



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
CAMPUS V
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E SOCIAIS APLICADAS
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

ALICE MARIA CABRAL DE SOUSA NÓBREGA

**CAPACIDADE DE REGULAÇÃO DE VOLUME CELULAR DE OSTRAS
(*Crassostrea rhizophorae*) DE DOIS AMBIENTES ESTUARINOS DA PARAÍBA**

**JOÃO PESSOA
2018**

ALICE MARIA CABRAL DE SOUSA NÓBREGA

CAPACIDADE DE REGULAÇÃO DE VOLUME CELULAR DE OSTRAS (*Crassostrea rhizophorae*) DE DOIS AMBIENTES ESTUARINOS DA PARAÍBA

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao 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. Dra. Enelise Marcelle Amado

**JOÃO PESSOA
2018**

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.

N754c Nobrega, Alice Maria Cabral de Sousa.
Capacidade de regulação de volume celular de ostras (*Crassostrea rhizophorae*) de dois ambientes estuarinos da Paraíba [manuscrito] / Alice Maria Cabral de Sousa Nobrega. - 2018.
25 p. : il. colorido.
Digitado.
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e Sociais Aplicadas, 2018.
"Orientação : Profa. Dra. Enelise Marcelle Amado, Coordenação do Curso de Ciências Biológicas - CCBSA."
1. Teor de hidratação tecidual. 2. Estuário Mamanguape.
3. Estuário Paraíba. I. Título

21. ed. CDD 639.41

ALICE MARIA CABRAL DE SOUSA NÓBREGA

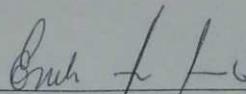
CAPACIDADE DE REGULAÇÃO DE VOLUME CELULAR DE OSTRAS (*Crassostrea rhizophorae*) DE DOIS AMBIENTES ESTUARINOS DA PARAÍBA

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao 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.

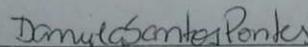
Área de concentração: Fisiologia Animal Comparada

Aprovada em: 26/06/2018.

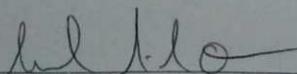
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dra. Enlişe Marcelle Amado (Orientador)
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)



Prof. Dra. Daniela Santos Pontes
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)



Prof. Dr. Cleber Ibraim Salimon
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)

A mim, por todo o estresse e noites mal dormidas,
DEDICO.

AGRADECIMENTOS

A gratidão é um dos mais belos sentimentos. E ter um espaço para agradecer em meio a um dos documentos de grande importância na vida de um acadêmico traz toda uma leveza a algo que atormenta tanto nossa vida.

Aos meus pais, o maior dos agradecimentos. Por todo o incentivo que me foi dado não apenas durante a faculdade, mas em toda a minha vida. Em especial a minha mãe, por nunca ter me deixado desistir durante esses longos quatro anos. Por todo carinho e compreensão das minhas madrugadas não dormidas.

Ao meu irmão, Germano, por todos os momentos de distração, aliviando um pouco do estresse acumulado (e põe estresse nisso, né? Haha) e por ter sido capaz de me aturar todo esse tempo.

À melhor cunhada de todas, Vitoria, que esteve ao meu lado em muitos momentos de desespero e choro. Por ter me ouvido com tanta paciência e carinho.

À vovó Bia, tia Rachel, tia Bela, “Elisão” e Antonia, por todo o amor, carinho e incentivo. Todos os abraços e sorrisos.

À Eltonn, por na reta final ter tido toda a paciência do mundo de aguentar minhas crises de ansiedade e ser capaz de me acalmar.

À minha belíssima e incrível orientadora Enelise Amado, por não ter desistido de mim, mesmo quando mereci haha.

À Tony, Kami, Helena e Sarah, por todas as resenhas no laboratório e coletas, deixando tudo sempre mais leve e menos cansativo.

Aos melhores e maravilhosos amigos de turma, Anderson, Samara, Glacy e, especialmente, à Jicaury, por simplesmente terem me feito rir infinitas vezes, apesar de todos os nossos estresses com as aulas.

Sem vocês eu não teria concluído essa etapa enfadonha da minha vida. Vocês são parte importante dessa jornada. E por isso, serei eternamente grata!

“O homem é o único animal que sente prazer em viver no meio de tanta poluição e degradação do meio em que habita.”

Leandro Prajo

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	07
2	MATERIAL E MÉTODOS	09
2.1	ÁREAS DE ESTUDO	09
2.2	COLETA E MANUSEIO DOS EXEMPLARES	11
2.3	TEOR DE HIDRATAÇÃO TECIDUAL	12
2.4	PREPARO DAS SOLUÇÕES	14
2.5	REGULAÇÃO DE VOLUME CELULAR	14
2.6	ANÁLISES ESTASTÍSTICAS	15
3	RESULTADOS	15
3.1	TEOR DE HIDRATAÇÃO TECIDUAL	15
3.2	REGULAÇÃO DE VOLUME CELULAR	18
4	DISCUSSÃO	20
5	CONCLUSÃO	22
	ABSTRACT	22
	REFERÊNCIAS	23

CAPACIDADE DE REGULAÇÃO DE VOLUME CELULAR DE OSTRAS (*Crassostrea rhizophorae*) DE DOIS AMBIENTES ESTUARINOS DA PARAÍBA

Alice Maria Cabral de Sousa Nóbrega*

RESUMO

As ostras do mangue, *Crassostrea rhizophorae*, são moluscos bivalves, eurialinos e osmoconformadores, muito utilizadas no biomonitoramento ambiental, por serem capazes de adsorver e bioacumular contaminantes químicos. O contato com poluentes causa alterações nos processos fisiológicos necessários para a manutenção do organismo. Devido às flutuações de salinidade que ocorrem no estuário, os organismos precisam de adaptações para que seja possível sua permanência no ecossistema, e uma delas é a regulação de volume celular, que permite que a célula volte ao seu volume inicial após sofrer com um choque osmótico. Com o objetivo de verificar a capacidade de regulação de volume celular de ostras do mangue de dois estuários do litoral da Paraíba com diferentes níveis de impactos antrópicos, foi testado se a capacidade de regulação de volume desses animais foi comprometida pelos impactos existentes no ambiente. As ostras foram coletadas nos estuários do Rio Paraíba (impactado) e do Rio Mamanguape (considerado preservado), para realização de experimentos *in vivo* (Teor Hídrico), para analisar o teor de hidratação tecidual da brânquia e músculo, e *in vitro* (Regulação de volume celular), onde foi utilizada uma técnica de fluorescência para medir a capacidade regulatória do volume celular da brânquia. Foi encontrado um maior Teor Hídrico nas brânquias que nos músculos dos animais. Isso se dá devido à localização e funções do tecido branquial, já que a brânquia está em contato direto com o ambiente e realiza diversas funções fisiológicas, como osmorregulação, por exemplo. A partir desses experimentos foi observado que as ostras do estuário do Rio Paraíba estão tendo a sua capacidade de regulação celular afetada pela poluição, principalmente para os choques hiperosmóticos. Já as ostras do estuário do Rio Mamanguape permanecem apresentando uma boa capacidade regulatória.

Palavras-Chave: Teor de Hidratação Tecidual. Estuário Mamanguape. Estuário Paraíba.

