



**UEPB**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA  
CAMPUS V - MINISTRO ALCIDES CARNEIRO  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E SOCIAIS APLICADAS  
CURSO DE BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**MIKAELLE CRISTINA MEDEIROS CHAVES**

**REGULAÇÃO HÍDRICA DE OSTRAS (*Crassostrea brasiliiana*) DOS RECIFES DA  
PRAIA DO CABO BRANCO, JOÃO PESSOA, BRASIL**

**JOÃO PESSOA  
2019**

MIKAELLE CRISTINA MEDEIROS CHAVES

**REGULAÇÃO HÍDRICA DE OSTRAS (*Crassostrea brasiliana*) DOS RECIFES DA  
PRAIA DO CABO BRANCO, JOÃO PESSOA, BRASIL**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado a Coordenação do Curso de Graduação em Ciências Biológicas do Campus V da Universidade Estadual da Paraíba, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

**Área de concentração:** Fisiologia Animal Comparada.

**Orientador:** Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Enelise Marcelle Amado.

**JOÃO PESSOA  
2019**

É expressamente proibido a comercialização deste documento, tanto na forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano do trabalho.

C512r Chaves, Mikaelle Cristina Medeiros.  
Regulação hídrica de ostras (*Crassostrea brasiliana*) dos recifes da praia do Cabo Branco João Pessoa, Brasil [manuscrito] / Mikaelle Cristina Medeiros Chaves. - 2019.  
22 p. : il. colorido.  
Digitado.  
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e Sociais Aplicadas, 2019.  
"Orientação : Profa. Dra. Enelise Marcelle Amado, Coordenação do Curso de Ciências Biológicas - CCBSA."  
1. Osmoconformador. 2. Brânquia. 3. Músculo adutor. 4. Teor Hídrico. 5. Regulação de Volume Celular. I. Título  
21. ed. CDD 630.41

MIKAELLE CRISTINA MEDEIROS CHAVES

REGULAÇÃO HÍDRICA DE OSTRAS (*Crassostrea brasiliiana*) DOS RECIFES DA  
PRAIA DO CABO BRANCO, JOÃO PESSOA, BRASIL

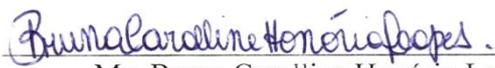
Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado a Coordenação do Curso  
Ciências Biológicas da Universidade  
Estadual da Paraíba, como requisito  
parcial à obtenção do título de Bacharel  
em Ciências Biológicas.

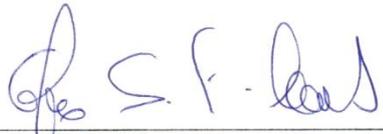
Área de concentração: Fisiologia Animal  
Comparada.

Aprovada em: 29/11/2019.

**BANCA EXAMINADORA**

  
\_\_\_\_\_  
Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Enelise Marcelle Amado (Orientadora)  
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)

  
\_\_\_\_\_  
Me. Bruna Caroline Honório Lopes  
Universidade Federal da Paraíba (UFPB)

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Elvio Sergio Figueredo Medeiros  
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)

A minha mãe, pelo apoio, confiança e amor,  
DEDICO.

“Nunca duvide que você é importante e poderosa e merecedora de todas as chances e oportunidades no mundo para correr atrás dos seus sonhos.”

HRC

## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	7
2	<b>METODOLOGIA</b> .....	8
2.1	<b>Área de Estudo</b> .....	8
2.2	<b>Coleta e Manuseio dos Exemplares</b> .....	9
2.3	<b>Experimento <i>in vivo</i></b> .....	10
2.3.1	<i>Exposição dos animais a variação de salinidade</i> .....	10
2.3.2	<i>Teor de Hidratação Tecidual</i> .....	10
2.4	<b>Experimento <i>in vitro</i></b> .....	11
2.4.1	<i>Análise da capacidade de regulação de volume celular</i> .....	11
2.5	<b>Análise estatística</b> .....	12
3	<b>RESULTADOS</b> .....	12
3.1	<b>Teor de Hidratação Tecidual</b> .....	12
3.2	<b>Regulação de Volume Celular</b> .....	15
4	<b>DISCUSSÃO</b> .....	16
5	<b>CONCLUSÃO</b> .....	18
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	18

# REGULAÇÃO HÍDRICA DE OSTRAS (*Crassostrea brasiliana*) DOS RECIFES DA PRAIA DO CABO BRANCO, JOÃO PESSOA, BRASIL

Mikaelle Cristina Medeiros Chaves\*

## RESUMO

A ostra *Crassostrea brasiliana* (Lamarck, 1819) pertencente ao Filo Mollusca, possui ampla distribuição no litoral brasileiro, sendo encontrada fixada a rochas e raízes da zona entre-marés. São animais osmoconformadores que variam a concentração osmótica de seus fluidos corporais de acordo com a variação de salinidade do ambiente. Tal variação expõe os tecidos do organismo a variações osmóticas, e para manter a hidratação tecidual as células devem ativar mecanismos de regulação de volume celular. O estudo teve como objetivo investigar a capacidade de regulação hídrica das ostras *C. Brasiliana* dos recifes da Praia do Cabo Branco, uma vez que a região tem sofrido impactos do desmoronamento da Barreira do Cabo Branco, e da urbanização do entorno. Para tanto, as ostras foram coletadas em 2 pontos dos recifes, um próximo (Ponto 1) e outro distante da barreira (Ponto 2), e foram submetidas a desafios osmóticos *in vivo* e *in vitro*. As capacidades de manutenção da hidratação tecidual e regulação de volume celular foram analisadas diante de uma condição hiposmótica e uma hiperosmótica. Os resultados indicam que existe diferença nas respostas à variação de salinidade entre as ostras dos diferentes pontos de coleta, mas a proximidade com a barreira parece não ser um fator relevante. As diferenças encontradas entre as ostras dos dois pontos de coleta aparentemente devem-se mais a influência do ambiente físico natural, em função da posição que elas ocupam nos recifes.

**Palavras-chave:** Osmoconformador. Brânquia. Músculo adutor. Teor hídrico. Regulação de Volume Celular.

## ABSTRACT

The oyster *Crassostrea brasiliana* (Lamarck, 1819) belongs to the Mollusca Phylum, is widely distributed on the Brazilian coast, found attached to rocks and roots of the intertidal zone. They are osmoconformers animals that vary the osmotic concentration of their body fluids according to environmental salinity variations. Such variation exposes body tissues to osmotic challenges, and to maintain tissue hydration cells must activate cell volume regulation mechanisms. The study aimed to investigate the water regulation capacity of *C. brasiliana* oysters from the Cabo Branco Beach reefs, since the region has been impacted by the collapse of the Cabo Branco Barrier and from the surrounding urbanization. To this end, the oysters were collected at 2 points of the reefs, one near (Point 1) and one far from the barrier (Point 2), and were submitted to osmotic challenges *in vivo* and *in vitro*. The ability to maintain tissue hydration and to perform cell volume regulation were analyzed upon hyposmotic and a hyperosmotic conditions. The results indicate that there is a difference in the responses to salinity variation between oysters from different collection sites, but proximity to the barrier does not seem to be a relevant factor. The differences found between the oysters of the two sites apparently are due to the influence of the natural physical environment, due to the position they occupy in the reefs.

