



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

**DANIELA DANTAS DAVID**

**TOLERÂNCIA DE OSTRAS *Crassostrea sp.* À VARIAÇÃO DE SALINIDADE:  
UMA ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE INDIVÍDUOS COLETADOS EM DOIS  
ESTUÁRIOS DA PARAÍBA.**

**JOÃO PESSOA**

**2015**

**DANIELA DANTAS DAVID**

**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 Ciências Biológicas do Campus V da Universidade Estadual da Paraíba, como requisito parcial à obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Área de concentração: Fisiologia Animal Comparada.

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

**JOÃO PESSOA  
2015**

É expressamente proibida 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 da dissertação.

D249t David, Daniela Dantas  
Tolerância de ostras *Crassostrea* sp. à variação de salinidade  
[manuscrito] : uma análise comparativa entre indivíduos coletados  
em dois estuários da Paraíba / Daniela Dantas David. - 2015.  
53 p. : il. color.

Digitado.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências  
Biológicas) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de  
Ciências Biológicas e Sociais Aplicadas, 2015.

"Orientação: Profa. Dra. Enelise Marcelle Amado,  
Departamento de Ciências Biológicas".

1. Regulação de volume celular. 2. Teor de hidratação  
tecidual. 3. Poluição. 4. Estuário Mamanguape. 5. Estuário  
Paraíba. I. Título. 21. ed. CDD 631.7

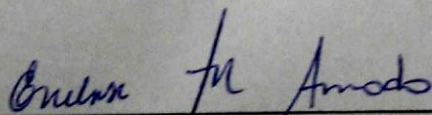
DANIELA DANTAS DAVID

TOLERÂNCIA DE OSTRAS *Crassostrea* sp. À VARIAÇÃO DE SALINIDADE: UMA ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE INDIVÍDUOS COLETADOS EM DOIS ESTUÁRIOS DA PARAÍBA.

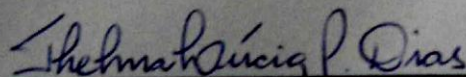
Monografia apresentada ao curso de graduação em Ciências Biológicas do Campus V da Universidade Estadual da Paraíba, como requisito final à obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.  
Área de concentração: Fisiologia Comparada.

Aprovada em: 16 / 06 / 2015.

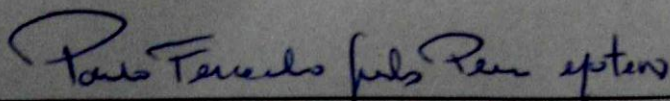
BANCA EXAMINADORA



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



Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Thelma Lúcia Pereira Dias  
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)



Prof. Me. Paulo Fernando Guedes Pereira Montenegro  
Universidade Federal da Paraíba (UFPB)

À todos que acreditaram e que acreditam em  
mim, DEDICO.

## AGRADECIMENTOS

Este é o momento no qual podemos expressar nossas emoções diante de todos. Dizer o quão foi satisfatório realizar esse trabalho dentro de um espaço tão pequeno, mas repleto de pessoas adoráveis.

Agradeço aos meus pais por todo amor e por terem acreditado que um dia eu estaria feliz com o que eu escolhi pra minha vida, e ter suportado os dias em que fiquei fora de casa pra desenvolver meus projetos, amo vocês.

Agradeço a minha irmã que foi parte essencial na construção do meu caráter, e o pouco de responsabilidade que eu tenho, foi por me espelhar nela. Agradeço também as minhas 3 primas lindas Joyce, Suzana e Thaynnara por toda alegria durante todos os anos da minha vida, amo vocês.

Agradeço a Valéria Ribeiro, minha prima bióloga que compartilha as dificuldades comigo e me incentiva a continuar na carreira (kkkkkkkkkkkk), te amo e morro de saudades.

Agradeço a UEPB que mesmo com todas as dificuldades financeiras e físicas me proporcionou um ensino MARAVILHOSO, do qual não tenho o que reclamar e que irei me orgulhar pelo resto da vida.

Agradeço a Enelise Amado, minha orientadora mais linda, compreensiva, fofa, inteligente, dedicada e que me apresentou tudo o que eu queria trabalhar em uma coisa só, A FISILOGIA e agora tenho certeza do que quero como bióloga. Obrigada por todos os ensinamentos, por todas as dicas e desculpa pelas minhas inseguranças. Ps.: não teria melhor.

Agradeço aos professores Élvio Medeiros, Francisco Mendonça e Rodrigo Santos, por terem me aceitado em seus laboratórios e me ajudado, mesmo que não tenha continuado com certeza aprendi muito.

Agradeço a todos os professores em especial a Dani Pontes (xará), Enelise Amado, Ênio Wocilly e Vancarder Brito, que são os professores mais especiais para mim, dessa UEPB, que além de ensinar o que está na ementa, me deu ensinamentos de vida que vou carregar pra sempre.

Agradeço a todos os pescadores e a professora Ana Lúcia que viabilizaram as coletas, como também ao CNPq pelo financiamento do projeto universal da minha orientadora.

Agradeço aos professores da banca avaliadora, Thelma Pereira e Paulo Montenegro, pela disponibilidade e por todas as informações passadas.

Aos amigos de laboratório, vamo lá vê se eu lembro de todos: Matheus, Ignácio, Tony, Camis, Nathy, Jeh, Filipe, Beth, Gaby, Raissa, Layane e Netinho, por todas as conversas dentro do lab. Siiim... e ao técnico mais doido e divertido da UEPB André Pontes, agradeço.

Agradeço em especial a Matheus por estar sempre ao meu lado inclusive nas sextas a noite depois do lab. A Jôingrid por ouvir meus desesperos (todos os dias praticamente), me aconselhar e me amar assim como a amo <3. A Camis meu amor, mais linda, amiga, que me ajudou demaaaaaaais... muito obrigada pelas noites em que passei na sua casa, pelos seminários compartilhados, pelos dias divertidos, por tudo mesmo, você foi essencial. E a César Costa, o amigo mais fiel e companheiro que pude ter durante toda a graduação... obrigada pelos almoços compartilhados, pelas idas até a próxima parada e por tudo mais que compartilhamos juntos.

Pelos amigos eternos que conquistei Catraca (meu brother), Alisson (minha inspiração), Allysson (galego), Alanzinho (meu ex-futuro marido), Wanna, Rodolpho, Marina, Rod Bala, Nathy, Jeh, Thuanny, Tony, Camis, Bruna, Gaby, Allisson, Idálio, Jéssica Sena, agradeço.

Aos amigos de classe, Camis, Nathy, Milena, Amayana, Aninha, Michelly, Jorge e Davi, obrigada por todos esses anos juntos, das conversas antes, durante e depois das aulas, das tentativas de fazer mapas e tabelas kkkkk, sentirei saudades.

À Deus, pela permissão de todas as coisas, agradeço.

“O amor para com todas as criaturas viventes, é uma das mais nobres virtudes humanas.”

*Charles Darwin*



## RESUMO

A salinidade é um dos parâmetros físico-químicos que influencia a fisiologia de ostras sendo sua variação bastante característica em estuários. Atualmente os estuários recebem uma carga elevada de poluentes que afetam os mecanismos fisiológicos de animais que ali vivem. Assim, este trabalho teve como objetivo avaliar se a capacidade de regular o volume celular, o que confere a tolerância de ostras à variação de salinidade, está sendo comprometida pela poluição comumente encontrada nos estuários. Para isso foram analisadas ostras coletadas em dois pontos de diferentes salinidades de dois estuários da Paraíba, sendo um considerado “preservado” (Estuário Mamanguape) e o outro poluído (Estuário Paraíba). Foram realizados 2 experimentos: um *in vivo*, onde os animais foram submetidos à 3 condições experimentais (salinidades 12, 24 e 36), e após 24 horas foi analisado o teor de hidratação tecidual (brânquia e músculo adutor); e um *in vitro* onde o músculo adutor das ostras foi retirado e submetido à 3 salinas com concentrações osmóticas diferentes (497, 986 e 1485 mOsm/kg de H<sub>2</sub>O). O tecido muscular foi pesado de 15 em 15 minutos, totalizando 90 minutos, e os dados representaram a variação relativa de volume do tecido ao longo do tempo. Os resultados do experimento *in vivo* demonstraram uma manutenção da hidratação dos tecidos das ostras do estuário do Rio Mamanguape nos dois pontos analisados, enquanto no estuário do Rio Paraíba houve um comprometimento dos tecidos em manter o teor de hidratação. Em relação ao experimento *in vitro*, os músculos de todas as ostras analisadas mantiveram o volume ao longo do tempo na condição hiposmótica, porém houve um inesperado inchaço dos tecidos na condição isosmótica e hiperosmótica. Esse inchaço foi maior (em torno de 20%) nos tecidos provenientes do estuário do Rio Paraíba, do que nos tecidos do Mamanguape, onde o inchaço para os dois pontos não ultrapassou 7%. Dessa forma, os dois experimentos demonstraram uma melhor capacidade de regulação de volume celular das ostras do estuário Mamanguape, em relação ao estuário Paraíba, o que sugere que poluentes presentes nesse estuário podem estar comprometendo a capacidade de regulação de volume celular desses animais.

**Palavras-chave:** Regulação de volume celular. Teor de hidratação tecidual. Poluição. Estuário Mamanguape. Estuário Paraíba.

## ABSTRACT

Salinity is one of the physico-chemical parameters influencing the physiology of oysters that is quite variable in estuaries. Currently estuaries receive a high load of pollutants that affect the physiological mechanisms of animals living there. This study aimed to evaluate whether the ability of cell volume regulation, which confers the tolerance of oysters to salinity changes, is being compromised by pollution commonly found in estuaries. Therefore, oysters were collected at two points of different salinities in two estuaries of Paraíba; one considered "preserved" (Mamanguape Estuary) and the other polluted (Paraíba Estuary). Two experiments were performed. In the *in vivo* experiment animals were submitted to three experimental conditions (salinity 12, 24 and 36), and after 24 hours tissue hydration (gill and adductor muscle) was analyzed; in the *in vitro* experiment the oysters adductor muscle was removed and subjected to three saline solutions with different osmotic concentrations (497, 986 and 1485 mOsm/kgH<sub>2</sub>O). Muscle tissue was weighed from 15 to 15 minutes, total of 90 minutes, and data represented the relative tissue volume variation over time. The results of *in vivo* experiment showed maintenance of tissue hydration in oysters from Mamanguape, while there was an impairment of the tissues of Paraíba oysters in maintaining tissue hydration. Regarding the *in vitro* experiment, the muscles of all analyzed oysters maintained volume over time in hyposmotic condition, but there was an unexpected swelling of the tissues in isosmotic and hyperosmotic condition. This swelling was higher (around 20%) in tissues from the Paraíba River estuary than in Mamanguape tissues, where the swelling did not exceed 7%. Thus, the two experiments demonstrated better cell volume regulation capacity of the Mamanguape estuary oysters in relation to the Paraíba estuary oysters, which suggests that pollutants present in that estuary may be compromising the ability of cell volume regulation in the tissues of these animals.