1 INTRODUÇÃO

Os estuários são frequentemente descritos como corpos d'água semifechados, apresentando conexão com o mar, onde ocorre a mistura da água doce, proveniente do rio, com a água salina. Devido a essa conexão, apresentam variações de salinidade de acordo com o regime de marés e vazão do rio. Além da flutuação de salinidade, outros fatores físicos como O₂, temperatura e turbidez podem variar (Elliott & McLusky, 2002; Deaton, 1992). Por ser um ambiente que está em constante variação, os organismos residentes como, por exemplo, os invertebrados eurialinos (crustáceos e moluscos), apresentam adaptações

* Aluno de Graduação em Ciências Biológicas na Universidade Estadual da Paraíba – Campus V.
Email: alicesousacabral@gmail.com.br

fisiológicas que torna possível a permanência deles nesse ecossistema (Wilmer et al., 2004; Lopes, 2008; Fernandes, 2010). Os moluscos, bem como a maioria dos invertebrados marinhos, são osmoconformadores, ou seja, esses organismos possuem o meio extracelular isosmótico em relação ao ambiente, evitando o gasto energético para manterem-se diferentes do ambiente em que se encontram (Veiga, 2013).

Por serem isosmóticos, a concentração osmótica dos seus fluidos corpóreos varia em função de variações do ambiente, o que expõe as células a choques osmóticos. Dessa forma, uma adaptação fisiológica importante é a capacidade de manutenção do seu volume celular, processo fundamental para a sobrevivência das células desses organismos. A regulação de volume celular nada mais é que a capacidade das células voltarem ao seu tamanho normal após um choque osmótico. Quando o meio extracelular está hiperosmótico em relação ao meio intracelular, há uma redução do volume interno de água das células animais, fazendo com que as mesmas murchem, ao passo que se o meio extracelular estiver hiposmótico em relação ao meio intracelular, há uma tendência de aumento de volume interno de água nas células, promovendo o seu inchaço. Para que a célula retorne ao volume inicial, anterior ao choque osmótico, há a mobilização de solutos inorgânicos (íons) ou solutos orgânicos (aminoácidos, principalmente), permitindo, assim, que a célula mantenha o volume adequado para a sua sobrevivência. Para aumentar o volume após o choque hiperosmótico, a célula realiza RVI (Regulatory Volume Increase – Aumento Regulatório de Volume), enquanto que para reduzir o volume após o choque hiposmótico é realizado RVD (Regulatory Volume Decrease – Redução Regulatória de Volume). A ativação de sistemas de transporte de íons localizados na membrana celular, como liberação ou acúmulo de osmólitos, é um dos mecanismos responsáveis pelo RVD e RVI (Strange, 2004; Wilmer, 2004; Foster, 2010; Haussinger, 1996).

Popularmente conhecidas como ostras do mangue, a espécie *Crassostrea rhizophorae* (Guilding, 1828) é pertencente à família Ostreidae. É uma espécie encontrada em clima temperado e tropical, nativa da América do Sul, apresentando distribuição ao longo da costa brasileira, principalmente nos estados nordestinos. Classificada como um molusco eurialino e osmoconformador, possui grande resistência a diferentes salinidades, fazendo com que esse organismo seja encontrado não apenas nas raízes de *Rhizophora mangle* (mangue vermelho), como também no fundo dos estuários e fixadas a substratos que fiquem submersos na maré alta (Castello, 2010; Zanetti, 2010).

A *C. rhizophorae*, assim como outros moluscos bivalves, é muito utilizada na realização de biomonitoramento ambiental. Por serem filtradores, as ostras do mangue são

capazes de adsorver e bioacumular contaminantes químicos encontrados em seu habitat. Outras características tornam esses organismos interessantes para avaliar a saúde de um ambiente, como o fato de ser sésil, o que lhes impede de escapar da poluição se deslocando para outras áreas; possuem tempo de vida relativamente longo, permitindo estudos de longo prazo; apresenta ampla distribuição geográfica, o que permite e facilita a comparação de dados obtidos em diferentes regiões; aparecem frequentemente em alta densidade e são de fácil coleta; entre outras (Mamede, 2012; Galvão, 2009).

O tecido branquial é um órgão multifuncional, pois o mesmo atua nas trocas gasosas, no transporte de osmólitos e osmorregulação, na excreção de nitrogênio e regulação do equilíbrio ácido-base. Devido a sua função e localização, as células branquiais ficam expostas às alterações do ambiente aquático, como variações de salinidade e presença de poluentes. A exposição às alterações de salinidade é algo que essas células lidam normalmente, por ser um processo natural dos estuários, porém, com o crescimento da população humana nos ambientes estuarinos e aumento das ações antrópicas, as células ficam também expostas a uma grande variedade de contaminantes presentes no meio aquático (Péqueux, 1995; Amado, 2010). Esse contato com poluentes pode causar alterações na fisiologia dos organismos aquáticos, podendo prejudicar a realização de processos necessários para o funcionamento ótimo dos processos fisiológicos necessários para a manutenção do organismo (Galvão et al., 2009). Há estudos já realizados que demonstram que poluentes como metais pesados, afetam a fisiologia de invertebrados marinhos, incluindo a capacidade de regulação hídrica (Amado, 2010; Castello, 2010; Mamede, 2012).

O objetivo do presente trabalho foi verificar, experimentalmente, a capacidade de regulação de volume celular de ostras *C. rhizophorae* coletadas em dois estuários do litoral da Paraíba com diferentes níveis de impactos antrópicos. Devido ao grau de eurialinidade (condição de sobrevivência de animais a uma ampla faixa de salinidade) das ostras de mangue, que garante a elas uma boa capacidade de regulação de volume celular (Pierce, 1982; Smith & Pierce; Klöh, 2011; Veiga, 2013), espera-se que as mesmas consigam retornar ao volume inicial após sofrerem choques osmóticos. Foi testado se a capacidade de regulação de volume celular das ostras de mangue é afetada pelos impactos antrópicos existentes no ambiente.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Áreas de estudo

Localizado há cerca de 80 km da capital João Pessoa, no Estado da Paraíba, o Estuário do Rio Mamanguape (Figura 1) abrange os municípios de Marcação e Rio Tinto e está inserido numa Área de Proteção Ambiental (APA do Rio Mamanguape). Está entre as coordenadas 06°43'02'' e 06°51'01'' Sul, e 35°07'46'' e 34°54'46'' Oeste e possui cerca de 25 km de extensão e 2,5 km de largura, e uma área de 14.460 hectares. Representando a maior área de mangue do Estado da Paraíba, a porção estuarina da APA abrange aproximadamente 6000 ha de mangue (Alves et al., 2005).