---

\* Aluna de Graduação em Ciências Biológicas na Universidade Estadual da Paraíba - Campus V.  
Email: mikacristinamedeiros@gmail.com

**Keywords:** Osmoconformer. Gill. Muscle. Tissue Hydration. Cell Volume Regulation.

## 1 INTRODUÇÃO

Ostras são moluscos pertencentes à Classe Bivalvia, apresentando uma concha com duas valvas unidas por um músculo adutor forte, cabeça rudimentar, manto e brânquias (BRUSCA & BRUSCA, 2007). O gênero *Crassostrea* possui 48 espécies descritas (MolluscaBase, 2019), três delas podendo ser encontradas no Brasil. Os espécimes do gênero *Crassostrea* possuem um alto interesse comercial devido ao valor alimentício de sua “carne”. São eurihalinas e euritérmicas, porque apresentam boa capacidade de regulação hídrica e suportam variações na temperatura do ambiente (GALVÃO, 2000a; CHRISTO, 2006). A espécie *Crassostrea brasiliana* (LAMARCK, 1819) possui ampla distribuição no litoral brasileiro desde a costa do litoral paraibano até Santa Catarina, podendo ser encontrada em estuários, manguezais e rochas da região entremarés (DO AMARAL; SIMONE, 2014).

Assim como em regiões estuarinas, a região entremarés também está suscetível as variações de salinidade. As poças de maré dessa região ficam sempre expostas na maré baixa. Em dias chuvosos a salinidade do local pode chegar próximo da água doce. Em dias extremamente quentes, a salinidade pode chegar a uma água do mar hipersalina (FREIRE *et al.*, 2011), portanto os animais que vivem nesse ambiente precisam ser capazes de suportar uma grande amplitude de variações de salinidade e térmicas. Diante dessas variações de salinidade os animais devem apresentar mecanismos de regulação osmótica, seja a nível sistêmico, como é o caso dos osmorreguladores, ou a nível celular, como é o caso dos osmoconformadores.

Animais osmorreguladores possuem a capacidade de manter a concentração osmótica de seus fluidos corpóreos estável, independentemente das variações do meio ao qual está inserido. Essa manutenção da osmolaridade dos fluidos corpóreos protege seus tecidos internos de um estresse osmótico. Esse processo ocorre através da Regulação Extracelular Anisomótica (AER), onde mecanismos de transporte de sal nas membranas biológicas são ativados mantendo a homeostase do fluido extracelular (EVANS, 2008a; LARSEN *et al.*, 2014; DAVID *et al.*, 2016). Ao oposto disso estão os osmoconformadores, que variam a concentração osmótica de seus fluidos de acordo com as mudanças do meio externo. Por não possuírem a capacidade de realizar a regulação osmótica de seus fluidos extracelulares. Esses animais são dependentes unicamente da Regulação Isosmótica Intracelular (IIR) (RIVERA-INGRAHAM; LIGNOT, 2017). A IIR compreende dois mecanismos de ajuste a mudanças de salinidade, quando a célula precisa aumentar de volume após um choque hiperosmótico ela realiza RVI (Regulatory Volume Increase; Aumento Regulatório de Volume); por outro lado, se a célula precisa diminuir de volume após um choque hiposmótico ela realiza RVD (Regulatory Volume Decrease; Redução Regulatória de Volume) (HAUSSINGER, 1996; STRANGE, 2004). Os dois meios de regulação osmótica resultam em um aumento do gasto de energia do organismo. Na osmorregulação o gasto se deve principalmente a manutenção dos gradientes de íons e a ao controle da permeabilidade da membrana, por exemplo. Já na osmoconformação, esse maior gasto ocorre devido ao aumento das taxas de respiração para a produção de osmólitos orgânicos. A taxa de respiração aumenta conforme a salinidade externa aumenta, porém também existe aumento do gasto de energia em choques hiposmóticos (RIVERA-INGRAHAM; LIGNOT, 2017).

As ostras são animais osmoconformadores, essa condição impõe diversos desafios diários aos organismos, já que a salinidade de regiões entremarés e estuarinas, principalmente, podem variar em poucas horas. Essa variação expõe tecidos internos a choques osmóticos, e para tolerar alterações de salinidade, os osmoconformadores dependem dos mecanismos de regulação de volume celular. Além dos desafios osmóticos, a poluição presente no ambiente

aquático gera diversos distúrbios fisiológicos nos animais, especialmente na capacidade de invertebrados manterem sua hidratação tecidual ou de realizar a regulação de seu volume celular corretamente, esse assunto vem sendo amplamente abordado na literatura. Foi visto que o cádmio gerou uma alteração na capacidade de resposta homeostática em células digestivas de *Mytilus galoprovencialis*, atuando na Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>ATPase (TORRE *et al.*, 2013;). Já o chumbo, por exemplo, leva alterações nas células branquiais de caranguejos marinhos, prejudicando a Redução Regulatória de Volume, inibindo a Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>ATPase e alterando canais de Ca<sup>2+</sup> (AMADO *et al.*, 2012).

Localizada na capital do estado da Paraíba, João Pessoa, a Praia do Cabo Branco é um ponto turístico bem conhecido da cidade. Na parte mais ao sul da praia se localiza a Barreira do Cabo Branco, que vem sendo fonte de debate político e científico devido a sua alta vulnerabilidade à erosão, agravada principalmente pela construção civil em sua superfície e a retirada da vegetação nativa. Algumas tentativas de contenção da erosão já foram experimentadas ao longo dos anos, porém nenhuma apresentou um resultado satisfatório o suficiente (REIS, 2008). O desmoronamento da barreira atinge diretamente a vida dos organismos que pertencem à localidade. Esse impacto ocorre devido às características do tipo de solo. Os sedimentos que se desprendem se solubilizam na água tornando-a barrenta, impedindo a penetração de luz e dificultando o processo de alimentação de animais filtradores, aumentando as chances de morte. A área também sofre com a poluição, como esgoto doméstico em contato com o mar e lixo depositado na faixa de areia. Os efeitos da poluição do habitat podem gerar impactos enormes na capacidade de regulação osmótica dos animais que ali vivem.

Diversos trabalhos vêm sendo realizados com o intuito de avaliar a capacidade de regulação hídrica de animais marinhos como biomarcadores de degradação do ambiente aquático (DA SILVA, *et al.*, 2005; MOREIRA, *et al.*, 2016; NACEUR, *et al.*, 2016; DAVID, *et al.*, 2018). Este trabalho teve como objetivo analisar a capacidade de manutenção da hidratação tecidual e de regulação de volume celular das ostras *C. brasiliiana* diante de desafios salinos. Avaliar se existe diferença de resposta entre ostras que ocupam diferentes posições nos recifes do Cabo Branco: ostras que ocupam uma região próxima a barreira e, portanto, estão mais susceptíveis aos efeitos do desmoronamento, e ostras que ocupam uma região mais distante da barreira e da linha da praia. Dessa forma espera-se encontrar diferenças na capacidade das ostras de diferentes pontos de responder às variações de salinidade.