**Key words:** Cell volume regulation. Tissue hydration content. Pollution. Mamanguape Estuary. Paraíba Estuary

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1.</b>	Mapa de localização das áreas de estudo .....	23
<b>Figura 2.</b>	Pontos do Estuário do Rio Mamanguape.....	24
<b>Figura 3.</b>	Pontos do Estuário do Rio Mamanguape.....	24
<b>Figura 4.</b>	Esquema do experimento <i>in vivo</i> .....	25
<b>Figura 5.</b>	Esquema do experimento <i>in vitro</i> .....	27
<b>Figura 6.</b>	Gráfico do teor de hidratação tecidual das brânquias e músculos de <i>Crassostrea sp.</i> do ponto 1 do Estuário Mamanguape .....	30
<b>Figura 7.</b>	Gráfico do teor de hidratação tecidual das brânquias e músculos de <i>Crassostrea sp.</i> do ponto 2 do Estuário Mamanguape .....	31
<b>Figura 8.</b>	Gráfico do teor de hidratação tecidual das brânquias e músculos de <i>Crassostrea sp.</i> do ponto 1 do Estuário Paraíba .....	32
<b>Figura 9.</b>	Gráfico do teor de hidratação tecidual das brânquias e músculos de <i>Crassostrea sp.</i> do ponto 2 do Estuário Paraíba .....	33
<b>Figura 10.</b>	Variação temporal do volume de água tecidual do músculo de <i>Crassostrea sp.</i> do ponto 1 do Estuário Mamanguape .....	34
<b>Figura 11.</b>	Variação temporal do volume de água tecidual do músculo de <i>Crassostrea sp.</i> do ponto 2 do Estuário Mamanguape .....	35
<b>Figura 12.</b>	Variação temporal do volume de água tecidual do músculo de <i>Crassostrea sp.</i> do ponto 1 do Estuário Paraíba .....	37
<b>Figura 13.</b>	Variação temporal do volume de água tecidual do músculo de <i>Crassostrea sp.</i> do ponto 2 do Estuário Paraíba .....	37

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Composição osmótica das salinas .....	26
<b>Tabela 2.</b> Dados abióticos dos pontos amostrados .....	29
<b>Tabela 3.</b> Osmolalidades das águas utilizadas no experimento <i>in vivo</i> .....	29
<b>Tabela 4.</b> Osmolalidades das salinas utilizadas no experimento <i>in vitro</i> .....	33

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>14</b>
1.1. Estratégias de tolerância à variação de salinidade .....	14
1.2. Regulação de volume celular .....	15
1.3. O ambiente estuarino .....	18
1.4. Bivalves como bioindicadores .....	20
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>22</b>
2.1. Objetivo geral .....	22
2.2. Objetivos específicos .....	22
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>23</b>
3.1. Áreas de estudo .....	23
3.2. Coleta e manuseio dos exemplares .....	25
3.3. Experimento <i>in vivo</i> .....	26
3.3.1. Desenho experimental .....	26
3.3.2. Teor de hidratação tecidual .....	26
3.4. Experimento <i>in vitro</i> .....	27
3.4.1. Preparo das soluções .....	27
3.4.2. Regulação de volume celular .....	28
3.5. Análises estatísticas .....	28
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>30</b>
4.1. Dados abióticos .....	30
4.2. Teor de hidratação tecidual .....	30
4.3. Regulação de volume celular .....	34
<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>39</b>
<b>6. CONCLUSÃO .....</b>	<b>46</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>47</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Estratégias de tolerância à variação de salinidade

A salinidade é um dos parâmetros físico-químicos que mais influencia nos processos fisiológicos de invertebrados aquáticos, afetando tanto o balanço osmótico, fazendo com que estes requeiram energia para restaurar seu equilíbrio osmótico, quanto a defesa de alguns moluscos, pois em lugares onde se encontram alta salinidade há uma maior facilidade de adquirir doenças (FISHER & NEWELL, 1986). Além disso, a salinidade também possui um papel crucial na distribuição de bivalves (ANTÔNIO, 2007; ALBUQUERQUE et al., 2012).

Os invertebrados marinhos e estuarinos utilizam estratégias fisiológicas e comportamentais para manter o funcionamento ótimo do seu organismo quando expostos a alterações de salinidade no meio, e espécies costeiras estão mais propensas à essas variações osmóticas (FOSTER et al., 2010). Dois processos fisiológicos que são utilizados para lidar com a variação osmótica do meio externo são a osmorregulação e a osmoconformação. A osmorregulação se dá quando os animais tendem a manter a concentração osmótica do fluido extracelular diferente da concentração osmótica do meio. Com esse processo o animal gasta energia para a manutenção de uma concentração osmótica extracelular ideal para o bom funcionamento de suas células, ou seja, o animal evita que seus tecidos internos sofram um choque osmótico. Na osmoconformação, a concentração osmótica do fluido extracelular varia conforme a salinidade do meio aquático, promovendo um choque osmótico em suas células, e assim esses animais são considerados “isosmóticos” em relação ao meio externo. Entretanto, nenhum desses processos é ilimitado, pois a tolerância à salinidade varia de espécie para espécie (FLORKIN, 1962; WILLMER et al., 2004 BRUSCA & BRUSCA, 2007; FOSTER et al., 2010). A maioria dos animais osmorreguladores pode começar a exibir comportamento osmoconformador, dependendo da salinidade e do tempo de exposição, de acordo com seu limite de tolerância (AUGUSTO, 2005; FOSTER et al., 2010).

Moluscos bivalves possuem ainda uma estratégia comportamental, conhecida como “shell closing”, onde o animal se isola do meio externo por um curto período de tempo, o que sugere que o estado hiperosmótico de animais litorâneos nem sempre está relacionado com a regulação isosmótica, mas sim com esse mecanismo comportamental que é considerado uma regulação anisosmótica (GILLES &

JEUINAX, 1976). A primeira resposta de bivalves a uma mudança brusca na osmolaridade do ambiente é a adução das valvas (DEATON, 1992). Outras estratégias comportamentais são o recuo em fendas ou em piscinas temporárias e o hábito de enterrar-se, além do acúmulo de água no manto em moluscos (WILMER et al., 2004).

A maioria dos invertebrados marinhos, a exemplo dos moluscos, são osmoconformadores e desta forma não possuem gasto energético para manter suas concentrações osmóticas diferentes do ambiente externo (HOFFMANN & DUNHAM, 1995; STRANGE; WILMER et al., 2004; VEIGA, 2013). Dizer que os invertebrados marinhos são osmoconformadores e isosmóticos em relação ao ambiente externo, não quer dizer que eles possuam a taxa de soluto exatamente igual ao meio em que vivem. Isso porque seu fluido intersticial possui substâncias importantes e que seria um desperdício descartá-las no meio. Mas a concentração osmótica total é muito próxima à concentração osmótica do meio (SCHMIDT-NIELSEN, 2002). Diante de uma alteração de salinidade do meio externo, a concentração osmótica do meio extracelular também se altera, e em consequência, as células desses animais ficam expostas à um choque osmótico que pode desencadear alteração no seu volume celular (BERGER et al., 1978; FOSTER et al., 2010). Portanto, para ser capaz de tolerar a alteração de salinidade, o animal deve realizar regulação de volume celular (STRANGE; WILLMER et al., 2004).

## **1.2. Regulação de Volume Celular**

O processo de regulação de volume celular é dado pela necessidade das células voltarem ao seu tamanho normal após um estresse osmótico. Um aumento na concentração osmótica do meio aquático e consequentemente na hemolinfa levará a uma redução do volume interno de água das células animais promovendo o encolhimento dessas, porém caso ocorra uma redução osmótica no meio aquático, e consequentemente na hemolinfa, a tendência é aumentar o volume interno de água nas células, promovendo o seu inchaço (HOFFMANN & DUNHAM, 1995; STRANGE; WILMER, 2004). Para retornar ao volume inicial, anterior ao choque osmótico, as células promovem a mobilização de solutos osmoticamente ativos, utilizando inicialmente ou em estresses de curta duração, solutos inorgânicos (íons), e posteriormente ou em estresses de longa duração, solutos orgânicos (principalmente aminoácidos) (HOFFMANN & DUNHAM, 1995; HAUSSINGER,

1996; STRANGE, 2004; FOSTER et al., 2010). O grau de eurialinidade – que diz respeito à condição de sobrevivência de animais a uma ampla faixa de salinidade – de algumas ostras e mexilhões sugerem uma boa capacidade na regulação do volume celular, pois são osmoconformadores e suportam uma grande variação de salinidade (PIERCE, 1982; SMITH & PIERCE; GILLES, 1987; KLÔH, 2011; VEIGA, 2013).

Após estresses osmóticos os mecanismos de regulação de volume celular são ativados para controlar o volume e a concentração osmótica celular. 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). Tanto RVD quanto RVI se referem à ativação de mecanismos de transporte de solutos que auxiliam nesse processo de regulação do equilíbrio osmótico (HALLOWS & KNAUF, 1994; LANG et al., 1998; WEHNER et al., 2003).

Como já mencionado, osmólitos inorgânicos (íons) são utilizados na regulação de volume celular e entre os processos membranares envolvidos nesse mecanismo estão o transporte ativo de íons  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  pela  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase em vários tipos de células, canais de  $\text{Na}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ , co-transporte de  $\text{Na}^+-\text{K}^+-2\text{Cl}^-$ , e os trocadores  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ ,  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  (HOFFMAN & DUNHAM, 1995; HAUSSINGER, 1996; MORABITO et al., 2013). No entanto a  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase não é sensível a variação de volume na célula, portanto ela só é ativada num mecanismo de feedback dependendo da concentração de  $\text{Na}^+$  intracelular (HOFFMAN & DUNHAM, 1995). O uso de aquaporinas (canais de água), que são responsáveis pela função homeostática também vem sendo estudado nesses processos de regulação de volume celular (MORABITO et al., 2013). No caso de RVD ocorrerá o efluxo de íons através desses sistemas de transporte que levará a saída de água por osmose (HOFFMAN & DUNHAM, 1995), bem como descrito no trabalho de Morabito e colaboradores (2013), que sugeriu a saída de  $\text{K}^+$  e  $\text{Cl}^-$ , além da troca  $\text{H}^+/\text{K}^+$  em nematócitos de *Pelagia notiluca*. Berger e colaboradores (1978) em seu estudos com moluscos, observaram mecanismos de retenção de íons  $\text{K}^+$  eficazes, pois sua quantidade se manteve inalterada durante os experimentos já os níveis de  $\text{Na}^+$  e  $\text{Mg}^{2+}$  diminuíram devido o transporte para o meio durante um choque hiposmótico.



Nos casos de RVI haverá o influxo de íons e a mobilização de osmólitos orgânicos (HOFFMAN & DUNHAM, 1995). O aumento nas concentrações de  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$ , induzem a entrada de água e conseqüentemente o aumento do volume celular após um choque hiperosmótico. Essa mobilização de íons em RVI é considerada a fase precoce do mecanismo (ALFIERI & PETRONINI, 2007). Mesmo na presença desses mecanismos é importante uma rápida estabilização na concentração osmótica celular para seu funcionamento eficaz, pois um fluxo de água descompensado pode levar a um inchaço ou encolhimento irreversíveis (FOSTER et al., 2010).

Além desses processos iônicos atuarem na RVD e RVI, há também a presença de osmólitos orgânicos que podem ser compostos metilados, açúcares, polióis, uréia, mas geralmente em células de invertebrados eurialinos o mais comum são os aminoácidos, que podem ser sintetizados ou produtos da hidrólise de proteínas (HOFFMAN & DUNHAM, 1995, HAUSSINGER, 1996; WILMER et al., 2004), e considerados assim efetores osmóticos para a regulação do volume celular (DEATON, 1989). A síntese de aminoácidos ou a hidrólise de proteínas são processos que envolvem a transaminação e desaminação (WILMER et al., 2004). Em experimento realizado por Amado e colaboradores (2006) com o crustáceo *Dilocarcinus pagei* foi visto que a concentração de aminoácidos no tecido muscular, aumenta frente a um estresse hiperosmótico e que é mais provável ter acontecido a hidrólise do que a síntese de aminoácidos.

Em músculos de animais eurialinos, solutos como uréia e aminoácidos como taurina, glicina, prolina e alanina são mais importantes na regulação do volume celular (BURTON, 1983; HOFFMAN & DUNHAM, 1995; WILMER et al., 2004). Deaton (2001) observou um aumento dos níveis de alanina e betaína, aminoácidos que estão relacionados com a salinidade do meio, em tecidos de bivalves após um choque hiperosmótico para a restauração do volume celular. Segundo Gilles & Jeuniaux (1976) aminoácidos não essenciais são mais importantes dos que os essenciais, nestes mecanismos de regulação de volume. Hoffman & Dunham (1995), em seu trabalho demonstraram que em um processo de RVD 70% dos osmólitos perdidos são íons  $\text{K}^+$  e  $\text{Cl}^-$ , e os 30% restantes geralmente são de aminoácidos como a taurina.

Em alguns casos, quando a osmolaridade do meio externo varia previsivelmente, os indivíduos condicionados aquela variação permitem-se inchar ou

encolher com pouco ou nenhum sinal de regulação de volume, ou seja, se tornam parcialmente tolerantes à salinidade e perda de água (WILMER et al., 2004).