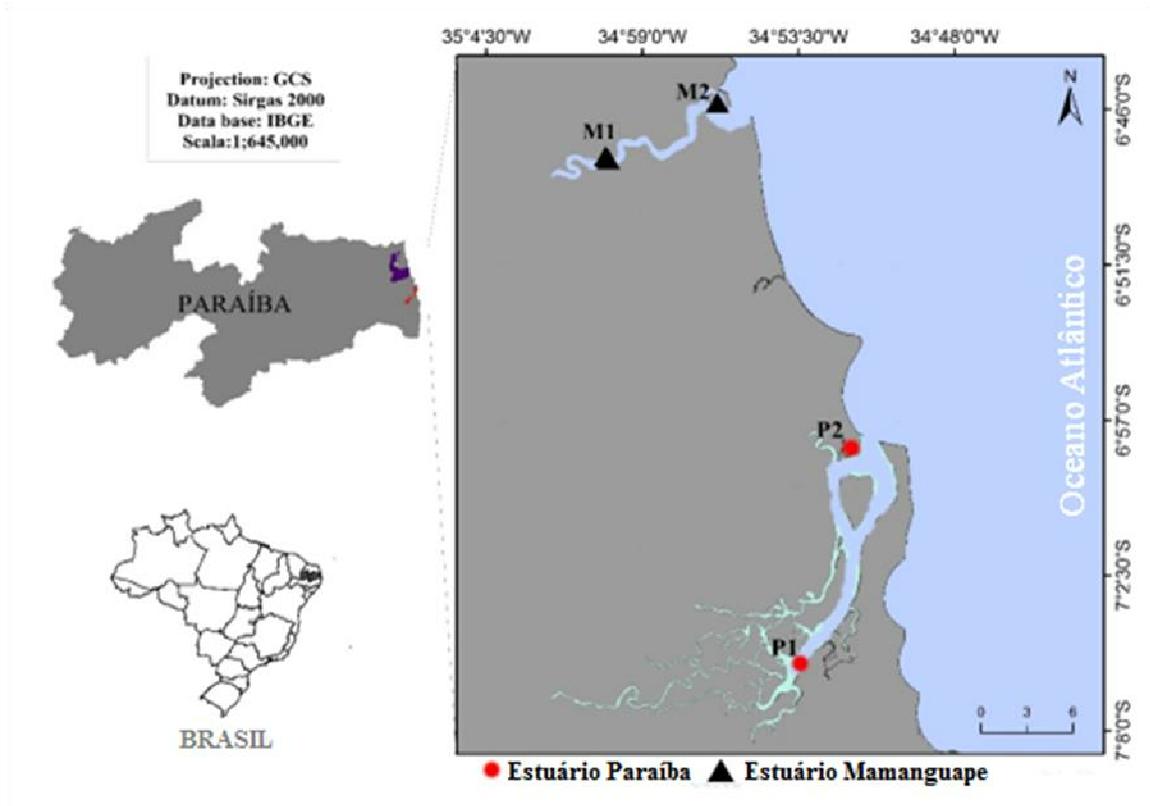
A região do Estuário do Rio Mamanguape possui uma alta diversidade em peixes, crustáceos e moluscos. Possui duas áreas protegidas, a APA do Rio Mamanguape e a Reserva Indígena Potiguar, porém apesar de se encontrar dentro de áreas protegidas, o estuário sofre com ações antrópicas derivadas principalmente do cultivo da cana de açúcar, a exemplo temos o despejo de vinhoto, a erosão dos tabuleiros e encostas devido ao plantio da cana de açúcar, poluição por agrotóxicos – entre os mais utilizados estão Metrimex, Divron e Atrazina (Silva, 2010) –, entre outros (Diegues & Rosman, 1998). Segundo Cunha (1992), conforme citado por Nishida (2004), o manguezal desse estuário se caracteriza como um dos mais preservados do estado da Paraíba, apesar das influências antrópicas.

O estuário do Rio Paraíba do Norte está inserido nas cidades de João Pessoa, Baeyux, Santa Rita e Lucena, no Estado da Paraíba, entre as coordenadas 34°47'07'' e 34°55'37'' Sul, e 06°56'58'' e 07°08'18'' Oeste. Estende-se por aproximadamente 22 km desde sua foz, no porto de Cabedelo, até a ponte sobre o Rio Sanhauá na cidade de Baeyux (Nishida et al., 2004).

O mangue do estuário do Rio Paraíba (Figura 1) está inserido em uma região metropolitana, estando bastante descaracterizado e recebendo efluentes das indústrias e residências. Os leitos dos rios que compõem o estuário sofrem com um intenso processo de assoreamento, provocado pela retirada das matas ciliares para a plantação de cana-de-açúcar ou pastagens. Esse processo traz prejuízos para a biota desse ecossistema e também para os que dele dependem para sobreviver (Silva, 2011).

Em ambos os estuários foram selecionados dois pontos para a realização das coletas dos espécimes, sendo o ponto 1 (à montante) de menor salinidade e o ponto 2 (à jusante) de maior salinidade. O ponto 1 do estuário do Rio Paraíba fica próximo à indústrias e residências na cidade de Bayeux, e o ponto 2 próximo ao Porto de Cabedelo (PB).

Figura 1: Mapa da localização das áreas de estudo e os pontos de coleta, Estuário do Rio Mamanguape (M1 e M2) e Estuário do Rio Paraíba (P1 e P2). Fonte: Produzido pelo Laboratório LEFA.



2.2 Coleta e Manuseio dos exemplares

Os pontos amostrados foram alcançados através de um barco. As ostras foram coletadas em raízes de plantas de mangue, retiradas com a ajuda de um facão por pescadores locais. Os espécimes foram retirados e inseridos dentro de um recipiente plástico contendo água do local, e esta mesma água coletada para realizar a manutenção dos animais. Fatores abióticos como salinidade, pH e temperatura (tabela 1) foram mensurados por uma sonda (HANNA-HI9829). Os indivíduos coletados foram transportados de carro para o Laboratório de Ecofisiologia Animal (LEFA) do Campus V da Universidade Estadual da Paraíba.

Ao chegar ao LEFA, os espécimes receberam aeração constante, realizada por aeradores de aquário (CX – 1000 AQUARIUM AIR PUMP) e a medição da salinidade foi feita com o auxílio de um refratômetro (RTS-101ATC). As ostras permanecem nos aquários por no mínimo 24 horas, tempo necessário e importante para a aclimação às condições do laboratório. Os experimentos foram conduzidos a fim de observar a variação de volume das células durante a exposição a um estresse osmótico.

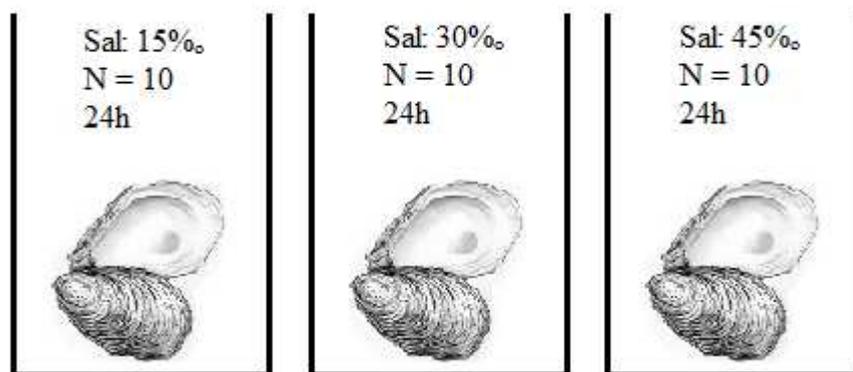
Tabela 1: Fatores abióticos medidos na água dos locais de coleta. Os dados são apresentados como a média dos valores medidos em todas as coletas independentes realizadas.

	Estuário Paraíba		Estuário Mamanguape	
	P1	P2	M1	M2
Salinidade (ppm)	14.9 ± 1.1	28.4 ± 1.6	17.9 ± 2	31.3 ± 0.5
pH	7.7 ± 0.2	7.9 ± 0.2	7.9 ± 0.1	8.6 ± 0.1
Temperatura (°C)	28,7 ± 1.1	28.3 ± 0.3	28 ± 0.2	28.2 ± 0.3

2.3 Teor de hidratação tecidual

Para a análise da capacidade de manutenção do teor hídrico (TH) as ostras foram submetidas a um experimento de variação de salinidade. Para tanto, foram preparadas 3 águas diferentes, utilizando sal marinho para aquarismo e água destilada. A primeira com salinidade 15‰, a segunda com salinidade 30‰ e a terceira com salinidade 45‰. 30 ostras coletadas em cada ponto de cada estuário foram distribuídas igualmente entre os aquários de diferentes salinidades. Após 24h de exposição às diferentes salinidades, as ostras foram retiradas da água para a realização da amostragem (Figura 2).

Figura 2: Esquema representativo do experimento de teor de hidratação tecidual.



As ostras referência foram amostradas ao chegar ao laboratório, sem passar por experimento, servindo como indicador de como estava o teor de hidratação dos animais nos diferentes pontos de coleta. As salinidades consideradas referência foram variadas de acordo com o ponto de coleta, já que foi utilizada a salinidade do ambiente no momento da coleta, em ambos os estuários.