## 2 METODOLOGIA

### 2.1 Área de estudo.

O estudo foi realizado nos recifes da Praia do Cabo Branco, no Estado da Paraíba. A praia do Cabo Branco é uma praia urbana que possui aproximadamente 5,1 km de extensão. Os recifes estão localizados na extremidade Sul da praia (7°08'46.1"S 34°47'55.1"W), no limite com a praia vizinha, a Praia do Seixas (Figura 1). A região dos recifes é constituída de um terraço de abrasão marinha do tipo arenito-ferruginoso que é margeado pela barreira (MANSO, 2008). Os terraços são resultado de processos naturais e antrópicos que alteram a paisagem e a tornam vulnerável a riscos socioambientais (FURRIER; DOS SANTOS SOUZA; DE LAVOUR, 2017). Localizado na região entre-marés, o recife apresenta diariamente períodos de maré baixa e maré alta.

**Figura 1:** Imagem de satélite da área de estudo. Recifes da praia do Cabo Branco, João Pessoa, Paraíba, Brasil.

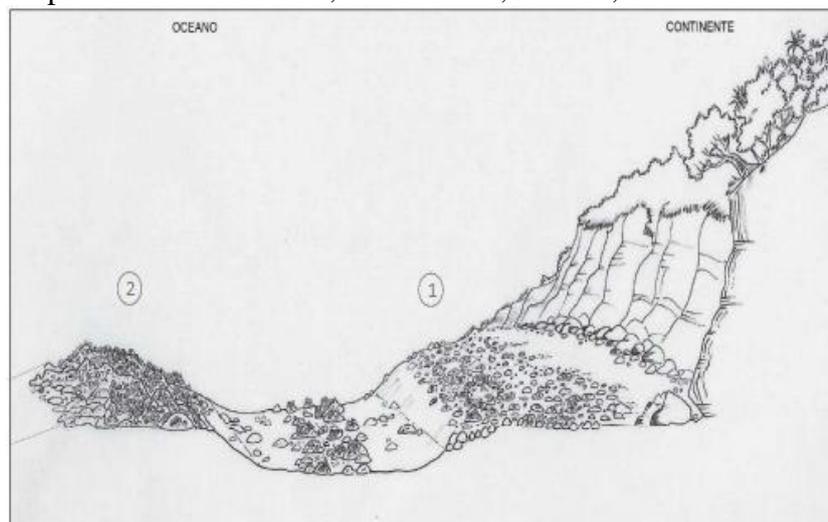


**Fonte:** Google Earth.

## 2.2 Coleta e Manuseio dos Exemplos

As coletas das ostras foram realizadas nos meses de março e abril (2018) e setembro de (2019), durante marés de sizígia em dois pontos do recife: o Ponto 1, mais próximo da linha da praia, a 22 metros de distância da barreira; e o Ponto 2, mais distante da linha da praia, a 367 metros da barreira, ambos os pontos ficam naturalmente emersos na maré baixa. Os animais foram coletados manualmente e de maneira aleatória, com auxílio de um facão. Em março de 2018 foram coletados 33 animais do Ponto 1. Já no mês de abril foram coletados 32 animais do Ponto 2. Em setembro de 2019, foram coletados 25 animais de cada um dos pontos. A taxa de mortalidade era de aproximadamente 2 ostras durante o período de aclimação.

**Figura 2:** Representação dos locais de amostragem nos recifes da praia do Cabo Branco, João Pessoa, Paraíba, Brasil.



**Fonte:** Ilustração adaptada e reproduzida de Monteiro Neto, I.E., 2016.

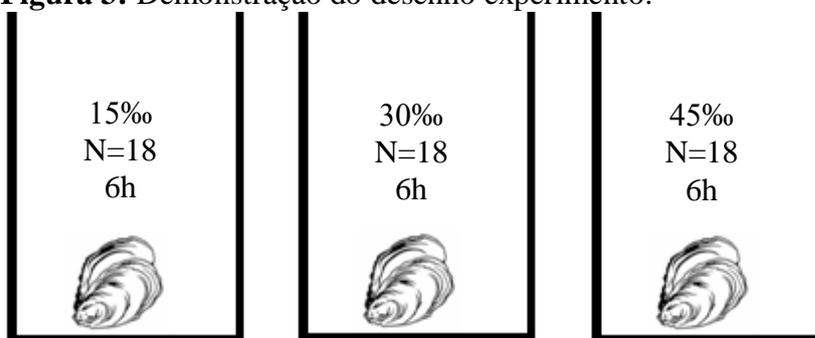
Os animais foram então transportados em caixas plásticas com água do local de coleta até o Laboratório de Ecofisiologia Animal (LEFA), do Curso de Ciências Biológicas, no Campus V da Universidade Estadual da Paraíba. No laboratório a salinidade foi verificada com o auxílio de um refratômetro (RTS-101ATC) e as caixas foram equipadas com aeradores de aquário (CX - 1000 AQUARIUM AIR PUMP) e mantidas com água do local de coleta em temperatura ambiente (25-26 °C), fotoperíodo natural. As ostras foram alimentadas com aproximadamente 3 g de ração de peixe a cada dois dias, e mantidas em um período de aclimação de no mínimo 4 dias antes da realização dos experimentos.

## 2.3 Experimento *in vivo*

### 2.3.1 Exposição dos animais à variação de salinidade

Neste experimento foram preparadas três águas experimentais de diferentes salinidades usando água destilada e sal marinho para aquarismo. As águas experimentais 15‰, 30‰ e 45‰ receberam, respectivamente, 15, 30 e 45 gramas de sal para cada litro de água destilada. Todas as águas tiveram sua salinidade conferida com o auxílio do refratômetro e foram colocadas nos aquários experimentais (2L cada), que receberam um aerador cada. A água experimental de 30‰, mais próxima da salinidade natural do local de coleta, foi considerada como a salinidade controle. As ostras foram distribuídas igualmente entre os aquários, com um intervalo de uma hora entre cada aquário. Depois de 6 horas de exposição às ostras foram retiradas da água e tiveram suas conchas desarticuladas com auxílio de uma faca, ocasionando na morte do animal (Figura 3). A brânquia e o músculo adutor foram então retirados com uma tesoura cirúrgica, para análise do teor de hidratação tecidual.

**Figura 3:** Demonstração do desenho experimento.



**Fonte:** Elaborado pela autora.

### 2.3.2 Teor de hidratação tecidual

Após a retirada, brânquia e o músculo adutor foram gentilmente secados em papel filtro e colocados em tubos de *ependorfs*, anteriormente identificados e pesados. Os tubos agora possuindo os tecidos foram novamente pesados em balança analítica com 0,1 mg de precisão (SHIMADZU AUY 220) resultando no peso úmido (Pu). Em seguida desidratados em estufa a 60 °C durante 24 horas e então pesados novamente para a obtenção do peso seco (Ps). O valor do peso do *ependorf* foi subtraído de Pu e Ps para o cálculo do teor de hidratação do tecido (Th) através da seguinte fórmula:

$$\text{Th (\%)} = \frac{(\text{Pu} - \text{Ps})}{\text{Pu}} \times 100$$

## 2.4 Experimento *in vitro*

### 2.4.1 Análise da Capacidade de Regulação de Volume Celular

Para analisar a capacidade de regulação de volume celular, células branquiais foram isoladas e submetidas a choques osmóticos de diferentes intensidades. As alterações do volume celular foram avaliadas utilizando a técnica de fluorescência chamada “Fluorescence Self-quenching”, descrita por HAMANN *et al.*, 2002; CAPÓ-APONTE *et al.*, 2006 e adaptada por AMADO *et al.* 2010. A técnica consiste em analisar a intensidade de fluorescência em certos fluoróforos que quando em altas concentrações sofrem o processo de auto-extinção, ou seja, a intensidade da fluorescência diminui com o aumento da concentração do fluoróforo. Tal propriedade física dos fluoróforos pode ser utilizada de maneira diretamente proporcional para medir alterações do volume de água nas células. Na prática quanto menor o volume de água na célula maior será a concentração de fluoróforos, levando a auto-extinção, e quanto maior o volume de água menor a concentração. Sendo assim quanto menos água na célula menor a emissão de fluorescência, e quanto mais água na célula, maior será a fluorescência.

