

VIVIANE PRODOCIMO

**REGULAÇÃO IÔNICA E ULTRA-ESTRUTURA BRANQUIAL E RENAL EM BAIACUS
DO GÊNERO *Spherooides* SUBMETIDOS A DILUIÇÃO DA ÁGUA DO MAR**

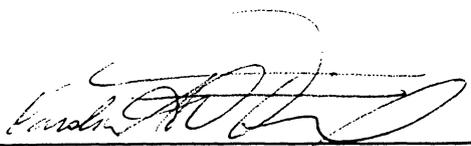
**Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós Graduação em Biologia Celular
do Setor de Ciências Biológicas da Universidade
Federal do Paraná, como requisito parcial para
obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular.
Orientadora: Prof^a Dr^a Carolina Arruda de Oliveira
Freire**

CURITIBA

2001

PARECER

A Comissão Examinadora de Dissertação de Mestrado **REGULAÇÃO IÔNICA E ULTRA-ESTRUTURA BRANQUIAL E RENAL EM BAIACUAS DO GÊNERO SPHOEROIDES SUBMETIDOS A DILUIÇÃO DA ÁGUA DO MAR** ", de autoria da Pós-Graduanda Viviane Prodocimo, e composta pelos Professores: Dr^a. Carolina Arruda Freire; (como Orientadora e Presidente); Dr^o. Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro (UFPR); e Dr^a. Marta Marques de Souza (UEL). Atribui individualmente as seguintes notas: Dr^a. Carolina Arruda Freire , nota 10,0 (*dez*); (Dr^o. Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro , nota 10,0 (*dez*);); e Dr^a. Marta Marques de Souza , nota 10,0 (*dez*). De acordo com o Regimento interno do Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular, a candidata foi: APROVADA com a nota 10,0 (*dez*), para a devida publicação o trabalho deve sofrer as modificações sugeridas. Em Curitiba, 19 de Março de 2001.



Dr^a Carolina Arruda Freire



Dr. Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro



Dr^a. Marta Marques de Souza

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Prof^a Carolina Arruda de Oliveira Freire pela incomparável orientação e companheirismo durante todas as etapas da execução do trabalho, pela confiança e amizade em mim depositadas.

Ao Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular, Prof. Ciro A. de Oliveira Ribeiro.

Ao Prof. Henry I. Spach do Centro de Estudos do Mar da UFPR, pela eficiência, boa vontade, organização e execução das coletas dos animais utilizados nesta dissertação. Também pelos dados relacionados ao local de coleta, referências bibliográficas e auxílio no uso de termos técnicos no manuscrito.

Ao Prof. Luiz Claudio Fernandes do Departamento de Fisiologia da UFPR, por permitir a utilização do espectrofotômetro em seu laboratório de pesquisa.

Ao Prof. Silvio S. Veiga do Departamento de Biologia Celular da UFPR, pela doação de reagentes.

À Marlene Bonifácio de Camargo, secretária do Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular pela eficiência na execução de todos os pedidos a ela solicitados.

Ao Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR por possibilitar a análise do material ao microscópio eletrônico de transmissão.

À minha amiga Anna Raquel S. Gomes pela amizade, apoio, incentivo e companheirismo em todas as horas que precisei.

À minha amiga Simone Ferreira pelo auxílio no processamento do material.

Às amigas do Laboratório de Fisiologia Comparativa Maristela Azevedo pelos momentos agradáveis de convivência e em especial à Alessandra F. de Lara por me acompanhar e ajudar nas coletas e na finalização da dissertação e também pelos momentos agradáveis de convivência.

À minha amiga Valéria Togni pelo apoio e auxílio no processamento das fotos do local da coleta.

Aos alunos do laboratório de Ictioplâncton do Centro de Estudos do Mar, César, Guilherme e Robert pela grande ajuda no experimento de campo.

Aos meus pais Acir e Marlene que sempre me apoiaram e possibilitaram que eu atingisse meus objetivos.

Aos meus irmãos Vinicius e Marcio por me fazerem rir nos momentos difíceis, não me deixando desanimar.

SUMÁRIO

	página
AGRADECIMENTOS	iii
LISTA DE FIGURAS	vii
RESUMO	viii
ABSTRACT	Xi
1 INTRODUÇÃO	01
1.1 INFLUÊNCIA DO AMBIENTE NA REGULAÇÃO OSMÓTICA E IÔNICA DE ESPÉCIES AQUÁTICAS	04
1.2 REGULAÇÃO OSMÓTICA E IÔNICA EM PEIXES TELEÓSTEOS	06
1.3 ATIVIDADE DAS BRÂNQUIAS NA REGULAÇÃO OSMÓTICA E IÔNICA DO PLASMA	09
1.4 ATIVIDADE DO RIM NA REGULAÇÃO OSMÓTICA E IÔNICA DO PLASMA	13
1.5 CARACTERÍSTICAS DO GÊNERO <i>Spherooides</i>	18
1.6 OBJETIVOS	21
1.6.1 Objetivo Geral	21
1.6.2 Objetivos Específicos	21
2 MATERIAL E MÉTODOS	25
2.1 ÁREA DE ESTUDO	25
2.2 COLETA E ACLIMATAÇÃO DOS ANIMAIS PARA EXPERIMENTOS DE CAMPO E DE LABORATÓRIO	25
2.3 EXPERIMENTO DE LABORATÓRIO	26
2.4 EXPERIMENTO DE CAMPO	27
2.5 DOSAGEM DAS CONCENTRAÇÕES IÔNICAS DO PLASMA DE <i>Spherooides testudineus</i> E <i>Spherooides greeleyi</i>	29
2.6 ULTRA-ESTRUTURA DAS BRÂNQUIAS E RINS DE <i>Spherooides testudineus</i>	30

2.7 ANÁLISE MORFOMÉTRICA DAS BRÂNQUIAS E RINS DE <i>Sphoeroides testudineus</i>	32
2.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA	33
3 RESULTADOS	37
3.1 CONCENTRAÇÃO DE SÓDIO NO PLASMA DE <i>Sphoeroides testudineus</i>	37
3.2 CONCENTRAÇÃO DE CLORETO NO PLASMA DE <i>Sphoeroides testudineus</i>	37
3.3 CONCENTRAÇÃO DE MAGNÉSIO NO PLASMA DE <i>Sphoeroides testudineus</i>	38
3.4 CONCENTRAÇÃO DE CLORETO E MAGNÉSIO NO PLASMA DE <i>Sphoeroides testudineus</i> E <i>Sphoeroides greeleyi</i> EM EXTREMOS DE SALINIDADE	39
3.5 CONCENTRAÇÃO DE CLORETO NO PLASMA DE <i>Sphoeroides testudineus</i> E <i>Sphoeroides greeleyi</i> EM EXPERIMENTO DE CAMPO	40
3.6 MORFOLOGIA E ULTRA-ESTRUTURA DO EPITÉLIO BRANQUIAL DE <i>Sphoeroides testudineus</i>	41
3.7 MORFOLOGIA E ULTRA-ESTRUTURA DO EPITÉLIO RENAL DE <i>Sphoeroides testudineus</i>	43
4 DISCUSSÃO	69
5 CONCLUSÕES	80
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1a. <i>Sphoeroides testudineus</i>	23
Figura 1b. <i>Sphoeroides greeleyi</i>	24
Figura 2a. Mapa da Baía de Paranaguá	35
Figura 2b. Gamboa do Rio Baguaçu	36
Figura 3: Curva de regulação plasmática do íon sódio (Na^+) (a), do íon cloreto (Cl^-) (b) e do íon magnésio (Mg^{2+}) (c) para <i>S. testudineus</i>	45
Figura 4: Curva de regulação plasmática do íon cloreto (Cl^-) para <i>S. testudineus</i> (a) e para <i>S. greeleyi</i> (b) em laboratório.	47
Figura 5: Curva de regulação plasmática do íon magnésio (Mg^{2+}) para <i>S. testudineus</i> (a) e para <i>S. greeleyi</i> (b) em laboratório.	49
Figura 6: Curva de regulação plasmática do íon cloreto (Cl^-) para <i>S. testudineus</i> (a) e para <i>S. greeleyi</i> (b) no ambiente natural.	51
Figura 7: Morfologia da brânquia de <i>S. testudineus</i> observada ao microscópio óptico.	53
Figura 8: Estrutura do epitélio branquial de <i>S. testudineus</i> observada ao microscópio eletrônico de transmissão após 15 dias em salinidade de 30 ‰ (controle).	55
Figura 9: Estrutura do epitélio branquial de <i>S. testudineus</i> observada ao microscópio eletrônico de transmissão após 15 dias em salinidade de 10 ‰ (experimental).	57
Figura 10: Morfologia do tubo renal de <i>S. testudineus</i> observado ao microscópio óptico.	59
Figura 11: Epitélio estratificado do tubo renal de <i>S. testudineus</i> .	61
Figura 12: Mitocôndrias e dobramentos de membrana na região basal das células do epitélio renal de <i>S. testudineus</i> observada ao microscópio óptico e microscópio eletrônico de transmissão.	63
Figura 13: Secreção tubular no epitélio renal <i>S. testudineus</i> observada ao microscópio eletrônico de transmissão após 15 dias em salinidade de 30 ‰ (controle).	65
Figura 14: Secreção tubular no epitélio renal de <i>S. testudineus</i> observada ao microscópio eletrônico de transmissão após 15 dias em salinidade de 10 ‰ (controle).	67

RESUMO

A regulação osmo-iônica é a função responsável pela manutenção do teor hídrico e composição dos líquidos corporais nos animais multicelulares. Nos teleósteos a osmorregulação envolve o movimento transepitelial de água e sais nas brânquias e rins, além do tubo digestivo no caso dos teleósteos marinhos, com resultante manutenção da estabilidade do líquido extracelular. As brânquias de teleósteos marinhos realizam secreção de sal (NaCl) através das células de cloreto, e os rins realizam secreção de íons multivalentes (Mg^{2+} e SO_4^{2-}) através do epitélio do túbulo proximal II. A principal espécie de teleósteo utilizada neste trabalho foi o baiacu-pintado *Sphoeroides testudineus* Linnaeus, 1758, uma espécie estuarina eurihalina abundante nos estuários da Baía de Paranaguá (Paraná, Brasil), e que se distribui em locais onde a salinidade varia de 0 ‰ (gamboas) a 34 ‰ (planícies de maré). A segunda espécie estudada foi o baiacu-mirim *Sphoeroides greeleyi* Gilbert, 1900, uma espécie limitada a uma área de salinidade mais elevada do que *S. testudineus*. O objetivo do presente trabalho foi assim o de avaliar a capacidade de regulação iônica das duas espécies quando submetidas a redução de salinidade, relacionando os resultados com os dados de distribuição de ambas as espécies na natureza, e ainda relacionar possíveis modificações ultra-estruturais nos epitélios branquial e renal com a adaptação de longo-prazo a salinidades baixas. Para atingir este objetivo foram elaboradas 1) curvas de regulação dos íons sódio, cloreto e magnésio após 6 horas e 15 dias de exposição do baiacu-pintado às salinidades de 30, 20, 10 e 5 ‰; 2) curvas de regulação dos íons

cloreto e magnésio após 6 horas e 15 dias de exposição das duas espécies de baiacus às salinidades extremas de 35 e 5 ‰; 3) curvas de regulação do íon cloreto das duas espécies de baiacus submetidas a redução de salinidade durante a diluição da água do mar pela maré vazante, no próprio local de coleta, a gamboa do Rio Baguaçu, com a salinidade reduzindo-se de 29,8 para 4,7 ‰ durante 5,5 horas. Foi feita ainda avaliação do efeito da redução da salinidade de 30 para 10 ‰ durante 15 dias sobre a ultra-estrutura (microscopia eletrônica de transmissão) do epitélio branquial e renal de *S. testudineus*, com a utilização de técnicas morfométricas de quantificação. Ambas as espécies mantiveram suas concentrações iônicas plasmáticas extremamente estáveis, em especial a do íon magnésio, que foi sempre fortemente hipo-regulado no plasma, para todas as salinidades e condições testadas. Contudo, de forma coerente com seus registros de distribuição na natureza, *S. greeleyi* apresentou menor capacidade de tolerar redução da salinidade até valores baixos, tendo sobrevivido apenas 5 dias em 5 ‰ e não tolerou salinidade de 4,7 ‰ no ambiente natural. Análise da ultra-estrutura do epitélio branquial e renal de *S. testudineus* não revelou alteração morfológica significativa em função da redução de salinidade. O rim apresentou estrutura incomum, ausência de glomérulos e presença de tubos pouco numerosos, grandes, com lúmen amplo e epitélio complexo e estratificado. As células em contato com o lúmen apresentaram evidência de secreção por exocitose, além de numerosas mitocôndrias envoltas por dobramentos de membrana na região basal das células, caracterizando epitélio de intensa atividade metabólica de transporte. Os baiacus mostraram-se assim eficientes reguladores das concentrações iônicas do plasma frente a diluição da água do mar, coerente com a ocupação do ambiente estuarino. Adicionalmente, os

experimentos de campo e de laboratório sustentaram os dados de distribuição das duas espécies no complexo estuarino. Espécies estuarinas residentes foram então caracterizadas quanto à sua capacidade de regulação iônica, podendo no futuro servir de biomarcadores na avaliação do impacto de poluentes presentes em ecossistemas litorâneos brasileiros.

ABSTRACT

Osmo-ionic regulation is the function responsible for the maintenance of water content and composition of body fluids in multicellular animals. In teleosts, osmoregulation involves transepithelial movement of water and salts in gills and kidneys, besides the gut in the case of marine teleosts, with resulting stability (homeostasis) in the extracellular fluid. The gills of marine teleosts secrete NaCl through chloride cells, and the kidneys secrete multivalent ions (Mg^{2+} e SO_4^{2-}) through proximal tubule II epithelium. The main pufferfish species used in the current study was *Sphoeroides testudineus* Linnaeus, 1758, an euryhaline estuarine species very abundant in the estuaries of Paranaguá Bay (Paraná, Brazil), and which is found in places where salinity ranges between 0 ‰ (tidal creeks) and 34 ‰ (tidal plains). The second pufferfish studied was *Sphoeroides greeleyi* Gilbert, 1900, a species limited in distribution to an area of higher salinity than *S. testudineus*. The present work thus aimed at evaluating the capacity of ionic regulation of both species of pufferfishes when submitted to salinity decrease, relating the results with both species' field distribution, and still relate possible ultrastructural changes in gill and renal epithelia with long-term acclimation to low salinities. The following was then done: 1) ion regulation curves for sodium, chloride, and magnesium ions after 6 hours and 15 days of exposure of the abundant *S. testudineus* to the salinities of 30, 20, 10, and 5 ‰; 2) ion regulation curves for chloride and magnesium after 6 hours and 15 days of exposure of both species to the extreme salinities of 35 and 5 ‰; 3) ion regulation curves for both species of pufferfishes

submitted to sea water dilution during ebb tide at the collection site, the Bagaçu River tidal creek, with salinity decreasing from 29.8 down to 4.7 ‰ during 5.5 hours. Additionally, the effect of long-term (15 days) acclimation to diluted salinity on the ultrastructure (transmission electron microscopy) of the branchial and renal epithelia of *S. testudineus* was investigated, using morphometric techniques of quantification. Plasma ionic concentrations were determined colorimetrically through commercially available kits. Both species kept their plasma ionic concentrations extremely stable, especially magnesium concentration, which was always strongly hypo-regulated, for all salinities and conditions tested. However, in accordance with their distribution records in nature, *S. greeleyi* was less able to tolerate sea water dilution down to low salinity values, having survived only 5 days in 5 ‰ water. Analysis of the ultrastructure of the branchial and renal epithelia of *S. testudineus* did not reveal any significant morphological alteration upon sea water dilution. The kidney presented a quite unusual morphology, absence of glomeruli, and presence of one or two large tubes with wide lumen and complex stratified epithelium. The cells facing the lumen presented evidence of secretion by exocytosis, besides numerous mitochondria wrapped by membrane infoldings in the basal region of the cells, characterizing a transport epithelium of intense metabolic activity. These estuarine pufferfishes are thus efficient regulators of plasma ionic concentrations when facing sea water dilution, in accordance with their occupation of the estuarine habitat. Additionally, laboratory and field experiments have supported the distribution records of both species in the estuarine complex. Resident estuarine species were then characterized with respect to their osmoregulatory capacities, and

may in the future be used as biomarkers in the evaluation of the impact of contaminants present in coastal brazilian ecosystems.

1 INTRODUÇÃO

Os compartimentos corporais dos animais multicelulares são soluções aquosas complexas constituídas em sua maior parte pelo solvente água e por solutos orgânicos e inorgânicos (sais). O volume e a composição dos líquidos corporais dos animais devem ser mantidos dentro de limites estreitos, para oferecer às suas células um ambiente estável que possibilite a execução de suas funções vitais (SCHMIDT-NIELSEN, 1997). A função responsável pela manutenção do teor hídrico e composição dos líquidos corporais é assim chamada de regulação osmo-iônica.

O organismo animal não é obviamente um sistema fechado, porque realiza trocas com o ambiente onde vive através da respiração, da obtenção de alimentos e da excreção de metabólitos, permitindo assim fluxos passivos de água e sais entre os compartimentos corporais e o ambiente, a favor dos gradientes, principalmente em animais aquáticos que respiram por brânquias. Para a manutenção da estabilidade dos seus líquidos corporais, um animal gasta energia para contrapor estes fluxos passivos e necessita de mecanismos fisiológicos para sustentar e manter estáveis os gradientes químicos entre seu corpo e o ambiente de forma compatível com suas funções celulares. Algumas estratégias empregadas para a manutenção da estabilidade dos líquidos corporais não envolvem gasto de energia metabólica. Os principais mecanismos que não requerem gasto de energia para minimizar o efeito do ambiente são a associação entre a redução de permeabilidade das membranas biológicas nos

tecidos de contato com o meio e a redução dos gradientes químicos (principalmente em animais aquáticos) entre os fluidos corporais e o meio externo (JOBILING, 1995; SCHMIDT-NIELSEN, 1997).

Nos diferentes ambientes onde os animais vivem (ambientes aquáticos marinhos, estuarinos e dulcícolas e ambiente terrestre) os problemas para a manutenção das concentrações de solutos e água são diferenciados. No ambiente aquático os sais que encontram-se dissolvidos em diferentes concentrações devem ser considerados, pois exercem influência inevitável sobre o equilíbrio osmótico dos organismos (SCHMIDT-NIELSEN, 1997), uma vez que a troca gasosa pela superfície respiratória (epitélio branquial) necessariamente implica em grande área de elevada permeabilidade, permitindo a difusão de água e solutos. Animais aquáticos, principalmente estuarinos ou dulcícolas, tanto vertebrados quanto invertebrados, irão efetuar regulação osmótica e iônica do seu fluido extracelular para assegurar a sua homeostase e minimizar a geração de gradientes através das membranas plasmáticas das células que perturbem o volume e a composição do citoplasma de suas células, uma vez que o líquido intracelular é necessariamente sempre iso-osmótico ao líquido extracelular em células animais, que não possuem parede celular (EVANS, 1993; JOBILING, 1995).

Os animais que vivem em ambiente aquático podem ser caracterizados de acordo com a concentração osmótica ou osmolalidade de seus fluidos corporais em diferentes ambientes salinos. Animais como os invertebrados marinhos, cuja osmolalidade dos fluidos corporais (extracelular e intracelular) é a mesma do ambiente onde vivem são ditos iso-osmóticos em relação ao meio. As espécies que vivem em água doce necessariamente possuem osmolalidade maior que a do ambiente, sendo

denominadas de hiper-osmóticas. Por outro lado, espécies marinhas como os teleósteos possuem osmolalidade dos fluidos corporais menor que a do ambiente, sendo denominadas de hipo-osmóticas. Considerando a composição iônica dos fluidos corporais, os animais podem ser caracterizados como iso-iônicos, o que é bastante raro mesmo entre invertebrados marinhos como os celenterados e equinodermas que sustentam gradientes de alguns íons. Os animais podem ser hiper-iônicos como peixes de água doce, ou hipo-iônicos, como peixes teleósteos e elasmobrânquios marinhos (JOBILING, 1995; SCHMIDT-NIELSEN, 1997).

De forma geral, quando espécies aquáticas são submetidas a variação de salinidade da água podem reagir de duas formas: a primeira é permitindo a variação na osmolalidade do fluido extracelular de forma a acompanhar a variação do ambiente, permanecendo aproximadamente iso-osmóticas e sendo chamadas de osmoconformadoras. Este tipo de estratégia envolve minimização de gradientes e pouco gasto metabólico em tecidos especializados, porém grande estresse e necessidade de regulação de volume celular pelas células em geral. A segunda forma de reagir à variação da salinidade da água é mantendo ou regulando sua concentração osmótica a despeito das alterações do ambiente (homeostase), sendo as espécies que atuam assim chamadas de osmorreguladoras (SCHMIDT-NIELSEN, 1997).

Independente de serem iso-, hiper- ou hipo-osmóticos, osmoconformadores ou osmorreguladores, os animais aquáticos podem ser ainda classificados avaliando-se sua tolerância em relação à variação de salinidade do ambiente. Os que conseguem tolerar grandes variações de concentração salina no ambiente onde vivem são chamados de eurihalinos, e os que possuem tolerância limitada à variação de

salinidade são chamados de estenohalinos. Deve-se ressaltar que esta última classificação tem mais sentido quando usada de forma comparativa, e que todas estas classificações dependem da salinidade do ambiente e do tempo de exposição a esta salinidade.

1.1 INFLUÊNCIA DO AMBIENTE NA REGULAÇÃO OSMÓTICA E IÔNICA DE ESPÉCIES AQUÁTICAS

A concentração de sal na água do mar é de aproximadamente 3,5% (ou 35 ‰), podendo variar com o nível de precipitação e com o aporte de água doce de rios locais (EVANS, 1993; SCHMIDT-NIELSEN, 1997). Em regiões litorâneas estuarinas onde a água do mar é misturada com a água de rios, a salinidade é diminuída formando água salobra com salinidade entre 3,0% (30 ‰) e 0,05% (0,5 ‰). Os principais elementos inorgânicos dissolvidos na água são sódio, cloreto, magnésio, enxofre e cálcio, sendo o sódio e o cloreto (NaCl) os de maior contribuição quantitativa para sua osmolalidade, assim como para a osmolalidade do líquido extracelular de todos os animais (EVANS, 1993; SCHMIDT-NIELSEN, 1997).