O tecido branquial e muscular foram amostrados e colocados em tubos de eppendorf identificados e pesados previamente. Os tubos contendo o tecido foram pesados em balança analítica de precisão (SHIMADZU AUY 220) para obtenção de peso úmido (PU), posteriormente levados a uma estufa a 60°C durante 24h. Após esse período na estufa, os tubos foram retirados e novamente pesados para a obtenção do peso seco (PS).

Após ser descontado o peso do eppendorf do PU e PS, o teor hídrico foi calculado utilizando a seguinte fórmula:

$$TH (\%) = \frac{(PU - PS)}{PU} \times 100$$

2.4 Preparo das soluções

Para a realização dos experimentos, foram preparadas soluções salinas com diferentes osmolaridades. As soluções foram adaptadas de Veiga (2013), contendo a mesma composição, porém com concentrações osmóticas diferentes e pH 8,2 (Tabela 2). Uma das salinas é considerada isosmótica à hemolinfa de bivalves marinhos, uma considerada hiposmótica e a última considerada hiperosmótica.

Tabela 2: Composição osmótica das salinas utilizadas para o experimento de Regulação de Volume Celular.

	Solução Isosmótica (mM)	Solução Hiposmótica (mM)	Solução Hiperosmótica (mM)
NaCl	470	235	705
KCl	10	5	15
MgSO4	54	27	81
CaCl2	10	5	15
Glicose	5	5	5
Hepes (Sal de sódio)	5	5	5
NaHCO3	2	2	2

2.5 Regulação de volume celular

Para detectar alterações de volume celular foi empregada a técnica de fluorescência chamada “Fluorescence Self-quenching”. A técnica consiste em utilizar da propriedade física de certos fluoróforos (em altas concentrações, a intensidade da fluorescência diminui – auto-extinção) para medir alterações do volume de água nas células numa relação diretamente proporcional, ou seja, quanto menos água, maior a concentração de fluoróforo e, conseqüentemente, menor a intensidade da fluorescência. Assim, uma diminuição de fluorescência significa perda de água e redução do volume celular. E um aumento da fluorescência significa ganho de água e aumento do volume celular.

Para tanto de 1 a 3 ostras (dependendo do tamanho das mesmas), de cada ponto, foram abertas para a retirada da brânquia. O tecido retirado foi colocado em 10 ml de PBS (Tampão Fosfato Salino), e depois transferido para uma placa de Petri contendo 10 ml de PBS + EDTA (Ácido Etilonodiamino Tetra-acético – agente quelante) para a realização da dissociação celular mecânica. Após ser realizada a dissociação, o líquido contendo as células foi filtrado com o auxílio de uma malha de 40 μ M para excluir restos de tecido e garantir que apenas as células dissociadas permaneçam em solução. Logo após esse procedimento, o líquido foi transferido para um tubo falcon e centrifugado por 5 minutos a uma velocidade de 250 rcf (Força Centrífuga Relativa). Com o termino da centrifugação, o sobrenadante foi retirado e o precipitado ressuspendido em 1 ml de PBS.

Após a realização desse processo, a solução contendo células foi distribuída em uma placa opaca. 100 μ l do precipitado ressuspendido foi pipetado em cada poço, totalizando 9 poços. A placa foi então submetida à primeira leitura, de autofluorescência, utilizando a leitora SpectraMaxi3, (leitura fluorescência pontual, excitação de 485nm e emissão de 530nm), apenas para saber se as células estavam distribuídas equitativamente em cada um dos poços. Ao ser identificado a distribuição equitativa das células, a placa foi centrifugada (5 minutos a uma velocidade de 250 rcf). Em cada um dos poços o sobrenadante foi substituído pela solução de incubação (solução salina isosmótica acrescida de 10 μ M do fluoróforo Calceína-AM). As células foram incubadas durante 1 hora com a Calceína. Quando a calceína entra na célula, esterases celulares clivam o grupo AM (acetoximetil) e emite fluorescência. O tempo de incubação foi monitorado com leituras de fluorescência a cada 3 minutos para acompanhar o aumento da emissão de fluorescência o que indica a entrada na calceína nas células. Após esse período, uma nova centrifugação foi realizada e, a solução de incubação foi substituída pela solução salina isosmótica. Leituras de fluorescência emitida foram realizadas

a cada 30 segundos por 5 minutos. Essa etapa era importante para acompanhar a estabilidade da fluorescência na ausência de desafios osmóticos.

As células foram então submetidas às condições experimentais. A placa foi novamente centrifugada e em 3 poços as células foram expostas novamente à salina isosmótica (controle) em outros 3 poços as células foram expostas à salina hiposmótica e em outros 3 poços à salina hiperosmótica. As leituras de fluorescência foram realizadas a cada 30 segundos durante 10 minutos. Para análise das variações de volume celular, os valores absolutos de fluorescência foram transformados em valores relativos, onde 1 significa o volume inicial no tempo 0.

2.6 Análises Estatísticas

Os dados foram apresentados como média \pm erro padrão da média. Os testes realizados para o experimento de teor de hidratação tecidual foram o *one way ANOVA* seguido de *Holm-sidak method* para o caso de dados normais e *Kruskal-Wallis one way ANOVA on ranks* seguido de *Tukey test* para o caso de dados não normais. Para o experimento de regulação de volume celular os dados foram tratados estatisticamente em cada tempo experimental através de *one way ANOVA* seguido de *Holm-sidak method*.

3 RESULTADOS

3.1 Teor de hidratação tecidual

A salinidade referência utilizada para a realização dos experimentos de teor hídrico foi variável, pois foi usada a salinidade do local onde as ostras foram coletadas. Sendo assim, para o estuário do Rio Paraíba as salinidades referência utilizadas foram 10‰ para o ponto 1 e 30‰ para o ponto 2. No estuário do Rio Mamanguape as salinidades referência utilizadas foram 15‰ e 29‰, para os pontos 1 e 2 respectivamente.

As ostras provenientes dos dois estuários foram submetidas a diferentes salinidades – 15%, 30% e 45% – para análise do teor de hidratação tecidual. Após a exposição dos indivíduos às salinidades citadas, a análise do TH revelou os seguintes resultados:

No ponto 1 do Estuário do Rio Paraíba (P1), no que diz respeito à brânquia, observou-se um maior volume de água tecidual na condição experimental 15‰, apresentando 90,92% de TH, seguido pelas condições de 30‰ (87,48%) e 45‰ (84,80%). Não há diferenças estatísticas entre as condições experimentais e a referência desse ponto, os choques de 30‰ e 45‰ não diferem entre si, mas apresentam diferenças do choque de 15‰. Já no que diz

respeito ao músculo, a condição experimental 15‰ apresentou o maior volume de água tecidual (84,60%), seguido pelas condições de 30‰ (79,39%) e 45‰ (79,16%). Entre o choque osmótico de 15‰ e a referência não há diferença estatística, porém, as condições 30‰ e 45‰ são estatisticamente diferentes da referência e do choque de 15‰.

No ponto 2, no que diz respeito à brânquia, as condições experimentais 15‰ e 30‰ apresentaram um TH de 89,59% e 88,49%, respectivamente. Já a condição experimental 45‰ apresentou um volume menor (86,43%). As condições de 15‰ e 30‰ diferem estatisticamente da referência desse ponto e não há diferenças em relação à condição de 45‰ – que não apresenta diferença estatística em relação à referência. No que diz respeito ao músculo, o maior volume de água tecidual foi apresentado pela condição experimental 15‰ (83,59%), seguido pela condição de 30‰ (79,57%) e 45‰ (76,91%). Estatisticamente, a condição de 15‰ não apresenta diferenças da referência, porém 30‰ e 45‰ diferem.