Para a análise, após a coleta e aclimação dos animais, as brânquias foram removidas com uma tesoura, após a desarticulação das conchas com auxílio de uma faca, e colocadas em 10 ml de Tampão Fosfato Salino (PBS) e em seguida transferidas para uma placa de petri contendo 10 ml de PBS + EDTA (Ácido Etilenodiamino Tetra-acético), utilizando um bisturi e uma pinça o tecido foi fragmentado, e em seguida a dissociação foi realizada mecanicamente com auxílio de uma pipeta de Pasteur. As células branquiais recém-dissociadas foram centrifugadas (Eppendorf Centrifuge 5810 R, Alemanha) a 290g por 5 min a 20°C.

O composto anterior foi substituído por solução salina isosmótica para moluscos (470mM NaCl, 10mM KCl, 54mM MgSO<sub>4</sub>, 10mM CaCl<sub>2</sub>, 5mM glicose, 5mM Hepes, 2mM NaHCO<sub>3</sub>, pH 8,2), e então distribuído em uma placa preta de 96 poços específica para fluorescência (*Optiplate 96-well, Black*), em uma densidade de aproximadamente 10<sup>4</sup> células por poço. A auto-fluorescência dessas células foi medida de maneira a confirmar se as células estão equivalentemente distribuídas nos poços em uma leitora de microplacas (Spectra Max I3x, Molecular Devices). A placa foi então centrifugada a 290 g por 5 minutos para substituir a salina isosmótica por solução salina isosmótica acrescida do fluoróforo Calceína-AM (10µM). As células ficaram incubando nessa solução por uma hora, com leituras a cada 3 minutos para acompanhar a emissão de fluorescência do fluoróforo.

Após o período de incubação, a placa foi novamente centrifugada e a solução de calceína foi substituída por solução salina isosmótica. A fluorescência isosmótica foi então lida a cada 30 segundos por 5 minutos na leitora de microplacas com excitação de 485nm e emissão de 530nm para analisar a estabilidade da emissão de fluorescência. A placa foi centrifugada novamente e então as células foram submetidas às seguintes condições: controle isosmótico (900 mOsm), choque hiposmótico (450 mOsm), choque hiperosmótico (1350 mOsm). A fluorescência foi lida novamente a cada 30 segundos durante 10 min. Para análise das variações de volume celular, os valores absolutos de fluorescência foram transformados em valores relativos, onde 1 significa o volume inicial.

As soluções utilizadas neste experimento foram adaptadas de Veiga (2013) para invertebrados marinhos, a composição permaneceu a mesma, apenas a osmolaridade foi corrigida (Tabela 1). Uma solução é Isosmótica aos fluídos extracelulares dos animais, e, portanto utilizada como controle, outra é Hiposmótica e tem -50% de concentração em relação à isosmótica, e a Hiperosmótica tem +50% a mais na concentração, baseada na isosmótica.

**Tabela 1:** Composição osmótica das salinas utilizadas para o experimento de Regulação de Volume Celular.

Reagentes (mM)	Solução Isosmótica (100%)	Solução Hiposmótica (-50%)	Solução Hiperosmótica (+50%)
NaCl	470	235	705
KCL	10	5	15
MgSO <sub>4</sub>	54	27	81
CaCl <sub>2</sub>	10	5	15
Glicose	5	5	5
Hepes	5	5	5
NaHCO <sub>3</sub>	2	2	2

## 2.5 Análise estatística

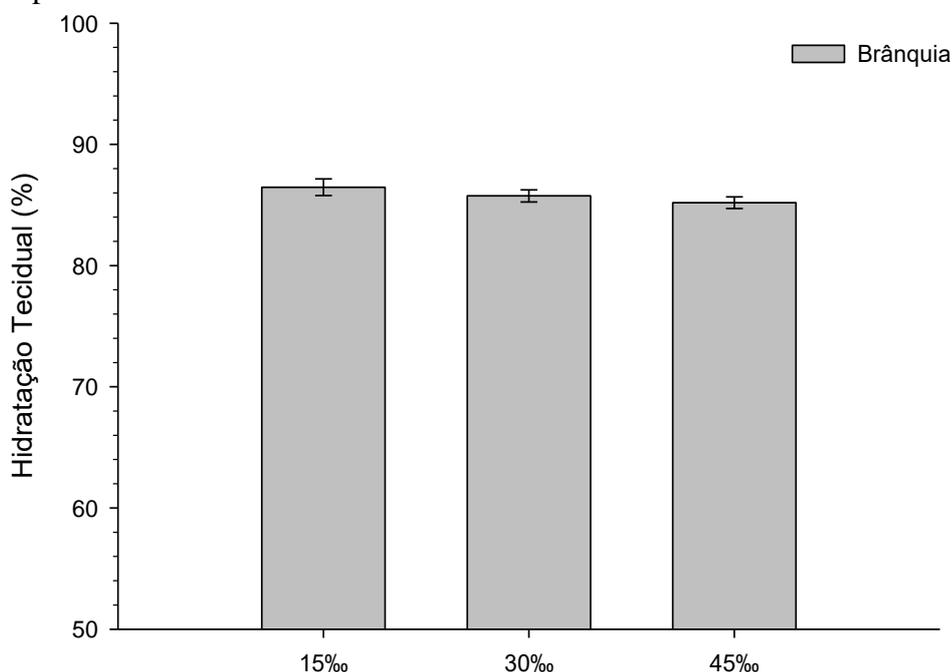
Os dados foram apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média. Todos os dados foram testados para normalidade e homocedasticidade. Para a análise do teor de hidratação tecidual foram usados os testes *oneway ANOVA* seguido de *Holm-sidak method* quando a distribuição se mostrou normal e *Kruskal-Wallis oneway ANOVA on ranks* seguido de *Tukey test* quando a distribuição se mostrou não normal (brânquia ponto 2). Para a análise de regulação de volume celular os dados foram tratados estatisticamente em cada tempo experimental através de *oneway ANOVA* seguido de *Holm-sidak method* ou *Kruskal-Wallis oneway ANOVA on ranks* seguido de *Tukey test*.