Os mecanismos de regulação de volume celular, por envolverem principalmente transportadores iônicos presentes na membrana celular, são particularmente sensíveis a agentes químicos que, entre outras ações, podem inibir esses canais de transportes (OEHLMANN & SCHULTE-OEHLMANN, 2003; GALVÃO et al., 2009). Assim, estudos recentes encontraram um comprometimento da capacidade de regulação de volume celular de animais aquáticos quando os mesmos, seus tecidos ou suas células foram expostos a poluentes comumente encontrados nesse ambiente. Amado e colaboradores (2006) avaliando o efeito do chumbo inorgânico na regulação de volume de água tecidual do caranguejo *Dilocarcinus pagei*, encontraram que o metal afetou o teor de hidratação do animal como um todo, bem como do tecido muscular isolado. Morabito e colaboradores (2013) encontraram a inibição de aquaporinas envolvidas no processo de RVD de nematócitos em *Pelagia noctiluca* devido a presença dos metais  $\text{La}(\text{NO}_3)_3$ ,  $\text{CoCl}_2$ ,  $\text{CdSO}_4$ ,  $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{ZnCl}_2$ . Também, Amado e colaboradores (2012) encontraram que o chumbo prejudica a habilidade de regulação de volume celular de duas espécies de caranguejos marinhos.

### 1.3. O Ambiente Estuarino

O estuário é considerado um corpo de água costeiro semifechado que ocorre ao longo de litorais baixos e possui conexão com o mar, onde tipicamente o rio adentra o mar promovendo a mistura da água salina com a água doce (LOPES, 2008). Essa conexão ocasiona alterações cíclicas de salinidade devido ao regime das marés, que promovem uma mistura instável das águas e, portanto, um desafio osmótico para as espécies que ocorrem nesse hábitat (GILLES & JEUNIAX, 1976). A água pode sofrer uma mistura homogênea e ser salobra, bem como em alguns casos se torna estratificada onde a água salgada, devido sua densidade fica abaixo da água doce (WILMER et al., 2004).

Além da variação de salinidade que ocorre nesses habitats, existem flutuações extremas de outros fatores físicos, como níveis de  $\text{O}_2$ , temperatura e turbidez (DEATON, 1992). Os estuários são ecossistemas de natureza dinâmica, mas, mesmo assim considerados ricos e com uma biomassa elevada (WILMER et al., 2004) e apesar dos desafios de se viver em um ambiente ciclicamente variável,

eles abrigam espécies de invertebrados eurialinos, como crustáceos e moluscos (BEDFORD, 1971; OEHLMANN & SCHULTE-OEHLMANN; PECHENIK et al., 2003; PEDRESCHI et al.; SILVA; WILMER, 2004; LOPES, 2008; FERNANDES, 2010). Alguns animais selecionam o estuário para passar parte do seu ciclo de vida, já outros passam toda a vida, e para isso desenvolvem uma gama de ajustes fisiológicos (WILMER et al., 2004; BRUSCA & BRUSCA, 2007).

Com o processo de urbanização o ecossistema estuarino passou a receber uma grande descarga de poluentes, dragagens e assoreamentos o que também pode alterar a sua concentração osmótica (STARK, 1998; SCHLACHER et al., 2005). Como consequência, a presença de poluentes nesse ambiente pode levar ao aumento das taxas de bioacumulação, perda da biodiversidade, e afetar os mecanismos fisiológicos que torna os animais tolerantes às flutuações de salinidade (DOMINGOS et al.; MONSERRAT et al., 2007).

Muitos trabalhos já foram realizados indicando a problemática da presença de poluentes em um ambiente com salinidade variável como é o caso do ambiente estuarino. Denton & Burdon-Jones (1981) avaliaram a influência da salinidade e temperatura nos processos de absorção e distribuição de metais como mercúrio, cádmio e chumbo em *Saccostrea echinata*, e os resultados obtidos foram que as baixas salinidades têm mais influência no acúmulo de metais nos tecidos do que a temperatura.

Como já foi dito, a salinidade afeta a defesa de animais que estão sujeitos a sua variação, além de estar envolvida nos processos de absorção e distribuição de metais pesados nos tecidos, que podem levar a anormalidades morfológicas e neurofisiológicas (WRIGHT & ZAMUDA, 1987; VOLETY, 2008; MORABITO et al., 2013). Segundo Anacleto e colaboradores (2015) os níveis de elementos tóxicos bioacumulados nos tecidos variam de espécie para espécie, bem como a duração da depuração, processo no qual, substâncias indesejadas são eliminadas. Silva e colaboradores (2001) detectaram em trabalho utilizando ostras como bioindicadores, que as concentrações de chumbo, zinco e cobre encontradas nas ostras e provenientes de poluição antropogênica, estavam acima dos níveis aceitos pela saúde pública, uma vez que estas servem como fonte de alimento. Como os bivalves tem hábito alimentar filtrador são mais expostos a estes agentes tóxicos, podendo incorporá-los como alimento (GALVÃO et al., 2009).

#### 1.4. Bivalves como bioindicadores

A Classe Bivalvia pertencente ao Filo Mollusca, é caracterizada pela presença de conchas articuladas dorsalmente, fechadas por músculos adutores, e possuem representantes marinhos e de água doce que inclui cerca de 20.000 espécies viventes (BRUSCA & BRUSCA, 2007). As atividades metabólicas sazonais em moluscos resultam de interações entre a disponibilidade de alimento, condições ambientais, crescimento e ciclo gametogênico (LIRA et al., 2013).

As ostras verdadeiras são bivalves pertencentes à família Ostreidae, e o gênero *Crassostrea* (Sacco, 1897), é constituído por espécies eurialinas e euritêrmicas, sendo adaptadas a ambientes estuarinos e de turbidez elevada e ocorrem ao longo de quase toda a extensão do litoral brasileiro (LIRA et al., 2013). Esse gênero é de bastante importância econômica, pois é considerado um animal com alto valor nutritivo (CHRISTO, 2006; BRITO, 2008; NETO, 2011).

Os bivalves possuem um papel importante na identificação de ambientes poluídos devido as suas respostas fisiológicas, em frente a esses problemas, sendo assim, considerados bons indicadores de poluição aquática (DENTON & BURDON-JONES, 1981; VOLETY, 2008; FILGUEIRA et al., 2013). Além disso, são considerados espécies-chaves de seus ecossistemas, e uma vez que filtram um metal, este vai ser bioacumulado em toda cadeia trófica (OEHLMANN & SCHULTE-OEHLMAN, 2003). Características como o hábito sésil – que não permite a fuga, quando em condições adversas -, tempo de vida consideravelmente longo, ampla distribuição geográfica, alta densidade, fácil coleta, hábito alimentar filtrador, contato com sedimentos e a capacidade de acumular metais os tornam organismos sentinela (SILVA et al., 2001; GALVÃO et al., 2009; ANACLETO et al., 2015). Segundo Azevedo (2005), bioindicadores sésseis e que são representativos em sua área de estudo são recomendáveis para o biomonitoramento dessas áreas.

Dessa forma, animais estuarinos como as ostras estão sujeitos não só às variações de salinidade, como também às implicações da associação de um estresse salino com poluentes químicos. Sabendo que a presença de poluentes no ambiente aquático influencia em diversos parâmetros fisiológicos, inclusive nos mecanismos de regulação de volume celular, e que as ostras podem acumular esses poluentes em seus tecidos, prejudicando suas funções fisiológicas, é

importante saber se capacidade fisiológica de tolerar as variações osmóticas do estuário estão sendo afetadas. Os resultados obtidos nesse trabalho podem ser relevantes para o melhor entendimento da influência da poluição sobre dois ecossistemas estuarinos da Paraíba.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Geral**

Verificar, experimentalmente, a tolerância osmótica de ostras *Crassostrea sp.* à variação de salinidade e comparar os resultados entre dois estuários do litoral da Paraíba.

### **2.2. Específicos**

- Analisar o teor de hidratação tecidual (brânquia e músculo) após exposição dos animais a três salinidades diferentes: 12, 24 e 36;
- Analisar a capacidade da regulação de água do tecido muscular após submetê-lo a diferentes choques osmóticos;

### 3. METODOLOGIA

#### 3.1. Áreas de Estudo

O Estuário do Rio Mamanguape (Figura 1A) situa-se na parte setentrional do Estado da Paraíba, há cerca de 80 km da capital João Pessoa localiza-se entre as coordenadas 06°43'02'' e 06°51'01'' Sul e 35°07'46'' e 34°54'46'' Oeste. Possui cerca de 25 km de extensão e 2,5 km de largura, e uma área de 14.460 hectares. O estuário abrange os municípios de Marcação e Rio Tinto e está inserido numa Área de Proteção Ambiental (APA do Rio Mamanguape). A porção estuarina da APA abrange uma vasta extensão de manguezal, com aproximadamente 6000 ha de mangue, representando a maior área de mangue do Estado da Paraíba (ALVES et al., 2005).

Dentre os ecossistemas principais possui uma área estuarina, manguezal, lagoas, planícies fluviais, recifes de arenito, ilhas e tabuleiros. É rico em peixes, crustáceos e moluscos, e possui duas áreas protegidas, a Área de Proteção Ambiental da Barra do Mamanguape e a Reserva Indígena Potiguar. Mesmo se encontrando dentro de uma área protegida, ainda assim sofre diversos impactos ambientais, como despejo de vinhoto, erosão de tabuleiro e encostas causados pelo plantio de cana-de-açúcar, poluição por agrotóxicos, entre outros (DIEGUES & ROSMAN, 1998).

Foram escolhidos 2 pontos deste estuário para a realização das coletas dos espécimes, sendo o ponto 1 de menor salinidade, onde caracterizou-se por ser um cultivo de ostras e o ponto 2 mais salino, onde os indivíduos estavam incrustados a recifes de arenito (Figura 2).

O Estuário do Rio Paraíba (Figura 1B) está situado na porção mediana do Estado da Paraíba e circunda as cidades de João Pessoa, Bayeux, Santa Rita e Lucena. Situado entre as coordenadas 34°47'07" e 34°55'37" Sul, e 06°56'58" e 07°08'18" Oeste, estendendo-se por aproximadamente 22 km desde sua foz (com 2,2 km de largura), no Porto de Cabedelo, até a ponte sobre o Rio Sanhauá na cidade de Bayeux (NISHIDA et al., 2004).

Possui áreas de mangue, solos arenosos de praia, restingas e cordões litorâneos, além de possuir várias ilhas, sendo a da Restinga e Stuart as maiores. Seus recursos pesqueiros também são peixes, moluscos e crustáceos. Dentre os impactos antropogênicos estão a plantação de cana-de-açúcar, que leva a um

processo de assoreamento da calha estuarina, mecanização da agricultura, e enorme expansão da urbanização em seu entorno, que leva a poluição doméstica (MARCELINO, 2000).

Para a coleta neste estuário também foram escolhidos 2 pontos que diferiram em salinidade, sendo o Ponto 1 próximo à indústrias e residências na cidade de Bayeux (PB), ponto de menor salinidade e o Ponto 2 próximo a Cabedelo (PB), o ponto de maior salinidade. As ostras nos dois pontos foram coletadas em raízes de plantas de mangue (Figura 3).

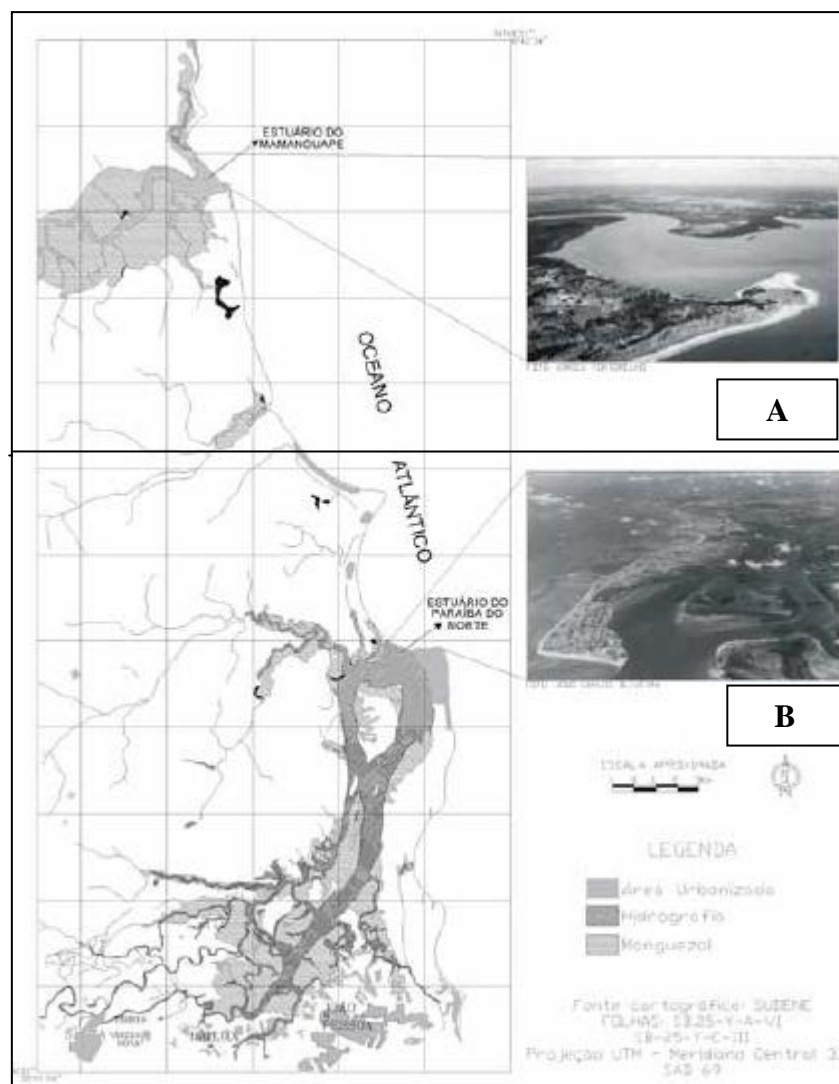


Figura 1. Mapa de localização das áreas de estudo, estuário do Rio Mamanguape (A) e estuário do Rio Paraíba do Norte (B). Fonte: Nishida A. K.; Nordi N.; Alves R. R. N. (2004).