No ponto 1 do Estuário do Rio Mamanguape, no que diz respeito à brânquia, observou-se um maior volume de água tecidual na condição experimental 15‰, apresentando 91,52% de TH, diferente das condições 30‰ (87,33%) e 45‰ (86,06%). Estatisticamente, a condição experimental 15‰ difere da referência desse ponto, enquanto que as condições 30‰ e 45‰ não. No que diz respeito ao músculo, o maior volume de água tecidual foi apresentado pela condição de 15‰ (84,35%), seguido pela condição 30‰ (82,35‰) e 45‰ (79,72%). Nenhuma das condições experimentais difere da referência, porém a condição 15‰ difere da 45‰.

No ponto 2, no que diz respeito à brânquia, não há diferenças entre as condições experimentais 15‰ e 30‰ (88,11% e 88,47%, respectivamente), diferente da condição 45‰, que apresentou 80,63% de TH. A condição 30‰ não difere estatisticamente da referência e da condição de 15‰, enquanto que 15‰ e 45‰ diferem. No que se refere ao músculo, a condição 30‰ apresenta o maior volume de água tecidual (89,94%), seguido pela condição de 15‰ (83,07%) e 45‰ (73,70%). A referência e as condições de 15‰ e 30‰ são estatisticamente iguais, enquanto 45‰ é diferente de todos.

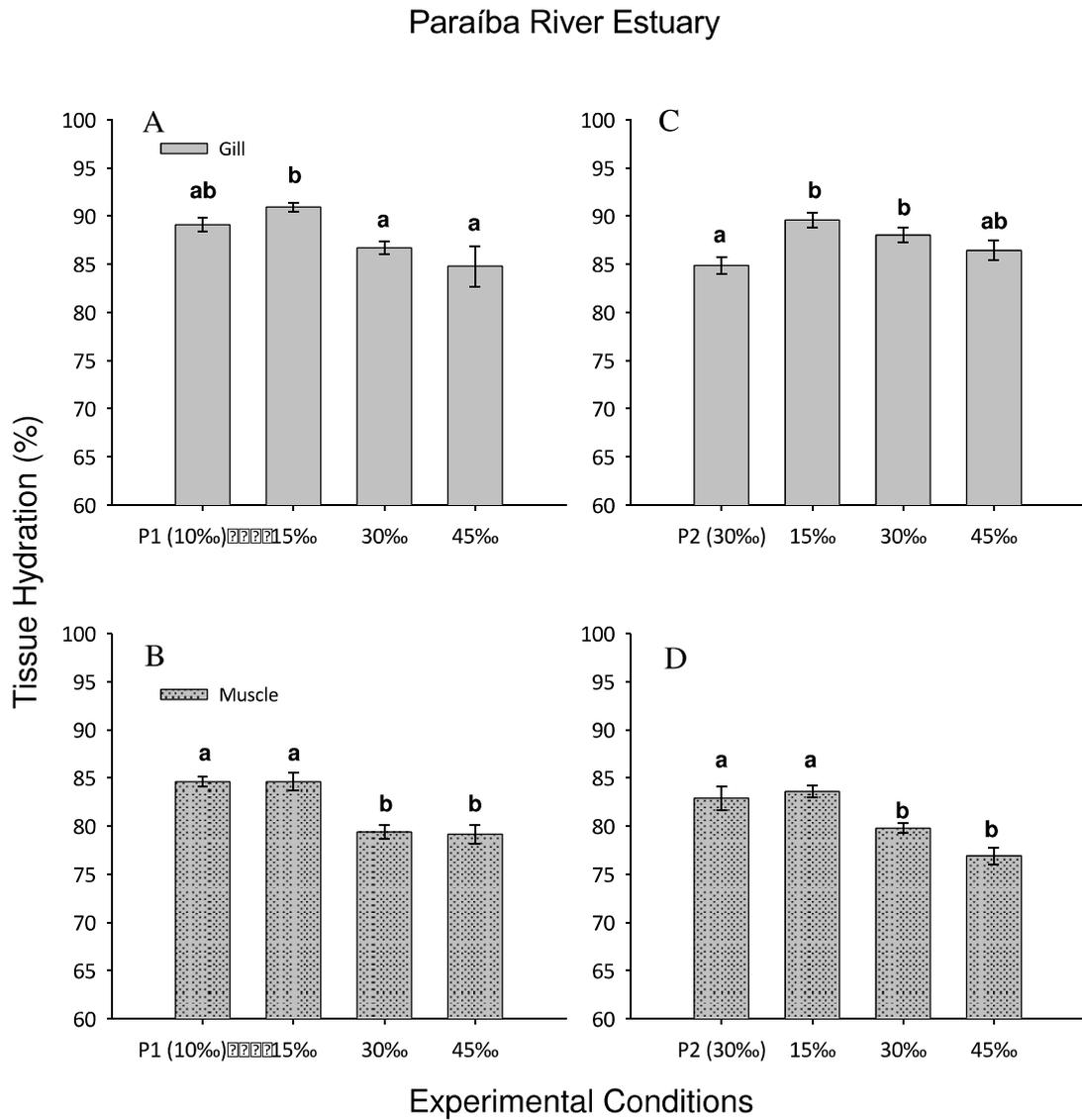


Gráfico 1: Gráficos referentes ao teor de hidratação das brânquias e músculo de *C. rhizophorae* após exposição às diferentes condições experimentais. P1 (A e B) e P2 (C e D) indicam os pontos de coleta. As condições referência estão indicadas entre parênteses, medidas no dia em que a coleta foi realizada. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre as condições experimentais (ANOVA, $p < 0,05$, $n = 10$).