## 3 RESULTADOS

### 3.1 Teor de hidratação tecidual

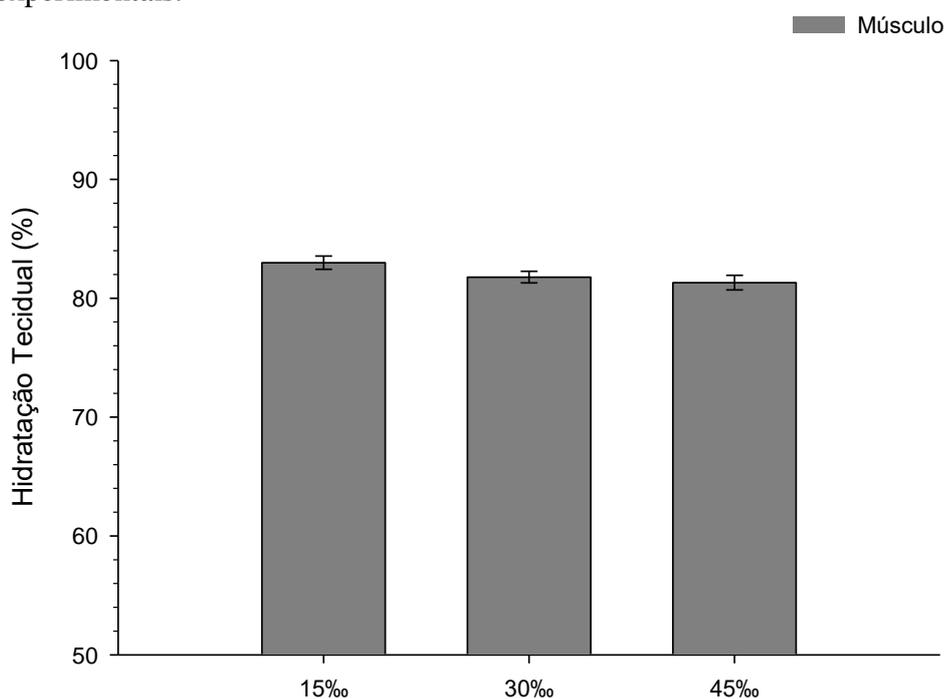
Quando as ostras do Ponto 1 foram submetidas à variação de salinidade, não foram encontradas diferenças estatísticas no teor de hidratação tecidual da brânquia (Gráfico 1). Os valores obtidos para a salinidade de 15‰ foram de  $86,5 \pm 0,7\%$ , com um N de 18. Já na salinidade de 30‰ os valores foram  $85,7\% \pm 0,5$ , com um N de 18. Já em 45‰, o N foi de 17, e os valores foram  $85,2\% \pm 0,5$ .

**Gráfico 1:** Teor de hidratação tecidual da brânquia de *Crassostrea brasiliana* do Ponto 1 após exposição em diferentes condições experimentais.



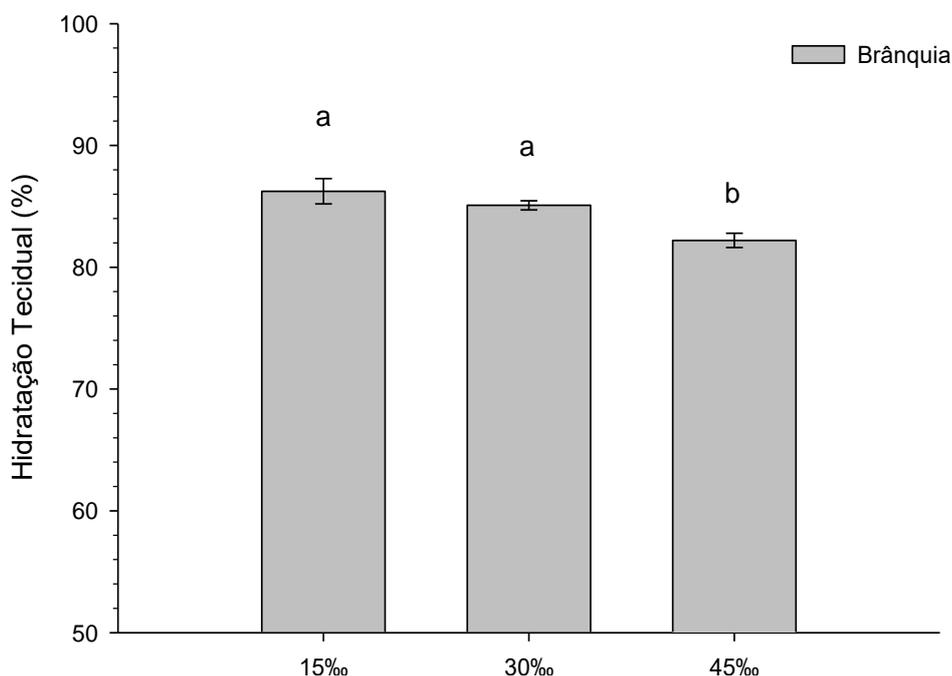
Também não houve diferença estatística no teor de hidratação tecidual do músculo adutor das ostras do Ponto 1 (Gráfico 2). Para a exposição de 15‰, os valores encontrados foram de 83%  $\pm$  0,6, com um N de 16. Os dados obtidos para a salinidade de 30‰, resultaram nos valores de 81,8%  $\pm$  0,5, para um N de 18. Na exposição de 45‰, o músculo adutor, com o N de 18, apresentou o valor de 81,3%  $\pm$  0,6.

**Gráfico 2:** Teor de hidratação tecidual no músculo adutor de *Crassostrea brasiliana* do Ponto 1 após exposição em diferentes condições experimentais.



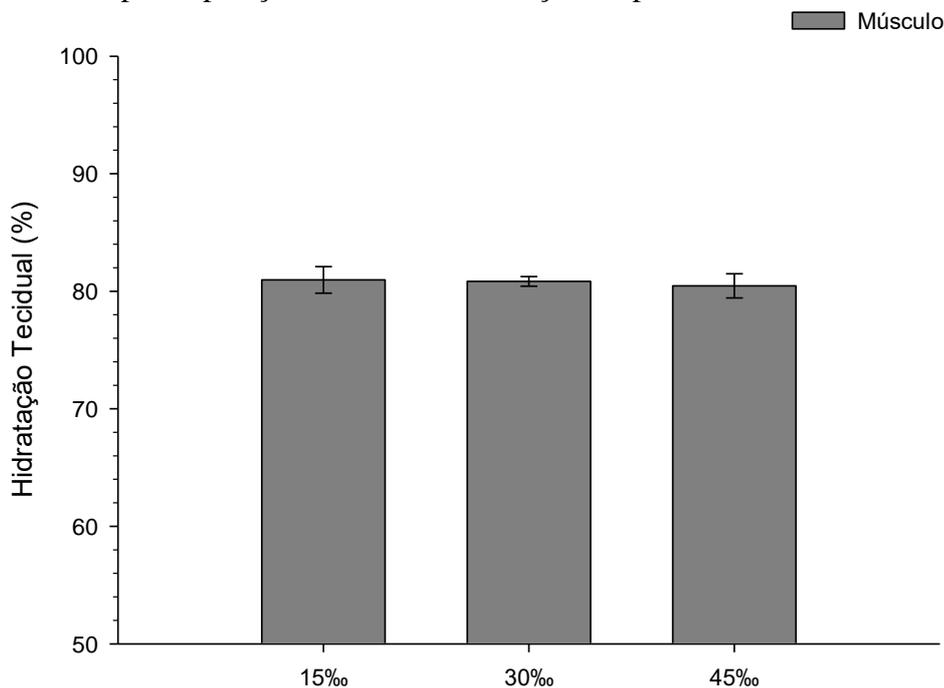
Nas ostras do Ponto 2, houve uma redução do teor de hidratação tecidual nas brânquias, após a exposição de 45‰. A análise estatística demonstrou que ocorreu uma diferença significativa. De acordo com essa análise, a brânquia exposta à condição experimental de 45‰ é diferente estatisticamente tanto quando comparada a condição de 15‰, quanto à condição experimental de 30‰ (Gráfico 3). Os valores obtidos para a exposição da brânquia na condição de 15‰ foram de  $86,2\% \pm 1,0$ , com o N de 18. Na exposição de 30‰ o resultado obtido foi de  $85,1\% \pm 0,4$ , para um N de 18. E na exposição de 45‰ os valores encontrados foram de  $82,2\% \pm 0,6$ , com um N de 18.