Figura 2. Imagens dos pontos de coleta no Estuário do Rio Mamanguape – PB. Ponto 1 à esquerda e ponto 2 à direita.



Figura 3. Imagens dos pontos de coleta no Estuário do Rio Paraíba – PB. Ponto 1 à esquerda e ponto 2 à direita.

### 3.2. Coleta e Manuseio dos Exemplos

Os pontos amostrados foram alcançados através de um barco e a coleta foi realizada nos meses de julho e setembro, 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 era coletada para posterior análise de osmolalidade. A salinidade, o pH e a temperatura, foram mensuradas com a ajuda de 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 da água foi feita com o auxílio de um refratômetro (RTS-101ATC). As ostras permaneceram nos aquários por no mínimo 24 horas, tempo necessário e

importante para a aclimatação. Os experimentos foram conduzidos afim de estimar a variação de volume das células durante a exposição a um estresse osmótico.

### 3.3. Experimento *in vivo*

A capacidade de regulação de água tecidual diante de flutuações de salinidade foi analisada através de um experimento *in vivo*. Os animais foram colocados em aquários de diferentes salinidades, e o teor de hidratação de seus tecidos foi analisado.

#### 3.3.1. Desenho experimental

Para a realização deste experimento foram preparadas três águas (1 litro) com salinidades diferentes, utilizando sal marinho para aquarismo e água destilada. A primeira com salinidade 12‰, a segunda com salinidade 24‰ e a terceira com salinidade 36‰. Após a preparação das águas foram retiradas alíquotas para posterior análise de osmolalidade. Foram escolhidas 15 ostras e distribuídas equitativamente entre os aquários (Figura 4). Após 24 horas de exposição às diferentes salinidades, as ostras foram retiradas da água e suas conchas foram desarticuladas resultando na morte do animal.

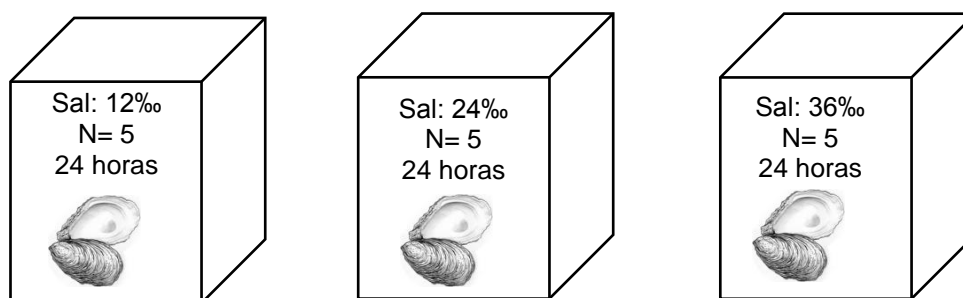


Figura 4. Esquema representativo do experimento *in vivo*.

#### 3.3.2. Teor de Hidratação Tecidual

Os tecidos moles – brânquia e músculo adutor - foram amostrados e colocados em tubos de eppendorf previamente identificados e pesados. Os tubos contendo agora os tecidos foram novamente pesados em balança analítica de precisão (SHIMADZU AUY 220) para a obtenção do peso úmido (PU), e posteriormente levados a uma estufa (NOVA - NI 1524) a 60°C durante 24 horas. Após esse período os tubos foram retirados e pesados novamente para a obtenção do peso seco (PS).

Após descontar o peso do eppendorf do PU e do PS, o teor de hidratação tecidual foi calculado utilizando a seguinte fórmula:

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

### 3.4. Experimento *in vitro*

A capacidade de regulação de volume celular de um tecido isolado diante de diferentes choques osmóticos foi estimada através de um experimento *in vitro*. O tecido muscular foi exposto à soluções salinas de diferentes concentrações osmóticas, e a variação do seu peso úmido foi acompanhada ao longo do tempo em uma balança analítica.

#### 3.4.1. Preparo das soluções

Para a realização deste experimento foram preparadas salinas adaptadas de Veiga (2013), contendo a mesma composição, porém com concentrações osmóticas diferentes e pH 8,2 (Tabela 1). Uma das salinas é considerada isosmótica (100%) à hemolinfa de bivalves marinhos, uma considerada hiposmótica (-50%) e a última considerada hiperosmótica (+50%), e alíquotas das salinas foram coletadas para análise de osmolalidade.

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

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

### 3.4.2. Regulação de volume celular

No dia posterior à preparação das salinas, foram separadas 7 ostras do aquário de aclimatação e sacrificadas para a retirada do músculo adutor. O músculo adutor de cada ostra foi dividido em 3 partes semelhantes e cada uma das partes foi pesada (peso inicial) e colocada em potes com 20 ml de cada uma das salinas (Figura 5). Os tecidos foram pesados novamente a cada 15 minutos até o tempo final de 90 minutos. Antes de serem pesados eles eram secos cuidadosamente em um papel absorvente onde era retirada a água superficial que encobria o tecido, evitando ao máximo o comprometimento do experimento. Os valores de peso úmido encontrados foram transformados em números relativos. Assim, a variação de peso úmido reflete a variação do volume tecidual em relação ao tempo inicial.

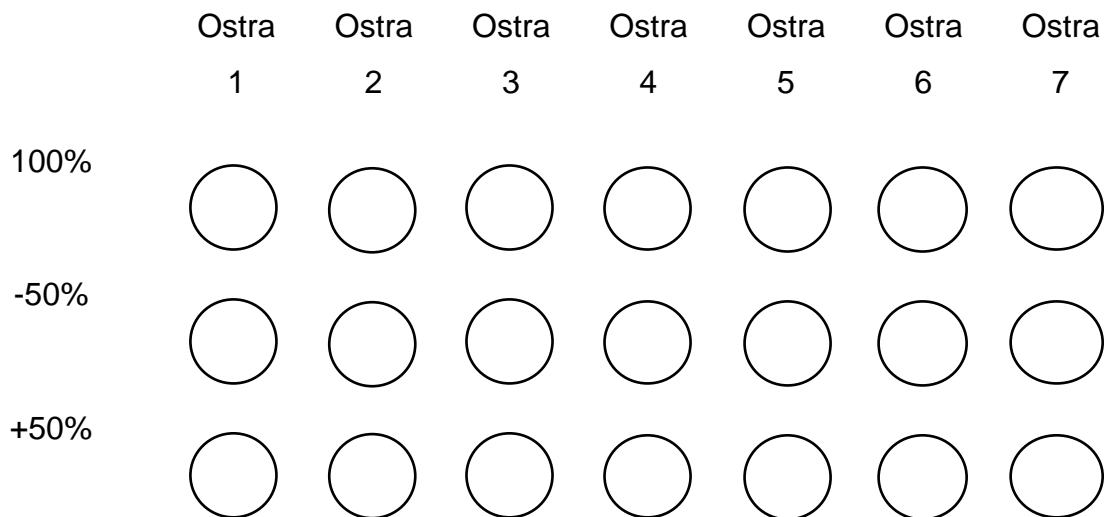


Figura 5. Esquema representativo do experimento *in vitro*.

### 3.5. Análises estatísticas

Os dados foram apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média. Os resultados foram analisados através do software Sigma plot® versão 11.0. Os testes utilizados para o experimento *in vivo* 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 *in vitro* foram utilizados os testes *one way repeated measures ANOVA* seguido de *Holm-sidak method* para o caso de dados normais, ou seguido de *Tukey test* para o caso de dados não normais. Além de *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.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Dados abióticos

Os dados abióticos foram mensurados e os valores de salinidade, pH e temperatura estão ilustrados na tabela 2.

Tabela 2. Dados abióticos dos pontos amostrados.

	Estuário do Rio Mamanguape		Estuário do Rio Paraíba	
	Ponto 1	Ponto 2	Ponto 1	Ponto 2
<b>Salinidade</b>	22,5	32,33	12,82	26,7
<b>pH</b>	7,72	8,38	7,35	7,72
<b>Temperatura</b>	28,05°C	29 °C	29,86 °C	27,47 °C

### 4.2. Teor Hídrico

As osmolalidades das amostras das águas utilizadas para os experimentos *in vivo* das ostras provenientes dos dois estuários estão ilustradas na tabela 3.

Tabela 3. Osmolalidades das águas utilizadas no experimento *in vivo*.

Osmolalidades	
<b>12‰</b>	350 mOsm/kg de H <sub>2</sub> O
<b>24‰</b>	723 mOsm/kg de H <sub>2</sub> O
<b>36‰</b>	1097 mOsm/Kg de H <sub>2</sub> O

Após a exposição dos indivíduos às águas com salinidades/osmolalidades mostradas acima, a análise do teor de hidratação tecidual revelou os seguintes resultados:

Em todas as condições experimentais e em todos os pontos analisados, as brânquias apresentaram volume de água tecidual maior do que os músculos, o que é comum devido às características teciduais.

No ponto 1 do Estuário do Rio Mamanguape, observou-se um maior volume de água dos tecidos na condição experimental de 12‰, sendo o teor de hidratação do músculo (83,05%) diferente das demais condições (77,20% em 24 e 76,55%, em 36) e o teor de hidratação da brânquia (87,89%) diferente da condição de 24

(84,23%), porém não apresentando diferença significativa com a condição de 36 (85,67%) (Figura 6).

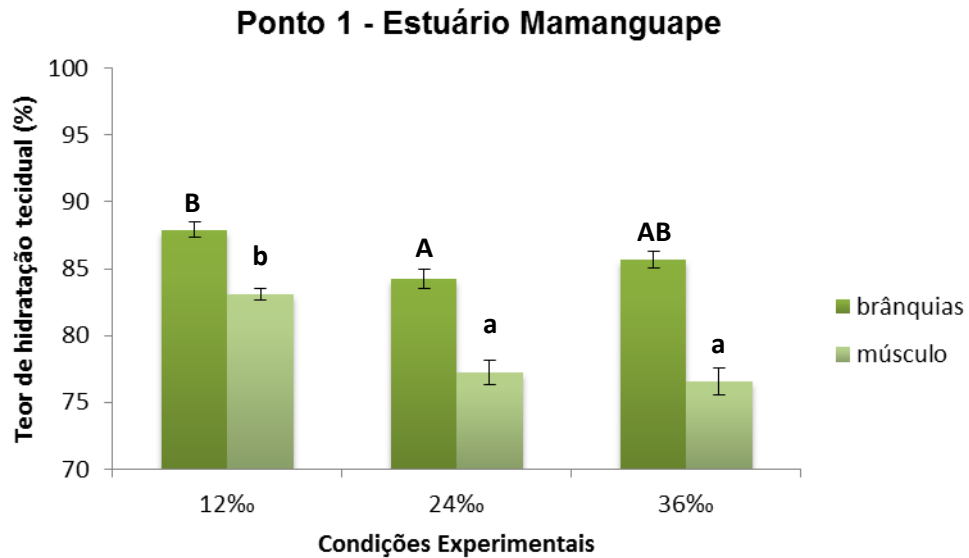


Figura 6: Teor de hidratação das brânquias e músculo de *Crassostrea* spp após exposição às diferentes condições experimentais. Letras diferentes indicam diferença estatística entre as condições experimentais (letras maiúsculas para as brânquias e minúsculas para o músculo, ANOVA,  $p < 0,05$ ,  $n=5$ ).