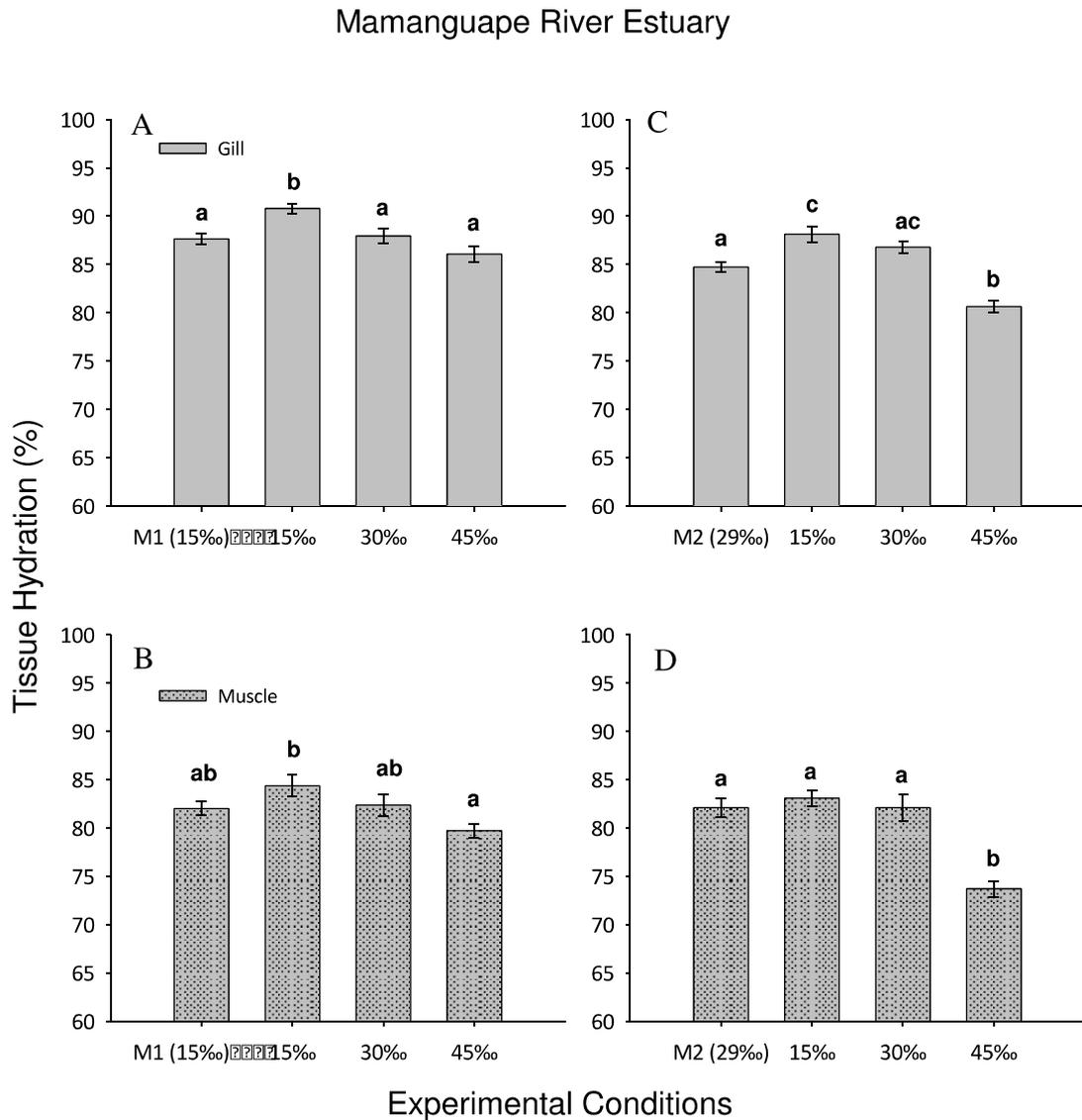


Gráfico 2: Gráficos referentes ao teor de hidratação das brânquias e músculo de *C. rhizophorae* após exposição às diferentes condições experimentais. M1 (A e B) e M2 (C e D) indicam os pontos de coleta. As condições referência estão indicadas entre parênteses, medidas no dia em que a coleta foi realizada. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre as condições experimentais (ANOVA, $p < 0,05$, $n = 10$).

3.2 Regulação de volume celular

O estuário do Rio Paraíba, em ambos os pontos, apresentou diferenças estatísticas entre o choque hiposmótico e os isosmótico e hiperosmótico, enquanto que os dois últimos são iguais. No ponto 1, a diferença é vista entre 2min30seg e 8min, enquanto que no ponto 2 a diferença é observada entre 4min e 7min. É durante esse período que é possível observar que a célula apresentou dificuldade em regular o seu volume celular, onde é visto um inchaço que é posteriormente corrigido.

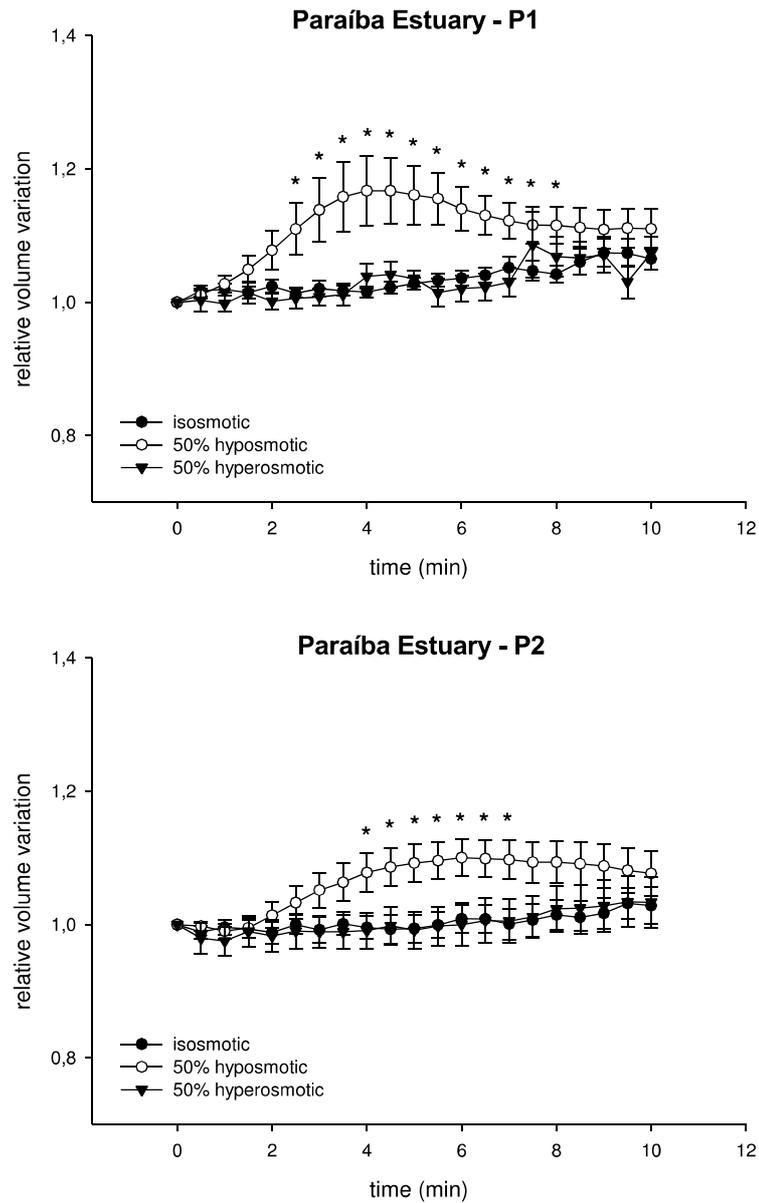


Gráfico 3: Gráficos referentes à regulação de volume celular de *C. rhizophorae* após exposição às diferentes condições experimentais. P1 e P2 indicam, respectivamente, os pontos 1 e 2. As diferenças estatísticas encontradas foram indicadas através de um asterisco (ANOVA, $p < 0,05$, $n = 12-18$).

No estuário do Rio Mamanguape, apenas três tempos apresentaram diferença estatística, 4min30seg, 5min e 7min, no ponto 1, houve diferença entre o choque hiposmótico e os choques iso e hiperosmótico. No ponto 2 não houve diferença entre as condições experimentais.