**Gráfico 3:** Teor de hidratação tecidual da brânquia de *C. brasiliiana* do Ponto 2 após exposição em diferentes condições experimentais.



Já no músculo adutor das ostras do Ponto 2, a análise estatística não apresentou nenhuma diferença significativa no teor de hidratação tecidual para nenhuma das condições experimentais (Gráfico 4). Os valores obtidos no músculo para a exposição de 15‰ foi de  $80,9\% \pm 1,1$ . Na exposição de 30‰ os valores apresentados foram de  $76,8 \pm 0,4$ . E com a exposição de 45‰ os valores obtidos foram de  $78,9\% \pm 1$ . Cada uma das três condições experimentais teve um N de 18.

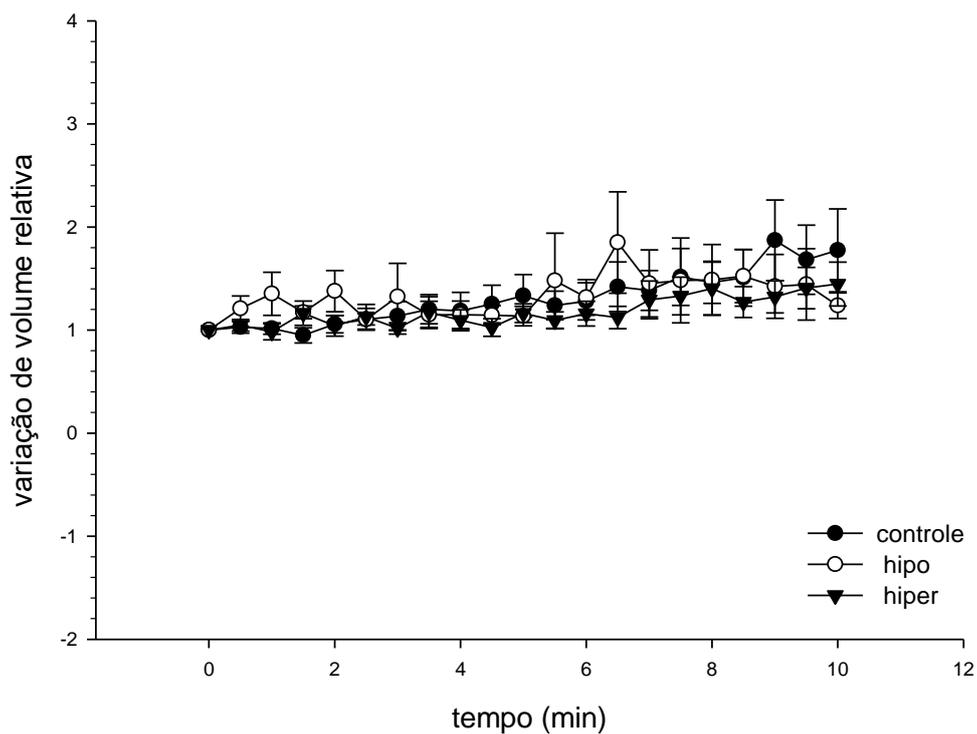
**Gráfico 4:** Teor de hidratação tecidual do músculo de *C. brasiliiana* no Ponto 2 após exposição a diferentes condições experimentais.



### 3.2 Regulação de volume celular

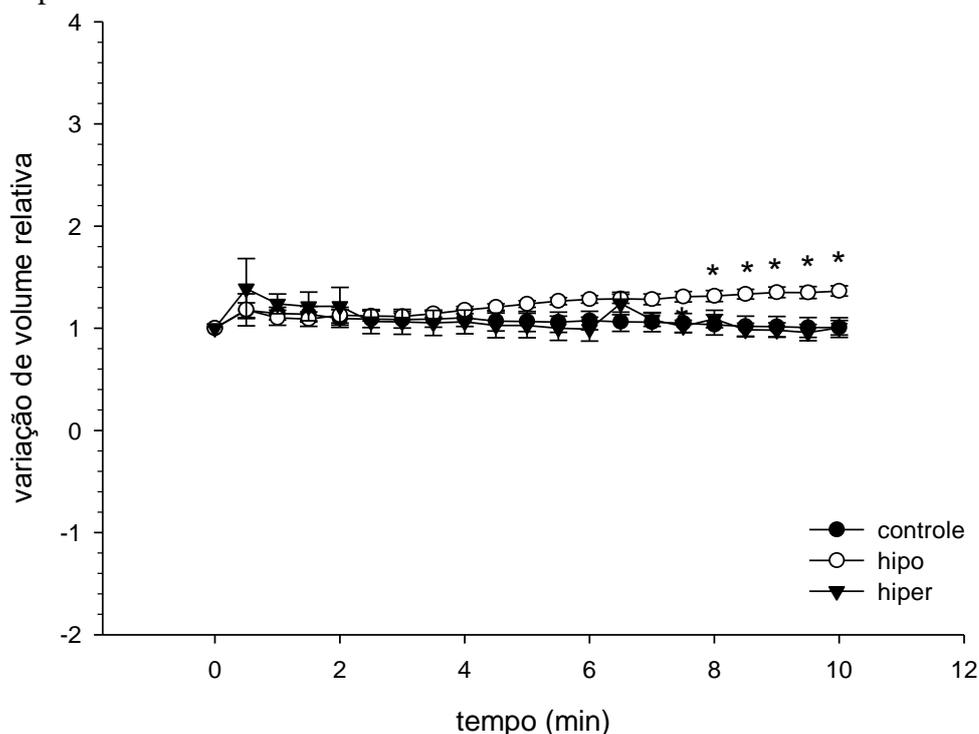
Os dados mostraram que não houve aumento ou diminuição de volume significativo nas ostras do Ponto 1 em nenhuma condição experimental ou tempo experimental analisado (Gráfico 5).

**Gráfico 5:** Gráfico de regulação de volume celular de *C. brasiliiana* do Ponto 1 após exposição a diferentes condições experimentais.



Porém, as células branquiais das ostras do Ponto 2 apresentaram um aumento significativo de volume a partir do tempo experimental de 7,5 min na condição hiposmótica (Gráfico 6).

**Gráfico 6:** Gráfico de regulação de volume celular de *C. brasiliana* do Ponto 2 após exposição a diferentes condições experimentais. O \* indica uma significância estatística entre o hiposmótico e o controle, e o hiposmótico e o hiperosmótico.