A água do mar comum contém cerca de 470 mmol de sódio e 550 mmol de cloreto por litro e junto com outros íons como o magnésio e sulfato alcança cerca de 1000 mOsm/kgH₂O. A concentração total de sais na água doce é muito baixa, variando de 0,1 a 10 mM, mas os íons individualmente podem apresentar uma grande variação nas suas concentrações de acordo com a origem da água (EVANS, 1993; JOBLING, 1995; SCHMIDT-NIELSEN, 1997).

A água salobra é encontrada principalmente em ambiente estuarino. Podemos definir estuário como uma massa de água costeira que possui ligação com o mar aberto, e é influenciada pelos movimentos das marés, que gera mistura da água doce com a água do mar em proporções variadas durante o dia, o que resulta em flutuação de salinidade (ODUM, 1988; MANN & LAZIER, 1991; ODUM, 1994). O estuário poderia ser considerado apenas uma área de transição entre o ambiente marinho e o de água doce, porém suas características ecológicas o tornam um ecossistema diferenciado e exclusivo (ODUM, 1988).

As principais propriedades de um ambiente estuarino são 1) sua alta produtividade devido à grande disponibilidade de nutrientes e circulação de água que favorecem o crescimento de vegetais e animais; 2) a presença de algas macrófitas bentônicas e de superfície e de fitoplâncton, as quais se responsabilizam pelo fornecimento de alimento aos organismos consumidores primários; e 3) a intensa atividade reprodutiva de inúmeras espécies de moluscos, crustáceos, equinodermas e peixes, que encontram nos estuários proteção contra predadores e alimento abundante para um crescimento rápido (ODUM, 1988; MANN & LAZIER, 1991; CUNHA, 1999; NARDI, 1999; LOPES, 2000).

De acordo com MANN & LAZIER (1991) variações sazonais no índice pluviométrico e ciclo das marés são os dois fatores que determinam diretamente a salinidade da água do estuário, influenciando a distribuição de suas espécies por alterações significativas na estratificação salina da coluna d'água. Para evitar o estresse da variação na salinidade, é observada muitas vezes uma adaptação comportamental de migração nas espécies que procuram a salinidade mais próxima do ideal para sua

sobrevivência, ou ainda comportamentos como fechar concha ou enterrar-se. Contudo, diversas espécies não evitam a variação na salinidade do meio, possuindo mecanismos para enfrentá-la assegurando a homeostase do líquido extracelular.

O ambiente estuarino é explorado pelo ser humano de formas variadas devido à sua importância econômica. Estuários atraem a presença humana por sua elevada produtividade biológica, por se localizarem próximos a cidades e por serem adequados para fins de aquicultura (MANN & LAZIER, 1991). Contudo, projetos que visem construções e modificações neste ambiente devem ser executados cuidadosamente para evitar perturbações no padrão normal de circulação da água, na vegetação marinha e dos mangues que constituem microambientes para a reprodução principalmente de animais invertebrados (ODUM, 1988).

1.2 REGULAÇÃO OSMÓTICA E IÔNICA EM PEIXES TELEÓSTEOS

A maioria dos estudos sobre regulação osmótica e iônica de peixes é feita com teleósteos, devido a: 1) seu elevado número de espécies, 2) sua altíssima diversidade tanto no ambiente marinho quanto dulcícola, 3) facilidade na obtenção de exemplares, e 4) facilidade na manutenção em laboratório (EVANS, 1993). Os peixes teleósteos mantêm sua concentração osmótica em torno de 1/4 a 1/3 da concentração da água do mar. As espécies de teleósteos marinhos são hipo-osmóticas à água do mar, apresentando concentração plasmática entre 370 e 480 mOsm/kgH₂O. Estes valores são mais elevados do que em espécies de água doce, as quais são obviamente hiper-osmóticas ao seu ambiente e apresentam osmolalidade plasmática entre 230 e 330 mOsm/kgH₂O (EVANS, 1993; JOBLING, 1995; SCHMIDT-NIELSEN, 1997).

A função da osmorregulação envolve o transporte de água e de sais no organismo do peixe com o objetivo de manter a estabilidade do líquido extracelular. A manutenção desta estabilidade frente a variações de salinidade do meio depende de vários mecanismos fisiológicos. Evidências experimentais demonstram alterações nos fluxos transepiteliais de íons e água nos epitélios branquial, renal e do tubo digestivo; modificações estruturais nas brânquias; alterações na atividade de enzimas; formação de proteínas de membrana responsáveis pelo transporte de sal, muitas vezes com demonstração da ação moduladora de hormônios glicocorticóides e esteróides sobre estes processos (KARNAKY, 1980; BORSKY *et al.*, 1994; GAUMET *et al.*, 1995; HANSEN *et al.*, 1995; JOBLING, 1995).

As adaptações fisiológicas que as espécies de peixes apresentam para lidar com variações de salinidade estão em última instância relacionadas com a absorção e secreção de uma determinada quantidade de sais (ZADUNAISKY, 1996; WOOD & PÄRT, 1997). Em teleósteos marinhos, que bebem água do mar, a taxa de absorção de sal pelo tubo digestivo está relacionada com a permeabilidade osmótica ao sódio e cloreto, que são os principais íons absorvidos. A absorção de sal acompanhada pela água inicia-se no esôfago e estende-se até o estômago e intestino. Os rins e as brânquias são os responsáveis pela secreção do excesso de sais ingeridos a fim de manter a sua baixa concentração plasmática (hipo-regulação) (EVANS, 1993; JOBLING, 1995).

A absorção dos íons no tubo digestivo ocorre porque a água do mar ingerida é mais concentrada que o organismo do animal, levando também à entrada de água no sangue do animal, que é desejável para contrapor a perda osmótica pelas superfícies

permeáveis (AVELLA *et al.*, 1993; EVANS, 1993; JOBLING, 1995). A água é perdida por osmose através do epitélio branquial e pela urina e para compensar estas perdas ocorre a ingestão de água do mar. Os sais absorvidos pelo tubo digestivo e que entraram por difusão passiva pelas brânquias são eliminados pelo próprio epitélio branquial através de transporte ativo de sódio e cloreto pelas células de cloreto (SMITH *et al.*, 1995; KÜLTZ, 1996; SCHMIDT-NIELSEN, 1997; HAOND *et al.*, 1998). Nos rins a excreção de sódio e cloreto é menor porque a urina de um peixe teleósteo marinho não é mais concentrada que seu sangue, porém a excreção de magnésio e sulfato é alta, não ocorrendo nas brânquias (HICKMAN & TRUMP, 1969; JOBLING, 1995; BIJVELDS *et al.*, 1997; BIJVELDS *et al.*, 1998; CHANDRA *et al.*, 1997; SCHMIDT-NIELSEN, 1997). Os teleósteos dulcícolas, por serem hiper-osmóticos ao ambiente onde vivem, realizam absorção de sal através do epitélio branquial e reabsorção de sal e excreção do excesso de água através do epitélio renal (urina diluída) para a manutenção da osmolalidade do plasma (EVANS, 1993; JOBLING, 1995).

Muitos teleósteos marinhos são fortemente eurihalinos, possuindo grande capacidade de tolerar e se adaptar a reduções de salinidade, especialmente animais que vivem em regiões estuarinas sujeitas a diluição da água do mar (JOBLING, 1995). Quando uma destas espécies é submetida a uma redução de salinidade, as modificações fisiológicas ocorrem em duas etapas. A primeira etapa é adaptativa, na qual ocorrem alterações na concentração iônica e osmótica do plasma. Quando um peixe marinho é transferido para água doce ocorre redução da osmolalidade do plasma pela perda de íons inorgânicos e ganho osmótico de água. A segunda etapa é regulatória, na qual a osmolalidade e as concentrações iônicas do plasma aumentam

para seus níveis normais, sendo reguladas e mantidas dentro de limites estreitos em homeostase. A redução da salinidade acarreta em geral uma redução do número de células de cloreto das brânquias, e da atividade da Na^+, K^+ -ATPase branquial, eventos controlados pelo hormônio prolactina (EPSTEIN *et al.*, 1980; EVANS, 1993; JOBLING, 1995; ZADUNAISKY, 1996). Por outro lado, em teleósteos dulcícolas eurihalinos transferidos para água do mar, na etapa adaptativa ocorre aumento da osmolalidade do plasma e da concentração iônica devido à reversão do gradiente salino que favorece agora a entrada difusiva de sal pelo epitélio branquial. Na etapa regulatória, após alguns dias ou semanas de aclimação à água do mar, em geral é observado um aumento no número de células de cloreto e aumento da atividade da enzima Na^+, K^+ -ATPase branquial, eventos controlados pelos hormônios cortisol e do crescimento (EPSTEIN *et al.*, 1980; EVANS, 1993; JOBLING, 1995; ZADUNAISKY, 1996; MORGAN *et al.*, 1997).

1.3 ATIVIDADE DAS BRÂNQUIAS NA REGULAÇÃO OSMÓTICA E IÔNICA DO PLASMA

As brânquias dos peixes teleósteos possuem dupla função. Além de realizarem o transporte de gases para a respiração, realizam transporte iônico para a manutenção do equilíbrio osmótico do animal. Nos filamentos branquiais e no epitélio opercular branquial destacam-se células especiais para o transporte ativo de íons cloreto, as células de cloreto (JOBLING, 1995; ZADUNAISKY, 1996; PERRY, 1997; VAN DER HEIJDEN *et al.*, 1997; FERNANDES *et al.*, 1998), além de células pavimentosas,

células de muco e células que constituem o neuro-epitélio branquial (KÜLTZ, 1996; MORON & FERNANDES, 1996; PERRY, 1997; FONSECA-NETO & SPACH, 1999).

As células de cloreto ocupam apenas uma pequena porção do epitélio branquial (lamelas primárias e secundárias), porém são primariamente responsáveis pelo transporte no sentido de absorção ou secreção de sal (LAURENT & DUNEL, 1980; AVELLA *et al.*, 1993; PERRY, 1997; VAN DER HEIJDEN *et al.*, 1997; EIRAS-STOFELLA & CHARVET-ALMEIDA, 1998). O transporte de íons ocorre de forma oposta em teleósteos marinhos e de água doce. Os peixes marinhos necessitam excretar sal e os de água doce necessitam absorver sal devido às diferenças de concentrações entre seus líquidos corporais e o ambiente onde vivem, ou seja, os diferentes gradientes que enfrentam (JOBILING, 1995; ZADUNAISKY, 1996; WOOD & PÄRT, 1997; PERRY, 1997; VAN DER HEIJDEN *et al.*, 1997).

Os mecanismos de excreção de sal destas células pelos teleósteos marinhos são os mesmos encontrados nas células da glândula retal dos tubarões e glândulas de sal das aves marinhas. As células transportadoras possuem condutância elevada ao cloreto na região apical e transportam sódio, potássio e o cloreto através do co-transportador $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ localizado na membrana basolateral (EVANS, 1980; PHILPOTT, 1980; EVANS, 1993; JOBILING, 1995; ZADUNAISKY, 1996). O papel da Na^+, K^+ -ATPase na secreção de sal nas células de cloreto de teleósteos em água do mar é indireto porém absolutamente necessário. Envolve a remoção de sódio das células de cloreto produzindo e mantendo um gradiente entre o meio intra e extracelular, favorecendo a entrada passiva de sódio na célula (PHILPOTT, 1980; JOBILING, 1995; ZADUNAISKY, 1996). Devido ao gradiente eletroquímico criado e

sustentado pela Na^+, K^+ -ATPase, o cloreto é transportado para o interior da célula por co-transporte com o sódio e o potássio na membrana basolateral ($\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$) e através de canais de cloreto sai da célula para a água, enquanto o sódio sai por via paracelular (CHOE *et al.*, 1999; JOBLING, 1995).

No entanto, o transporte de sal realizado nas células de cloreto das brânquias de teleósteos de água doce envolve transporte não só do cloreto, mas deste íon juntamente com o sódio e cálcio (FLIK *et al.*, 1993; JOBLING, 1995; ZADUNAISKY, 1996; VAN DER HEIJDEN *et al.*, 1997; PERRY, 1997; FERNANDES *et al.*, 1998). Os mecanismos pelos quais o íon cloreto é transportado nas brânquias de peixes de água doce não são completamente estabelecidos (PERRY, 1997), porém sabe-se que a concentração de cálcio intracelular pode servir de sinal (segundo mensageiro) em resposta a uma variação de salinidade do ambiente (ZADUNAISKY, 1996). A regulação iônica do cloreto em teleósteos de água doce afeta também o equilíbrio ácido-básico destes peixes (HASWELL *et al.*, 1980; MADSEN *et al.*, 1996; PERRY, 1997; FERNANDES *et al.*, 1998). Em alcalose metabólica peixes dulcícolas apresentam aumento do número de células de cloreto e um aumento na absorção de cloreto, com resultante aumento na secreção de bicarbonato. Em contrapartida, em acidose metabólica ocorre diminuição da superfície das células de cloreto expostas à água e o desacoplamento do co-transporte $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ (PERRY, 1997; GOSS *et al.*, 1998; PATRICK & WOOD, 1999).

Para desempenhar sua função de transporte de sal, as células de cloreto encontram-se concentradas entre as lamelas secundárias (na região inter-lamelar) da brânquia e nas junções entre o filamento (ou lamela primária) e a lamela branquial

secundária (LAURENT & DUNEL, 1980; PERRY, 1997; FERNANDES *et al.*, 1998), sendo classificadas em dois tipos: α e β . As do tipo α localizam-se na base das lamelas secundárias e estão presentes em brânquias de teleósteos de água doce e marinhos. Acredita-se que sejam as células precursoras das células de cloreto de peixes adaptados a água do mar. As do tipo β são encontradas na região inter-lamelar (entre as lamelas secundárias) do filamento primário. São células freqüentes em peixes de água doce e podem degenerar quando a espécie é transferida e adaptada a água do mar (JOBILING; 1995; PERRY, 1997; VAN DER HEIJDEN *et al.*, 1997).

As células de cloreto caracterizam-se por possuírem seu formato globoso, por apresentarem muitas mitocôndrias envoltas por um sistema tubular, vesículas sub-apicais, núcleo ovóide e complexas junções com células vizinhas (LAURENT & DUNEL, 1980; PHILPOTT, 1980; JOBILING, 1995; MORON & FERNANDES, 1996; ZADUNAISKY, 1996; PERRY *et al.*, 1996; PERRY, 1997). Transições adaptativas após longo prazo de exposição a salinidades diferentes são muitas vezes refletidas por modificações ultra-estruturais nestas células. Por exemplo, verificou-se redução da região apical das células de cloreto de exemplares o bagre (*Hypostomus plecostomus*) aclimatados a água destilada, gerando redução da perda de íons para o ambiente (FERNANDES *et al.*, 1998). Como outro exemplo, pode-se citar VAN DER HEIJDEN *et al.* (1997), observaram aumento no número das células de cloreto no epitélio branquial da tilápia (*Oreochromis mossambicus*) associando o aumento na salinidade.

1.4 ATIVIDADE DO RIM NA REGULAÇÃO OSMÓTICA E IÔNICA DO PLASMA

O rim dos vertebrados terrestres é o único órgão responsável pela excreção e manutenção da homeostase dos fluidos corporais. Nos peixes, este órgão é auxiliado nesta tarefa pelas brânquias e outros tecidos como esôfago, intestino e epitélio opercular, como já citado acima. Nas várias classes de vertebrados, encontramos diversos tipos de rins, adaptados ao ambiente onde o animal vive (HICKMAN & TRUMP, 1969; HENTSCHEL & ELGER, 1989; BEYENBACH, 1995).

O rim dos peixes teleósteos localiza-se dorsalmente, junto da coluna vertebral, e é dividido em rim anterior ou rim da cabeça que contém tecido hematopoiético e rim posterior ou do tronco que possui os túbulos (HICKMAN & TRUMP, 1969). Comparado com o rim de peixes elasmobrânquios, o rim dos teleósteos é morfologicamente simples. O rim dos tubarões e raias possui um elevado grau de complexidade, destinado principalmente à retenção da uréia utilizada na sua regulação osmo-iônica (HICKMAN & TRUMP, 1969; HENTSCHEL & ELGER, 1989; JOBLING, 1995).

A maioria dos teleósteos (principalmente os marinhos), possuem o néfron com número reduzido de segmentos. Em algumas espécies de peixes e anfíbios de água doce a estrutura renal é um pouco mais complexa, com néfrons apresentando segmentação bem definida (HICKMAN & TRUMP, 1969; HENTSCHEL & ELGER, 1989). A estrutura morfológica do rim dos teleósteos em geral, é caracterizada por apresentar néfron com corpúsculos renais (glomérulo e cápsula de Bowman) e túbulo renal. O túbulo renal é dividido em duas porções: uma proximal e outra distal. O segmento inicial após o corpúsculo renal é o túbulo proximal, seguido do túbulo distal

que conecta-se com os túbulos coletores e finalmente dutos coletores. Quando observada ao microscópio óptico, a morfologia do rim apresenta-se em geral com abundância de túbulos (HICKMAN & TRUMP, 1969; HENTSCHEL & ELGER, 1989; HENTSCHEL *et al.*, 1993).

O rim dos teleósteos de água doce possui glomérulos bem desenvolvidos ricamente vascularizados, juntamente com túbulos proximal e distal, túbulos e dutos coletores. O túbulo proximal é dividido em dois segmentos: segmento I com proeminente membrana apical de borda em escova e numerosos lisossomos, homólogo ao túbulo proximal dos tetrápodos; segmento II rico em mitocôndrias com membrana apical de borda em escova menos desenvolvida. O segmento proximal II é característico de teleósteos e elasmobrânquios, e não é homólogo a segmentos renais de tetrápodos. Os rins dos teleósteos marinhos apresentam número reduzido de glomérulos e em cerca de 30 espécies o segmento I do túbulo proximal e o glomérulo estão ausentes, o que caracteriza estas espécies como aglomerulares. O túbulo distal é geralmente ausente em teleósteos marinhos tanto glomerulares quanto aglomerulares (HICKMAN & TRUMP, 1969; BEYENBACH & BAUSTIAN, 1989; EVANS, 1993; JOBLING, 1995).

Cada estrutura do rim desempenha uma função específica na produção da urina e regulação osmo-iônica no animal. Os glomérulos dos teleósteos estão concentrados na região posterior do rim, e são responsáveis pela ultrafiltração do sangue, produzindo um fluido filtrado que dará origem à urina. Nas espécies marinhas e estuarinas adaptadas a água do mar os corpúsculos renais apresentam um extenso mesângio (grupamento de células intersticiais que realizam sustentação dos capilares

glomerulares) ao redor da periferia dos capilares glomerulares, arranjo bem menos desenvolvido em espécies de água doce (HICKMAN & TRUMP, 1969; HENTSCHEL & ELGER, 1989).

Alterações morfológicas glomerulares podem ocorrer nos teleósteos em determinadas condições. Por exemplo, acredita-se que em espécies eurihalinas ocorra redução do tamanho dos glomérulos durante a adaptação à água do mar pela ação de hormônios vasoativos (HENTSCHEL & ELGER, 1989). A aparente redução no ritmo de filtração glomerular de peixes de água doce adaptados a água do mar se dá devido a uma redução no número de glomérulos filtrantes em até 90%, além da diminuição do ritmo de filtração por alteração no calibre dos capilares glomerulares pela atuação das células mesangiais, e por redução nos poros endoteliais (HICKMAN & TRUMP, 1969; HENTSCHEL & ELGER, 1989; EVANS, 1993). A intensidade da filtração pode assim ser modificada como uma adaptação fisiológica à variação de salinidade do ambiente, e depende da área de superfície filtrante do glomérulo, do número e tamanho dos glomérulos funcionais, juntamente com a pressão coloidosmótica e hidrostática do sangue nos capilares glomerulares (HENTSCHEL & ELGER, 1989).

O segmento inicial do túbulo proximal (PI) tem a finalidade de reabsorver o filtrado glomerular, contendo células especializadas com aparato apical túbulo-vesicular (citoplasma apical com pequenas vesículas, túbulos e vacúolos responsáveis por endocitose de macromoléculas) e lisossomal (lisossomos responsáveis pela digestão das macromoléculas endocitadas) envolvidos em mecanismos de absorção (HICKMAN & TRUMP, 1969; HENTSCHEL & ELGER, 1989). Muitas moléculas de açúcares e aminoácidos são reabsorvidos por transporte acoplado com o sódio, por co-

transportadores localizados na membrana apical de borda em escova, de forma homóloga ao rim dos demais vertebrados (FREIRE *et al.*, 1995). No segmento II do túbulo proximal (PII) ocorrem basicamente mecanismos de secreção transepitelial de íons inorgânicos multivalentes (Mg^{+2} e SO_4^{-2}) e substâncias orgânicas, muitas vezes através da exocitose de vesículas (BEYENBACH & BAUSTIAN, 1989; BEYENBACH *et al.*, 1993; HENTSCHEL & ZIEROLD, 1994; FREIRE *et al.*, 1995; FREIRE *et al.*, 1996). As microvilosidades da membrana apical de borda em escova são menores e menos densas em comparação com as da borda em escova do segmento I. No túbulo distal ocorre a regulação da composição iônica urinária e o balanço ácido-básico, e acredita-se que ocorra reabsorção do cloreto de sódio para a produção de urina diluída, em espécies de água doce (RENFRO, 1980; HENTSCHEL & ELGER, 1989; HENTSCHEL *et al.*, 1993; BEYENBACH, 1995).

A urina produzida é transportada para a bexiga urinária que funciona não apenas como reservatório, mas possui epitélio atuante na secreção e reabsorção de íons e água de forma controlada por ação endócrina de hormônios tais como a urotensina, peptídeo natriurético atrial, entre outros (JOBBLING, 1995).

Teleósteos de água doce possuem uma menor permeabilidade do organismo a água, em relação a teleósteos marinhos, e um ritmo de filtração glomerular elevado, coerente com o maior desenvolvimento anatômico dos glomérulos mencionado anteriormente, para compensar a inevitável elevada entrada osmótica da água. Esta elevada taxa de filtração, aliada à reabsorção de solutos orgânicos no túbulo proximal e a reabsorção de cloreto de sódio no túbulo distal e duto coletor, gera uma urina com aproximadamente 10% da concentração do plasma (urina diluída, hipotônica ao seu

sangue) (EVANS, 1993; JOBLING, 1995). Em contrapartida, em peixes marinhos a água é retida, sendo o volume excretado muito pequeno, uma vez que já ocorre perda osmótica para o ambiente hiper-salino (BAUSTIAN *et al.*, 1997). A urina serve como via de eliminação de sais, porém leva a perda de água pois será no máximo iso-osmótica ao plasma do teleósteo marinho (HICKMAN & TRUMP, 1969; HENTSCHEL & ELGER, 1989; JOBLING, 1995).