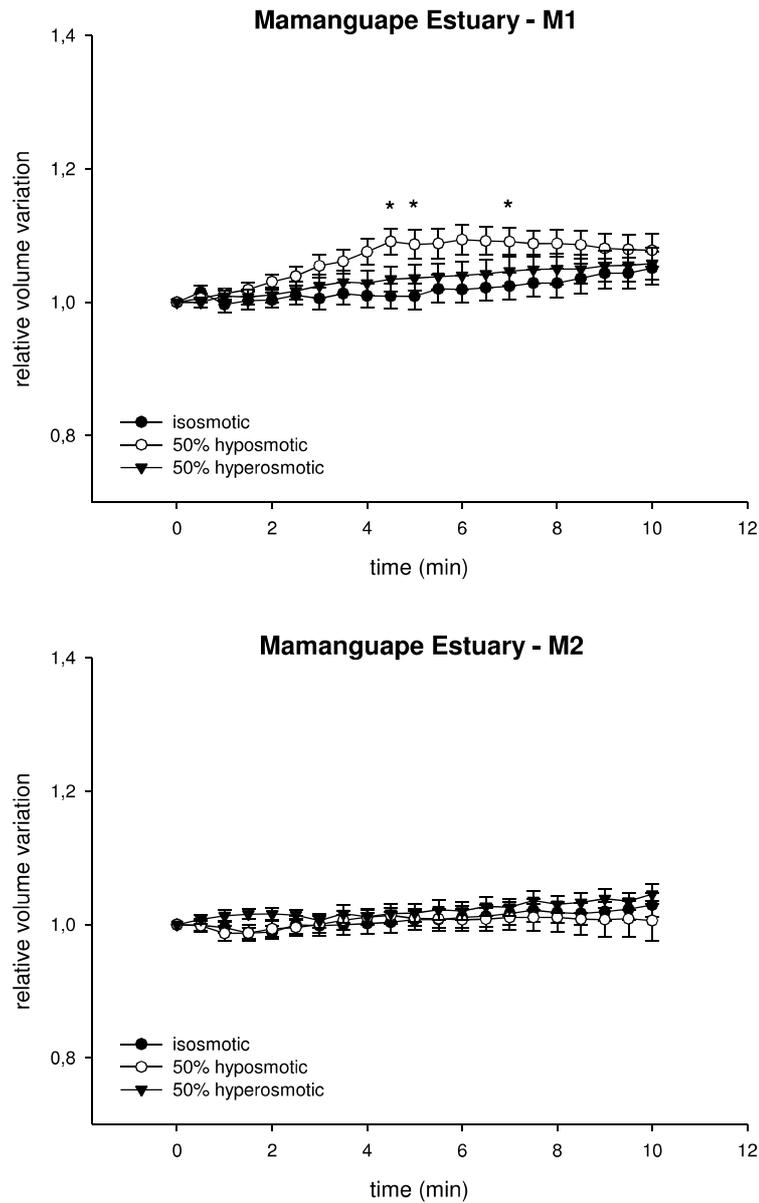


Gráfico 4: Gráficos referentes à regulação de volume celular de *C. rhizophorae* após exposição às diferentes condições experimentais. M1 e M2 indicam, respectivamente, os pontos 1 e 2. As diferenças estatísticas encontradas foram indicadas através de um asterisco (ANOVA, $p < 0,05$, $n = 10-20$).

4 DISCUSSÃO

As ostras são organismos eurialinos que osmoconformam quando expostos a uma variação de salinidade, sendo assim, devem ser bons reguladores de volume celular. O animal deve possuir a capacidade de manter a hidratação adequada das células teciduais sem provocar danos irreversíveis, como um inchaço que pode levar a lise celular ou muchar ao ponto de comprometer as funções celulares, por exemplo (Haussinger, 1996).

Os resultados obtidos a respeito do teor de hidratação tecidual mostraram que as brânquias apresentaram maiores volumes de água tecidual que os músculos, independente do choque osmótico sofrido pelas mesmas ou ponto de coleta. Este resultado já era esperado devido às funções desse tecido (respiração, alimentação, osmorregulação) e seu contato direto com o ambiente aquático (Galvão et al, 2009). Conforme citado por David (2015), o músculo apresenta menor teor de hidratação devido a uma maior concentração de proteínas nesse tecido.

As ostras do estuário do Rio Paraíba, no ponto 1, regularam o TH da brânquia para todas as condições experimentais, enquanto no ponto 2 apenas a condição 45 houve regulação do teor de hidratação. Já para o músculo, para os dois pontos, apenas a condição 15 apresentou regulação. No que diz respeito ao estuário do Rio Mamanguape, em relação à brânquia das ostras do ponto 1, houve regulação nas condições 30 e 45 e no ponto 2 não houve regulação em nenhuma das condições experimentais. No que se refere ao músculo, no ponto 1 houve regulação nas condições de 30 e 45 e no ponto 2 há regulação na condição 15 e não há regulação na condição experimental 45. Esses resultados mostram que as ostras do estuário do Rio Mamanguape apresentam melhor capacidade de regulação de volume. Quando observado os experimentos de regulação de volume celular, fica ainda mais claro a diferença entre as capacidades de regulação das ostras dos estuários do Rio Paraíba e do Rio Mamanguape, pois as ostras de ambos os pontos do estuário do Paraíba, no choque hiposmótico, apresentaram dificuldade na hora de realizar RVD. Resultados semelhantes foram encontrados por David (2015), onde as ostras encontradas no estuário do Paraíba apresentaram maior dificuldade em regular o teor de hidratação tecidual e o volume celular que as ostras do estuário do Mamanguape.

O presente trabalho não avaliou a presença de metais nos tecidos ou fez análise no ambiente, a literatura disponível mostra que esses poluentes podem afetar a ação de enzimas e transportadores que atuam nos mecanismos de regulação de volume celular inibindo-os. Devido ao processo de bioacumular, alguns trabalhos discorrem sobre a acumulação de metais pesados nos tecidos, o que poderia ocasionar a atuação desses poluentes durante o experimento, mesmo que os agentes químicos em questão não estivessem presentes na água utilizada no experimento (Galvão et al, 2009; Amado et al, 2012; Morabito et al, 2013). Com isso, é possível deduzir que, caso haja a presença de metais no estuário do Paraíba, esses poluentes estejam afetando as ostras desse ambiente e reduzindo a eficiência desses organismos na manutenção do volume celular.

Um estudo realizado por Veiga (2013) analisou o teor hídrico do músculo de mexilhões *Perna perna* e de ostras *Crassostrea gigas*, sem interferência de poluentes, que mostrou que o tecido muscular desses bivalves apresentaram uma boa regulação de água tecidual, o que nos leva a inferir que a melhor regulação apresentada pelas ostras do estuário do Mamanguape é um indicativo de que um ambiente menos impactado favorece a capacidade de um organismo de manter a sua capacidade regulatória. Ou seja, mesmo que as ostras da espécie *C. rhizophorae* seja organismos que suportam uma grande flutuação de salinidade e sejam capazes de regular o volume de água em suas células, a poluição decorrente das ações antrópicas próximas e/ou no ambiente, podem afetar a capacidade que esses organismos possuem de realizar a manutenção de seu volume celular.

5 Conclusão

De acordo com a literatura, o estuário do Paraíba encontra-se mais impactado quando comparado ao estuário do Mamanguape (considerado o mais preservado do estado). Com isso, é possível inferir que os impactos antrópicos existentes no estuário do Paraíba têm afetado a capacidade regulatória de volume celular das ostras do mangue, pois através dos experimentos, foi possível observar que as ostras desse ambiente estão apresentando dificuldades em realizar a regulação de volume celular, principalmente o que diz respeito ao RVD. Ao passo que as ostras do estuário do Mamanguape apresentam uma boa capacidade de regular o volume de suas células. Isso nos mostra que a *Crassostrea rhizophorae* pode ser utilizada para a realização de biomonitoramento, já que a mesma apresenta respostas fisiológicas em decorrência da presença de poluentes na água.

CAPACITY OF REGULATION OF CELLULAR VOLUME OF OYSTERS (*Crassostrea rhizophorae*) OF TWO ESTUARINIAN AMBIENTS OF PARAÍBA

ABSTRACT

Mangrove oysters, *Crassostrea rhizophorae*, are bivalve molluscs, eurialinos and osmoconformers, widely used in environmental biomonitoring, as they are able to adsorb and bioaccumulate chemical contaminants. Contact with pollutants causes changes in the physiological processes necessary for the maintenance of the organism. Due to fluctuations in salinity occurring in the estuary, organisms need adaptations to allow them to remain in the ecosystem, and one of them is the regulation of cell volume, which allows the cell to return to its initial volume after suffering from an osmotic shock . With the objective of verifying the

cellular volume regulation capacity of mangrove oysters of two estuaries of the coast of Paraíba with different levels of anthropic impacts, it was tested if the capacity of volume regulation of these animals was compromised by the existing impacts on the environment. Oysters were collected in the estuaries of the Rio Paraíba (impacted) and the Rio Mamanguape (considered preserved), to perform experiments in vivo (Water Content), to analyze the tissue hydration content of the gill and muscle, and in vitro volume), where a fluorescence technique was used to measure the regulatory capacity of the gill cell volume. A higher water content was found in the gills than in the muscles of the animals. This is due to the location and functions of the gill tissue, since the gill is in direct contact with the environment and performs several physiological functions, such as osmoregulation, for example. From these experiments it was observed that the oysters of the estuary of the Paraíba River are having their capacity of cellular regulation affected by the pollution, mainly for the hyperosmotic shocks. The oysters of the Mamanguape River estuary remain good regulatory capacity.