#### 4 DISCUSSÃO

As ostras são animais osmoconformadores eurialinos, o que lhes confere a capacidade de manter seus fluidos corpóreos isosmóticos ao ambiente externo e de suportar amplas variações de salinidade. Animais com tais características devem ser bons reguladores de volume celular. Tal mecanismo expõe as células desses animais a choques osmóticos, que podem levar a morte celular, onde tal capacidade de regulação protege as células da lise no caso de um inchaço, ou de murchar de tal forma que comprometa as atividades celulares ((RIVERA-INGRAHAM; LIGNOT, 2017).

O teor de hidratação pode refletir a nível tecidual o volume celular, pois a quantidade de água dentro de cada célula altera o peso do tecido como um todo. Os nossos experimentos mostram que o teor de hidratação tecidual das brânquias é maior do que no músculo. Esse resultado independe de ser qualquer um dos pontos de coleta ou de condição experimental utilizada. Tal resultado já era esperado, devido à função das brânquias de respiração, alimentação e osmorregulação, além do seu contato direto com meio externo (GALVÃO *et al.*, 2009b). O teor de hidratação tecidual apresenta que as ostras dos dois pontos regulam muito bem a quantidade de água nos seus tecidos, o que já é esperado para tal grupo. Porém, no tecido branquial das ostras do Ponto 2 houve uma leve diminuição de hidratação na exposição a água experimental de 45‰. A salinidade de 45‰ possui 50% a mais sal do que a água experimental controle (30‰), representando assim uma condição hiperosmótica para o tecido branquial. Essa condição hiperosmótica fez o tecido perder água, o que explica a diminuição da hidratação tecidual. No entanto, diante de um choque osmótico de 50%, a

redução de hidratação tecidual foi de apenas 4% (quando comparado ao controle), o que indica que houve ativação de mecanismos de regulação de volume celular para conter a saída de água, porém esses mecanismos não foram tão eficientes como os mecanismos ativados pelas ostras do ponto 1, que nem chegaram a perder água tecidual.

Essa menor habilidade de manutenção do teor de água nas brânquias das ostras do Ponto 2 pode estar associada às condições ambientais à que esses animais estão naturalmente expostos. Devido ao Ponto 2 estar localizado mais distante da faixa de areia e mais próximo da quebra de ondas, as poças de maré ali formadas podem não chegar a secar muito em dias de calor, mantendo a salinidade mais próxima a 30‰ (observação pessoal). Nesse caso, a salinidade de 45‰, tornou-se um desafio osmótico muito maior do que os que as ostras daquela área estão acostumadas. Enquanto isso as ostras do Ponto 1, por estarem posicionadas em um local de menor profundidade, estão sujeitas a uma amplitude de variação de salinidade natural maior. Essas diferenças na habilidade de regulação de hidratação tecidual em relação à distribuição espacial já foram registradas em outros osmoconformadores marinhos (AMADO *et al.*, 2011; AMADO *et al.*, 2015).

Estudos vêm demonstrando que a resposta regulatória de volume dos animais é assimétrica, o aumento de volume em choque hiposmóticos gera um aumento inicial de peso menor e um retorno mais instantâneo ao peso original quando comparado com um choque hiperosmótico de mesma magnitude. As respostas de tecidos inteiros comparados as células também se diferenciam, onde muitas vezes o tecido não demonstra resposta ao choque, mas a célula responde (EVANS, 2008b).

Nos testes de regulação de volume celular as ostras do ponto 2 na condição hiposmótica apresentaram um aumento de volume significativo a partir dos 7,5 min. Esse aumento também foi visto em *Crassostrea rhizophorae* em estuários poluídos (DAVID *et al.*, 2018). Nos experimentos de Naceur e colaboradores (2016), esse aumento de volume celular também foi visto em *C. brasiliiana* após exposição à baixa concentração de hidrocarbonetos, que danificou seus mecanismos membranares que realizam o RVD. Porém, testes para a presença de poluentes na região não foram realizados neste trabalho. Nesse caso, as células branquiais das ostras do Ponto 2 podem ter realizado o chamado RVD parcial, que consiste na perda de KCl e de osmólitos de maneira menos intensa, com a intenção de não perder muito desses compostos para o meio e ainda assim evitar a lise celular (HOFFMAN, DUNHAM, 1995).

Os resultados indicam que as ostras do Ponto 2 apresentam menor habilidade de regular teor de água diante de variação hiperosmótica nas suas brânquias, pois apesar de um choque osmótico de +50%, o tecido branquial não chegou a perder nem 5% do volume de água tecidual. Enquanto nos experimentos de regulação de volume celular, as ostras do Ponto 2, aumentaram seu volume de água no choque hiposmótico. A divergência dos resultados pode ser explicada pela diferença de resposta de tecidos para células. Onde as células têm maior facilidade de se recuperar de um choque hiposmótico que de um choque hiperosmótico, tendo que levar em consideração que o choque do experimento *in vivo* durou 6 horas, enquanto no experimento *in vitro* duraram 10 minutos.

Apesar das ostras do Ponto 1 não demonstrarem que a proximidade com a barreira afeta a sua capacidade de regulação hídrica, o desmoronamento pode influenciar outros aspectos fisiológicos. Durante as coletas foi possível observar que as ostras do Ponto 1 morreram após um ressaca do mar no ano de 2018, provavelmente devido a baixa oxigenação da água. Portanto, a barreira pode influenciar outros fatores fisiológicos, como o crescimento e a reprodução.

## 5 CONCLUSÃO

A boa capacidade de manutenção da hidratação tecidual e de regulação de volume celular das ostras do Ponto 1, correspondem as expectativas para o grupo. As ostras do Ponto 2, demonstraram menor habilidade em manter a hidratação de suas brânquias com um choque hiperosmótico e de regular seu volume celular no choque hiposmótico. Portanto, existe diferença entre as respostas de ostras de pontos de coleta diferentes, mas nesse caso a proximidade com a barreira parece não ser um fator relevante na resposta dos organismos à variação de salinidade. As diferenças encontradas entre as ostras dos dois pontos de coleta aparentemente devem-se mais a influência do ambiente físico natural, em função da posição que elas ocupam nos recifes. Mais estudos devem ser realizados analisando outros parâmetros para determinar se o desmoronamento da barreira afeta de maneira significativa na fisiologia das ostras do Cabo Branco.

## REFERÊNCIAS

- AMADO, Enelise Marcelle. **O efeito do chumbo sobre a fisiologia celular braquial de crustáceos**. Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular da Universidade Federal do Paraná, Curitiba/PR, p. 156, 2010.
- AMADO, Enelise M. et al. Distinct patterns of water and osmolyte control between intertidal (*Bunodosoma caissarum*) and subtidal (*Anemonia sargassensis*) sea anemones. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 158, n. 4, p. 542-551, 2011.
- AMADO, Enelise M. et al. Lead hampers gill cell volume regulation in marine crabs: stronger effect in a weak osmoregulator than in an osmoconformer. **Aquatic toxicology**, v. 106, p. 95-103, 2012.
- AMADO, Enelise M. et al. Different abilities to regulate tissue hydration upon osmotic challenge in vitro, in the cephalopods *Octopus vulgaris* and *O. insularis*. **Marine and freshwater behaviour and physiology**, v. 48, n. 3, p. 205-211, 2015.
- BRUSCA, R. C.; BRUSCA, G. J. **Invertebrados**. Segunda edição. 2007.
- CAPÓ-APONTE, José E.; ISEROVICH, P.; REINACH, P. S. Characterization of regulatory volume behavior by fluorescence quenching in human corneal epithelial cells. **The Journal of membrane biology**, v. 207, n. 1, p. 11-22, 2005.
- CHRISTO, Susete Wambier. **Biologia reprodutiva e ecologia de ostras do gênero *Crassostrea* Sacco, 1897 na baía de Guaratuba (Paraná-Brasil): um subsídio ao cultivo**. 2006. Tese de Doutorado.
- DAVID, Daniela Dantas et al. Capacity of tissue water regulation is impaired in an osmoconformer living in impacted estuaries?. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 166, p. 375-382, 2018.
- DA SILVA, Angela Zaccaron et al. Effects of salinity on biomarker responses in *Crassostrea rhizophorae* (Mollusca, Bivalvia) exposed to diesel oil. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 62, n. 3, p. 376-382, 2005.