O sódio e o cloreto são os íons osmoticamente dominantes no fluido do túbulo proximal e são reabsorvidos nesta porção tubular, já o magnésio e sulfato são secretados. O magnésio é secretado ativamente no lúmen do túbulo proximal II, contra o seu gradiente eletroquímico, e sua concentração luminal é mais elevada em comparação com as concentrações peritubulares. Por ser elemento crucial no metabolismo animal, o magnésio tem suas concentrações intracelulares e extracelulares mantidas dentro de limites estreitos através dos mecanismos de transporte renal (principal local de regulação extracelular). Os mecanismos renais são responsáveis pela forte hipo-regulação de magnésio nos teleósteos marinhos: aproximadamente 1 mM no plasma, e 54 mM na água do mar (BEYENBACH *et al.*, 1993; HENTSCHEL & ZIEROLD, 1994; BEYENBACH, 1995; BIJVELDS *et al.*, 1998).

O transporte de magnésio para o lúmen ocorre de forma por via transcelular ou paracelular. Estudos sugerem diferentes mecanismos de secreção de magnésio no epitélio tubular. A secreção pode ocorrer de forma ativa na membrana com borda em escova nas células epiteliais tubulares; o sódio pode ser transportado para o interior da célula devido ao seu gradiente eletroquímico acoplado à secreção do magnésio para o interior do túbulo; pode ocorrer exocitose de vesículas contendo magnésio

(BEYENBACH *et al.*, 1993; HENTSCHEL & ZIEROLD, 1994; BEYENBACH, 1995). Por permanecer no lúmen, o magnésio exerce efeito Donnan, elevando a pressão osmótica no lúmen que leva à secreção transepitelial da água (BEYENBACH *et al.*, 1993; HENTSCHEL & ZIEROLD, 1994; BEYENBACH, 1995; BEYENBACH *et al.*, 1997; GONZALEZ-CABRERA *et al.*, 1995; CHANDRA *et al.*, 1997).

Peixes marinhos aclimatados a água do mar diluída reduzem a concentração urinária de magnésio e aumentam a concentração de sódio, indicando uma menor secreção de magnésio (e/ou menor reabsorção de água) pelo túbulo proximal e uma maior secreção de sódio (BEYENBACH *et al.*, 1993; BAUSTIAN *et al.*, 1997). Se o animal for aclimatado em água doce deixará de haver secreção e ocorrerá absorção resultante de magnésio pela membrana luminal. Em espécies de teleósteos de água doce o túbulo proximal realiza reabsorção do magnésio filtrado.

1.5 CARACTERÍSTICAS DO GÊNERO *Sphoeroides*

O gênero *Sphoeroides* (família Tetraodontidae) reúne baiacus que habitam águas marinhas costeiras nos oceanos Atlântico, Índico e Pacífico e algumas espécies que penetram em estuários, possuindo ainda alguns representantes dulcícolas, tanto em regiões tropicais quanto subtropicais (TARGETT, 1978; CORRÊA *et al.*, 1990; WOSIACKI, 1990; ALVAREZ – LEÓN, 1991; CORRÊA *et al.*, 1992; NELSON, 1994; WALKER Jr & BUSSING, 1996; CHAVES & CORRÊA, 1998; CUNHA, 1999; NARDI, 1999; LOPES, 2000; FIGUEIREDO & MENEZES, 2000).

O nome da família se deve à presença de maxilas modificadas, constituídas por duas placas superiores e duas inferiores, resultantes da coalescência de unidades

dentígeras. Uma característica marcante destes animais é o corpo arredondado transversalmente capaz de ser inflado por ingestão de água ou ar, não apresentando costelas e ossos epipleurais. Os membros do gênero *Sphoeroides* não apresentam espinhos em sua epiderme, porém estes podem estar presentes em outros gêneros pertencentes a esta família (LAUDER & LIEM, 1983; NELSON, 1994; FIGUEIREDO & MENEZES, 2000).

Os baiacus são conhecidos pela população mundial pela produção de um alcalóide tóxico, a tetrodotoxina (TTX), um poderoso inibidor de canais de sódio das membranas celulares (HILLE, 1992), que aloja-se nas suas vísceras e pode ser fatal se ingerido. A toxina não é encontrada na musculatura, porém, encontra-se nas vísceras de forma geral e nas gônadas no período reprodutivo (CORRÊA *et al.*, 1990; CORRÊA *et al.*, 1992; NELSON, 1994; FIGUEIREDO & MENEZES, 2000).

A principal espécie utilizada neste trabalho é o *Sphoeroides testudineus* Linnaeus, 1758 (baiacu-pintado) (Figura 1a), caracterizado por não apresentar apêndices dérmicos (pequenas projeções cutâneas achatadas), e possuir linhas claras isolando manchas escuras de formatos diversos na região dorsal do corpo. Assim como outras espécies pertencentes a este gênero, habitam baías e estuários, chegando a penetrar em água doce (CORRÊA *et al.*, 1990; WOSIACKI, 1990; CORRÊA *et al.*, 1992; FIGUEIREDO & MENEZES, 2000). *S. testudineus* distribui-se de Nova Jersey (Estados Unidos da América) até o estado de Santa Catarina no Brasil. Na Baía de Paranaguá (Paraná) está entre as espécies mais abundantes nos estuários tanto nos canais do manguezal chamados de gamboas quanto nas planícies de maré adjacentes, distribuindo-se em locais com salinidade variando de 0 ‰ (gamboas) a 34 ‰ (planície

de maré) (CUNHA, 1999; NARDI, 1999; LOPES, 2000). Alimentam-se de diferentes organismos abundantes neste ambiente: crustáceos, moluscos, equinodermas, briozoários, poliquetas, peixes e algas (TARGETT, 1978; FIGUEIREDO & MENEZES, 2000).

A segunda espécie estudada aqui, *Sphoeroides greeleyi* Gilbert, 1900 (baiacumirim) Figura 1b), apresenta um padrão de manchas escuras mais irregular no dorso e laterais do corpo, com tamanho, número e disposição variáveis, e apresenta apêndices dérmicos na parte látero-inferior do corpo. *S. greeleyi* é uma espécie de baiacu comum no litoral brasileiro e da mesma forma que *S. testudineus* habita baías e estuários de águas pouco profundas. Distribui-se de Honduras, pelo Caribe até o litoral do Paraná (FIGUEIREDO & MENEZES, 2000). Na baía de Paranaguá, o *S. greeleyi* está limitado a uma área de salinidade mais elevada que o *S. testudineus*, sendo menos abundante em canais de manguezal mais internos, onde a salinidade tende a diminuir pelo aporte de água doce dos rios que constituem o complexo estuarino (CUNHA, 1999; NARDI, 1999; LOPES, 2000). Ambas as espécies de baiacus são encontradas em estuários da Baía de Paranaguá em todos os períodos do ano nas formas adultas e juvenis, utilizando o complexo estuarino como local de reprodução (CUNHA, 1999; NARDI, 1999).

Nenhum estudo foi feito com representantes deste gênero visando explicar suas adaptações fisiológicas e morfológicas (ultra-estruturais) frente às reduções de salinidade do seu ambiente. Dada a importância econômica das regiões estuarinas e sua susceptibilidade à contaminação por poluentes de origem antropogênica, torna-se crucial o estudo da função da regulação osmo-iônica em espécies deste ambiente. A função da osmorregulação é imediatamente afetada pela presença de agentes tóxicos

na água, podendo assim servir de biomarcador de contaminação. Através de experimentos de aclimatação a curto prazo (6 horas), podem ser obtidos dados da capacidade de regulação osmo-iônica dos animais em situação semelhante à descida de maré no seu ambiente. Experimentos de campo nos quais os animais são monitorados ao longo do ciclo de maré são até o momento desconhecidos para o litoral paranaense e são importantes para validar os resultados dos experimento de laboratório. Por outro lado, após a aclimatação de 15 dias, pode ser verificada a capacidade de regulação a longo prazo das concentrações iônicas do plasma, diante da redução de salinidades em níveis variados. A investigação de possíveis alterações ultra-estruturais das brânquias e rins após 15 dias de aclimatação pode fornecer as bases morfológicas para os processos fisiológicos que levam a homeostase nestas espécies de peixes estuarinos, quando submetidos a redução de salinidade.

1.6 OBJETIVOS

1.6.1 Objetivo Geral

Avaliar a capacidade de regulação iônica dos baiacus pertencentes às espécies *Sphoeroides testudineus* e *Sphoeroides greeleyi* periodicamente sujeitos a redução da salinidade no seu ambiente natural durante a descida de maré, e relacionar os resultados com dados de distribuição das espécies nos estuários.

1.6.2 Objetivos específicos

1. Estabelecer curvas de regulação iônica plasmática dos íons sódio, cloreto e magnésio, diante de redução da salinidade da água em *S. testudineus*;

2. Comparar as curvas de regulação iônica dos íons cloreto e magnésio a curto prazo (6 h) e longo prazo (15 dias) entre *S. testudineus* e *S. greeleyi* em extremos de salinidade;
3. Comparar as curvas de regulação iônica dos íons cloreto no ambiente natural ao longo do ciclo de descida da maré entre *S. testudineus* e *S. greeleyi*;
4. Avaliar o efeito da redução de salinidade a longo prazo (15 dias) sobre a ocorrência de alterações ultra-estruturais no epitélio branquial e tubular renal indicativos de mecanismos de atuação na regulação iônica do plasma de *S. testudineus*.

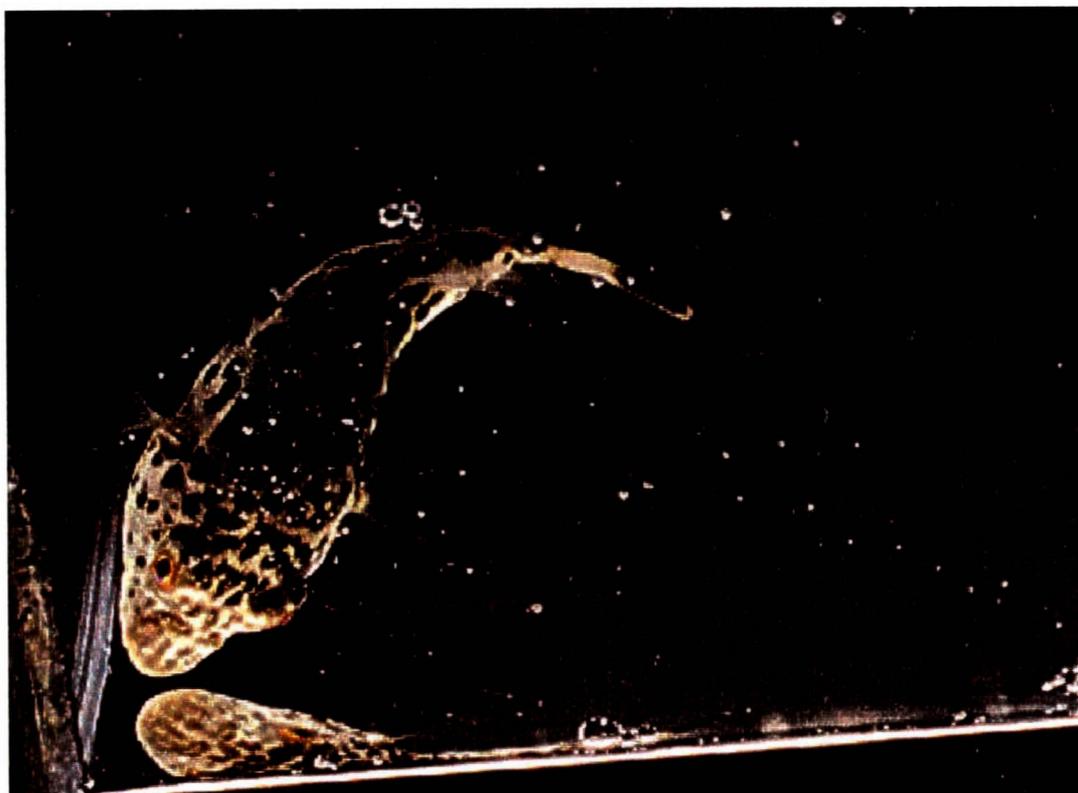


Figura 1: *Sphoeroides testudineus*

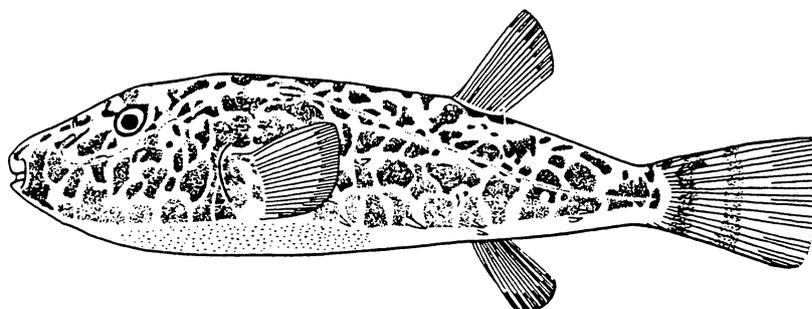


Figura 1b: *Sphaeroides greeleyi*

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 ÁREA DE ESTUDO

Os exemplares de *Sphoeroides testudineus* e *Sphoeroides greeleyi* utilizados neste estudo foram coletados na Gamboa do Rio Baguaçu (25° 33' 6,33"S, 48° 23' 41,63"W) (Figura 2a e 2b). Gamboas são canais de maré no manguezal dependentes do regime de marés. Esta gamboa se situa na margem sul da Baía de Paranaguá, um complexo estuarino situado no estado do Paraná, no sul do Brasil. A salinidade no local de coleta varia amplamente com o ciclo de marés, atingindo valores entre 0 ‰ e 32 ‰ (NARDI, 1999).

2.2 COLETA E ACLIMATAÇÃO DOS ANIMAIS PARA EXPERIMENTOS DE LABORATÓRIO

Exemplares adultos de *S. testudineus* com aproximadamente 15 cm de comprimento e 40 g de peso e de *S. greeleyi* com aproximadamente 10 cm de comprimento e 20 g de peso foram coletados na Gamboa do Rio Baguaçu durante o período de junho de 1999 a julho de 2000. As coletas foram realizadas durante a maré enchente com a instalação de uma rede de espera tipo 'fyke' cruzando o canal da gamboa. A rede permaneceu instalada por um período de 6 horas até o pico de maré enchente (parada entre a maré enchente e maré vazante), quando foi feita a coleta da

rede e captura dos animais. Os animais foram capturados durante a maré enchente devido à sua tendência de irem para o estuário, rio adentro, à medida em que a água do mar vai entrando.

No momento da coleta a salinidade da água foi verificada com salinômetro refratômetro S-28 (Shibuya[®]), sendo sempre de aproximadamente 30 ‰. Os animais foram colocados em galão plástico, com aeração constante e transportados para o Laboratório de Fisiologia Comparativa da Osmorregulação da Universidade Federal do Paraná em Curitiba, Paraná, onde foram imediatamente colocados em aquário estoque com capacidade de 250 litros abastecido com água do mar do local de coleta com salinidade ajustada para 30 ‰, temperatura de aproximadamente 20 °C, e constante aeração.

Os peixes foram alimentados diariamente com crustáceos e oligoquetas durante todo o período de manutenção no laboratório e também durante os experimentos de aclimação de longo prazo a redução de salinidade.

2.3 EXPERIMENTO DE LABORATÓRIO

Após aproximadamente 7 dias de aclimação às condições laboratoriais, os espécimes de *S. testudineus* foram submetidos por período de 6 horas (curto-prazo: para simular em laboratório o ciclo de maré do ambiente natural) e 15 dias (longo-prazo: para verificação de eventuais alterações ultra-estruturais) a redução de salinidade: 5 ‰, 10 ‰, 20 ‰, ou à salinidade controle de 30 ‰ em aquários com capacidade de 30 litros, com aeração constante e temperatura de aproximadamente 20 °C, e um número máximo de 6 animais por aquário. A diluição da água do mar foi feita com água doce

filtrada. Após o período de aclimatação foram verificadas as concentrações plasmáticas do íon sódio, cloreto regulados por mecanismos de transporte branquial e magnésio regulado por mecanismos de transporte renal. Para a comparação entre *S. testudineus* e *S. greeleyi*, exemplares de cada espécie foram submetidos por período de 6 horas (curto prazo) e 15 dias (longo prazo) às salinidades extremas de 5 ‰ e 35 ‰, com verificação apenas das concentrações plasmáticas dos íons cloreto e magnésio, devido a problemas técnicos no Kit de dosagem do íon sódio. A aclimatação dos animais às salinidade reduzidas foi gradual para evitar choque osmótico. Para os experimentos de 6 horas foi realizada a diluição gradual da água ao longo de 1 hora e para os experimentos de 15 dias foi realizada diluição da água “overnight”, e então os animais foram colocados nas salinidades de 10 ‰ ou 5 ‰.

Após o período de aclimatação à redução de salinidade os exemplares de *S. testudineus* e *S. greeleyi* foram anestesiados com MS-222 (ácido 3-aminobenzóico metil éster) 0,04% dissolvidos em 1000 mL da água do aquário de aclimatação. Uma amostra de sangue foi obtida por punção cardíaca, com seringa heparinizada para evitar coagulação. As amostras foram centrifugadas por 10 min (2.100 xg) para permitir a retirada do plasma, sendo imediatamente congeladas até o momento das dosagens iônicas.

2.4 EXPERIMENTO DE CAMPO

Neste experimento, exemplares de ambas as espécies foram submetidas a redução de salinidade no próprio local de coleta, ao permanecerem em cercado na gamboa durante a maré vazante. A redução da salinidade foi acompanhada com termo-

salinômetro MC 5 da Hidro-Bios[®] a partir de embarcação do Centro de Estudos do Mar da UFPR. Exemplares de *S. testudineus* e *S. greeleyi* foram coletados em fevereiro de 2001. Logo após a coleta no pico da maré enchente (parada entre a maré enchente e maré vazante quando a salinidade do local apresentou-se mais elevada 29,8 ‰) 5 exemplares *S. testudineus* e 6 de *S. greeleyi* foram anestesiados, amostra de sangue foi retirada, congelada em gelo seco e posteriormente analisada em laboratório. Exemplares de cada espécie foram então separados e colocados em cercados dentro da gamboa, sendo submetidos a redução na salinidade da água pelo ciclo de maré, início da maré vazante (baixa-mar). Quando a salinidade do local atingiu 13,5 ‰ (após 4 horas) 5 animais de cada espécie foram anestesiados e tiveram amostra de sangue coletada. Nova coleta foi efetuada quando a salinidade atingiu 4,7 ‰ (após 1 hora e 30 minutos depois de coleta de 13,5 ‰). Quatro exemplares de *S. testudineus* restantes no cercado foram anestesiados e amostra de sangue coletada. Todos os exemplares de *S. greeleyi* restantes no cercado foram encontrados mortos, não havendo então amostras de sangue para esta espécie nesta salinidade. O ciclo de maré vazante acompanhado durou aproximadamente 5,5 horas. Em laboratório as amostras de sangue foram descongeladas e centrifugadas para obtenção do plasma, que foi então congelado (-20°C) até o momento da análise das concentrações iônicas. O inevitável procedimento de congelar e descongelar as amostras deste experimento de campo levaram a hemólise das células sangüíneas. Os valores de magnésio plasmático foram afetados pela hemólise das células e os valores obtidos apresentaram-se mais elevados que os valores comuns verificados para teleósteos em geral e para estas espécies em laboratório. Como o conteúdo intracelular de íons cloreto é negligível

quando comparado aos valores do plasma as concentrações de cloreto puderam ser usadas como marcadores da regulação iônica, e os valores obtidos apresentaram a mesma faixa dos valores obtidos para os experimentos de laboratório.

2.5 DOSAGEM DAS CONCENTRAÇÕES IÔNICAS DO PLASMA DE *Sphoeroides testudineus* e *Sphoeroides greeleyi*

As amostras de plasma de *S. testudineus* e *S. greeleyi* aclimatados às diferentes salinidades foram dosadas quanto às suas concentrações iônicas de sódio, cloreto e magnésio por métodos colorimétricos, sendo diluídas com água destilada de forma apropriada para permanecerem dentro da faixa de linearidade de cada método de dosagem iônica. Cada amostra foi analisada em duplicata. As amostras foram processadas seguindo-se as instruções dos fabricantes dos kits de dosagem: Kits Doles[®] (sódio) e Labtest[®] (cloreto e magnésio), com leitura de absorbância no espectrofotômetro ULTROSPEC 2000 (Pharmacia[®]).

Os íons sódio foram dosados através da formação de um complexo insolúvel de acetatos de sódio, uranila, magnésio e zinco que precipitam. O sobrenadante contém íons uranilo que formam complexo ao reagir com o tioglicolato de amônio, com leitura de absorbância a 410 nm. O kit de dosagem é composto por : reagente precipitante contendo solução de acetato de uranila 30 mM, acetato de magnésio 180 mM e acetato de zinco 5 mM; reagente de cor contendo solução de tioglicolato de amônio 750 mM e solução padrão de cloreto de sódio 140 mM.

A dosagem da concentração iônica de cloreto foi feita pela reação destes íons com o tiocianato de mercúrio na presença de nitrato férrico formando tiocianato férrico,

com leitura de absorvância a 470 nm. O kit de dosagem é composto por: reagente de cor que contém tiocianato de mercúrio 2 mM, nitrato férrico 17 mM e ácido nítrico 30 mM; ativador composto por nitrato de mercúrio 1,1 mM e ácido nítrico 0,9 mM e solução padrão de 100 mM de cloreto.

A concentração de magnésio no plasma foi determinada pela reação destes íons com o magon sulfonado em meio alcalino com leitura de absorvância a 505 nm. O kit colorimétrico é composto por: solução tampão contendo tris hidroxiamino metano 400 mM, carbonato de potássio 153 mM e azida sódica 0,01g/dL pH 11,5; magon sulfonado 0,1 g/L além de surfactantes e preservativos, e solução padrão 2,0 mg/dl de magnésio (0,823 mM).

2.6 ULTRA-ESTRUTURA DAS BRÂNQUIAS E RINS DE *Sphoeroides testudineus*

Exemplares de *Sphoeroides testudineus* aclimatados por 15 dias às salinidades de 30 ‰ (salinidade controle) e 10 ‰ (salinidade reduzida) foram abertos por incisão ventral, os órgãos internos retirados, gerando o acesso aos rins localizados ao longo da coluna vertebral. Foi retirado o rim posterior, que contém os túbulos renais (HICKMAN & TRUMP, 1969), e o segundo arco branquial do lado direito, do qual um filamento da região central foi então removido. Um fragmento do rim posterior e a porção mediana do filamento branquial foram então fixados por imersão em solução de fixação primária contendo glutaraldeído 2,5% e paraformaldeído 200 mM em tampão de cacodilato de sódio 100 mM, contendo adicionalmente 100 mM de NaCl, 3 mM de KCl, 2 mM de

MgCl₂ e 3 mM de CaCl₂ em proporções aproximadas, adequadas para a espécie (EVANS, 1993; FREIRE & McNAMARA, 1995), em gelo por 2 horas.