No ponto 2 o maior volume tecidual foi encontrado na brânquia da condição 24 (87,96%), que é diferente das demais condições. As brânquias das condições 12 e 36 (85,63% e 85,83% respectivamente) não apresentaram diferença, como também não houve diferença entre os músculos nas três condições experimentais (79,85%; 81,70% e 79,05% em 12, 24 e 36, respectivamente) (Figura 7).

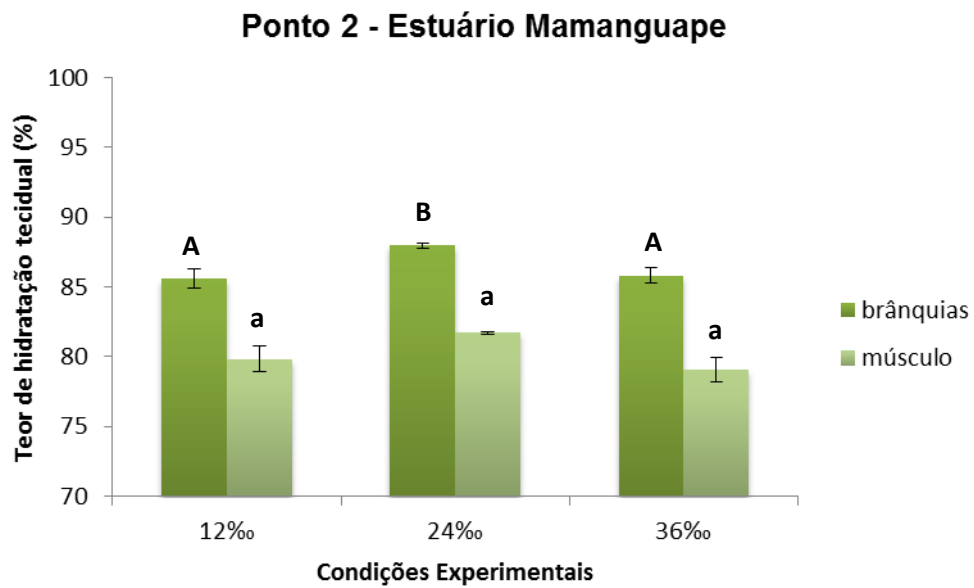


Figura 7: Teor de hidratação das brânquias e músculo de *Crassostrea* spp após exposição às diferentes condições experimentais. Letras diferentes indicam diferença estatística entre as condições experimentais (letras maiúsculas para as brânquias e minúsculas para o músculo, ANOVA,  $p < 0,05$ ,  $n=5$ ).

No ponto 1 do Estuário do Rio Paraíba, o teor de hidratação das brânquias da condição 12 (88,31%) foi maior do que o teor de hidratação das brânquias na condição 36 (83,66%), mas não foi diferente da condição 24 (85,78%). Porém o músculo da condição 12 (84,02%) foi diferente das outras duas condições que por sua vez assemelham-se estatisticamente (78,15% e 79,19% em 24 e 36, respectivamente). As brânquias cujos indivíduos foram condicionadas à salinidade 36 também não apresentaram diferença com as da salinidade 24 (Figura 8).



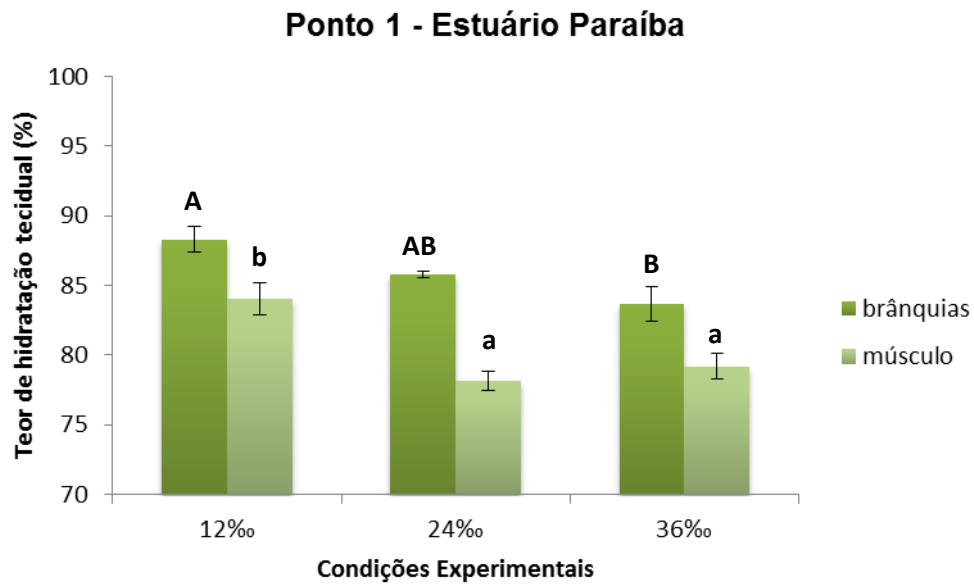


Figura 8: Teor de hidratação das brânquias e músculo de *Crassostrea* spp após exposição às diferentes condições experimentais. Letras diferentes indicam diferença estatística entre as condições experimentais (letras maiúsculas para as brânquias e minúsculas para o músculo, ANOVA,  $p < 0,05$ ,  $n=5$ ).

No ponto 2 do Paraíba as brânquias das condições experimentais 12 (87,11%) e 24 (86,07%) não apresentaram diferença entre si, porém a condição 36 (79,46%) foi diferente das duas, apresentando-se com o menor volume de água tecidual entre as condições. Já o teor de hidratação dos músculos foi diferente em todas as salinidades testadas. Os valores encontrados foram 84,50%; 81,54% e 78,29% nas salinidades 12, 24 e 36 respectivamente (Figura 9). Neste ponto 1 indivíduo morreu na condição 12.

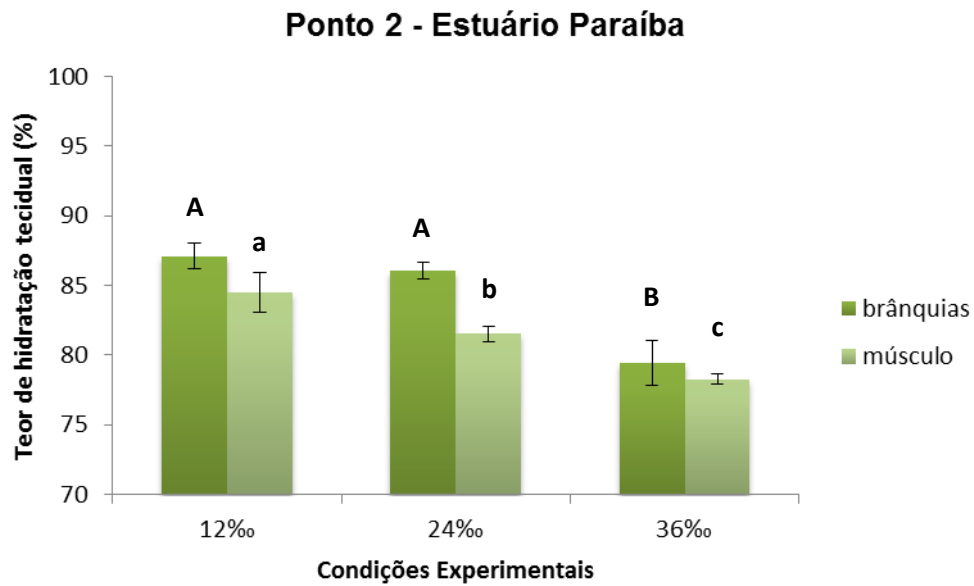


Figura 9: Teor de hidratação das brânquias e músculo de *Crassostrea* spp após exposição às diferentes condições experimentais. Letras diferentes indicam diferença estatística entre as condições experimentais (letras maiúsculas para as brânquias e minúsculas para o músculo, ANOVA,  $p < 0,05$ ,  $n=4$ ).

### 4.3. Regulação de Volume Celular

As osmolalidades das salinas utilizadas no experimento *in vitro* para os dois estuários também foram mensuradas e seus resultados estão ilustrados na tabela 4.

Tabela 4. Osmolalidades das soluções salinas utilizadas no experimento de regulação de volume celular.

<b>Osmolalidades</b>	
<b>100%</b>	497 mOsm/kg de H <sub>2</sub> O
<b>-50%</b>	986 mOsm/kg de H <sub>2</sub> O
<b>+50%</b>	1485 mOsm/kg de H <sub>2</sub> O

De um modo geral, em todos os experimentos *in vitro*, houve um inchaço progressivo do tecido muscular nas condições isosmótica (100%) e hiperosmótica (+50%), enquanto na condição hiposmótica (-50%) o tecido muscular conseguiu manter sua hidratação tecidual ao longo de todo o tempo experimental. Para analisar os resultados foram utilizados 2 tipos de comparação estatística: a análise da variação do volume de água ao longo do tempo experimental (90 min) para cada uma das condições; e a comparação das 3 condições experimentais em cada um

dos tempos experimentais (15, 30, 45, 60, 75 e 90 min). Para evitar uma poluição visual nos gráficos, as diferenças estatísticas encontradas na análise da variação do volume de água ao longo do tempo experimental não foram apresentadas por símbolos no gráfico, mas estão indicadas ao longo do texto abaixo.

No experimento das ostras coletadas no ponto 1 do estuário do rio Mamanguape, o músculo submetido à condição hiposmótica não apresentou variação de volume ao longo do tempo. Na condição hiperosmótica, a partir do tempo experimental 60', houve um aumento de volume contínuo até o fim do experimento. Já na condição isosmótica ocorreu inchaço apenas no tempo 90'. O volume final das condições foi de 97% (hiposmótica), 106% (isosmótica) e 105% (hiperosmótica). Em relação à comparação de cada tempo experimental entre as três condições, foi a partir do tempo 45' e 60' que os músculos expostos à salina hiperosmótica e isosmótica, respectivamente, apresentaram diferença estatística em relação ao músculo exposto à salina hiposmótica no mesmo tempo experimental (Figura 10).

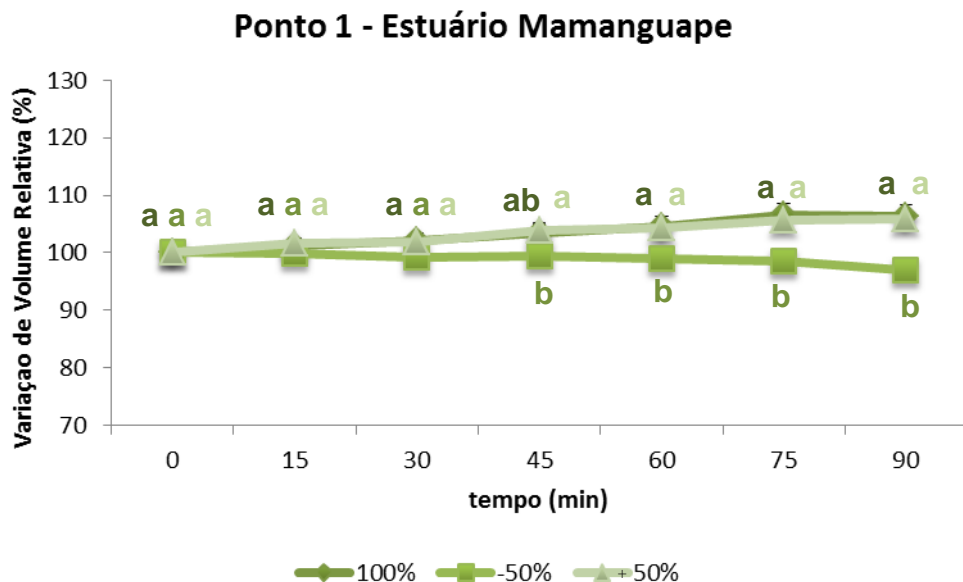


Figura 10: Variação temporal do volume de água tecidual do músculo de *Crassostrea* spp exposto a choques osmóticos de diferentes intensidades (-50% e +50% do controle isosmótico 100%). Letras diferentes indicam diferença estatística entre as condições em cada um dos tempos experimentais (one way ANOVA,  $p < 0,05$ ,  $n = 7$ ).

