early stages of teleost development. **J. Exp. Zool.,** New York, v. 236, p. 115-126, 1985.

HWANG, P.P. Multicellular Complex of Chloride Cells in the Gills of Freshwater Teleosts . **J. Morphol.,** New York, v. 196, p.15-22, 1988.

HWANG, P.P. Salinity effects on development of chloride cells in the larvae of ayu (Plecoglossus altivelis). **Mar. Biol.,** New York, v.107, p. 1-7, 1990.

KARNOWSKY, M.J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolaly for use in ejectron microscopy. **J. Cell Biol.,** New York, v. 27:137A-138A(abs.), 1965.

KING, P.A; GOLDSTEIN, L. Organic osmolytes and cell volume regulation in fish. **Molecular Physiology,** v. 4, p.53-66, 1983

KIRSCHNER, L.B. The energetics of osmotic regulation in ureotelic and hypoosmotic fishes. **J. Exp. Zool.,** New York, v. 267, p.19-26, 1993.

KOCK, K. **Antarctic Fish and Fisheries** . Cambridge: Cambridge University Press, 1992.

LAURENT, P.; DUNEL, S. Morphology of gil epithelia in fish. **Am. J. Physiol.**, Bethesda, v.238: R147-R159, 1980.

LAURENT, P. Structure of vertebrate gills. In: HOULIHAN, D.F.; RANKIN, J.C.; SHUTTLEWORTH, T.J. **Gills**. New York:Cambridge University Press, 1982.

LAURENT, P. Gill Internal Morphology. In: HOAR, W. S.; RANDALL, D.J. **Fish phisiology.** v. XA. New York:Academic Press Inc., 1984.

LAURENT, P ; DUNEL-ERB, S. In: HOAR, W. S.; RANDALL, D. J. **Fish phisiology.** v. XB, New York: Academic Press Inc., 1984.

LEINO, R.L. Rodlet cells in the gill and intestine of *Catostomus commersoni* and *Perca flavescens*: a comparison of their light and electron microscopic cytochemistry with that of mucous and granular cells. **Can. J. Zool.**, Ottawa, v. 60, p. 2768-2782, 1982.

LIMA, C.L.B.F.; REIS, N.S.; CECCARELLI, P.S. Estudo topográfico e histológico do rim de pacu Piaractus mesopotamicus Holmeberg, 1887 (Teleostei, Serrasalminae). **B. Téc. CEPTA**, Pirassununga, v,6, n.2, p41-52, 1993.

LIN, H.; RANDALL, D. Evidence for the presence of an eletrogenic proton pump on the trout gill epithelium. **J. Exp. Biol.**. Cambridge, v.161, p.119-134, 1991.

LIN, H.; RANDALL, D. Protom Pumps in Fish Gills. In: WOOD, M.C. and SHUTTLEWORTH, T.J., **Cellular and Molecullar Approaches to Fish Ionic Regulation**. New York: Academic Press, p. 229-250, 1995

LOGSDON, J.M; DOOLITTLE, F. Origin of antifreeze protein genes: A coll tale in molecular evolution. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington v. 94, p. 3485-3487, 1997.

LORETZ, C.A. Osmotic and cell volume regulation in the goby, Gollichthys mirabilis. **J. Exp. Zool.**, New York, v. 210, p. 237-244, 1979.

LORETZ, C. A.; BERN, H.A. Ion Transport by the Urinary Bladder of the gobiid teleost, *Gillichthys mirabilis*. **Am. J. Physiol.**, Bethesda, v. 239, p. 415-423, 1980.

LUFT, J.L. Improvements in epoxy resin embedding methods. **J. Biochem. Cytol.**, New York, v. 9, p. 409-414, 1961.

LUTJEHARMS, J.R.E. The Oceanography and Fish Distribution of the Southern Ocean. In: GON, O.; HEEMSTRA, P.C. **Fishes of the Southern Ocean**. J. L. B. Smith Institute of Ichthyology, 1990. p 6-27.

LUVIZOTTO, M.F. **Efeito de diferentes salinidades sobre as células de cloreto e as células secretoras do epitélio do peixe antártico *Nototheniops nudifrons* (LÖNNBERG, 1905).** Curitiba, 1994, 88p., Tese (Mestrado em Ciências Morfológicas). Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

MAINA, J.N. A Study of the Morphology of the Gills of an Extreme Alkalinity and Hyperosmotic adapted teleost Oreochromis alcalicus grahami (Boulenger) with Particular Emphasis on the Ultraestucture of the Chloride Cells and their Modifications with Water Dilution - A SEM and TEM Study. **Anat. Embryol.**, Berlin, v. 181, p. 83-98, 1990.