DO AMARAL, Vanessa Simao; SIMONE, Luiz Ricardo L. Revision of genus *Crassostrea* (Bivalvia: Ostreidae) of Brazil. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, v. 94, n. 4, p. 811-836, 2014.

EVANS, David H. Teleost fish osmoregulation: what have we learned since August Krogh, Homer Smith, and Ancel Keys. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 295, n. 2, p. R704-R713, 2008.

EVANS, David H. **Osmotic and ionic regulation: cells and animals**. CRC Press, 2008.

FREIRE, Carolina A. et al. Oxidative stress in estuarine and intertidal environments (temperate and tropical). **Oxidative stress in aquatic ecosystems**, p. 41-57, 2011.

FURRIER, Max; DOS SANTOS SOUZA, Alexandre; DE LAVOUR, Larissa Fernandes. Environmental analysis and legal bases for coastal area evaluation: the Seixas Beach sample–PB. **Journal of Urban and Environmental Engineering**, v. 11, n. 2, p. 226-239, 2017.

GALVÃO, Maireia Santos Nunes et al. Aspectos reprodutivos da ostra *Crassostrea brasiliensis* de manguezais do estuário de Cananéia, SP (25 S; 48 W). **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 26, n. 2, p. 147-162, 2000.

GALVÃO, P. M. A. et al. Metals bioaccumulation in bivalve mollusks: evolutive and ecological aspects to be concerned in marine biomonitoring. **Brazilian Journal of Aquatic Science & Technology**, v. 13, n. 2, p. 59-66, 2009.

HAMANN, Steffen et al. Measurement of cell volume changes by fluorescence self-quenching. **Journal of fluorescence**, v. 12, n. 2, p. 139-145, 2002.

HÄUSSINGER, Dieter. The role of cellular hydration in the regulation of cell function. **Biochemical Journal**, v. 313, n. Pt 3, p. 697, 1996.

HOFFMANN, Else K.; DUNHAM, Philip B. Membrane mechanisms and intracellular signalling in cell volume regulation. In: **International review of cytology**. Academic Press, 1995. p. 173-262.

LARSEN, Erik Hviid et al. Osmoregulation and excretion. **Comprehensive physiology**, v. 4, n. 2, p. 405-573, 2011.

MANSO, Cynthia Lara de Castro et al. **Echinodermata da Praia do Cabo Branco, João Pessoa, Paraíba, Brasil**. 2008.

MOLLUSCABASE (2019). MolluscaBase. *Crassostrea* Sacco, 1897. **Registro Mundial de Espécies Marinhas**. Disponível em: <http://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=138297>. Acesso em: 07 dez. 2019

MOREIRA, Anthony et al. Salinity influences the biochemical response of *Crassostrea angulata* to Arsenic. **Environmental pollution**, v. 214, p. 756-766, 2016.

NACEUR, Chiraz Ben et al. Oyster's cells regulatory volume decrease: A new tool for evaluating the toxicity of low concentration hydrocarbons in marine waters. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 133, p. 327-333, 2016.

RIVERA-INGRAHAM, Georgina A.; LIGNOT, Jehan-Hervé. Osmoregulation, bioenergetics and oxidative stress in coastal marine invertebrates: raising the questions for future research. **Journal of Experimental Biology**, v. 220, n. 10, p. 1749-1760, 2017.

REIS, Christianne Maria Moura. **O litoral de João Pessoa (PB), frente ao problema da erosão costeira**. 2008. Tese (Doutorado). Programa de Pós-Graduação em Geociências, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2008.

STRANGE, Kevin. Cellular volume homeostasis. **Advances in physiology education**, v. 28, n. 4, p. 155-159, 2004.

TORRE, A.; TRISCHITTA, F.; FAGGIO, C. Effect of CdCl<sub>2</sub> on regulatory volume decrease (RVD) in *Mytilus galloprovincialis* digestive cells. **Toxicology in Vitro**, v. 27, n. 4, p. 1260-1266, 2013.

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar a Deus por me fortalecer nas minhas fraquezas e por me dar coragem de seguir os meus sonhos.

À minha mãe, que me criou sozinha com muito sacrifício, que fez de um tudo para garantir que eu tivesse uma boa educação e me incentivou a escolher uma profissão por amor. Não sei se um dia poderei recompensar tudo que fez por mim. Obrigada por todas as suas orações, por não permitir que eu desistisse e por sempre acreditar que eu era maior do que meus medos. Você é incrível, minha eterna inspiração. Amo você, mainha.

Agradeço a Rennier, meu pai de coração, por toda ajuda durante minha caminhada até aqui, por todo incentivo, carinho e amor. Amo você.

À tio Paulinho e tia Marta, tia Auxiliadora, tia Socorro, tio Anselmo e tia Nenê, por serem minha fortaleza.

À “Abelhinha”, Dolfô, Lara e Sara, por todas as risadas, palhaçadas e amor ao logo dos anos.

Um obrigado mais do que especial a Dani e Iasmim, as melhores amigas de infância que eu poderia desejar e as irmãs que meu coração escolheu. Vocês são incríveis, mesmo longe ajudaram a me acalmar, me apoiaram nos meus momentos mais difíceis e comemoram comigo todas as minhas vitórias. Amo demais vocês.

À Enelise, minha orientadora, toda minha gratidão. Agradeço pela oportunidade de adquirir experiência no LEFA, por toda sua paciência e compreensão, e por me acalmar. A senhora é incrível.

Aos meus colegas de LEFA: Sarah, Tony e Bruna, pelos ensinamentos e vivências.

A Kamila e Amanda, por serem as melhores companheiras de laboratório. As nossas coletas foram épicas kkk, desde os tênis cheios de lama até os bronzeados no sol de meio dia. Vocês me deram forças todos os dias a prosseguir e acreditar que um dia vamos realizar todos os nossos sonhos. À Hianka e Misael, por completarem essa panelinha estranha, mas que nos divertiu, rendeu boas histórias. Agradeço por escutarem meus lamentos e bobagens, e comprarem meus brigadeiros - olha o BRIGADEIRO, é só cinquenta centavooooos!!! Vocês me trouxeram até aqui. Vocês são o melhor 3 por 10 que eu ganhei nesses anos.

À Ariel Mazzaropi, por ser o melhor e mais louco cachorro que alguém poderia ter.

Agradeço imensamente a UEPB, todos os professores e funcionários, por proporcionarem uma educação de qualidade apesar de todos os problemas financeiros e estruturais.