No experimento das ostras coletadas no ponto 2 do estuário do rio Mamanguape, novamente não houve inchaço dos tecidos na condição hiposmótica

ao longo do tempo, e tanto na condição hiperosmótica como na condição isosmótica houve um inchaço do músculo a partir de 45' e 60', respectivamente. O volume final na condição hiposmótica foi de 96,64%, na hiperosmótica foi de 107,09% e na isosmótica foi de 106,50%. Na comparação entre as soluções em cada tempo experimental, tanto na solução isosmótica quanto na solução hiperosmótica houve diferença estatística no volume do tecido em relação à condição hiposmótica partir do tempo experimental de 60' até o final do experimento (Figura 11).

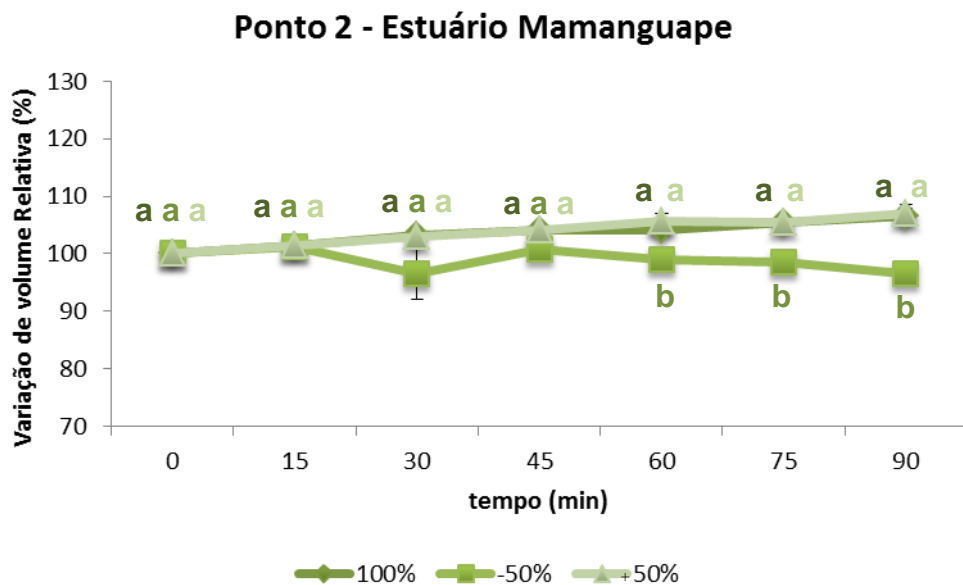


Figura 11: Variação temporal do volume de água tecidual do músculo de *Crassostrea* spp exposto a choques osmóticos de diferentes intensidades (-50% e +50% do controle isosmótico 100%). Letras diferentes indicam diferença estatística entre as condições em cada um dos tempos experimentais (one way ANOVA,  $p < 0,05$ ,  $n = 7$ ).

No experimento com as ostras coletadas no ponto 1 do estuário do rio Paraíba houve um aumento de volume nas condições isosmótica e hiperosmótica a partir de 60' e 90', respectivamente. Não houve variação do volume muscular na solução hiposmótica. O volume final do tecido muscular foi de 104,9% na condição hiposmótica, 111,5% na condição isosmótica e 119% na condição hiperosmótica. Em relação a cada tempo experimental as diferenças estatísticas entre as condições, apareceram no tempo 45' entre as condições hiposmótica (102,85%) e hiperosmótica (115,49%) e persistiram até o fim do experimento. Não houve diferença entre as condições isosmótica e hiperosmótica ou isosmótica e hiposmótica (Figura 12).

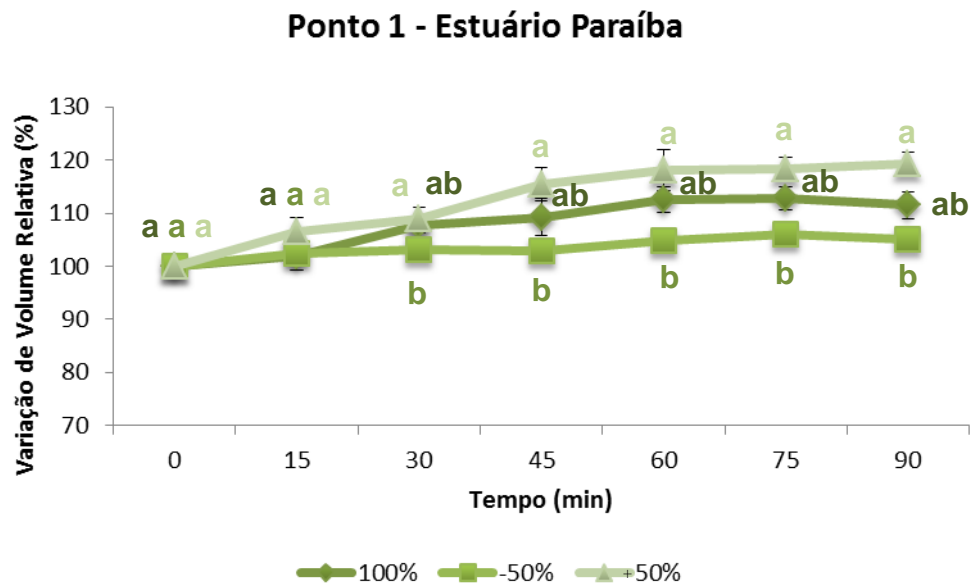


Figura 12: Variação temporal do volume de água tecidual do músculo de *Crassostrea* spp exposto a choques osmóticos de diferentes intensidades (-50% e +50% do controle isosmótico 100%). Letras diferentes indicam diferença estatística entre as condições em cada um dos tempos experimentais (one way ANOVA,  $p < 0,05$ ,  $n = 7$ ).

No experimento com as ostras coletadas no ponto 2 do estuário Paraíba a análise em cada condição ao longo do tempo demonstrou que a condição hiposmótica, como em todos os outros pontos não apresentou aumento de volume, os tecidos da condição hiperosmótica aumentaram de volume a partir do tempo 90' e a condição isosmótica a partir do tempo 45'. O volume final do tecido muscular foi de 100,9% na condição hiposmótica, 120,2% na condição isosmótica, e 117,2% na condição hiperosmótica. Quando comparados os tempos experimentais, a partir do tempo 45' hipo houve diferença do músculo na condição isosmótica em relação à condição hiposmótica, mas não em relação à condição hiperosmótica. Porém a partir de 75' tanto o músculo na condição isosmótica quanto o músculo na condição hiperosmótica apresentaram diferenças estatísticas em relação ao músculo na condição hiposmótica. Durante todo o experimento as condições hiperosmótica e isosmótica foram semelhantes estatisticamente (Figura 13).

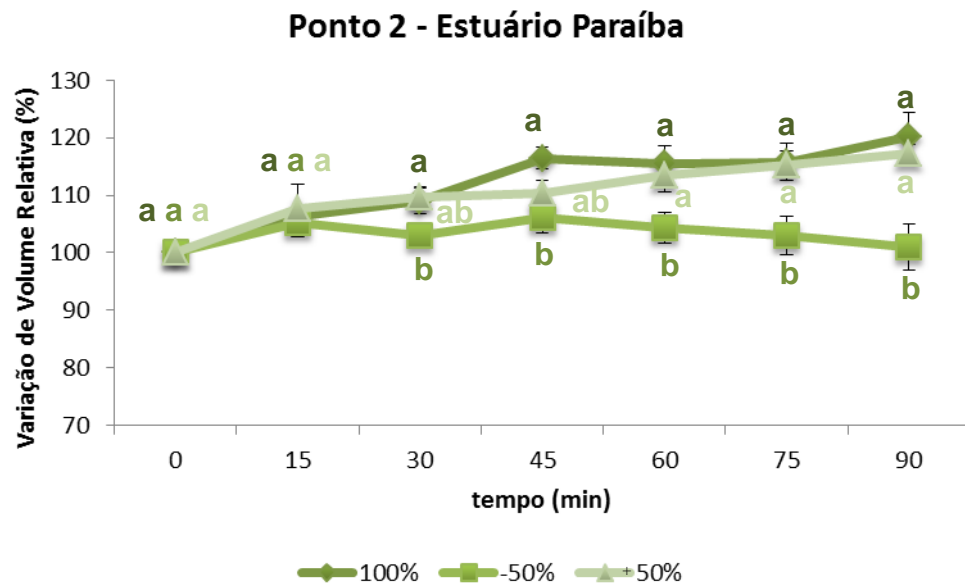


Figura 13: Variação temporal do volume de água tecidual do músculo de *Crassostrea* spp exposto a choques osmóticos de diferentes intensidades (-50% e +50% do controle isosmótico 100%). Letras diferentes indicam diferença estatística entre as condições em cada um dos tempos experimentais (one way ANOVA,  $p < 0,05$ ,  $n = 7$ ).

## 5. DISCUSSÃO

As ostras são animais eurialinos que osmoconformam quando expostos à uma variação de salinidade. O comportamento osmoconformador expõe os tecidos internos do animal às variações osmóticas e iônicas do meio. Assim, por ser um animal eurialino, esses animais devem ser bons reguladores de volume celular. Nossos resultados do teor de hidratação tecidual confirmam a capacidade que o animal possui de manter a hidratação adequada das células daquele tecido sem provocar danos irreversíveis, como um inchaço que pode levar à lise celular, ou um encolhimento que pode levar ao comprometimento das funções celulares (HAUSSINGER, 1996). Assim, uma manutenção do teor de hidratação tecidual sugere se ocorreu uma regulação do volume celular após exposição do animal à salinidades diferentes.

No experimento *in vivo* as salinidades testadas foram 12, 24 e 36, que são naturalmente encontradas em estuários (WILMER et al., 2004; JACKSON, 2013), e portanto, não representam desafios osmóticos além daqueles que esses moluscos já estão habituados. Os resultados obtidos neste trabalho a respeito do teor de hidratação tecidual após exposição dos animais às salinidades testadas apontam para uma melhor regulação de volume de água tecidual na salinidade mais alta (36) o que seria um choque hiperosmótico se considerarmos a salinidade 24 como “referência”. Entretanto as ostras foram coletadas em pontos com diferentes salinidades, e mantidas até o momento do experimento nas águas desses pontos. Como as ostras são osmoconformadoras e, portanto, isosmóticas ao meio, é necessário considerar qual era a condição osmótica desses animais antes deles entrarem no experimento. Assim, para discutir os resultados consideramos diferentes salinidades como “referência”, mesmo sabendo que o estuário pode variar de salinidade todo o tempo.

Independente do choque osmótico aplicado, ou do ponto de coleta, as brânquias como tecido mais externo e que estão diretamente em comunicação com a água, devido suas funções de respiração, transporte de água, íons e alimentação (GALVÃO et al, 2009), apresentaram maiores volumes de água tecidual quando comparadas com os músculos, em todas as condições. Além disso, a brânquia possui um epitélio fino, ideal para o transporte de gases, enquanto o músculo é mais

denso por apresentar uma maior concentração de proteínas e conseqüentemente menor conteúdo de água.

Considerando no Ponto 2 do Paraíba e no Ponto 1 de Mamanguape a condição 24 como referência, que é próxima da salinidade na qual foram coletados os indivíduos (ver Tabela 2), temos um choque hiposmótico (12) e um choque hiperosmótico (36), desta forma observamos que os indivíduos do Paraíba perderam água no choque hiper e não recuperaram seu volume, já os animais do Mamanguape, apresentaram teor de hidratação tecidual igual ao controle após o choque hiper. Frente ao choque hiposmótico as brânquias dos indivíduos do ponto 2 do Paraíba regularam o volume de água, mas o músculo não, e no estuário Mamanguape os dois tecidos apresentaram inchaço em relação ao controle considerado, onde o mecanismo de RVD não mostrou eficiência total.