Os fragmentos dos rins e brânquias foram lavados em solução tampão contendo os mesmos sais do fixador primário, porém sem os aldeídos (3 vezes por 5 min cada) e pós-fixados em tampão cacodilato com sais (mesma composição salina do fixador primário) e tetróxido de ósmio 1 % por 1,5 horas em gelo. Os fragmentos de tecido foram a seguir desidratados em série alcoólica (50 % a 100 %) permanecendo 10 min em álcool 50 %, 10 min em álcool 70 %, 15 min em álcool 95 % e duas vezes de 15 min em álcool 100 %. Após a desidratação o material foi transferido para óxido de propileno (duas vezes de 15 min), posteriormente sendo infiltrados em óxido de propileno e resina Araldite 502 (1:1) por 1 h e óxido de propileno e resina Araldite 502 (1:2) "overnight". Em seguida os fragmentos foram então embebidos em resina pura por 1 h em estufa a 45 °C e posteriormente emblocados permanecendo em estufa a 60 °C por 48 horas (FREIRE & McNAMARA, 1995). Cortes semi-finos (500 nm) e finos (50 nm) foram feitos em Ultramicrótomo Leica Ultracut UCT do Laboratório de Ultramicrotomia do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular do Departamento de Biologia Celular da UFPR com navalhas de vidro confeccionadas através do Knifemaker Reichert Leica. Os cortes semi-finos foram corados com azul de toluidina em bórax aquoso a 1 %, e fotografados no fotomicroscópio Zeiss Axiophot do Setor de Ciências Biológicas da UFPR. Os cortes finos foram contrastados com acetato de uranila 5% e citrato de chumbo (REYNOLDS, 1963), e examinados ao Microscópio Eletrônico de Transmissão Jeol JEM 1200 EXII do Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR, a 80 kV de voltagem acelerante.

2.7 ANÁLISE MORFOMÉTRICA DAS BRÂNQUIAS E RINS DE *Sphoeroides testudineus*

Foram fotografadas a região interlamelar dos filamentos branquiais, onde estão as células de cloreto, e o epitélio dos tubos renais dos animais aclimatados por 15 dias às salinidades de 30 ‰ (controle) e 10 ‰ (reduzida). As células de cloreto foram analisadas quanto as suas mitocôndrias em aumento final de 27.500 vezes. Já o epitélio dos túbulos renais foram fotografados salientando região com abundância em mitocôndrias envoltas por dobramentos de membrana e analisadas em aumento final de 11.053 vezes.

Um sistema teste em transparência na forma de uma gráticula de segmentos de 1 cm igualmente espaçados foi aplicada sobre cada ampliação para estimar-se a fração de volume das mitocôndrias (volume de mitocôndrias/volume de citoplasma) para as células de cloreto e para o epitélio dos tubos renais, e a densidade de área (área de superfície dos dobramentos/volume de citoplasma) dos dobramentos de membrana para o epitélio dos tubos renais (FREIRE & McNAMARA, 1995).

O cálculo do volume relativo de mitocôndrias (V_m) foi feito a partir da contagem do número de pontos das extremidades dos segmentos de reta do sistema teste localizados sobre as mitocôndrias e sobre o citoplasma das células. O cálculo foi feito para cada eletromicrografia utilizada, segundo a fórmula: $V_m = P_m/P_{cit.} \times 100$, onde P_m é o número de pontos sobre as mitocôndrias e $P_{cit.}$ é o número de pontos sobre o citoplasma.

A densidade de área dos dobramentos de membrana no epitélio dos túbulos renais foi estimada segundo a fórmula $S_i/V_i = (4 \times l_i)/z.P_i$, onde l_i é o número de

cruzamentos dos segmentos do sistema teste com os dobramentos de membrana plasmática, z é o comprimento em um do segmento do sistema teste dividido pelo aumento final da eletromicrografia e P_i é o número de pontos sobre o citoplasma.

2.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística dos dados foi feita através do programa SigmaStat® para Windows versão 2.03, sempre com limite de significância em 0,05. Análises de variância de dois fatores “TWO-WAY ANOVA” foram realizadas para as concentrações de sódio, cloreto e magnésio dosadas no plasma de *S. testudineus* para os fatores tempo (2 níveis: 6 horas e 15 dias) e salinidade (4 níveis: 5 ‰, 10 ‰, 20 ‰ e 30 ‰). Em seguida testes-t de Student não pareados foram realizados para localizar as diferenças reveladas pela ANOVA. Para cada íon foram comparados cada dois grupos: 1) mesma salinidade, 6 horas x 15 dias, quando houve indicação do efeito do tempo; 2) mesmo tempo de exposição, 30 ‰ x 5 ‰, 30 ‰ x 10 ‰, 30 ‰ x 20 ‰ quando houve indicação do efeito da salinidade. Foram também feitas “TWO-WAY ANOVAS” para as concentrações de cloreto e magnésio dosadas no plasma de *S. testudineus* e *S. greeleyi* para os fatores espécie (2 níveis: *S. testudineus* e *S. greeleyi*) e salinidade (2 níveis: 5 ‰ e 35 ‰). Os dados de 6 horas e 15 dias foram analisados separadamente porque *S. greeleyi* resistiu apenas 5 dias em salinidade 5 ‰. Testes-t não pareados foram feitos para identificar o efeito da espécie ou da salinidade e comparar grupos na mesma salinidade e mesma espécie, 6 horas x 15 dias. Para análise dos dados da concentração de cloreto no plasma de *S. testudineus* e *S. greeleyi* em experimento de campo, foram feitas “TWO-WAY ANOVAS” para os fatores espécie (2 níveis: *S.*

testudineus e *S. greeleyi*) e salinidade (3 níveis: 29,8 ‰, 13,5 ‰ e 4,7 ‰) e testes-t não pareados comparando-se mesma espécie, 29,8 ‰ x 13,5 ‰, 29,8 ‰ x 4,7 ‰, 13,5 ‰ x 4,7 ‰.

Testes-t não pareados foram realizados para comparação das medidas obtidas por análise morfométrica do epitélio branquial e renal, comparando-se volume relativo de mitocôndrias no epitélio branquial, volume relativo de mitocôndrias e densidade de área dos dobramentos de membrana no epitélio renal dos animais aclimatados por 15 dias nas condições controle de 30 ‰ e experimental de 10 ‰.

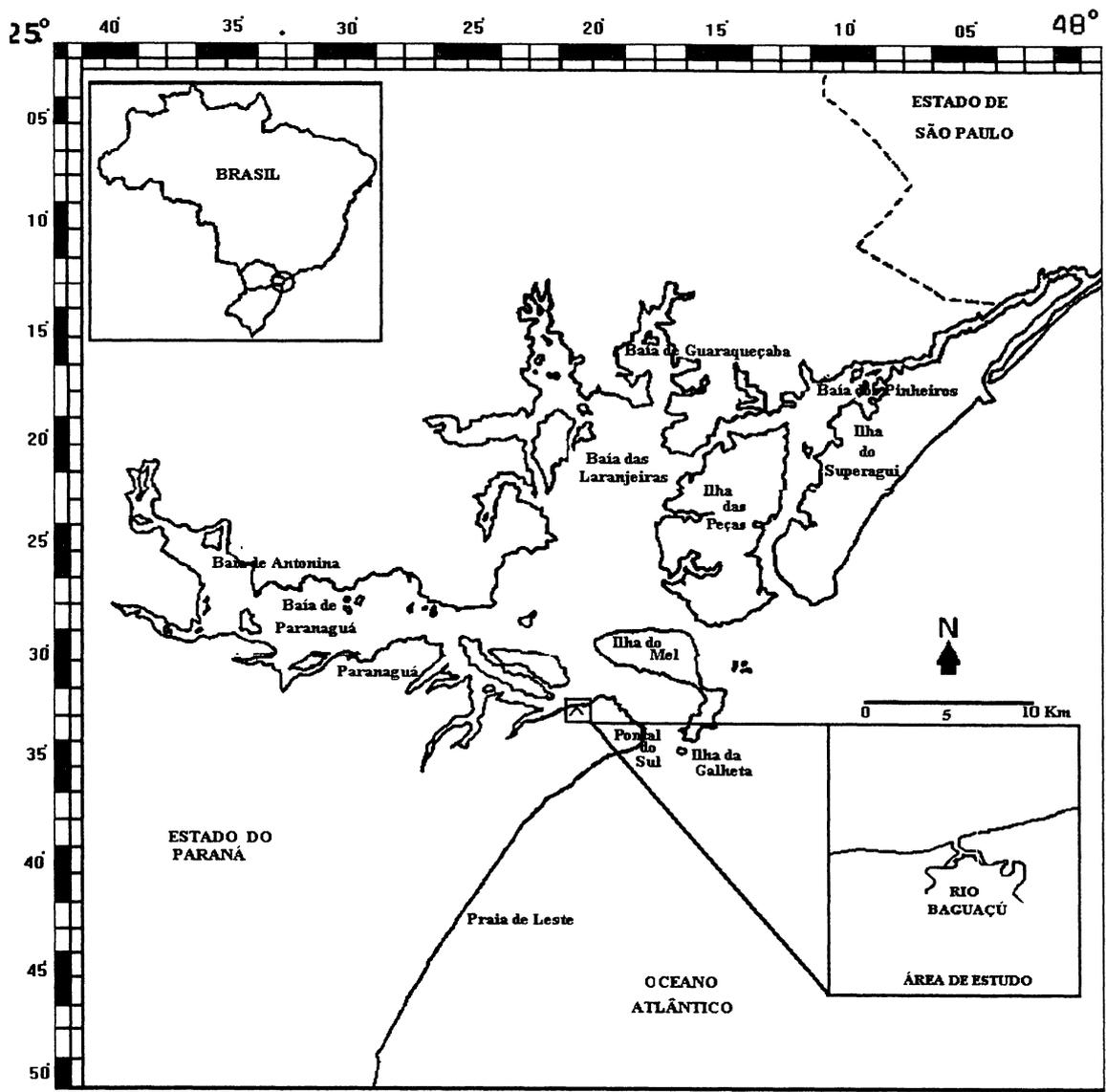


Figura 2a: Imagem parcial do litoral do Paraná com a localização da Gamboa do Rio Baguaçu.



Figura 2b: Gamboa do Rio Baguaçu.

3 RESULTADOS

3.1 CONCENTRAÇÃO DE SÓDIO NO PLASMA DE *Spherooides testudineus*

A concentração de íons sódio ($[Na^+]$) no plasma de *S. testudineus* após 6 horas e 15 dias nas salinidades controle e experimentais está representada na Figura 3a. É possível constatar que os valores de $[Na^+]$ foram mantidos praticamente constantes apesar da redução de salinidade, e ANOVA de 2 fatores revelou ausência de efeito dos fatores salinidade ($P=0,100$) e tempo ($P=0,618$) sobre a $[Na^+]$ plasmática.

Na salinidade de 5 ‰ *S. testudineus* hiper-regulou sódio, mantendo sua concentração plasmática acima da linha iso-iônica, havendo hipo-regulação nas salinidades de 20 ‰ e 30 ‰, tendo cruzado a linha iso-iônica aproximadamente na salinidade de 10 ‰ (Figura 3a).

3.2 CONCENTRAÇÃO DE CLORETO NO PLASMA DE *Spherooides testudineus*

Apesar da exposição por 6 horas a redução de salinidade até 5 ‰, *S. testudineus* apresentou concentrações de cloreto ($[Cl^-]$) muito estáveis no seu plasma (Figura 3b). A análise de variância (ANOVA) de dois fatores não revelou efeito significativo do fator salinidade ($P=0,229$) ou do fator tempo ($P=0,388$) sobre a $[Cl^-]$ plasmática. Apenas na

salinidade 5 ‰ a espécie apresentou-se hiper-regulando cloreto, com concentração acima da linha iso-iônica, tendo cruzado a linha iso-iônica aproximadamente na salinidade 7 ‰. Houve hipo-regulação de cloreto nas salinidades de 10 ‰, 20 ‰ e 30 ‰, com concentrações abaixo da linha iso-iônica. (Figura 3b).

3.3 CONCENTRAÇÃO DE MAGNÉSIO NO PLASMA DE *Sphoeroides testudineus*

As concentrações plasmáticas de íons magnésio ($[Mg^{2+}]$) (Figura 3c), apresentaram-se praticamente constantes para os baiacus. A ANOVA de dois fatores revelou um efeito do fator salinidade ($P=0,008$), porém não efeito do fator tempo ($P=0,256$) sobre a $[Mg^{2+}]$. Ocorreu redução ($P=0,020$) da $[Mg^{2+}]$ plasmática nos animais expostos por 6 horas à salinidade reduzida de 5 ‰ em relação ao controle de 30 ‰ (Figura 3c). Nos animais aclimatados por 15 dias às salinidades reduzidas não houve diferenças em relação à $[Mg^{2+}]$ na salinidade controle de 30 ‰. A indicação do efeito da salinidade sobre a $[Mg^{2+}]$ plasmática mas não sobre a $[Cl^-]$ e a $[Na^+]$ pode parecer estranha pela observação da figura 3, mas deve ser considerado que para este tipo de representação gráfica da regulação iônica plasmática, uma vez que os valores de Mg^{2+} plasmáticos são tão inferiores aos valores da água, existe um achatamento inevitável dos dados dando uma impressão aumentada de valores constantes, mas que não afeta a análise estatística. O baiacu-pintado hipo-regula fortemente os íons magnésio, mantendo suas concentrações plasmáticas sempre muito abaixo da linha iso-iônica, para todos os tempos de exposição e em todas as salinidades de aclimação (Figura 3c).

3.4 CONCENTRAÇÃO DE CLORETO E MAGNÉSIO NO PLASMA DE *Spherooides testudineus* E *Spherooides greeleyi* EM EXTREMOS DE SALINIDADE

ANOVA de dois fatores para a $[Cl^-]$ plasmática de *S. testudineus* (Figura 4a) e *S. greeleyi* (Figura 4b) expostos por 6 horas às salinidades de 5 ‰ e 35 ‰ revelou ausência de efeito do fator salinidade ($P=0,098$) ou do fator espécie ($P=0,528$) bem como da interação entre estes dois fatores ($P=0,298$) sobre a $[Cl^-]$ plasmática. Para os animais das duas espécies aclimatados por 15 dias às salinidades de 5 ‰ e 35 ‰, a ANOVA de dois fatores revelou efeito do fator salinidade ($P<0,001$), porém ausência de efeito do fator espécie e da interação entre os dois fatores sobre a $[Cl^-]$, com $P=0,800$ e $P=0,758$ respectivamente. De fato, a $[Cl^-]$ plasmática tanto para *S. testudineus* ($P=0,015$) quanto para *S. greeleyi* ($P=0,006$) em 5 ‰ foi inferior ao valor em 35 ‰. Os exemplares de *S. greeleyi* aclimatados à salinidade de 5 ‰ não resistiram ao período de aclimação de 15 dias, sendo retirados da condição experimental após 5 dias de aclimação, quando um exemplar estava morto, e os cinco restantes apresentavam perda de equilíbrio e redução dos movimentos, além de não alimentarem-se mais. Para as $[Cl^-]$ plasmáticas tanto de *S. testudineus* quanto de *S. greeleyi* os valores após 6 horas e após 15 dias de aclimação não foram diferentes.

Ambas as espécies hiper-regulam íons cloreto na salinidade de 5 ‰, mantendo suas concentrações acima da linha iso-iônica, e hipo-regulam cloreto na salinidade de 35 ‰, com concentrações sendo mantidas abaixo da linha iso-iônica (Figuras 4a e 4b).

ANOVA de dois fatores para a $[Mg^{2+}]$ plasmática de *S. testudineus* (Figura 5a) e *S. greeleyi* (Figura 5b) expostos por 6 horas às salinidades de 5 ‰ e 35 ‰ revelou

ausência de efeito do fator salinidade ($P=0,789$) ou do fator espécie ($P=0,811$) sobre a $[Mg^{2+}]$ plasmática bem como da interação entre os dois fatores ($P=0,474$) (Figuras 5a e 5b). Para os animais pertencentes às duas espécies aclimatados por 15 dias às salinidade de 5 ‰ (5 dias para *S. greeleyi*) e 35 ‰ a ANOVA de dois fatores revelou efeito do fator salinidade sobre a $[Mg^{2+}]$ ($P<0,001$), porém ausência de efeito do fator espécie ($P=0,447$) ou da interação entre os dois fatores, salinidade e espécie ($P=0,464$). Houve redução na $[Mg^{2+}]$ plasmática tanto para *S. testudineus* ($P=0,003$) quanto para *S. greeleyi* ($P=0,010$) na salinidade reduzida de 5 ‰ comparada a salinidade de 35 ‰. Para as $[Mg^{2+}]$ plasmáticas tanto de *S. testudineus* quanto de *S. greeleyi* os valores após 6 horas e após 15 dias de aclimação não foram diferentes.

Observou-se novamente, confirmando os resultados para *S. testudineus* com outras salinidades (Figura 3c) que ambas as espécies hipo-regulam fortemente a $[Mg^{2+}]$ plasmática (Figuras 5a e 5b) mantendo seus valores sempre bem abaixo da linha iso-iônica.

3.5 CONCENTRAÇÃO DE CLORETO NO PLASMA DE *Sphoeroides testudineus* E *Sphoeroides greeleyi* EM EXPERIMENTOS DE CAMPO

ANOVA de dois fatores para a $[Cl^-]$ plasmática de *S. testudineus* (Figura 6a) e *S. greeleyi* (Figura 6b) expostos a redução de salinidade acompanhando o ciclo de maré vazante revelou ausência de efeito do fator espécie ($P=0,260$) sobre a $[Cl^-]$ plasmática, porém indicou efeito do fator salinidade ($P=0,008$). Ocorreu redução ($P=0,008$) da $[Cl^-]$ plasmática nos exemplares de *S. testudineus* expostos à salinidade reduzida de 4,7 ‰ em relação a salinidade de 29,8 ‰ (Figura 6a) e na $[Cl^-]$ plasmática de *S. greeleyi*

expostos à salinidade reduzida de 13,5 ‰ em relação a salinidade de 29,8 ‰ ($P=0,031$) (Figura 6b). Os exemplares de *S. greeleyi* não sobreviveram à redução de salinidade até 4,7 ‰, estando todos os exemplares mortos no momento da retirada dos animais do cercado.

Ambas as espécies hipo-regulam íons cloreto na salinidade de 13,5 ‰ e 29,8 ‰, mantendo suas concentrações abaixo da linha iso-iônica, e *S. testudineus* hiper-regulou cloreto na salinidade de 4,7 ‰, com concentrações sendo mantidas acima da linha iso-iônica (Figuras 6a e 6b).

3.6 MORFOLOGIA E ULTRA-ESTRUTURA DO EPITÉLIO BRANQUIAL DE *Sphoeroides testudineus*

A morfologia dos filamentos branquiais de *S. testudineus* observada ao microscópio de luz apresentou padrão comum aos outros teleósteos, com as lamelas primárias (filamentos branquiais) e longas e delgadas lamelas secundárias com capilares sangüíneos (Figura 7). Não pode ser detectado efeito óbvio da redução de salinidade sobre a micro-anatomia do epitélio branquial de *S. testudineus* (Figura 7a – controle 30 ‰; Figura 7b – experimental 10 ‰).

As eletromicrografias mostram a ultra-estrutura das células que compõem os filamentos branquiais (Figuras 8 e 9). Na situação controle, após 15 dias em água 30 ‰, observa-se a lamela primária na região interlamelar (entre lamelas secundárias) apresentando células de cloreto. Estas células possuem mitocôndrias espalhadas por todo seu citoplasma envoltas por um sistema tubular de membranas (Figura 8), e região apical com algumas projeções da membrana apical em contato com o meio externo

(água). Observam-se ainda nas proximidades da região apical de uma célula de cloreto intensas interdigitações entre células adjacentes (Figura 8). As lamelas secundárias apresentam delgadas células pavimentares revestindo-as externamente e células sangüíneas no interior dos capilares (Figura 8). Na situação experimental, após 15 dias em água 10 ‰ observa-se célula acessória com citoplasma mais eletrondenso quando comparado com as células de cloreto, e também rico em mitocôndrias (Figura 9). Em um aumento maior observa-se o aspecto do citoplasma de uma célula de cloreto, com abundância de mitocôndrias envoltas pelo sistema tubular de membranas (Figuras 8 e 9).

Após aclimação de 15 dias à redução de salinidade para 10 ‰ (Figura 9) não foi encontrada diferença óbvia em relação aos controles quanto ao número, a disposição e distribuição das células de cloreto no epitélio branquial. O aspecto geral das mitocôndrias e das projeções da membrana apical nas células de cloreto é o mesmo observado nos animais controle (Figura 9).

Análise morfométrica foi realizada com o objetivo de avaliar o possível efeito da redução da salinidade sobre a ultra-estrutura das células de cloreto. O volume relativo de mitocôndrias (V_m) das células de cloreto foi avaliado. O teste-t de Student não revelou diferença significativa entre a condição experimental e a condição controle, sendo verificada a média e o erro padrão para as duas condições. Em 10 ‰, $V_m = 39,8 \pm 6,04 \%$ ($n=4$); em 30 ‰, $V_m = 30,2 \pm 3,98 \%$ ($n=3$) ($P=0,064$). Embora não quantificado, foi observado um aparente aumento nas cisternas do sistema tubular de membranas em 10 ‰, quando comparados com os controles em 30 ‰ (Figuras 8 e 9)

3.7 MORFOLOGIA E ULTRA-ESTRUTURA DO EPITÉLIO RENAL DE *Sphoeroides testudineus*

A morfologia dos tubos renais de *S. testudineus* aclimatados por 15 dias à salinidade de 30 ‰ (controle) (Figura 10a) e 10 ‰ (experimental) (Figura 10b) observada ao microscópio óptico, revelou ausência de glomérulos e presença de 1 a 3 tubos, com lúmen amplo e evidência de secreção tubular (Figura 10a), sem indicação clara de efeito da salinidade. O epitélio renal revelou-se estratificado: Figuras 11a, b, c – microscopia de luz; Figura 11d – microscopia eletrônica de transmissão. Dois tipos de células com citoplasmas de diferentes eletrondensidades foram observados ambas igualmente ricas em mitocôndrias.