MALLATT, J. Fish Gill Strutural Changes Induced by Toxicants and other Irritants : A Statistical Review. **Can. J. Fish Aquat. Sci.**, Ottawa, v. 42, p.630-648, 1985.

MANSURI, A.P.; BHAN, S. Adaptation to the osmotic stress in the marine euryhaline teleost, Periphthalmus dipes - IV. Changes in total protein levels of various tissues. **J. Anim. Morphol. Physiol.**, Baroda, v. 25, n. 1 and 2, p. 131-137, 1978.

MARENZI, A.D. Sobre la Determinacion del Sódio en el Plasma. **Publ.Centro Invest. Tisiol.**, v. 5, p. 319, 1942.

MARSHALL, W.S. Transport Processe in Isolated Teleost Epithelia: Opercular Epithelium e Urinary Bladder. In: WOOD, M.C.; SHUTTLEWORTH, T.J. **Cellular and Molecullar Approaches to Fish Ionic Regulation**. New York:Academic Press, p.1-19, 1995.

MATTEY, D.L.; MORGAN, M.; WRIGHT, D.E. Distribution and development of rodlet Cells in the Gills and Pseudobranch of the bass, *Dicentrachus labrax* (L). **J. Fish Biol.**, London, v. 15, p. 363-370, 1979.

McCORMICK, S.D. Hormonal Control of Gill Na^+,K^+-ATPase and Chloride Cell Function. In: WOOD, M.C., SHUTTLEWORTH, T.J. **Cellular and Molecullar Approaches to Fish Ionic Regulation**. New York: Academic Press, p. 285-307, 1995

McENROE, M. Aspects of osmorregulation in the white sturgeon, Acipenser transmontanus. **Dissertation Abstracts International**, v.47, n. 10, 1987.

NORDLIE, F.G. Plasma osmotic, Na^+ and Cl^- regulation under euryhaline conditions in Cyprinodon Variegatus lacépède. **Comp. Biochem. Physiol.**, Oxford, v.86A., n. 1, p 57-61, 1987.

OGAWA, M. Comparative study on the internal structure of the teleostean kidney. **Sci. Rept. Saitama Univ.**, Saitama, B4, 107-129, 1962.

OGAWA, M.; FUKUCHI, M. Comparative Studies on the Kidneys and Urinary Bladders of Antarctic teleosts. **Nihon Suisoan Gakkaishi**, Tokyo, v. 54, n. 11, p. 1919-1922, 1988.

O'GRADY, S.M.; DeVRIES, A.L. Osmótic and ionic regulation in polar fishes **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.**, v. 57, p. 219-228, 1982.

OGURI, M. Kidney of the red batfish *Halieutaea stellata* as aglomerular type. **Nihon Suisoan Gakkaishi**, Tokyo, v. 55, n.4, p. 743, 1989.

PERRY, S.F. The Chloride Cell: Structure and Function in the Gills of Freshwater Fishes. **Ann. Rev. Physiol.**, v. 59, p.325-347, 1997.

PHILLIPS, J.G. **Fisiología Ecológica**. Madrid: H.Blume Ediciones. 1976.

PISAM, M. Membranous systems in the "chloride cell"of teleostean fish gill; their modification in response to the salinity of the environmental. **Anat. Rec.**, New York, v. 200, p.401-414, 1981.

PLAZA-YGLESIAS, M ; LAUFER, M.; HERRERA, F.C. Ionic and osmotic regulation in blood, aqueous humor, gill and retina in the euryhaline fish, Eugerres plumieri. **Comp. Biochem. Physiol.**, Oxford, v. 89 A, n.3, p. 377-382, 1988.

POUGH, H.F.; HEISER, J.B.; McFARLAND,W.N. **A Vida do Vertebrados**. São Paulo: Atheneu Editora, 1993.

RAKUSA-SUSZCZEWSKI, S. **The Marine Antarctic Coastal Ecosystem of Admiralty Bay**. Warsaw:Polish Academy of Sciences, 1993. 216p.

REYNOLDS, E.S. The use of lesd citrate at high pH as na electron-opaque stain in electron microscopy. **J. Cell Biol.**, New York, v.17, p. 208-212, 1963.

RICHMAN III, N.H.; DIAZ, S.T.; NISHIOKA, R.S.; PRUNET, P.; BERN, H.A., Osmorregulatory and endocrine relationships with chloride cell morphology and density during smoltification in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 60, p. 265-285, 1987.

RIOS, F.S. **Ecomorfologia do Aparato Branquial Faríngeo do Peixe Antártico Notothenia neglecta Nybelin (1951) em relação ao Hábito Alimentar.** Curitiba, 1997,

127p. Tese (Mestrado em Ciências Morfológicas). Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

RIOS, F.S.; FANTA, E. Morphology of gill rakers and their ecological function in the feeding of the antarctic fish *Notothenya neglecta* Nybelin. Antarctic Record, Tokyo 42 (2), 1998, in press.