Em relação a isso Hoffman & Dunham (1995) falam sobre a possibilidade de ocorrer um RVD parcial, que resulta da perda de KCl e alguns osmólitos orgânicos. Segundo Torre e colaboradores (2013), quando a redução no volume celular é pequena após um inchaço devido a um choque hiposmótico, sugere-se que a célula tenha realizado um RVD parcial, evitando o efeito deletério da redução de um grande volume e perda de osmólitos importantes. Isso pode ter ocorrido uma vez que o choque osmótico aplicado foi de 50%, mas o aumento do volume de água tecidual foi bem menor do que isso (não chega a 10% de aumento). Ou seja, o tecido inchou bem menos do que o esperado caso nenhum mecanismo de controle (RVD) estivesse envolvido.

Para o ponto 2 do Mamanguape a condição 36 foi considerada referência, e como mostram os resultados esse foi o ponto onde houve a melhor regulação de água tecidual, pois todos os músculos regularam e apenas a brânquia da condição 24 apresentou diferença. Porém o inchaço foi tão pequeno que para animais eurialinos essa variação não pode ser considerada um estresse. Hoffman & Dunham (1995), relatam que os transportadores que atuam na regulação de volume nem sempre são ativados caso ocorra um pequeno inchaço, portanto no caso do ponto 2 do Mamanguape é mais fácil considerarmos a opção de não ter ocorrido uma regulação, do que um RVD parcial, pois os tecidos da condição 12, que foi um choque hiposmótico de maior intensidade, não apresentaram diferença em relação ao controle.



Por fim no ponto 1 do Paraíba, que foi o ponto de coleta com a menor salinidade, a condição considerada como referência foi a 12, sendo assim os dois choques induzidos foram hiperosmóticos. O tecido branquial da condição 24 regulou em relação ao controle, porém o músculo, não retomou o volume, e no desafio maior que foi 36 os dois tecidos perderam água e apresentaram dificuldade em realizar RVI completa.

Esses resultados indicam claramente que as ostras do estuário Paraíba estão com mais dificuldade de regular sua água tecidual do que as ostras de Mamanguape. Há um comprometimento da capacidade das ostras, de ambos os pontos de coleta analisados nesse estuário, em realizar RVD, mas principalmente RVI. Como os choques osmóticos não são intensos, o esperado seria que as ostras conseguissem manter seu teor de hidratação tecidual inalterado, independente da alteração de salinidade. Veiga (2013), analisou o teor hídrico do músculo de mexilhões *Perna perna* e da ostra *Crassostrea gigas*, e por mais que o estresse salino tenha sido maior (0, 35 e 45) do que o do presente trabalho, o tecido muscular dos bivalves apresentaram uma boa regulação de água tecidual. Portanto, a possível presença de poluentes no estuário Paraíba pode estar comprometendo a capacidade de regulação de volume celular desses animais.

Em relação à habilidade do tecido muscular das ostras de regular volume de água tecidual mediante um estresse osmótico, os resultados dos experimentos *in vitro* indicam que independente da origem das ostras (ponto de coleta), o tecido muscular não alterou seu volume de água na condição hiposmótica (-50%), mas aumentou de volume na condição isosmótica e hiperosmótica (100% e +50%). Essas salinas foram preparadas baseadas na composição e concentração osmótica de bivalves marinhos (osmoconformadores, mesma concentração osmótica do meio). Portanto, aumentar de volume na condição isosmótica e hiperosmótica é um resultado curioso e difícil de ser explicado. Mesmo quando o animal não consegue regular seu volume celular, geralmente ocorre o que aconteceu com o bivalve *Corbiculea fluminea*, que em um experimento semelhante ao nosso, quando o tecido muscular entrou em contato com os choques osmóticos, apresentou o controle em torno de 100% de hidratação, os tecidos da condição hiposmótica em torno de 115% e os da hiperosmótica com aproximadamente 85% de hidratação (RUIZ & SOUZA, 2008). Ou seja, houve um aumento de volume na condição hiposmótica e uma redução de volume na condição hiperosmótica.

O fato de todos os tecidos terem regulado volume na condição hiposmótica indica que talvez a osmolalidade da solução salina experimental utilizada (-50% = 497 mOsm/kg de H<sub>2</sub>O) não represente um problema osmótico para esse tipo celular. Essa osmolalidade representa uma salinidade de aproximadamente 16, salinidade comumente encontrada no ambiente estuarino. Se considerarmos que as ostras coletadas no ponto 1 de cada estuário, cujas salinidades medidas foram de 22,5 no Mamanguape e 12,82 no Paraíba estavam isosmóticas à água do seu ambiente de coleta, então um estresse osmótico dessa magnitude não foi problema para essas células, que conseguiram manter a hidratação do tecido muscular. Entretanto, mesmo se considerarmos a salina -50% como “controle” para o caso dessas ostras coletadas nos pontos de salinidade mais baixa, ainda fica difícil explicar porque as células incharam e não murcharam diante das outras duas salinas (100% - 986 mOsm/kg de H<sub>2</sub>O; e +50% - 1485 mOsm/kg de H<sub>2</sub>O), que nesse caso representariam um estresse hiperosmótico para o tecido do animal.

Também, se pensarmos a respeito das ostras coletadas no ponto 2 dos dois estuários, cujas salinidades medidas foram de 32,33 no Mamanguape e 26,7 no Paraíba, e considerarmos que essas ostras estavam isosmóticas à água do seu ambiente de coleta, neste caso a salina -50% é de fato hiposmótica, a salina 100% é aproximadamente isosmótica e a salina +50% é de fato hiperosmótica em relação aos tecidos desses animais. O fato do tecido ter mantido o volume de água diante de um estresse hiposmótico não surpreende e até era esperado. Moluscos são, em geral, bons reguladores de volume celular (BERGER et al., 1978; DEATON, 1989; 1992; 2001; VEIGA, 2013), e esse resultado indica que diante de um estresse hiposmótico mecanismos membranares de transporte foram ativados o que permitiu que as células mantivessem seu volume celular e portanto o volume de água tecidual foi mantido. A literatura demonstra que realizar RVD que é um processo basicamente de extrusão de íons e alguns osmólitos orgânicos (HOFFMAN & DUNHAM, 1995; WILMER et al., 2004; MORABITO et al., 2013), pode ser considerado mais fácil do que realizar RVI que envolve além do recrutamento de íons do meio, expressão de genes de transportadores, produção de proteínas de choque térmico (ALFIERI & PETRONINI, 2007; CASTELLANO, 2012), hidrólise de proteínas e aumento no pool intracelular de aminoácidos (HOFFMAN & DUNHAM, 1995; WILMER et al., 2004; AMADO et al., 2006). Mas ainda assim o fato das células incharem nas salinas isosmótica e hiperosmótica é um resultado inesperado.

Apesar de inesperado, não é a primeira vez que esse “comportamento” celular é reportado na literatura. Castellano (2012) encontrou aumento de volume celular progressivo em células isoladas de dois tecidos (esôfago e intestino) de 4 espécies de equinodermos sob todas as soluções experimentais testadas (choques osmóticos de - 20% e - 50% de diminuição, e + 20% e + 50% de aumento, bem como nas salinas controles) e especulou sobre a possibilidade desse inchaço ocorrer por uma instabilidade inerente às células de equinodermos. Equinodermas, assim como os moluscos, são osmoconformadores, porém mais restritos ao ambiente marinho por serem estenoalinos. Entretanto, considerando nossos resultados com os moluscos bivalves nesse trabalho, um pequeno inchaço encontrado no músculo de *Octopus vulgaris* diante de uma salina isosmótica utilizando essa mesma técnica no trabalho de Amado *et al*, (2015), assim como a informação que inchaço em condições hiperosmóticas tem sido encontrado em outros osmoconformadores (dados ainda não publicados, comunicação pessoal Dra. Carolina Arruda Freire) refutam essa possibilidade apontada por Castellano (2012). Provavelmente um inchaço em condições isosmóticas ou hiperosmóticas deve-se a algum desequilíbrio nos mecanismos de regulação de volume celular por motivo ainda desconhecido. Talvez diante de um choque hiperosmótico a célula ative mecanismos de RVI de uma maneira tão intensa, o que faz com que ela “passe do ponto” de apenas restabelecer o volume perdido e comece a inchar. Segundo Hoffman & Dunham (1995), algumas células tem a capacidade de realizar RVI sem um prévio encolhimento celular, como aparentemente aconteceu no nosso meio “controle”, bem como após um choque osmótico as células aumentem o processo de captação de sal e conseqüentemente de água, levando a um inchaço maior do que o original.

Contrariando nossos resultados Veiga (2013) utilizando a mesma técnica e a mesma composição das salinas - exceto pela presença de glicina - utilizadas neste estudo, encontrou uma perfeita capacidade de regulação de água tecidual do músculo de *Crassostrea gigas* quando esse tecido foi exposto às salinas controle, hiposmótica e hiperosmótica. Entretanto, a intensidade do choque osmótico aplicado por Veiga foi menor (+30% e -30%) do que a aplicada nesse estudo.

Apesar da resposta inesperada dos tecidos de todas as ostras analisadas nesse estudo, os gráficos apresentados nos resultados demonstram que a diferença de volume dos tecidos entre as salinas, está muito maior, em torno de 20%, no

Paraíba, do que o volume dos tecidos do Mamanguape que varia em no máximo 7%. Consideramos desde o início que o Estuário do Rio Mamanguape é menos impactado, o que pode levar a entender o porquê do tecido muscular das ostras do Estuário do Rio Paraíba apresentar uma maior variação no volume, pois como sabemos a poluição doméstica que é inerente neste último estuário, traz para o corpo d'água metais pesados que podem influenciar na fisiologia de bivalves (GALVÃO et al, 2009). Portanto não podemos descartar o fato de que poluição rica em metais, pode estar influenciando nos resultados e mostrando que no Estuário Paraíba, a capacidade de regulação de volume celular esteja sendo comprometida em relação ao Estuário Mamanguape.

O nosso trabalho não avaliou a presença de metais nos tecidos, mas de acordo com a literatura esses poluentes inibem a ação de enzimas e transportadores que atuam nos mecanismos de regulação de volume celular (AMADO et al, 2012; MORABITO et al, 2013). E mesmo que os agentes químicos não estivessem nas águas do experimento, alguns trabalhos, falam sobre a acumulação de metais nos tecidos (GAINAIRE et al., 2004; VOLETY, 2008; GALVÃO et al., 2009; MORABITO et al, 2013), e portanto, não seria impossível que esse tipo de poluente tivesse atuado durante o experimento. Foi visto no trabalho de Morabito e colaboradores (2013) a inibição da regulação do volume (RVD) em nematócitos de *Pellagia notiluca*, na presença de metais, que pode estar relacionada com o co-transporte de  $\text{Ca}^{2+}$ . Amado e colaboradores (2012) identificaram que o chumbo prejudica a RVD de células branquiais de caranguejos marinhos atuando via canais de  $\text{Ca}^{2+}$  e inibindo a  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ATPase. Em células digestivas isoladas de *Mytilus galoprovincialis*, houve uma alteração na resposta homeostática quando postas em solução com o cádmio, metal pesado difundido em ambientes aquáticos, onde a  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ATPase, teria sido seu alvo (TORRE et al., 2013).

Nossos resultados dos experimentos *in vivo* e *in vitro* indicam que houve um comprometimento da RVI nas ostras coletadas no Paraíba, mas esse comprometimento ocorreu de maneiras contrárias. Aparentemente no experimento *in vivo*, as células murcharam e não conseguiram retomar ao seu volume normal, e no experimento *in vitro* as células possivelmente executaram RVI para além de simplesmente retomar o volume perdido, e começaram a inchar. É preciso ressaltar que os choques osmóticos aplicados nos dois experimentos foram de intensidades

diferentes, o desafio do músculo no experimento *in vitro* foi muito maior do que no experimento *in vivo*.

Assim é possível supor que no caso do experimento *in vitro*, a grande intensidade do choque osmótico (que corresponde a uma salinidade de ~45) ativou mais intensamente os mecanismos de RVI que foram amplificados pela presença de poluentes nos tecidos dos animais. Existem alguns registros na literatura de metais e outros poluentes como pesticidas aumentando a proteólise e conseqüentemente o pool intracelular de aminoácidos em invertebrados marinhos (KASSCHAU et al, 1980; BLASCO & PUPPO, 1999). Esse é justamente um dos mecanismos da RVI, aumentar a concentração intracelular de osmólitos orgânicos, e quanto maior a concentração de osmólitos orgânicos, maior a entrada de água na célula.