O epitélio renal de *S. testudineus* (Figuras 11d, 12, 13 e 14) observado ao microscópio eletrônico de transmissão em ambas as condições (controle e experimental), apresentou-se extremamente rico em mitocôndrias e dobramentos de membrana envolvendo estas mitocôndrias, as quais localizam-se mais na região subapical das células (Figuras 13 e 14). A região apical das células do epitélio tubular apresentou ausência de organelas e presença de vesículas de secreção. A membrana apical possui microvilos e destacam-se também na região sub-apical complexos juncionais intercelulares com desmossomos facilmente evidentes entre células adjacentes (Figuras 13a e 14c). Nas Figuras 13b e 14b,c pode-se observar o processo de secreção realizado pelas células do epitélio tubular tanto para os animais controle (Figura 13b) quanto para os submetidos à redução de salinidade (Figuras 14b,c). Embora não quantificada, a intensidade de secreção é expressivamente maior nos animais em salinidade reduzida (Figura 14). Óbvias vesículas de exocitose foram

observadas na região apical das células (Figuras 13b e 14a, b, c), com material amorfo secretado presente no lúmen do tubo renal, tanto em 30 ‰ (Figura 13b) quanto na salinidade reduzida de 10 ‰ (Figuras 14a,b).

Análise morfométrica foi realizada com o objetivo de avaliar o possível efeito da redução da salinidade sobre a ultra-estrutura do epitélio do tubo renal, quantificando o volume relativo de mitocôndrias e a área de dobramentos de membrana envolvendo mitocôndrias na região subapical das células tubulares dos animais controles e experimentais. As células foram examinadas aleatoriamente podendo ser amostradas tanto as células de eletrondensidade maior, como as de eletrondensidade menor (figura 11d). O teste-t não revelou diferença no volume relativo de mitocôndrias (média±erro padrão) entre a condição experimental de 10 ‰ ($30,8 \pm 2,18 \%$, n= 5) e a condição de controle 30 ‰ ($22,5 \pm 2,73 \%$, n= 3) ($P=0,057$) e na área de dobramentos de membrana (média±erro padrão) (experimental 10 ‰: $5,28 \pm 1,2 \%$, n=5; e controle 30 ‰: $5,45 \pm 0,72 \%$, n=3) ($P=0,919$).

Figura 3: Curva de regulação plasmática do íon sódio (Na^+) **(a)**, do íon cloreto (Cl^-) **(b)** e do íon magnésio (Mg^{+2}) **(c)** para *S. testudineus* expostos por 6 horas (\bullet) às salinidades de 5 ‰, 10 ‰, 20 ‰ e 30 ‰ e aclimatados por 15 dias (\square) às salinidades de 10 ‰, 20 ‰ e 30 ‰; $4 < n < 8$ para Na^+ , $5 < n < 10$ para Cl^- , $5 < n < 8$ para Mg^{2+} . Os valores apresentados nos gráficos são média \pm erro padrão. * Diferença significativa da $[\text{Mg}^{+2}]$ plasmática entre a salinidade controle de 30 ‰ ($1,75 \pm 0,47$ mM) e salinidade reduzida de 5 ‰ ($0,77 \pm 0,11$ mM) após 6 horas de aclimação. A linha tracejada representa a linha iso-iônica.

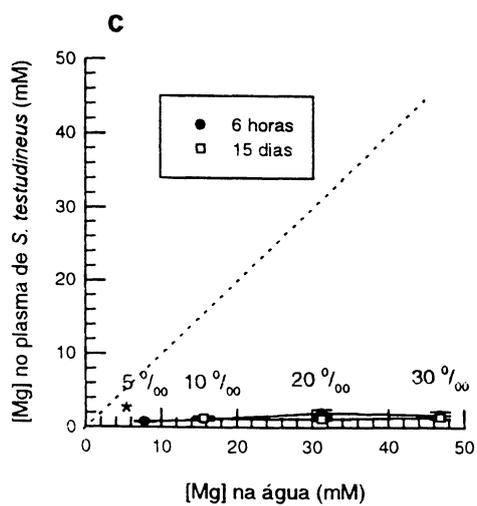
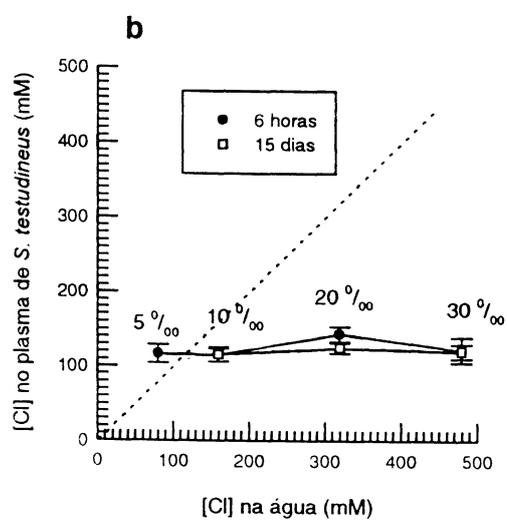
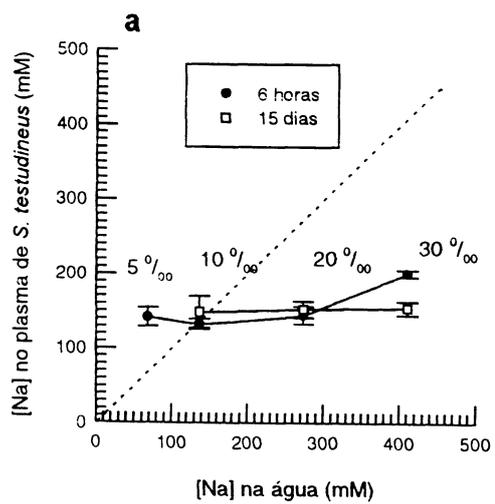


Figura 4: Curva de regulação plasmática do íon cloreto (Cl^-) para *S. testudineus* (a) e para *S. greeleyi* (b) expostos por 6 horas (\bullet) às salinidades de 5 ‰ e 35 ‰, para *S. testudineus* aclimatados por 15 dias (\square) às salinidades de 5 ‰ e 35 ‰, e para *S. greeleyi* aclimatado por 5 dias (\triangle) na salinidade de 5 ‰, e 15 dias (\square) na salinidade de 35 ‰; $4 < n < 6$ para Cl^- em *S. testudineus*; $5 < n < 6$ para Cl^- em *S. greeleyi*. Os valores apresentados nos gráficos são média \pm erro padrão. * Diferença significativa da $[\text{Cl}^-]$ plasmática entre a salinidade de 35 ‰ e salinidade reduzida (5 ‰) após 15 dias de aclimação. A linha tracejada representa a linha iso-iônica.

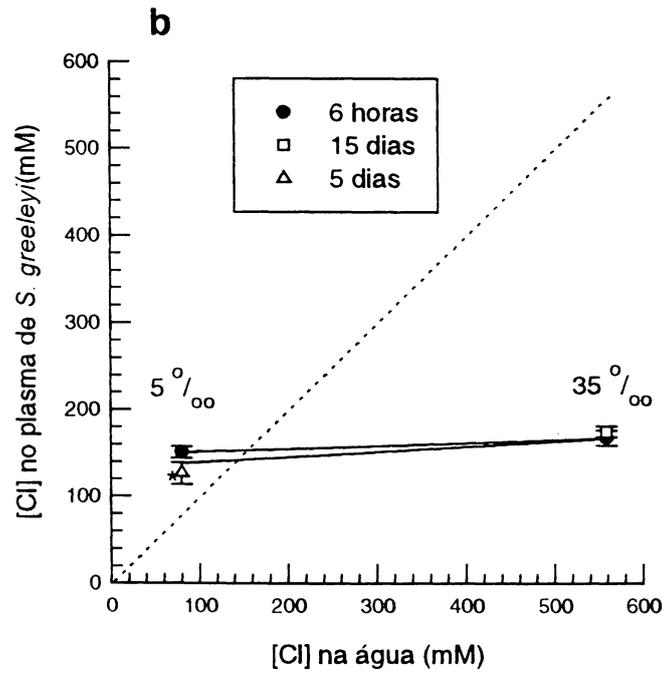
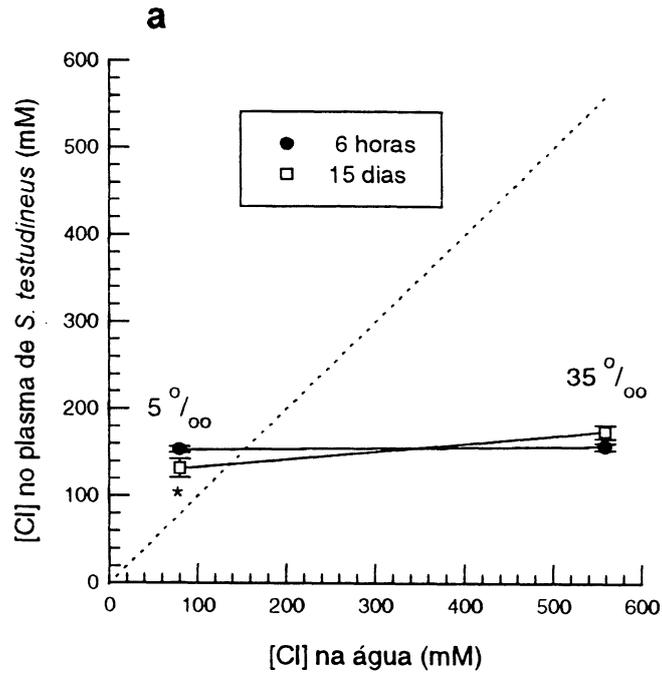


Figura 5: Curva de regulação plasmática do íon magnésio (Mg^{2+}) para *S. testudineus* (a) e para *S. greeleyi* (b) expostos por 6 horas (•) às salinidades de 5 ‰ e 35 ‰, para *S. testudineus* aclimatados por 15 dias (□) às salinidades de 5 ‰ e 35 ‰ e para *S. greeleyi* aclimatado por 5 dias (△) na salinidade de 5 ‰ e 15 dias (□) na salinidade de 35 ‰; $4 < n < 6$ para Mg^{2+} tanto em *S. testudineus* quanto em *S. greeleyi*. Os valores apresentados nos gráficos são média ± erro padrão. * Diferença significativa da $[Mg^{2+}]$ plasmática entre a salinidade de 35 ‰ ($1,45 \pm 0,25$) e salinidade reduzida (5 ‰) ($1,22 \pm 0,34$) após 15 dias de aclimação para *S. testudineus* e entre a salinidade de 35 ‰ ($1,74 \pm 0,21$) e salinidade reduzida (5 ‰) ($0,81 \pm 0,18$) após 5 dias de aclimação para *S. greeleyi*. A linha tracejada representa a linha iso-iônica.

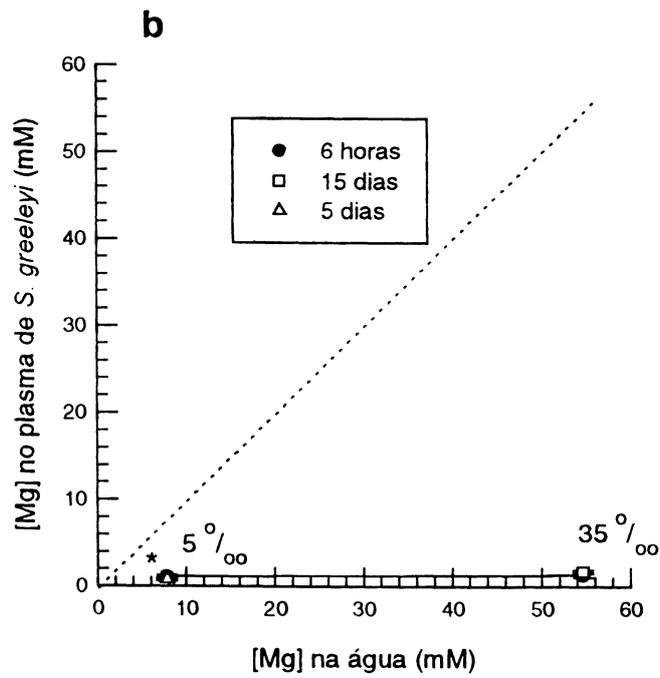
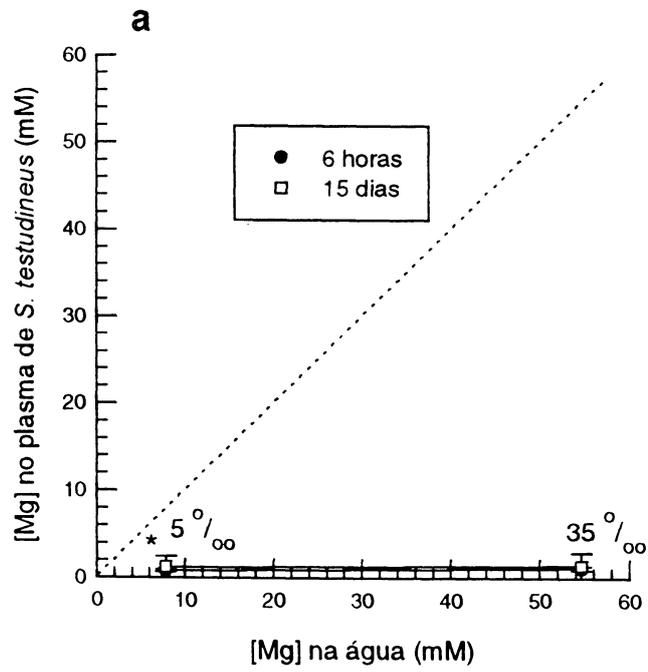


Figura 6: Curva de regulação plasmática do íon cloreto (Cl^-) para *S. testudineus* (a) e para *S. greeleyi* (b) expostos a redução de salinidade no ambiente natural. Os valores apresentados nos gráficos são média \pm erro padrão.* Diferença significativa da $[\text{Cl}^-]$ plasmática entre a salinidade de 29,8 ‰ e salinidade reduzida de 4,7 ‰ para *S. testudineus* e entre a salinidade de 29,8 ‰ e salinidade reduzida de 13,5 ‰ para *S. greeleyi*; n=5 para todos os grupos, exceto n= 4 para *S. testudineus* em 4,7 ‰ e n=6 para *S. greeleyi* em 29,8 ‰. A linha tracejada representa a linha iso-iônica.

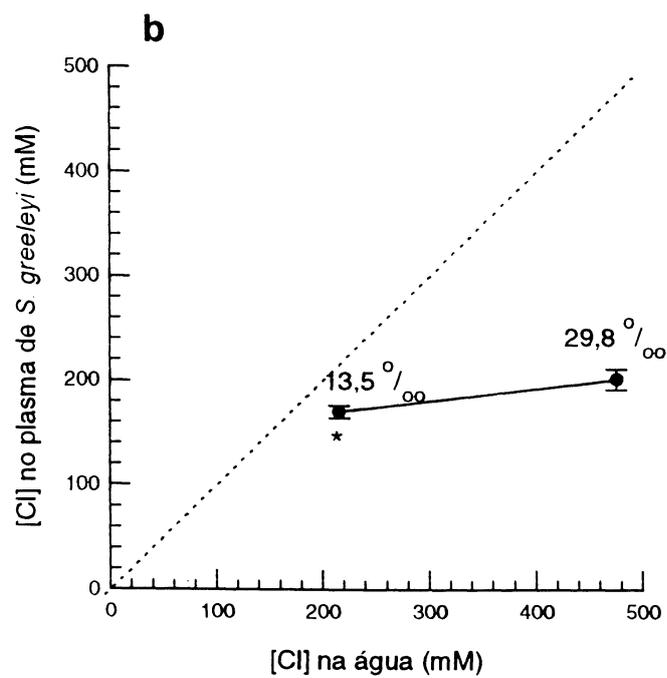
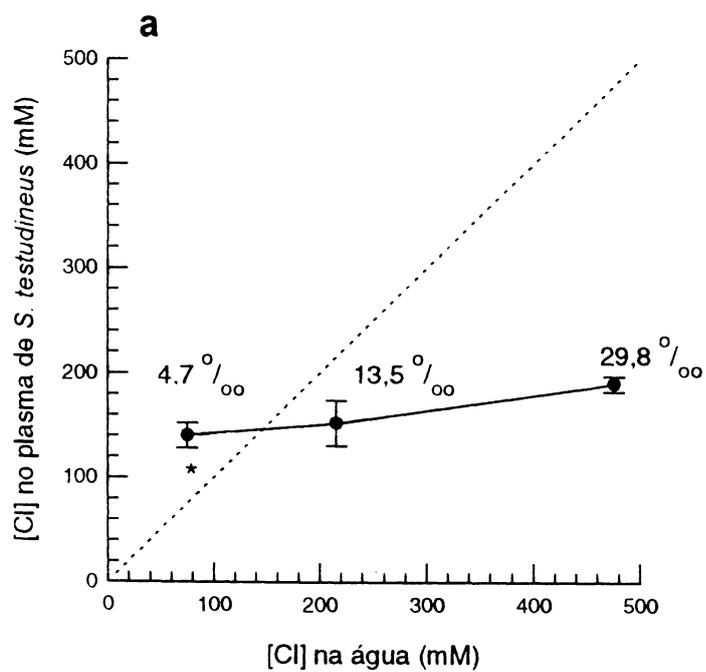


Figura 7: Morfologia da brânquia de *S. testudineus* observada ao microscópio de luz. **a:** Após 15 dias em salinidade 30 ‰ (controle) e **b:** Após 15 dias em salinidade 10 ‰ (experimental); lamela primária (p), lamela secundária (s) e região interlamelar (→). Aumento de 200 x.

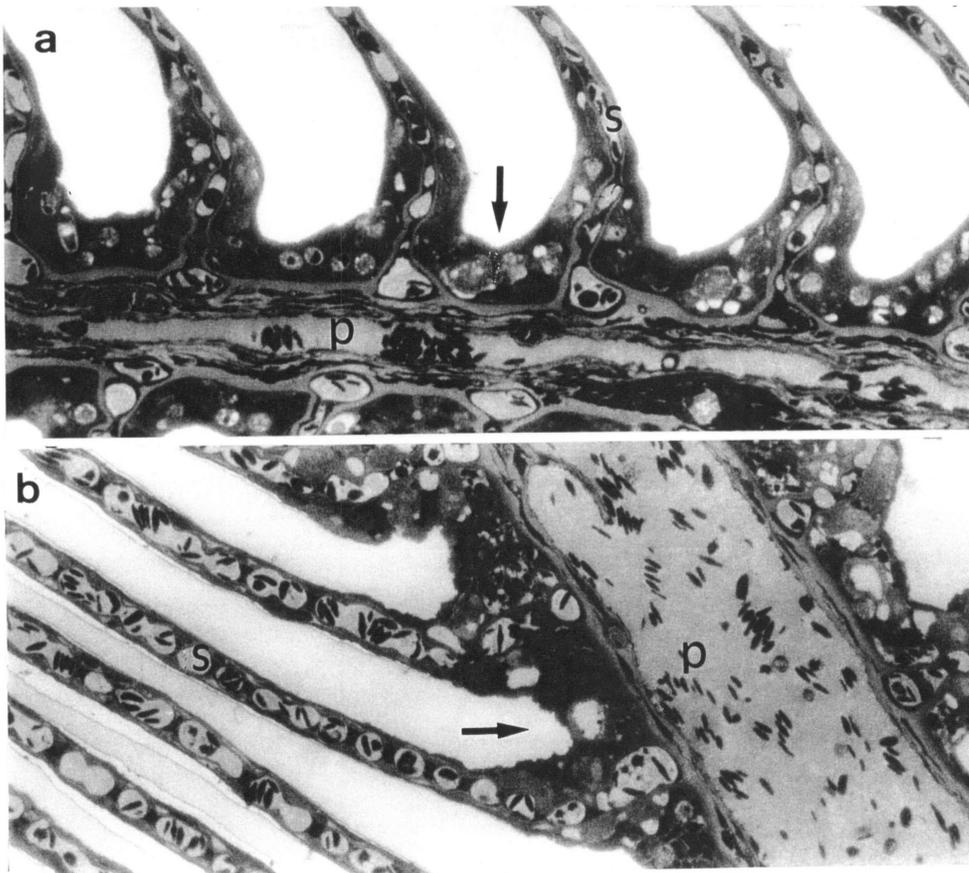


Figura 8: Estrutura do epitélio branquial *S. testudineus* observada ao microscópio eletrônico de transmissão após 15 dias em salinidade 30 ‰ (controle). Lamela primária (P), lamela secundária (S) com células pavimentares (pv) e células sanguínea (*) no lúmen de um capilar; células de cloreto (cc) com projeções apicais (★) e mitocôndrias (m); região de junção intercelular com interdigitações (→). Aumento de 6.250 x. **Inserto:** Citoplasma de célula de cloreto do epitélio branquial de *S. testudineus* nas mesmas condições, mostrando sistema tubular (→) e mitocôndrias (m) em maior aumento. Aumento 18.000 x.