Keywords: Tissue Hydration Content. Mamanguape Estuary. Estuary Paraíba.

REFERÊNCIAS

ALVES, R. N. et al. Environmental perception of gatherers of the crab ‘caranguejo-uçá’ (*Ucidescordatus*, Decapoda, Brachyura) affecting their collection attitudes. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v. 1, p. 10, 2005.

AMADO, E. M. O efeito do chumbo sobre a fisiologia celular branquial de crustáceos. **Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular da Universidade Federal do Paraná**, Curitiba/PR, p. 156, 2010.

BIANCHI, T. S. Estuaries: Where the River Meets the Sea. **Nature Education Knowledge**, 2013.

CASTELLO, B. F. L. Avaliação dos teores de As, Cu, Cd, Ni e Zn em ostras, *Crassostrea rhizophorae* (Guilding, 1828), nas baías de Paranaguá e Guaratuba, Paraná. **Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Sistemas Costeiros e Oceânicos, Setor de Ciências da Terra da Universidade Federal do Paraná**, Pontal do Paraná/PR, p. 67, 2010.

DAVID, D. D. Tolerância de ostras *Crassostrea sp.* à variação de salinidade: uma análise comparativa entre indivíduos coletados em dois Estuários da Paraíba. **Monografia apresentada ao curso de graduação em Ciência Biológicas da Universidade Estadual da Paraíba**, João Pessoa/PB, p. 54, 2015.

DEATON, L. E. Osmoregulation and epithelial permeability in two euryhaline bivalve molluscs: *Mya arenaria* and *Geukensia Demissa*. **Journal Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 158, p. 167-177, 1992.

DIEGUES, A. C.; ROSMAN, P. C. C. Caracterização dos ativos ambientais em áreas selecionadas da zona costeira brasileira. **Ministério do Meio Ambiente / Programa Nacional do Meio Ambiente**, Brasil, p. 136, 1998.

ELLIOTT, M.; MCLUSKY, D. S. The Need for Definitions in Understanding Estuaries. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 55, p 815-827, 2002.

FERNANDES, A. F. Estresse osmótico: proteínas de estresse e balanço oxidativo em *Neohelice granulata* (Crustacea, Decapoda, Veronidae). **Tese de Doutorado submetida ao Curso de Pós Graduação em Ciências Biológicas – Fisiologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, Porto Alegre/RS, p. 175, 2010.

FOSTER, C. et al. Do osmoregulators have lower capacity of muscle water regulation than osmoconformers? A study on decapods crustaceans. **Journal Experimental Zoology**, v. 313A, p. 80-94, 2010.

FREIRE, C.A.; ONKEN, H.; MCNAMARA, J.C. A structure function analysis of íon transport in crustaceans gills and excretory organs. **Comp. Biochem. Physiol.** 151(A): 272–304, 2008a.

GALVÃO, P. M. A et al. Bioacumulação de metais em moluscos bivalves: Aspectos evolutivos e ecológicos a serem considerados para a biomonitoração de ambientes marinhos. **Brazilian Journal of Aquatic Science and Technology**, v. 13, n. 2, p. 56-66, 2009.

HAUSSINGER, D. The role of cellular hydration in the regulation of cell function. **Biochem.J.**, v. 313, p. 697-710, 1996.

KLÔH, A. D. S. Tolerância fisiológica do bivalve *Mytella charruana*, dos cirripédios *Amphibalanus reticulatus*, *Fistubolanus citerosum* e *Megabalanus coccopoma* e potencial invasor. **Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ecologia e Conservação, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná**, Curitiba/PR, 52 f., 2011.

LOPES, G. R. Crescimento da ostra-do-mangue *Crassostrea brasiliana* (LAMARCK, 1819) cultivada em dois ambientes no estado de Santa Catarina. **Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Aquicultura do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina**, Florianópolis/SC, 32 p., 2008.

MAMEDE, T. C. A. Biomonitoramento por *Crassostrea rhizophorae* (Guilding, 1928) e percepção de risco socioambiental na Baía de Todos os Santos, Bahia. **Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Geoquímica: Petróleo e Meio ambiente – POSPETRO, Instituto de Geociências, Universidade Federal da Bahia**, Salvador/BA, 120 p., 2012.

NISHIDA, A. K. et al. Abordagem etnoecológica da coleta de moluscos no litoral paraibano. **Trop Ocean**, v. 32, p 53-68, 2004.

PÉQUEUX, A. Osmotic regulation in crustaceans. **J. Crust. Biol.** 15:1–60, 1995.

PEZZATTI, R. R. Utilização da ostra *Crassostrea rhizophorae* como biomonitor na análise da contaminação por metais pesados do ambiente marinho sob influência dos portos de Santos e São Sebastião. **Trabalho de conclusão de curso com objetivo de aprovação no curso de graduação: Bacharelado Interdisciplinar em Ciências e Tecnologia do Mar**, Santos/SP, p. 48, 2014.

PIERCE, S. K. Invertebrate cell volume control mechanisms: A coordinated use of intracellular amino acids and inorganic ions as osmotic solute. **Biological Bulletin**, v. 163, p. 405-419, 1982.

SILVA, E. L. P. Da casa ao mangue: abordagem sócio-ecológica do processo de trabalho das marisqueiras do Estuário do Rio Paraíba/PB. **Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Serviço Social do Centro de Ciências Humanas, Letras e Artes da Universidade Federal da Paraíba**, João Pessoa/PB, p. 203, 2011.

SILVA, J. F. Degradação ambiental a partir da cultura da cana-de-açúcar, no município de Itapororoca – PB. **Monografia apresentada ao Curso de Geografia da Universidade Estadual da Paraíba – UEPB, Campus III**, Guarabira/PB, p. 58, 2010.

SMITH, JR L. H.; PIERCE, S. K. Cell volume regulation by molluscan erythrocytes during hypoosmotic stress: Ca^{2+} effects on ionic and organic osmolyte effluxes. **Biological Bulletin**, v. 173, p. 407-418, 1987.

STRANGE, K. Cellular volume homeostasis. **Rev. Adv. Physiol. Educ.** v. 28, p. 155-159, 2004.

VEIGA, M. P. T. Fisiologia osmorregulatória em Mollusca: *Perna perna*, *Crassostrea gigas* e *Stramonita brasiliensis*. **Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Zoologia, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná**, Curitiba/PR, 180 p., 2013.

WILMER, P. et al. *Environmental Physiology of Animals*, 2nd edition, Blackwell, Oxford, 2004.

ZANETTI, D. P. A *Crassostrea rhizophorae* (Guilding, 1828) é uma boa espécie indicadora da qualidade ambiental? Estudo de caso da Área de Proteção Ambiental do Rio Mamanguape – PB. **Dissertação apresentada ao Programa Regional de Pós-Graduação em Desenvolvimento e Meio Ambiente – PRODEMA, Universidade Federal da Paraíba, Universidade Estadual da Paraíba**, João Pessoa/PB, p. 51, 2010.