ROMER, A.S.; PARSONS, T.S. **Anatomia Comparada dos Vertebrados**. São Paulo: Atheneu Editora, 1985. 559 pp.

SABÓIA-MORAES, S.M.T.; HERNANDEZ-BLAZQUEZ, F.J.; MOTA, D.L.; BITTENCOURT, A.M. Mucous cell types in the branchial epithelium of the euryaline fish *Poecilia vivipara*. **J. Fish Biol.**, London, v. 49, p. 545-548, 1996.

SCHMIDT-NIELSEN, K. **Fisiologia Animal - Adaptação ao Meio Ambiente.** 5 ed. Santos: Santom Editora, 1996. 600p.

SICINSKI, J.; RÓZYCKI, O.; KITTEL W. Zoobenthos and zooplankton of Herve Cove, King George Island, South Shetlands, Antarctic. **Polish Polar Research**, Warsovia, v. 17, n. 3-4, p. 221-238, 1996.

SILVA, P.; SOLOMAN, R.; SPOKES, K.; EPSTEIN, F.H. Ouabain inhibition of gill Na,K-ATPase: Relationship to active transport. **J. Exp. Zool.**, New York, v.199, p. 419-426, 1977.

SILVA, S.O. **Estudo Comparativo da Morfologia das Brânquias de Salminus maxillosus Valenciennes, 1840 e Prochilodus scrofa Steindachner, 1881, da Bacia do Rio Mogi Guaçu, Região de Pirassununga, São Paulo.** Curitiba, 1997. (Monografia em Ciências Biológicas) - Departamento de Biologia Celular, Universidade Federal do Paraná.

SKORA, K.; NEYELOV, A.V. Fish of Admiralty Bay (King George Island, South Shetland Islands, Antarctica. **Polar Biol.**, Berlin, v. 1, p. 469-476, 1992.

SOMERO, G.N.; GIESE, A.C.; WOHLSCHLAG, D.E. Cold adaptation of the antarctic fish *Trematomus bernacchii*. **Comp. Biochem. Physiol.**, Oxford, v.26, p. 223-233, 1968.

SOMERO, G.N. Biochemical Mechanisms of Cold Adaptation and Stenothermality in Antarctic Fish. In: PRISCO, G.; MARESCA, B.; TOTA, B. **Biology of Antarctic Fish**. Berlin: Springer-Verlag, 1991.

STUENKEL, E.L.; HILLYARD, S.D. Effects of temperature and salinity on gill Na^+-K^+ ATPase activity in the pupfish, Cyprinodon salinus, **Comp. Biochem. Physiol.**, Oxford, v. 67A., p. 179-182, 1980.

VENTURINI, G.; CATSLDI, E.; MARINO,G.; PUCCI, P.; GARIBALDI,L.; BRONZI,P. Serum ions concentration and ATPase activity in gills, kidney and oesophagus of european sea bass (Dicentrarchus labrax, Pisces, Perciformes) during acclimation trials to fresh water. **Comp. Biochem. Physiol.**, Oxford, v. 103 A., n. 3, p. 451-454, 1992.

WHITEAR, M. Causative Aspects of microridges on the Surface of Fish Epithelia. **J. Submicrosc. Cytol. Pathol.**, Bologna, v. 22, n.2, p. 211-220, 1990.

WOO, N.Y.S.; FUNG, A.C.Y. Study on the biology of the red sea bream, Chrysophrys major - II. Salinity adaptation. **Comp. Biochem. Physiol.**, Oxford, v. 69A, p. 237-242, 1981.

WOOD, C.M.; MARSHALL, W.S. Ion Balance, Acid-Base Regulation, and Chloride Cell Funtion in the Common Killifish, Fundulus heteroclitus - A Euryhaline Estuarine Teleost. **Estuaries**, Lawrence, v. 17, n.1A, p.34-52, 1994.

ZACCONE, G. Effect Of Osmotic Stress on the Chloride and Mucous Cells in the Gill Epithelium of the Fresh-Water Teleost Barbus filamentosus (Cypriniformes, Pisces). A Structural and Histochemical Study. **Acta Histochem.**, Jena, v 68, p. 147-159, 1981,

ZADRÓZNY, T. Fishes of Admiralty Bay Caught in 1994 and 1995 (King George Island, South Shetland Islands, Antarctica). **Polar Arch. Hydrobiol.**, Lomianki, v. 43, n.3, p. 347-354, 1996.

ZADUNAISKY, J.A. Chloride Cells and Osmoregulation. **Kidney International**, Cambridge, v. 49, p. 1563-1567, 1996.