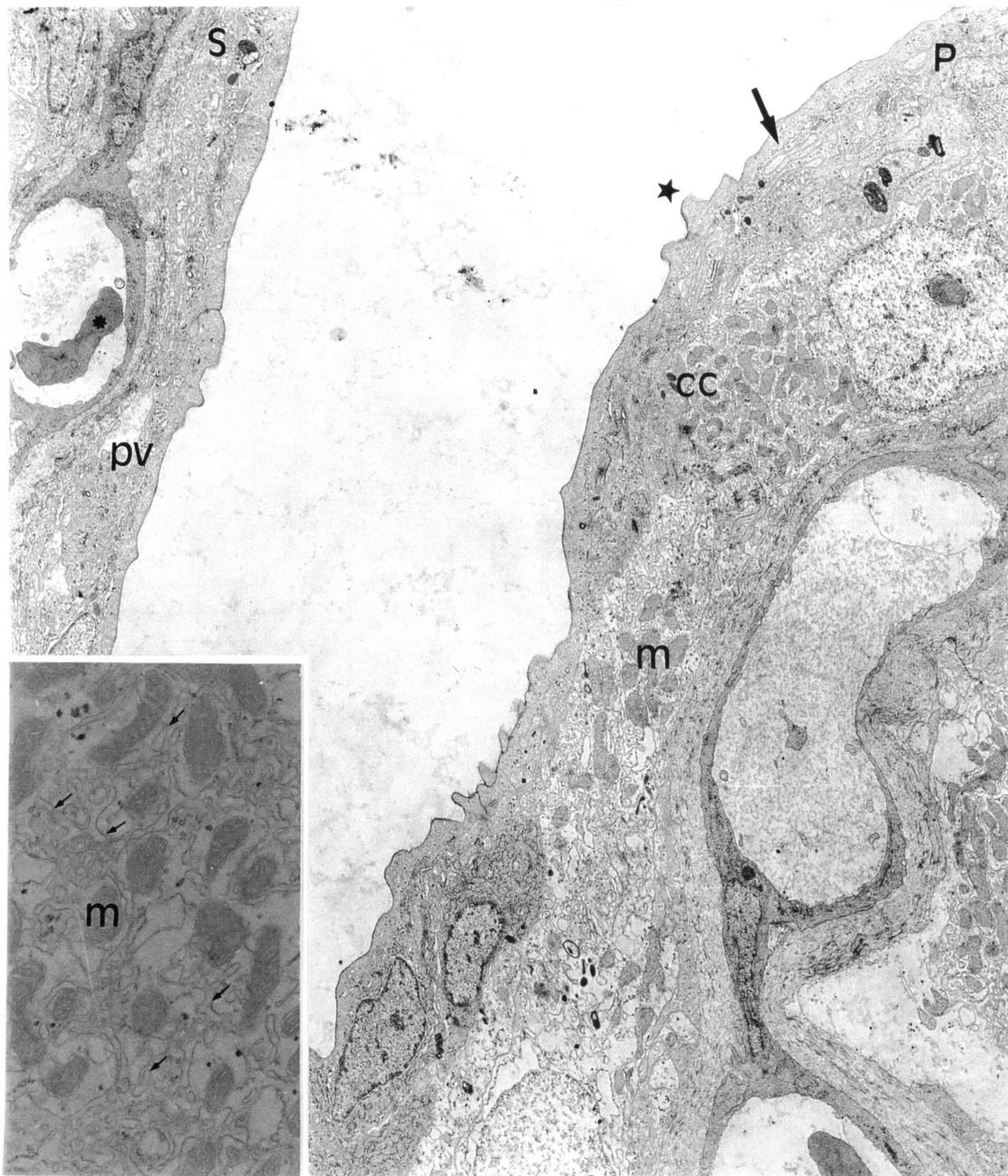


Figura 9: Estrutura do epitélio branquial *S. testudineus* observada ao microscópio eletrônico de transmissão após 15 dias em salinidade 10 ‰ (experimental). Lamela primária (P), lamela secundária (S) com células sangüíneas (*) no lúmen de um capilar; célula acessória com citoplasma eletron denso (a); células de cloreto (cc) com mitocôndrias (m). Aumento de 5.600 x. **Inserto:** Citoplasma de célula de cloreto do epitélio branquial de *S. testudineus* nas mesmas condições, mostrando sistema tubular (→) e mitocôndrias (m) em maior aumento. Aumento 15.000 x.

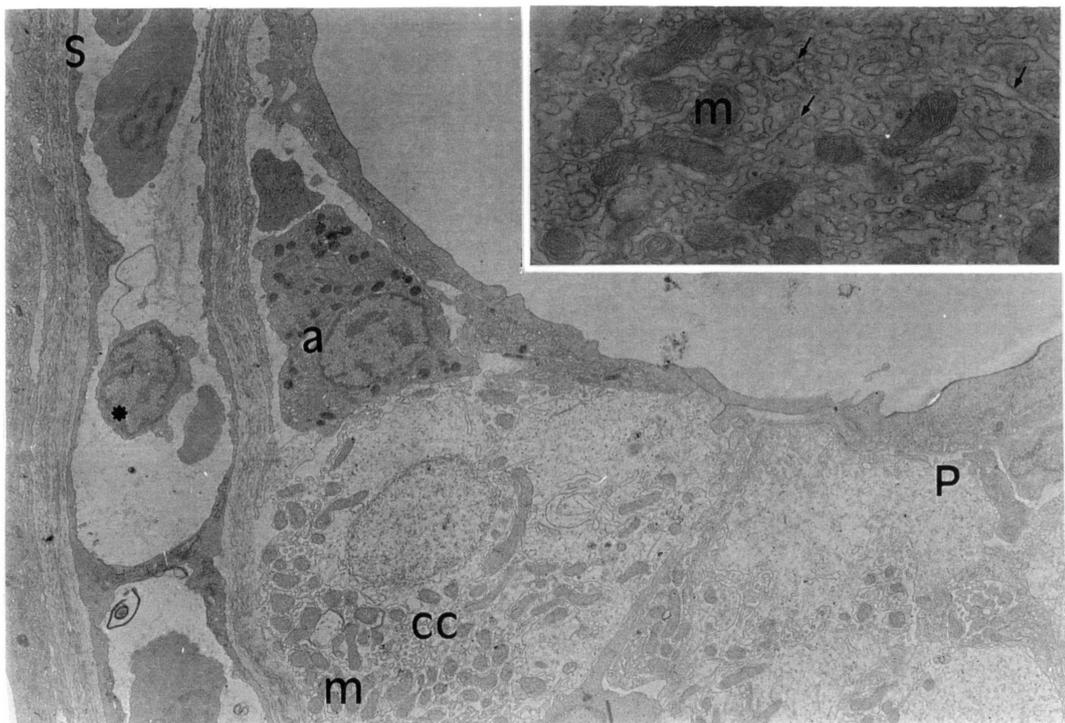


Figura 10: Morfologia do tubo renal de *S. testudineus* observado ao microscópio de luz. **a:** Após 15 dias em salinidade 30 ‰ (controle) e **b:** Após 15 dias em salinidade 10 ‰ (experimental); lúmen do tubo renal (l), epitélio tubular (ep) e indício de secreção tubular (→). Aumento de 200 x.

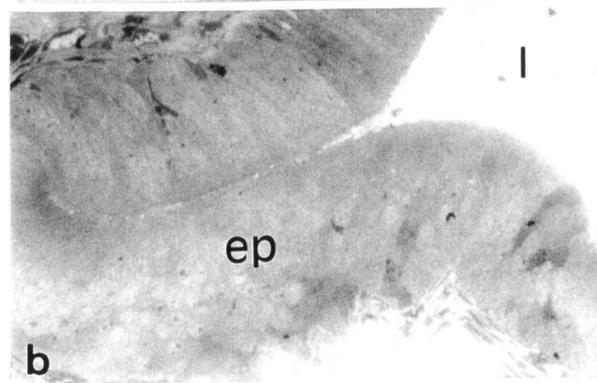
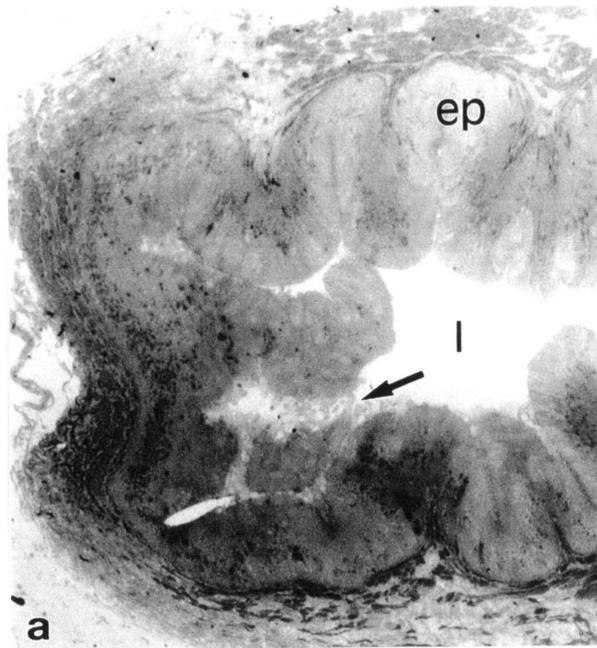


Figura 11: Epitélio estratificado do tubo renal de *S. testudineus*. **a** e **b**: Observado ao microscópio de luz após 15 dias em salinidade 30 ‰ (controle) **c**: Após 15 dias em salinidade 10 ‰ (experimental); epitélio estratificado (➡). Aumento de 200 x. **d**: Epitélio renal observado ao microscópio eletrônico de transmissão após 15 dias em salinidade 30 ‰ (controle); células do epitélio estratificado com eletrodensidade diferente. Aumento de 7.200 x.

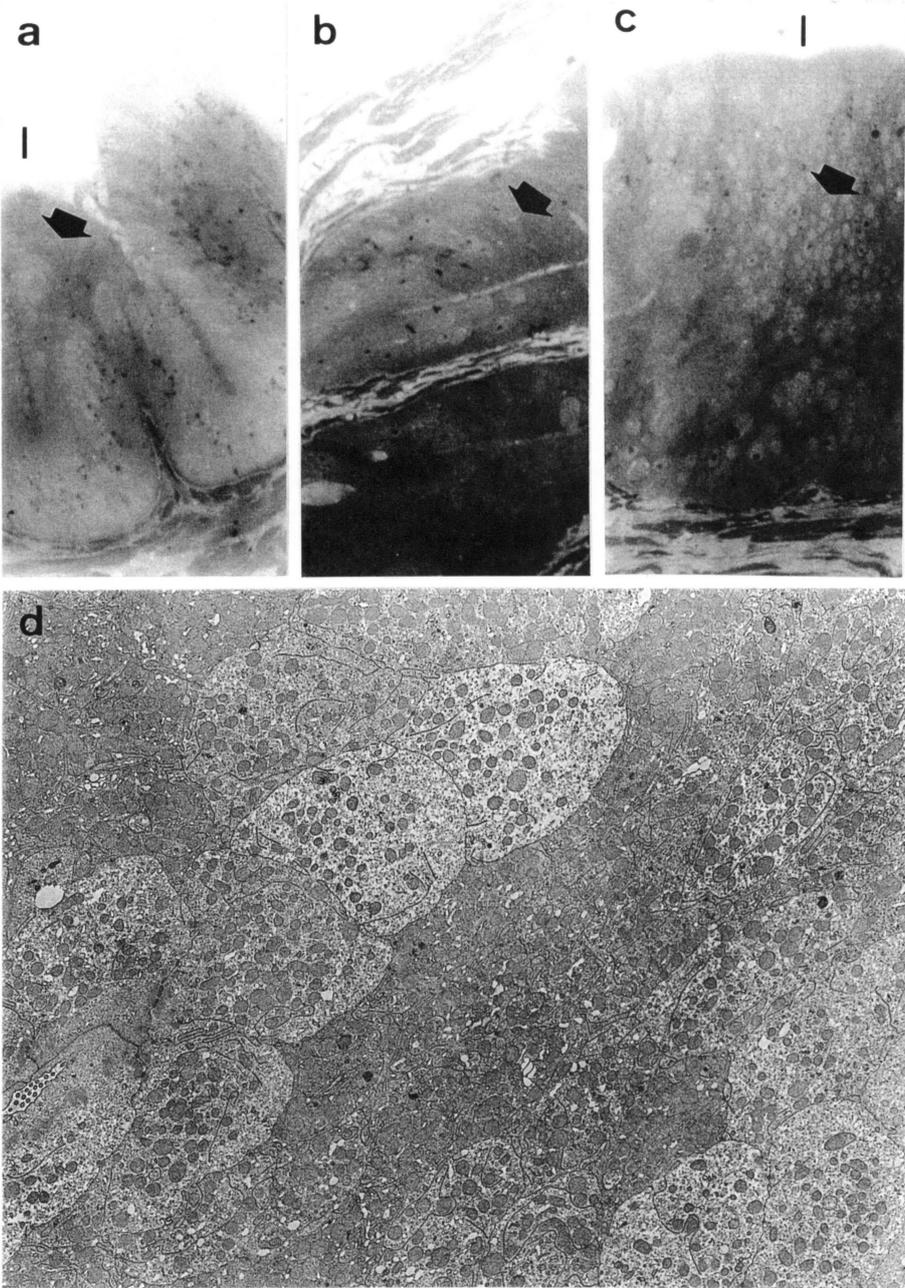


Figura 12: Mitocôndrias e dobramentos de membranas na região subapical das células do epitélio renal de *S. testudineus* observado ao microscópio eletrônico de transmissão. **a:** Após 15 dias em salinidade 30 ‰ (controle). Aumento de 9.110 x. **b:** Após 15 dias em salinidade 10 ‰ (experimental). Aumento de 7.330 x; dobramentos de membrana (→) e mitocôndrias (m).

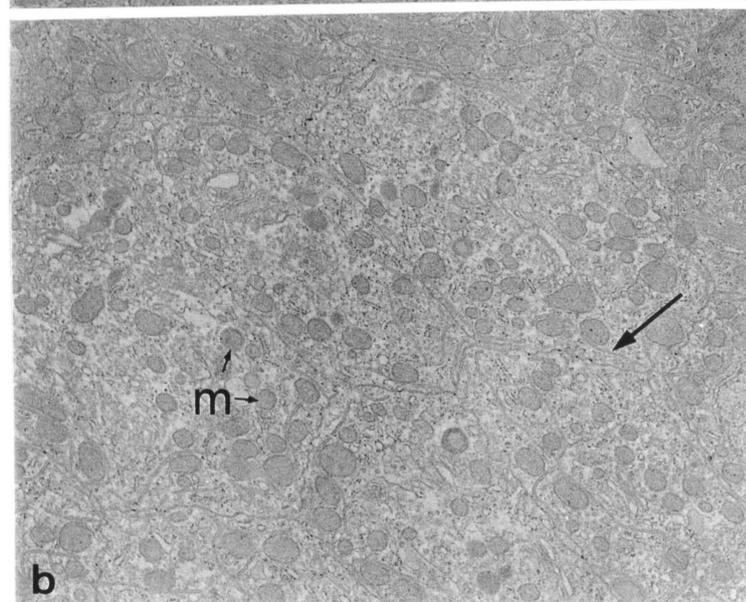
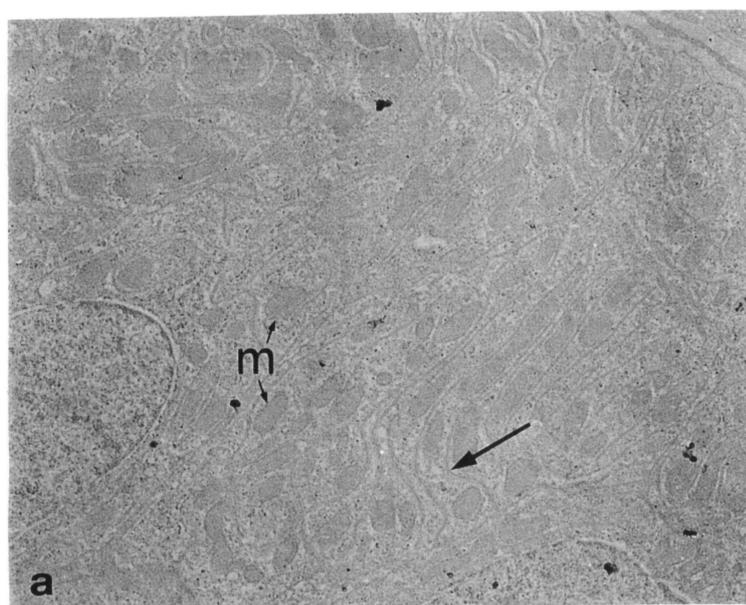


Figura 13: Secreção tubular no epitélio renal de *S. testudineus* observado ao microscópio eletrônico de transmissão, após 15 dias em salinidade 30 ‰ (controle). **a:** lúmen tubular (l), região apical com microvilos (★), região subapical com mitocôndrias (m) e região intercelular com desmossomo (d). Aumento de 21.330 x. **b:** Detalhes do processo de secreção tubular. Microvilos (★), vesículas de secreção (*) na região apical, material amorfo secretado no lúmen (➡) e região subapical com mitocôndrias (m). Aumento de 36.000 x.

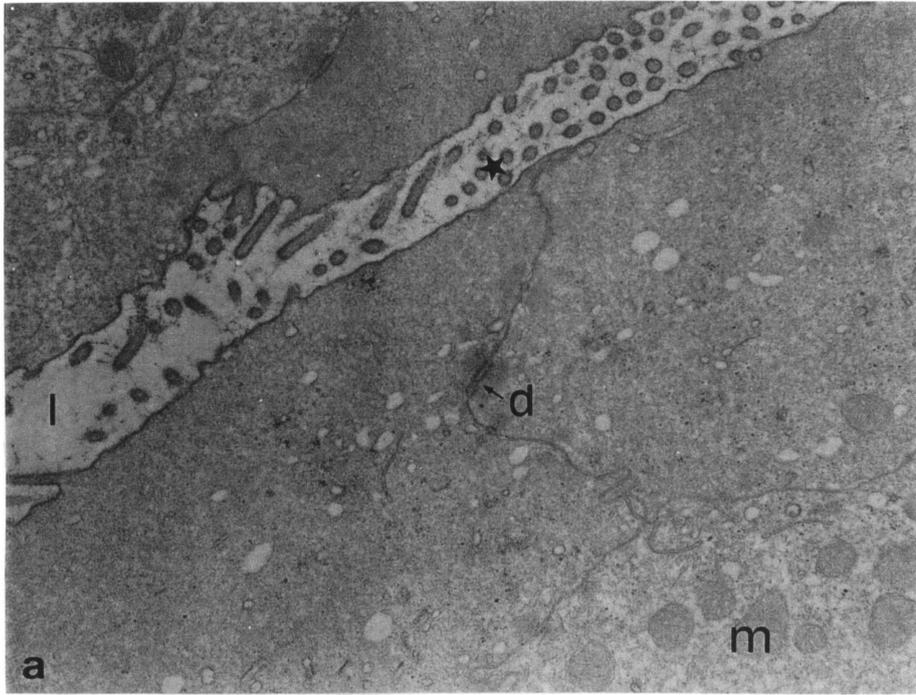
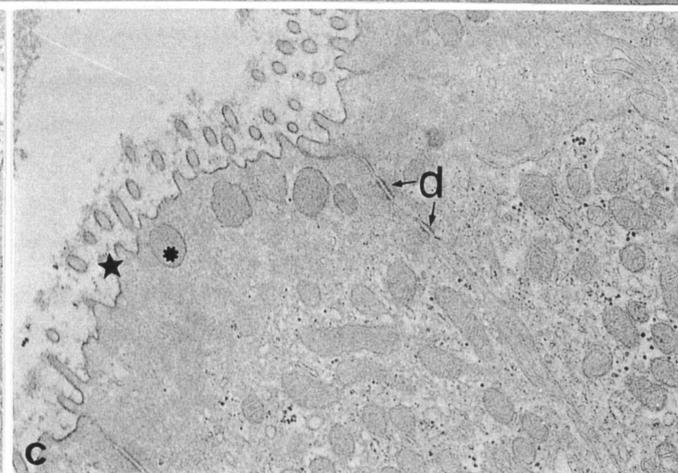
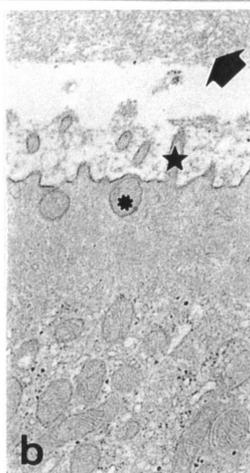
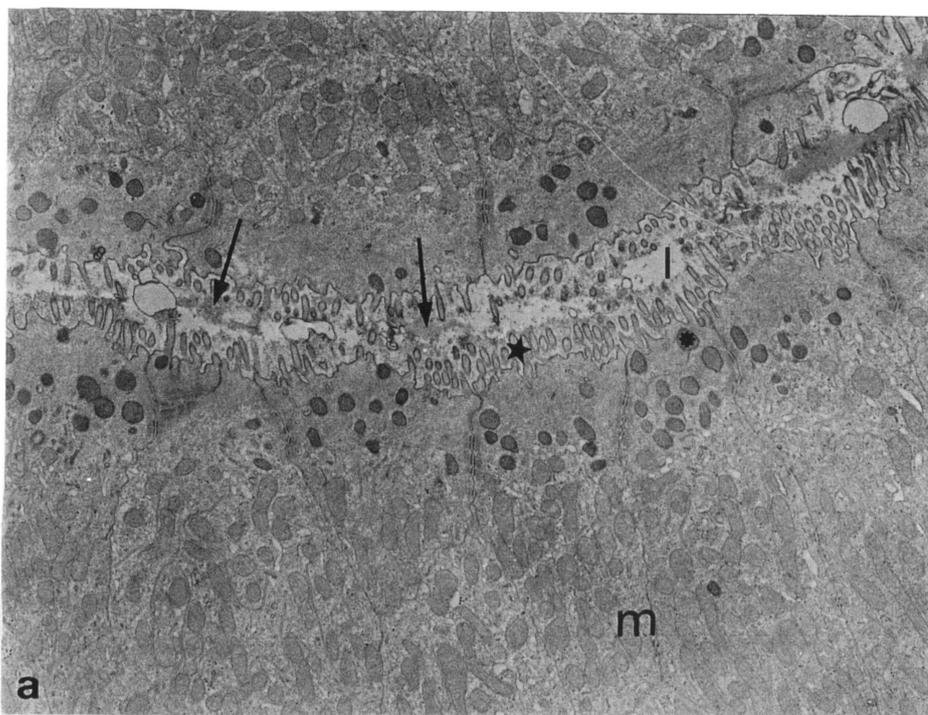


Figura 14: Secreção tubular no epitélio do túbulo renal de *S. testudineus* observado ao microscópio eletrônico de transmissão, após 15 dias em salinidade 10 ‰ (experimental). **a:** lúmen tubular (l), região apical com microvilos (★), vesículas de secreção (*) no citoplasma apical sem organelas, material amorfo secretado no lúmen (seta) e região subapical com mitocôndrias (m). Aumento de 8.000 x. **b e c:** Detalhes do processo de secreção tubular. Microvilos (★), vesículas de secreção (*) na região apical, e material amorfo secretado no lúmen (➡), região intercelular com desmossomo (d). Aumento de 16.000 x.



4 DISCUSSÃO

Os baiacus *Sphoeroides testudineus* e *Sphoeroides greeleyi* demonstraram grande capacidade de regulação iônica do plasma, tanto em água do mar quanto em água do mar diluída. A concentração plasmática em água do mar (30 ‰) e águas diluídas (20 ‰, 10 ‰ e 5 ‰) dos íons sódio ($[Na^+]$) para *S. testudineus* manteve-se próxima a dos íons cloreto ($[Cl^-]$), sendo ambas bastante estáveis. A concentração do íon magnésio ($[Mg^{2+}]$) foi praticamente constante.

As curvas de regulação iônica da $[Cl^-]$ e da $[Mg^{2+}]$ plasmática para *S. testudineus* e *S. greeleyi* apresentaram mesmo padrão e valores muito próximos, quando submetidos aos extremos de salinidade 5 ‰ e 35 ‰. Nos experimentos de campo, da mesma forma que nos experimentos de laboratório, as curvas de regulação iônica da $[Cl^-]$ plasmática para *S. testudineus* e *S. greeleyi* apresentaram mesmo padrão e valores muito próximos. Contudo, *S. testudineus* mostrou-se mais resistente do que *S. greeleyi* à redução de salinidade a valores baixos (5 ‰), já que *S. greeleyi* não tolerou período de aclimatação de 15 dias em salinidade reduzida de 5 ‰ em laboratório, com mortalidade já no 5º dia de exposição, e não tolerou salinidade de 4,7 ‰ ao longo da descida da maré no ambiente natural em experimento de campo, ao longo de 6 horas. Não está claro porque *S. greeleyi* sobreviveu 5 dias em 5 ‰ no laboratório, mas não suportou 6 horas com salinidade descendo até 4,7 ‰ no campo. O motivo pode ter sido

estresse de encontrar-se confinado em cercado no seu ambiente natural, sem poder se deslocar para locais onde a salinidade não fosse tão baixa.

Cabe aqui salientar que não foi encontrado relato na literatura de experimentos de campo com monitoramento da variação da salinidade com o ciclo de maré para espécies estuarinas na costa brasileira, com a finalidade de se estudar a regulação iônica. No entanto o experimento realizado com *S. testudineus* e *S. greeleyi* é o primeiro a ser efetuado, sendo precursor no estudo do efeito do ciclo de maré sobre mecanismos de regulação iônica de peixes eurihalinos estuarinos.

Dados da distribuição das duas espécies de baiacus no ambiente natural são totalmente compatíveis com estes resultados obtidos em laboratório e também com os resultados do experimento de campo. No ambiente natural *S. testudineus* e *S. greeleyi* estão sujeitos a variação constante da salinidade decorrente do ciclo das marés, e em um período de aproximadamente 6 horas a salinidade do local onde os animais são coletados, na gamboa do Rio Bagaçu, pode variar de 30 ‰ até 0 ‰. De fato *S. testudineus* é encontrado em maior número que *S. greeleyi* em regiões mais internas das gamboas, em locais onde a salinidade podem atingir valores próximos a 0 ‰, enquanto *S. greeleyi* não ocorre em locais de salinidade 0 ‰, sendo encontrado em maior número em pontos mais externos às gamboas onde a salinidade é mais elevada (CUNHA, 1999; NARDI, 1999; LOPES, 2000). Ficou demonstrado que a salinidade de 5 ‰ após 15 dias de aclimação representou um limite fisiológico mesmo para *S. testudineus*, uma vez que o animal começou demonstrar sinais de estar no seu limite de capacidade de regulação iônica. No ambiente natural esta espécie não permanece mais que algumas horas em água do mar diluída até esta faixa.

Os valores da $[Na^+]$ verificados para *S. testudineus* e da $[Cl^-]$ verificados para *S. testudineus* e *S. greeleyi* foram de aproximadamente 130 mM, semelhantes aos valores encontrados para outras espécies de teleósteos marinhos e estuarinos na literatura quando em água do mar (Tabela 1), mantendo a concentração de sal (NaCl) abaixo da concentração da água do mar, em forte hipo-regulação. Em alguns casos, mesmo em água do mar diluída ou água doce, a concentração de sal é mantida dentro de limites estreitos de variação, indicando eurihalinidade e capacidade de regulação osmótica e iônica bem desenvolvida, o que foi observado aqui para estas espécies de baiacus, e para outros teleósteos marinhos ou estuarinos (Tabela 1). Cabe acrescentar que a maioria dos estudos de regulação osmótica e iônica em teleósteos foi feita com espécies de água doce submetidas a aumento de salinidade. Espécies marinhas ou estuarinas submetidas a diluição da água do mar receberam bem menos atenção, um fato que confere maior relevância a esta investigação.

Dentre os íons dosados no plasma dos baiacus, o magnésio se destaca por apresentar concentrações plasmáticas sempre muito baixas (~1,3 mM), como o padrão para teleósteos marinhos, embora valores de $[Mg^{2+}]$ não tenham sido reportados para muitas destas espécies (Tabela 1) (HICKMAN & TRUMP, 1969; DOBBS & DeVRIES, 1975; RENFRO, 1980; MAREN *et al.*, 1992; BEYENBACH *et al.*, 1993; EVANS, 1993; JOBLING, 1995; CRUZ, 1998). O íon Mg^{2+} é hipo-regulado fortemente pelos baiacus e outros teleósteos marinhos através de secreção tubular renal (BEYENBACH *et al.*, 1993; HENTSCHEL & ZIEROLD, 1994; BEYENBACH, 1995; BEYENBACH *et al.*, 1997). As células dos túbulos renais (túbulo proximal II) secretam ativamente Mg^{2+} no lúmen tubular (BEYENBACH *et al.*, 1993; BEYENBACH, 1995; BAUSTIAN *et al.*, 1997;

CHANDRA *et al.*, 1997). Diferentes mecanismos de secreção de magnésio pelo epitélio tubular renal têm sido propostos (BEYENBACH *et al.*, 1993). Observou-se relação inversa entre a $[Mg^{2+}]$ e $[Na^+]$ na urina e foi feita sugestão do acoplamento da secreção de magnésio com a reabsorção de sódio através de um trocador Na^+/Mg^{2+} . Contudo, a relação inversa pode ocorrer simplesmente pela secreção de Mg^{2+} concomitante com a reabsorção de Na^+ e água (BEYENBACH & KIRSCHNER, 1975; BEYENBACH *et al.*, 1993; BEYENBACH *et al.*, 1997). Outra possibilidade é a secreção ativa na membrana apical por ATPase (BEYENBACH *et al.*, 1993; BEYENBACH, 1995). Finalmente, houve evidência de secreção de Mg^{2+} por exocitose de vesículas contendo Mg^{2+} (HICKMAN & TRUMP, 1969; HENTSCHEL & ZIEROLD, 1994). Esta última forma é compatível com a observação de óbvias figuras de exocitose na membrana luminal e de material amorfo no lúmen do tubo renal de *S. testudineus* em microscopia eletrônica de transmissão, principalmente em água do mar diluída (10 ‰) (Figuras 14a, b e c). A observação de material amorfo em grande quantidade no lumen do tubo renal de *S. testudineus* é bastante coerente com a proposição de HENTSCHEL & ZIEROLD (1994) de que íons Mg^{2+} se ligariam a glicoconjugados após secretados ativamente para o interior das vesículas de secreção presentes na região apical. A confirmação da natureza deste material secretado necessitaria de estudos futuros. A secreção de Mg^{2+} através de vesículas serviria tanto para hipo-regulação plasmática do íon Mg^{2+} quanto para levar à formação de urina, com secreção de volume, crucial em peixes aglomerulares que não realizam filtração do sangue (HICKMAN & TRUMP, 1969; RENFRO, 1980; BEYENBACH & BAUSTIAN, 1989; HENTSCHEL & ELGER, 1989; BEYENBACH, 1995), como é o caso de *S. testudineus*.

A observação de secreção de vesículas foi qualitativa, porém ocorre em maior intensidade quando *S. testudineus* está em água 10 ‰ do que em água 30 ‰ (Figuras 13 e 14). Em 10 ‰ *S. testudineus* é iso-iônico ao meio, porém a ingestão da água ambiente que leva a absorção de sal acompanhado de água no tubo digestivo (EVANS, 1993; JOBLING, 1995) vai resultar em maior entrada de água no corpo animal, já que na salinidade reduzida a água ingerida e depois absorvida tem menor concentração de sal, e maior concentração de água. Este excesso de água deve então ser excretado. O aumento aparente nas figuras de exocitose na salinidade reduzida deve ser atribuído à maior necessidade de eliminar água (aumentar fluxo urinário), e não eliminar Mg^{2+} , uma vez que em salinidade reduzida a entrada de Mg^{2+} no organismo do peixe vai ser menor.

À morfológia básica observada para os filamentos branquiais do baiacu-pintado e semelhante à estrutura descrita para outros teleósteos, como a traíra (*Hoplias malabaricus*) (MORON & FERNANDES, 1996), o bagre (*Hypostomus plecostomus*) (FERNANDES *et al.*, 1998), o curimatá (*Prochilodus scrofa*) (EIRAS-STOFELLA & CHARVET-ALMEIDA, 1998), a tainha (*Mugil platanus*) (FONSECA NETO & SPACH, 1999), dentre outras espécies (SARDET *et al.*, 1979; GIRARD & PAYAN, 1980; HOOTMAN & PHILPOTT, 1980; LAURENT & DUNEL, 1980; PISAM *et al.*, 1990; PISAM *et al.*, 1993; AVELLA *et al.*, 1993; FONTAINE *et al.*, 1995; GRECO *et al.*, 1995; JOBLING, 1995; UCHIDA *et al.*, 1996; PERRY, 1997; CRUZ, 1998). As brânquias de *S. testudineus* apresentaram lamela primária e longas lamelas secundárias nas quais estão presentes as células que constituem o epitélio branquial. Além das células de cloreto responsáveis pelo transporte de NaCl, o epitélio branquial apresentou células

pavimentares delgadas ocupando toda a superfície das lamelas secundárias. Estas células pavimentares são responsáveis pela superfície de contato entre o sangue e o ambiente externo (água) com a finalidade de realizar transporte de gases durante a respiração (SARDET *et al.*, 1979; LAURENT & DUNEL, 1980; MORON & FERNANDES, 1996; PERRY, 1997). Células acessórias ocorreram na base ou ao lado das células de cloreto na região interlamelar, com citoplasma mais eletrondenso do que o citoplasma das células de cloreto. As mitocôndrias das células acessórias parecem ser menores, mais eletrondensas e menos abundantes quando comparadas às das células de cloreto. Estas células acessórias possuem também sistema tubular de membranas e função relacionada com o secreção de sal, sendo encontradas em epitélio branquial de teleósteos marinhos (SARDET *et al.*, 1979; HOOTMAN & PHILPOTT, 1980; LAURENT & DUNEL, 1980; PISAM *et al.*, 1990; PISAM *et al.*, 1993; FONTAINE *et al.*, 1995; JOBLING, 1995; LAURENT, *et al.*, 1995; SHIRAIISHI *et al.*, 1997).

A ultra-estrutura das células de cloreto do epitélio branquial do baiacu *S. testudineus* é semelhante à descrita para outras espécies de teleósteos dulcícolas e marinhos. Estas células possuem formato globoso e sistema tubular de membranas bastante desenvolvido e associado a mitocôndrias, além de projeções da membrana apical, tal como descrito para outras espécies (PHILPOTT & COPELAND, 1963; KARNAKY *et al.*, 1976, SARDET *et al.*, 1979; HOOTMAN & PHILPOTT, 1980; LAURENT & DUNEL, 1980; KARNAKY, 1980; HWANG & HIRANO, 1985; PISAM *et al.*, 1990; EVANS, 1993; FONTAINE *et al.*, 1995; JOBLING, 1995; PISAM *et al.*, 1995; ZADUNAISKY *et al.*, 1995; UCHIDA *et al.*, 1996; ZADUNAISKY, 1996; PERRY, 1997;

SHIRAISHI *et al.*, 1997; VAN DER HEIJDEN *et al.*, 1997; WOOD & PÄRT, 1997; FERNANDES *et al.*, 1998; FLETCHER *et al.*, 2000).

Dois tipos de células de cloreto foram relatadas para os teleósteos: as do tipo α , localizadas na região interlamelar (entre lamelas secundárias e primárias), presentes em espécies marinhas ou dulcícolas adaptadas a salinidade alta. O outro tipo de células de cloreto, as do tipo β , localizam-se mais na lamela primária e possuem membrana apical lisa sem projeções, são comuns e mais abundantes no epitélio branquial de peixes dulcícolas, tendo obviamente a função de absorver sal da água. Foi relatada degeneração das células β quando peixes de água doce são submetidos a aumento de salinidade (PISAM *et al.*, 1987; PISAM *et al.*, 1990; JOBLING, 1995; PISAM *et al.*, 1995; PERRY, 1997). O epitélio branquial de *S. testudineus* apresentou células de cloreto em geral na região interlamelar, algumas vezes associadas a células acessórias, e com projeções apicais sugerindo que estas células sejam células de cloreto do tipo α (JOBLING, 1995; PERRY, 1997).

Não foi detectada alteração quanto à localização das células de cloreto no epitélio branquial, quanto ao número e tamanho destas células, ou nas interdigitações com células adjacentes, em relação à aclimatação de *S. testudineus* a salinidade reduzida. Contudo, a análise morfométrica das células de cloreto sugeriu aumento no volume relativo de mitocôndrias em água do mar diluída (39,8 %), em comparação com o controle em 30 ‰ (30,2 %), e a diferença foi quase significativa: $P=0,064$. Embora não quantificado, aparentemente ocorreu aumento no sistema tubular de membranas das células de cloreto em salinidade reduzida (Figuras 8 e 9). Foram relatadas na literatura alterações na ultra-estrutura das células de cloreto em função da salinidade do

ambiente, compatíveis com as modificações e até reversões nos gradientes salinos. Nas espécies marinhas *Scophthalmus maximus* e *Sparus sarba* submetidas a redução de salinidade como feito aqui para *S. testudineus*, ou seja, com redução na necessidade de secretar sal para hipo-regulação, foram observadas algumas alterações: aumento nas projeções da membrana apical das células de cloreto, redução no sistema tubular (oposto ao observado aqui para *S. testudineus*) e redução na cripta apical (PISAM *et al.*, 1990; KELLY & WOO, 1999).

O rim de *S. testudineus*, como o rim dos teleósteos em geral, apresentou-se dividido em duas porções, rim da cabeça com tecido hematopoiético e rim posterior com túbulos (HICKMAN & TRUMP, 1969). A morfologia dos túbulos renais observada ao microscópio óptico revelou-se bastante diferente do observado para outros peixes. Não foram observados glomérulos, e o rim apresentou 1 a 3 tubos grandes com epitélio estratificado e lúmen amplo. Este tubo, ou melhor, as células em contato com o lumen, puderam ser caracterizadas como células típicas do túbulo proximal II (PII) pela presença de microvilos apicais, região sub-apical sem mitocôndrias e apresentando vesículas, complexos juncionais intercelulares bem desenvolvidos e região basal com dobramentos envolvendo numerosas mitocôndrias (HICKMAN & TRUMP, 1969; HENTSCHEL & ELGER, 1989; HENTSCHEL & ZIEROLD, 1994). A adaptação a salinidade reduzida não levou a alteração nestas mitocôndrias e dobramentos de membrana, após análise morfométrica, o que pode sugerir que pelo menos em termos puramente estruturais, a regulação da função renal em função da salinidade ocorra mais na região apical (secreção de vesículas) do que na região basal. O rim dos peixes não foi até agora alvo de tantos estudos estruturais quanto as brânquias, e não foram

encontrados trabalhos que relatassem alterações estruturais no rim de peixes em função da salinidade de aclimatação de uma mesma espécie. Em suma, a presença de epitélio espesso, estratificado e não em monocamada evidencia uma estrutura totalmente atípica para o rim do baiacu-pintado, quando comparado com a morfologia e estrutura já relatadas para rins de peixes, glomerulares ou aglomerulares.

Os dados obtidos sobre a regulação iônica do *S. testudineus* indicam que esta espécie é osmorreguladora, mantendo as concentrações plasmáticas dos íons estáveis mesmo quando submetida a redução de salinidade. Comparando a regulação iônica de *S. testudineus* com *S. greeleyi* observam-se semelhanças na capacidade osmorregulatória das duas espécies em salinidades mais altas, porém incapacidade de *S. greeleyi* de regular em salinidades mais baixas. A observação dos epitélios branquial e renal de *S. testudineus* indicam estrutura especializada para transporte de íons, com células abundantes em dobramentos de membrana envolvendo mitocôndrias, característico de epitélios de transporte de íons. Contudo, não foram detectadas alterações significativas na ultra-estrutura destes epitélios nos parâmetros analisados em função da adaptação à redução de salinidade. Também foi possível observar a total ausência de glomérulos no rim do *S. testudineus*, caracterizando esta espécie como aglomerular e portadora de rim atípico, com tubo grande com epitélio complexo e estratificado, e com secreção por exocitose atuante na formação da urina.

Tabela 1: Composição iônica plasmática de teleósteos marinhos e estuarinos.

Espécie	Ámbiente / aclimação	[Osm], mOsm/kgH ₂ O	[Na], m \bar{m}	[Cl], m \bar{m}	[mg], m \bar{m}	Referência
<i>Lophius piscatorius</i> (peixe-ganso)	Marinho AM	452	185	153	2,5	POTTS & PARRY, 1964
<i>Paralichthys lethostigma</i> (linguado)	Marinho AM	318	174,2	145,9	1,07	HICKMAN & TRUMP, 1969
<i>Trematomus loennbergi</i> ("cod icefish")	Marinho AM	563	256	238	2,15	DOBBS & DEVRIES, 1975
<i>Trematomus hansonii</i> ("cod icefish")	Marinho AM	581	271	253	1,19	DOBBS & DEVRIES, 1975
<i>Pseudopleuronectes americanus</i> (linguado)	Marinho AM		180,3	184,3	1,20	RENFRO, 1980
<i>Opsanus tau</i> (peixe-sapo)	Marinho AM	333		151		GRIFFITH, 1981
<i>Cynoscion regalis</i> (pescada)	Marinho AM	425		150		GRIFFITH, 1981
<i>Scomber scomber</i> (cavalinha)	Marinho AM	487		171		GRIFFITH, 1981
<i>Paralichthyes dentatus</i> (linguado)	Marinho AM	363		172		GRIFFITH, 1981
<i>Dicentrarchus labrax</i> ("sea bass")	Marinho AM (21 dias) AD (21 dias)		225 190	225 120		VENTURINI <i>et al.</i> , 1992
<i>Myoxocephalus octodecimspinosus</i> ("long-horned sculpin")	Marinho AM (72 h) 7 ‰ (72 h) 2,8 ‰ (72 h) 1,4 ‰ (72 h)	300	187	185 158 148 141 105	1	MAREN <i>et al</i> , 1992 CLAIBORNE <i>et al.</i> , 1994
<i>Fundulus heteroclitus</i> ("killifish")	Marinho AM (0 h) AM (20 h) AM (80 h)	65 350 300				ZADUNAIKY <i>et al</i> , 1995; ZADUNAIKY, 1996
<i>Dicentrarchus labrax</i> ("european sea bass")	Marinho AD (10 dias) 5 ‰ (10 dias) 15 ‰ (10 dias) 25 ‰ (10 dias) 50 ‰ (10 dias)	240 325 325 325 360	100 200	90 160 160		JENSEN <i>et al.</i> , 1998
<i>Parablennius sanguinolentus</i> ("interdial blenny")	Marinho AM (36 ‰) 14 ‰ (30 dias) AD (30 dias)	420 340 270	200 170 130			PLAUT, 1999

Espécie	Ambiente / aclimatação	[Osm], mOsm/kgH ₂ O	[Na], mM	[Cl], mM	[Mg], mM	Referência
<i>Notothenia neglecta</i> ("cod icefish")	Marinho					CRUZ, 1998
	AM (34 ‰) (6 horas)		230	186	1,03	
	17 ‰ (6 horas)		189	185	1,04	
	AM (34 ‰) (10 dias)		214	189	0,90	
<i>Boleophthalmus boddarti</i> ("mudskippers")	17 ‰ (10 dias)		205	179	0,84	CHEW & IP, 1990
	Estuarino					
	4 ‰ (7 dias)	252,4				
	17 ‰ (7 dias)	270,3				
	28 ‰ (7 dias)	275,1				
<i>Periophthalmus chrysopilus</i> ("mudskippers")	Estuarino					CHEW & IP, 1990
	4 ‰ (7 dias)	260,2				
	17 ‰ (7 dias) 28 ‰ (7 dias)	301,4 314,7				

AM= água do mar; AD= água doce; [Osm]= osmolalidade do plasma; [Na]=
concentração de íons sódio no plasma; [Cl]= concentração de íons cloreto no plasma;
[Mg]= concentração de íons magnésio no plasma.

5 CONCLUSÕES

Conclui-se que os baiacus *Sphoeroides testudineus* e *Sphoeroides greeleyi* são espécies eurihalinas e excelentes reguladoras das concentrações de NaCl e de íons magnésio no plasma.

Secretam NaCl pela brânquia e Mg^{2+} pelo rim, para a manutenção do equilíbrio osmo-iônico tanto em água do mar quanto em água do mar diluída, com as concentrações plasmáticas destes íons muito próximas entre as duas espécies.

S. testudineus é mais resistente a salinidades reduzidas quando comparados ao *S. greeleyi*, de forma totalmente compatível com sua distribuição na natureza. Por possuírem mecanismos eficientes de regulação iônica, estas duas espécies estuarinas podem no futuro servir de biomarcadores na avaliação de poluentes presentes em ecossistemas litorâneos brasileiros.

Os epitélios branquial e renal de *Sphoeroides testudineus* indicam ultra-estrutura especializada para transporte de íons, com células abundantes em dobramentos de membrana envolvendo mitocôndrias, característico de epitélio de transporte de íons. Não foram detectadas alterações significativas ultra-estruturais nas células de cloreto do epitélio branquial ou no epitélio renal, para os parâmetros analisados morfometricamente em função da adaptação à redução de salinidade.

O baiacu *S. testudineus* possui rim aglomerular totalmente atípico, com tubo grande com epitélio complexo e estratificado. As células junto ao lumen do tubo

apresentaram características estruturais de células do túbulo proximal II, típico segmento do néfron de rins aglomerulares, e apresentaram alta intensidade de secreção tubular por exocitose.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVAREZ – LEÓN, R. Peces colectados en el rio Acandi (Choco) suroeste del caribe colombiano. **Caldasia**, v. 16, n. 79, p. 525 – 530, 1991.
- AVELLA, M. ; BERHAUT, J. & BORNANCIN, M. Salinity tolerance of two tropical fishes, *Oreochromis aureus* and *O. niloticus*. I. Biochemical and morphological changes in the gill epithelium. **Journal of Fish Biology**, v. 42, p. 243 – 254, 1993.
- BAUSTIAN, M. D.; WANG, S. Q. & BEYENBACH, K. W. Adaptative responses of aglomerular toadfish to dilute sea water. **Journal of Comparative Physiology B**, v. 167, p. 61 – 67, 1997.
- BEYENBACH, K. W. Secretory eletrolyte transport in renal proximal tubules of fish. Em WOOD, C. M. & SHUTTLEWORTH, T. J. (eds). **Cellular and Molecular Approaches to Fish Ionic Regulation**. v. 14 in The Fish Physiology series. San Diego : Academic Press, 1995.
- BEYENBACH, K. W. & BAUSTIAN, M. D. Comparative physiology of the proximal tubule. From the perspective of aglomerular urine formation. KINNE, R. K. H. (ed): **Structure and function of the kidney**. v. 1, p. 103 – 142 in Comparative Physiology. Basel : Karger, 1989.
- BEYENBACH, K. W. & KIRSCHNER, L. B. Kidney and urinary bladder functions of the rainbow trout in Mg and Na excretion. **American Journal of Physiology**, v. 229, n. 2, p. 389 – 393, 1975.

- BEYENBACH, K. W.; FREIRE, C. A.; KINNE, R. K. H. & KINNE-SAFFRAN, E. Epithelial transport of magnesium in the kidney of fish. **Mineral and Electrolyte Metabolism**, v. 19, p. 241-249, 1993.
- BEYENBACH, K. W.; FREIRE, C. A.; KINNE-SAFFRAN, E. & KINNE, R. K. H. Transport of magnesium across renal membrane vesicles: evidence for a channel? Em SMETANA, R (ed). **Advances in magnesium research: 1 magnesium in cardiology**. London : John Libbey . 1997.
- BIJVELDS, M. J. C.; KOLAR, Z.; BONGA, S. E. W. & FLIK, G. Mg²⁺ transport in plasma membrane vesicles of renal epithelium of the mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*). **Journal of Experimental Biology**, v. 200, p. 1931 – 1939, 1997.
- BIJVELDS, M. J. C.; VAN DER VELDER, J. A.; KOLAR, Z.; & FLIK, G. Magnesium transport in freshwater teleosts **Journal of Experimental Biology**, v. 201, p. 1981 – 1990, 1998.
- BORSKI, R. J.; YOSHIKAWA, J. S. M.; MADSEN, S.; NISHIOKA, R. S.; ZABETIAN, C.; BERN, H. A. & GRAU, E. G. Effects of environmental salinity on pituitary growth hormone content and cell activity in the euryhaline tilapia *Oreochromis mossambicus*. **General and Comparative Endocrinology**, v. 95, p. 483 – 494, 1994.
- CHANDRA, S.; MORRISON, G. H. & BEYENBACH, K. W. Identification of Mg-transporting renal tubules and cells by ion microscopy imaging of stable isotopes. **American Journal of Physiology**, v. 273, p. F939 – F948, 1997.

- CHAVES, P. de T. C. & CORRÊA, M. F. M. Composição ictiofaunística da área de manguezal da Baía de Guaratuba, Paraná, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 15, n. 1, p. 195 – 202, 1998.
- CHEW, S. F. & IP, Y. K. Differences in the responses of two mudskippers, *Boleophthalmus boddarti* and *Periophthalmus chrysospilos* to changes in salinity. **Journal Experimental Zoology**, v. 256, p. 227 – 231, 1990.
- CHOE, K. P., EDWARDS, S.; MORRISON-SHETLAR, A. I.; TOOP, T. & CLAIBORNE, J. B. Immunolocalization of Na⁺-K⁺ - ATPase in mitochondrion-rich cells of the atlantic hagfish (*Myxine glutinosa*) gill. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A**, v. 124, p. 161 – 168, 1999.
- CLAIBORNE, J. B.; WALTON, J. S. & COMPTON-McCULLOUGH, D. Acid-base regulation, branchial transfers and renal output in a marine teleost fish (the long-horned sculpin *Myoxocephalus octodecimspinosus*) during exposure to low salinities. **Journal Experimental Biology**, v. 193, p. 79 – 95, 1994.
- CORRÊA, M. F. M.; SILVA, L. R.; KONOLSAISEN, J. F.; ASSANUMA, M. H. & ABILHOA, V. Determinação da toxicidade oral do baiacu-pintado *Sphoeroides testudineus* (OSTEICHTHYES-TETRAODONTIDORMES) em camundongos (*Mus musculus*) e cobaias (*Cavia porcellus*). **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, v. 33, n. 2, p. 413 – 438, 1990.
- CORRÊA, M. F. M.; KONOLSAISEN, J. F.; ASSANUMA, M. H.; ABRÃO, G. M. & SILVA, L. R. Determinação da toxicidade oral do baiacu-pintado *Sphoeroides testudineus* e do baiacu-mirim *S. greeleyi* (OSTEICHTHYES-

- TETRAODONTIFORMES) e sintomatologia da intoxicação em camundongos (*Mus musculus*). **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, v. 35, n. 3, p. 431- 447, 1992.
- CRUZ, S. R. Z. **Adaptações morfofuncionais e regulação iônica do peixe antártico *Notothenia neglecta* Nybelin (1951) submetido a decréscimo de salinidade.** Curitiba, 1998, 123 p. Dissertação (Mestrado em Morfologia), Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, 1998.
- CUNHA, F. **Estrutura das assembléias de peixes na gamboa do Sucuriú. Ilha da Cotinga, Baía de Paranaguá: agosto/98 a janeiro/99.** Pontal do Sul, 1999. Monografia (Bacharelado em Ciências Biológicas), Centro de Estudos do Mar, Universidade Federal do Paraná.
- DOBBS, G. H & DeVRIES, A. L. Renal function in antarctic teleost fishes: serum and urine composition. **Marine Biology**, v. 29, p. 59 – 70, 1975.
- EIRAS-STOFELLA, D. & CHARVET-ALMEIDA, P. Ultrastructure (SEM) of the gills of *Prochilodus scrofa* Steindachner (Pisces, Teleostei). **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 15, n. 2, p. 279 – 287, 1998.
- EPSTEIN, F. H.; SILVA, P. & KORMANIK, G. Role of Na-K-ATPase in chloride cell function. **American Journal of Physiology**, v. 238, p. R246 – R250, 1980.
- EVANS, D. H. Fish. Em MALOIJ, G. M. O. (ed). **Animals**, Orlando : Academic Press, 1979, 305 p.
- EVANS, D. H. Kinetic studies of ion transport by fish gill epithelium. **American Journal of Physiology**, v. 238, p. R224 - R230, 1980.
- EVANS, D. H. **The Physiology of Fishes.** Boca Raton : CRC Press, 1993.

- FERNANDES, M. N. ; PERNA, S. A. & MORON, S. E. Chloride cell apical surface changes in gill epithelia of the armoured catfish *Hypostomus plecostomus* during exposure to distilled water. **Journal of Fish Biology**, v. 52, p. 844 – 849, 1998.
- FIGUEIREDO, J. L. & MENEZES, N. A. **Manual de peixes marinhos do sudeste do Brasil. VI Teleostei (5)**. São Paulo: Museu de Zoologia, Universidade de São Paulo, 2000.
- FLETCHER, M.; KELLY, S. P.; PÄRT, P.; O'DONNELL, M. J. & WOOD, C. M. Transport properties of cultured branchial epithelia from freshwater rainbow trout: a novel preparation with mitochondria-rich cells. **Journal Experimental Biology**, v. 203, p. 1523 – 1537, 2000.
- FLIK, G.; VAN DER VELDEN, J. A.; DECHERING, K. J.; VERBOST, P. M.; SCHOENMAKERS, T. J. M.; KOLAR, Z. I. & BONGA, S. E. W. Ca^{2+} and Mg^{2+} transport in gills and gut of tilapia *Oreochromis mossambicus*: A Review. **Journal of Experimental Zoology**, v. 265, p. 356 – 365, 1993.
- FONSECA NETO, J. C. DA & SPACH, H. L. Morfologia de arcos branquiais de juvenis de *Mugil platanus* Günther (Pisces, Mugilidae). **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 16, n. 2, p. 489 – 500, 1999.
- FONTAINE, Y. A.; PISAM, M.; LE MOAL, C. & RAMBOURG, A. Silvering and gill “mitochondria-rich” cells in the eel, *Anguilla anguilla*. **Cell Tissue Research**, v. 281, p. 465 – 471, 1995.
- FREIRE, C. A.; KINNE-SAFFRAN, E.; BEYENBACH, K. W. & KINNE, R. K. H. Na-D-glucose cotransport in renal brush-border membrane vesicles of an early teleost

(*Oncorhynchus mykiss*). **American Journal of Physiology**, v. 269, p. R592-R602, 1995.

FREIRE, C. A.; KINNE, R. K. H; KINNE-SAFFRAN, E. & BEYENBACH, K. W. Electrodiffusive transport of Mg across renal membrane vesicles of the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. **American Journal of Physiology**, v. 270, p. F739-F748, 1996.

FREIRE, C. A. & McNAMARA, J. C. Fine structure of the gills of the freshwater shrimp *Macrobrachium olfersii* (Decapoda): effect of acclimation to high salinity medium and evidence for involvement of the lamellar septum in ion uptake. **Journal of Crustacean Biology**, v. 15, n. 1, p. 103-116, 1995.

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

GIRARD, J. P. & PAYAN, P. Ion exchange through respiratory and chloride cells in freshwater and seawater-adapted teleosts. **American Journal of Physiology**, v. 238, p. R260 – R268, 1980.

GONZALEZ-CABRERA, P. J.; DOWD, F.; PEDIBHOTLA, V. K.; ROSARIO, R.; STANLEY-SAMUELSON, D. & PETZEL, D. Enhanced hypo-osmoregulation induced by warm-acclimation in antarctic fish is mediated by increased gill and kidney Na^+/K^+ - ATPase activities. **Journal of Experimental Biology**, v. 198, p. 2279 – 22291, 1995.

- GOSS, G. G.; PERRY, S. F., FRYER, J. N. & LAURENT, P. Gill Morphology and acid-base regulation in freshwater fishes. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A**, v. 119, n. 1, p. 107 –115, 1998.
- GRECO, A. M.; GILMOUR, K. M.; FENWICK, J. C. & PERRY, S. F. The effects of softwater acclimation on respiratory gas transfer in the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. **Journal Experimental Biology**, v. 198, p. 2557 – 2567, 1995.
- GRIFFITH, R. W. Composition of blood serum of deep-sea fishes. **Biological Bulletin**, v. 160, p. 250 – 264, 1981.
- HANSEN, H. J.; OLSEN, A. G. & ROSENKILDE, P. Formation of phosphatidylethanolamine as a putative regulator of salt transport in the gills and esophagus of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 112B, p. 161 – 167, 1995.
- HAOND, C.; FLIK, G. & CHARMANTIER, G. Confocal laser scanning and electron microscopical studies on osmoregulatory epithelia in the branchial cavity of the lobster *Homarus gammarus*. **Journal of Experimental Biology**, v. 201, p. 1817 – 1833, 1998.
- HASWELL, M. S.; RANDALL, D. J. & PERRY, S. F. Fish gill anhydrase: acid-base regulation or salt transport? **American Journal of Physiology**, v. 238, p. R240 – R245, 1980.
- HENTSCHEL, H. & ELGER, M. Morphology of glomerular and aglomerular kidneys. Em Kinne, R.K.H. (ed). **Structure and Function of the Kidney. Comparative Physiology**. Basel: Karger, v. 1., p. 1-72, 1989.

- HENTSCHEL, H.; MÄHLER, S.; HERTER, P. & ELGER, M. Renal tubule of dogfish, *Scyliorhinus caniculus*: A comprehensive study of structure with emphasis on intramembrane particles and immunoreactivity for H⁺-K⁺-Adenosine Triphosphatase. **The Anatomical Record**, v. 235, p. 511 – 532, 1993.
- HENTSCHEL, H & ZIEROLD, K. Morphology and element distribution of magnesium-secreting epithelium: the proximal tubule segment PII of dogfish, *Scyliorhinus caniculus* (L.). **European Journal of Cell Biology**, v. 63, p. 32 – 42, 1994.
- HICKMAN, C.P. Jr & TRUMP, B. F. The kidney. In: HOAR, W. S. & RANDALL, D. J. (eds). **Fish Physiology**. New York: Academic Press, v. 1, p. 91-239, 1969.
- HILLE, B. **Ionic Channels of Excitable Membranes**. 2. ed. Sunderland : Sinauer Associates Inc., 1992.
- HOSSLER, F. E. Gill arch of mullet, *Mugil cephalus* III. Rates of response to salinity change. **American Journal of Physiology**, v. 238, p. R160 – R164, 1980.
- HOOTMAN, S. R. & PHILPOTT, C. Accessory cells in teleost branchial epithelium **American Journal of Physiology**, v. 238, p. R199 – R206, 1980.
- HWANG, P. P. & HIRANO, R. Effects of environmental salinity on intercellular organization and junctional structure of chloride cells in early stages of teleost development. **Journal of Experimental Zoology**, v. 236, p. 115 – 126, 1985.
- JENSEN, M. K.; MADSEN, S. S. & KRISTIANSEN, K. Osmoregulation and salinity effectes on the expression and activity of Na⁺, K⁺-ATPase in the gills of european sea bass, *Dicentrarchus labrax* (l.). **Journal of Experimental Zoology**, v. 282, p. 290 – 300, 1998.
- JOBLING, M. **Enviromental Biology of Fishes**. London : Chapman & Hall, 1995.

- KARNAKY Jr, K. J.; ERNST, S. A. & PHILPOTT, C. W. Teleost chloride cell. I Response of pupfish *Cyprinodon variegatus* gill Na,K-ATPase and chloride cell fine structure to various high salinity environments. **Journal of Cell Biology**, v. 70, p. 144 – 156, 1976.
- KARNAKY Jr, K. J. Ion-secreting epithelia: chloride cells in the head region of *Fundulus heteroclitus*. **American Journal of Physiology**, v. 238, p. R185 – R198, 1980.
- KELLY, S. P. & WOO, N. Y. S. The response of sea bream following abrupt hyposmotic exposure. **Journal of Fish Biology**, v. 55, p. 732 – 750, 1999.
- KÜLTZ, D. Plasticity and stressor specificity of osmotic and heat shock responses of *Gillichthys mirabilis* gill cell. **American Journal of Physiology**, v. 271, p. C1181 – C1193, 1996.
- LAUDER, G. V. & LIEM, K. F. The evolution and interrelationships of the actinopterygian fishes. **Bulletin of the Museum of Comparative Zoology**, v. 150, n. 3, p. 95 – 197, 1983.
- LAURENT, P. & DUNEL, S. Morphology of gill epithelia in fish. **American Journal of Physiology**, v. 238, p. R147 – R159, 1980.
- LAURENT, P.; MAINA, J. N.; BERGMAN, H. L.; NARAHARA, A.; WALSH, P. J. & WOOD, C. M. Gill structure of a fish from an alkaline lake: effect of short-term exposure to neutral conditions. **Canadian Journal of Zoology**, v. 73, p. 1170 – 1181, 1995.
- LOPES, S. DE C. G. **Ictiofauna de uma planície de maré adjacente à gamboa do Baguaçu, Baía de Paranaguá**. Pontal do Sul, 2000. Monografia (Bacharelado em Ciências Biológicas). Centro de Estudos do Mar, Universidade Federal do Paraná.

- MADSEN, S. S.; LARSEN, B. K. & JENSEN, F. B. Effects of freshwater to seawater on osmoregulation, acid-base balance and respiration in river migrating whitefish (*Coregonus lavaretus*). **Journal Comparative Physiology B**, v. 166, p. 101 – 109, 1996.
- MANN, K.H. & LAZIER, J. R. N. **Dynamics of Marine Ecosystems – Biological-Physical Interactions in the Oceans**. Boston : Blackwell Scientific Publications, 1991.
- MAREN, T. H.; FINE, A.; SWENSON, E. R.; ROTHMAN, D. Renal acid-base in marine teleost, the long-horned sculpin *Myoxocephalus octodecimspinosus*. **American Journal of Physiology**, v. 263, p. F49-F55, 1992.
- MORGAN, J. D.; SAKAMOTO, T.; GRAU, E. G. & IWAMA, G. K. Physiological and respiratory responses of the mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*) to salinity acclimation. **Comparative Biochemistry and Physiology A**, v. 117, n. 3, p. 391 – 398, 1997.
- MORON, S. E. & FERNANDES, M.N. Pavement cell ultrastructural differences on *Hoplias malabaricus* gill epithelia. **Journal of Fish Biology**, v. 49, p. 357 – 362, 1996.
- NARDI, M. **Assembléia de peixes em um ambiente de gamboa**. Pontal do Sul, 1999. Monografia (Bacharelado em Ciências Biológicas). Centro de Estudos do Mar, Universidade Federal do Paraná.
- NELSON, J. S. **Fishes of the World**. 3. ed. New York : John Wiley & Sons, Inc., 1994.
- ODUM, E.P. **Ecologia**. Rio de Janeiro : Guanabara Koogan, 1988.

ODUM, H. T. **Ecological and General Systems: An Introduction to Systems Ecology**. Revised edition. Colorado : University Press of Colorado, 1994.

PATRICK, M. L. & WOOD, C. M. Ion and acid-base regulation in freshwater mummichog (*Fundulus heteroclitus*): a departure from the standard model for freshwater teleosts. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A**, v. 122, p. 445 – 456, 1999.

PERRY, S. F. The chloride cell: structure and function in the gills of freshwater fishes. **Annual Reviews in Physiology**, v. 59, p. 325 – 347, 1997.

PERRY, S. F.; REID, S. G.; WANKIEWICZ, E.; IYER, V. & GILMOUR, K. M. Physiological responses of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to prolonged exposure to soft water. **Physiological Zoology**, v. 69, n. 6, p. 1419 – 1441, 1996.

PHILPOTT, C. W. Tubular system membranes of teleost chloride cells: osmotic response and transport sites. **American Journal of Physiology**, v. 238, p. R171 – R184, 1980.

PHILPOTT, C. W. & COPELAND, D. E. Fine structure of chloride cells from species of *Fundulus*. **Journal of Cell Biology**, v. 18, p. 389 – 404, 1963.

PISAM, M.; BOEUF, G.; PRUNET, P. & RAMBOURG, A. Ultrastructural features of mitochondria-rich cells in stenohaline freshwater and seawater fishes. **American Journal of Anatomy**, v. 187, p. 21 – 31, 1990.

PISAM, M.; AUPERIN, B.; C.; PRUNET, P. RENTIER-DELRUE, F.; MARTIAL, J. & RAMBOURG, A. Effects of prolactin on α and β cells in the gill epithelium of the saltwater adapted tilapia *Oreochromis niloticus*. **Anatomical Record**, v. 235, p. 275 – 284, 1993.

- PISAM, M.; CAROFF, A. & RAMBOURG, A. Two types of chloride cells in the gill epithelium of a freshwater adapted euryhaline fish: *Lebistes reticulatus*, their modifications during adaptations to saltwater. **American Journal of Anatomy**, v. 179, p. 40 – 50, 1987.
- PISAM, M.; LE MOAL, C.; PRUNET, P. & RAMBOURG, A. Apical structures of “mitochondria-rich” α and β cells in euryhaline fish gill: their behaviour in living conditions. **Anatomical Record**, v. 241, p. 13 – 24, 1995.
- PLAUT, I. Effects of salinity on survival, osmoregulation, and oxygen consumption in the blenny, *Parablennius sanguinolentus*. **Copeia**, v. 3, p. 775 – 779, 1999.
- POTTS, W. T. W. & PARRY, G. **Osmotic and ionic regulation in animals**. New York : Macmillan, 1964.
- RENFRO, J. L. Relationship between renal fluid and Mg secretion in a glomerular marine teleost. **American Journal of Physiology**, v. 238, p. F92 – F98, 1980.
- REYNOLDS, E.S. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. **Journal of Cell Biology**, v. 17, p. 208 – 212, 1963.
- SARDET, C.; PISAM, M. & MAETZ, J. The surface epithelium of teleostean fish gills. Cellular and junctional adaptations of the chloride cell in relation to salt adaptation. **Journal of Cell Biology**, v. 80, p. 96 – 117, 1979.
- SHIRAISHI, K.; KANEKO, T.; HASEGAWA, S. & HIRANO, T. Development of multicellular complexes of chloride cells in the yolk-sac membrane of tilapia (*Oreochromis mossambicus*) embryos and larvae in seawater. **Cell Tissue Research**, v. 288, p. 583 – 590, 1997.

SCHMIDT - NIELSEN, K. **Animal Physiology: Adaptation and Environment**. 5. ed.

Cambridge : Cambridge University Press, 1997.

SMITH, N. F.; EDDY, F. B. & TALBOT, C. Effect of dietary salt load on transepithelial Na⁺ exchange in freshwater rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Journal of Experimental Biology**, v. 198, p. 2359 – 2364, 1995.

TARGETT, T. E. Food resource partitioning by the pufferfishes *Sphoeroides spengleri* and *S. testudineus* from Biscayne Bay, Florida. **Marine Biology**, v. 49, p. 83 – 91, 1978.

UCHIDA, K.; KANEKO, T. YAMAUCHI, K. & HIRANO, T. Morphometrical analysis of chloride cell activity in the gill filaments and lamellae and changes in Na⁺,K⁺-ATPase activity during seawater adaptation in chum salmon fry. **Journal Experimental Zoology**, v. 276, p. 193 – 200, 1996.

VAN DER HEIJDEN, A. J. H.; VERBOST, P. M.; EYGENSTEYN, J.; LI, J.; BONGA, S. E. W. & FLIK, G. Mitochondria-rich cells in gills of tilapia (*Oreochromis mossambicus*) adapted to fresh water or sea water: quantification by confocal laser scanning microscopy. **Journal of Experimental Biology**, v. 200, p. 55 – 64, 1997.

VENTURINI, G.; CATALDI, E.; MARINO, G.; PUCCI, P.; GARIBALDI, L.; BRONZI, P. & CATAUDELLA, S. Serum ions concentration and atpase activity in gills, kidney and oesophagus of european sea bass (*Discentrarcus labrax*, PISCES, PERCIFORMES) during acclimation trials to fresh water. **Comparative Biochemistry and Physiology A**, v. 103, n. 3, p. 451 – 454, 1992.

WALKER JR., H. J. & BUSSING, W. A. Two new pufferfishes of the genus *Sphoeroides* from the eastern Pacific. **Copeia**, v. 3, p. 677 – 684, 1996.

WOOD, C. M. & PÄRT, P. Cultured branquial epithelia from freshwater fish gills.

Journal of Experimental Biology, v. 200, p. 1047 – 1059, 1997.

WOSIACKI, W. B. The contribution of Andre Mayer for the natural hystory of Paraná

(Brazil). **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, v. 33, n. 4, p. 853 – 862, 1990.

ZADUNAISKY, J. A.; CARDONA, S.; AU, L.; ROBERTS, D. M.; FISHER, E.

LOWENSTEIN, B.& CRAGOE Jr., E. J. Chloride transport activation by osmolarity during rapid adaptation to high salinity of *Fundulus heteroclitus*. **Journal of**

Membrane Biology, vol. 143, p. 207 – 217, 1995.

ZADUNAISKY, J. A. Chloride cells and osmoregulation. **Kidney International**, vol. 49,

p. 1563 – 1567, 1996.