## 6. CONCLUSÃO

- Os resultados do teor de hidratação tecidual e de regulação de volume auxiliam no entendimento da tolerância das ostras à salinidade;
- De fato a poluição encontrada nos estuários parece influenciar na capacidade de regulação de volume celular, uma vez que os resultados encontrados nos pontos do Estuário Paraíba, considerado mais poluído, mostraram a dificuldade das ostras de controlar sua hidratação tecidual;
- Mais estudos são necessários, mas aparentemente distúrbios nos mecanismos de regulação de volume celular podem ser utilizados como biomarcadores de contaminação aquática.

## 7. REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE, M. C. P. et al. Influência da temperatura e da salinidade na sobrevivência e crescimento de larvas da ostra perlífera *Pteria hirundo*. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, Vol. 3, No. 38, p. 189-197, 2012.

ALFIERI R. R., PETRONINI P. G. Hyperosmotic stress response: comparison with other cellular stresses. **Pflugers Arch – European Journal Physiology**, v. 454, p. 173-185, 2007.

ALVES R. R.N., NISHIDA A. K., HERNÁNDEZ M. I. M. Environmental perception of gatherers of the crab ‘caranguejo-uçá’ (*Ucides cordatus*, Decapoda, Brachyura) affecting their collection attitudes. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v. 1, p. 10, 2005.

AMADO E. 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**, 2015.

AMADO E. M. et al. Lead hampers gill cell volume regulation in marine crabs: Stronger effect in a weak osmoregulation than in an osmoconformer. **Aquatic Toxicology**, v. 106-107, p. 95-103, 2012.

AMADO E. M., FREIRE C. A., SOUZA M. M. Osmoregulation in the freshwater red crab *Dilocarcinus pagei* (Crustacea, Decapoda), and the effect of waterborne inorganic lead. **Aquatic Toxicology**, v. 79, p. 1-8, 2006.

ANACLETO P. et al. Effects of depuration on metal levels and health status of bivalve molluscs. **Food Control**, v. 47, p. 493-501, 2015.

ANTONIO, I. G. Efeitos da salinidade e densidade de estocagem no crescimento e sobrevivência larval da ostra do mangue *Crassostrea rhizophorae* (Guilding, 1828) sob diferentes tempos de troca de água. **Ícaro Gomes Antonio**, Dissertação

(Mestrado em Recursos Pesqueiros e Aquicultura) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife/ PE, 50 p., 2007.

AUGUSTO A. S. A invasão da água doce pelos crustáceos: o papel dos processos osmorregulatórios. **Alessandra Silva Augusto**, Tese (Doutorado em Biologia Comparada) – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto/ SP, p. 148, 2005.

AZEVEDO M. A osmorregulação como biomarcador para análise do impacto de contaminantes e avaliação de regiões costeiras brasileiras. **Maristela Azevedo**, Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba/ PR, p. 94, 2005.

BEDFORD J. J. Osmoregulation in *Melanopsis trifasciata* – IV. The possible control of intracellular isosmotic regulation. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 40A, p.1015-1027, 1971.

BERGER V. Y. et al. The changes of ionic composition and cell volume during adaptation of molluscs (*Littorina*) to lowered salinity. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 60A, p. 447-452, 1978.

BLASCO J., PUPPO J. Effect of heavy metals (Cu,Cd and Pb) on aspartate and alanine aminotransferase in *Ruditapes philippinarum* (Mollusca: Bivalvia). **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology**, v. 122(2), p. 253-263, 1999.

BRITO, L. Efeito da salinidade sobre o crescimento da ostra nativa *Crassostrea* sp. como subsídio ao desenvolvimento da maricultura de espécies nativas em mar aberto. **Lineu de Brito**, Dissertação (Mestrado em Sistemas Costeiros e Oceânicos) – Universidade Federal do Paraná, Pontal do Paraná/ PR, 38 p., 2008.

BRUSCA R. C., BRUSCA G. J. Invertebrados, 2ª edição, Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2007.



BURTON R. F. The composition of animals cells: solutes contributing to osmotic pressure and charge balance. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.76B, n. 4, p. 663-671, 1983.

CASTELLANO G. C. Expressão de transportadores de membrana e de proteínas de choque térmico (HSP 70) e sua relação com o grau de eurihalinidade em equinodermos. **Giovanna Carstens Castellano**, Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal do Paraná), Curitiba/PR, p. 83, 2012.

CHRISTO, S. W. Biologia reprodutiva e ecologia de ostras do gênero *Crassostrea* Sacco, 1897 na Baía de Guaratuba (Paraná – Brasil): um subsídio ao cultivo. **Susete Wambier Christo**, Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba/ PR, p. 135, 2006.

DEATON L. E. et al. Osmoregulation and salinity tolerance in two species of bivalve mollusc: *Limnoperna fortune* and *Mytilopsis leucophaeta*. **Journal Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 133, p. 67-79, 1989.

DEATON L. E. Hyperosmotic volume regulation in the gills of the ribbed mussel, *Geukensia demissa*: rapid accumulation of betaine and alanine. **Journal Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 260, p. 185-197, 2001.

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.

DENTON D. R. W., BURDON-JONES C. Influence of temperature and salinity on the uptake, distribution and depuration of mercury, cadmium, and lead by the black-lip oyster *Saccostrea echinata*. **Marine Biology**, v. 64, p. 317-326.

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.

DOMINGOS, F.X.V. et al. Multibiomarker assessment of three Brazilian estuaries using oysters as bioindicators. **Environmental Research**, v. 105, p. 350–363, 2007.

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

FILGUEIRA, R. et al. Bivalve condition index as an indicator of aquaculture intensity: A meta-analysis. **Ecological Indicators**, v. 25, p. 215-229, 2013.

FISHER, W. S., NEWELL, R. I. E. Salinity effects on the activity of granular hemocytes of American oysters, *Crassostrea virginica*. **The Biological Bulletin** v. 170, p. 122-134, 1986.

FLORKIN M. La regulation isosmotique intracellulaire chez les invertébrés Marins. **Bulletin Academie Royal Belgique Clinical Science** v. 48, p. 687–694, 1962.

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

GAINAIRE B., GUYON-THOMAS H., RENAULT T. In vitro effects of cadmium and mercury on Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), haemocytes. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 16(4), p. 501-512, 2004.

GALVÃO P. M. A. et al. Bioacumulação de metais em moluscos bivalves: aspectos evolutivos e ecológicos a serem considerados para biomonitoração de ambientes marinhos. **Brazilian Journal Aquatic Science Technology**, v. 13, n. 2, p. 59-66, 2009.

GILLES J. H. R & JEUNIAUX C. H. Osmoregulation in molluscs of the intertidal zone. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 35A, p. 361-365, 1976.

GILLES, R. Current Topics in membranes and transport. **Cell Volume Control: Fundamental and Comparative Aspects in Animal Cells**, v. 30, p. 205-247, 1987.

HALLOWS K.F., KNAUF P.A. Principles of cell volume regulation. **In Strange K. Ed. Cellular and Molecular Physiology of Cell Volume Regulation**. CRC press: Boca Raton, 1994.

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

HOFFMANN E. K., DUNHAM P. B. Membrane mechanisms and intracellular signalling in cell volume regulation. **International Review of Cytology**, v. 161, p. 90, 1995.

JACKSON N. L. Treatise on Geomorphology. **Estuaries**, v. 10, cap 10.12, p. 308-323, 2013.

KASSCHAU M. R., SKAGGS M. M., CHEN E. C. M. Accumulation of glutamate in sea anemones exposed to heavy metals and organic amines. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 25(1), p. 873-878, 1980.

KLÔH , A. D. S. Tolerância fisiológica do bivalve *Mytella charruana*, dos cirripédios *Amphibalanus reticulatus*, *Fistulobalanus citerosum* e *Megabalanus coccopoma* e potencial invasor. **Aline dos Santos Klôh**, Dissertação (Mestrado em Ecologia e Conservação) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba/ PR, p. 52, 2011.

LANG F. et al. Functional significance of cell volume regulatory mechanisms. **Physiology Review**. v. 78, p. 247-306, 1998.

LIRA G. M. et al. Influence of seasonality on the chemical composition of oysters (*Crassostrea rhizophorae*). **Food Chemistry**, v. 138, p. 786-790, 2013.

LOPES, G. R. Crescimento da ostra-do-mangue *Crassostrea brasiliiana* (LAMARCK, 1819) cultivada em dois ambientes no estado de Santa Catarina. **Gustavo Ruschel Lopes**, Florianópolis/ SC, 32 p., 2008.

MARCELINO, R.L. Diagnóstico sócio-ambiental do estuário do Rio Paraíba do Norte – PB com ênfase nos conflitos de usos e nas interferências humanas em sua área de influência direta. **Rosalve Lucas Marcelino**, Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento e Meio Ambiente) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa/ PB, p. 99, 2000.

MONSERRAT J. M. et al. Pollution biomarkers in estuarine animals: critical review and new perspectives. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology Pharmacology**, v.146, p. 221-234, 2007.

MORABITO R., MARINO A., LA ESPADA G. Heavy metal affects regulatory volume decrease (RVD) in nematocytes isolated from the jellyfish *Pelagia noctiluca*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 165A, p. 199-206, 2013.

NETO, R. M. Influência de variáveis ambientais sobre o desenvolvimento de ostras *Crassostrea* (Sacco, 1897) na Baía de Guaratuba, Brasil. **Roberto Montanhini Neto**, Dissertação (Mestrado em Ciência Veterinária) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba/ PR, 56 p., 2011.

NISHIDA, A. K., NORDI N., ALVES R. R.N. Abordagem etnoecológica da coleta de moluscos no litoral paraibano. **Tropical Ocean**, v. 32, p. 53-68, 2004.

OEHLMAN J., SCHULTE-OEHLMAN U. Molluscs as bioindicators. **Bioindicators and biomonitors**, c. 17, p. 577-635, 2003.

PECHENIK J. A., MARSDEN I. D., PECHENIK O. Effects of temperature, salinity, and air exposure on development of the estuarine pulmonate gastropod *Amphibola crenata*. **Journal Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 292, p. 159-176, 2003.

PEDRESCHI O. et al. Effect of the salinity variation on the osmotic responses of *Crassostrea rhizophorae* (Guilding, 1828) (Mollusca-Bivalvia-Ostreidae): Physiological subsidies to cultivation. **Revista Nordestina de Biologia**, v. 18(1), p. 3-13, 2004.

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

RUIZ J. L., SOUZA M. M. Osmotic stress and muscle tissue volume response of a freshwater bivalve. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 151A, p. 399-406, 2008.

SCHLACHER T. A. et al. Fish track wastewater pollution to estuaries. **Oecologia**, v. 144, p. 570-584, 2005.

SHIMDT-NIELSEN, K. Fisiologia Animal – Adaptação e Meio Ambiente. Editora Santos, 5ª ed., 2002.

SILVA A. Z. Avaliação de biomarcadores bioquímicos na ostra-do-mangue (*Crassostrea rhizophorae*) (Mollusca:Bivalvia) exposta a óleo diesel em diferentes salinidades. **Ângela Zaccaron da Silva**, Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis/ SC, p. 148, 2004.

SILVA C. A. R. et al. Biomonitoring of trace metal contamination in the Potengi estuary, Natal (BRAZIL), using the oyster *Crassostrea rhizophorae*, a local food source. **Water Research**, v. 35, n. 17, p. 4072-4078, 2001.

SMITH JR L.H., PIERCE S.K. Cell volume regulation by molluscan erythrocytes during hypoosmotic stress: Ca<sup>2+</sup> effects on ionic and organic osmolyte effluxes. **Biology Bulletin**, v. 173, p. 407-418, 1987.

STARK, J. S. Heavy metal pollution and macrobenthic assemblages in soft sediments in two Sydney estuaries, Australia. **Australian Journal Marine Freshwater Research**, v.49, p. 533-540, 1998.

STRANGE K. Cellular volume homeostasis. **Review Advances Physiology Education**, v. 28, 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, p. 1260-1266, 2013.

VEIGA M. P. T. Fisiologia osmorregulatória em Mollusca: *Perna perna*, *Crassostrea gigas* e *Stramonita brasiliensis*. **Marcos Paulo Trindade da Veiga**, Tese (Doutorado em Ciências Biológicas – Zoologia) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba/ PR, p. 178, 2013.

VOLETY, A. K. Effects of salinity, heavy metals and pesticides on health and physiology of oysters in the Caloosahatchee Estuary, Florida. **Ecotoxicology**, p. 579-590, 2008.

WEHNER F., et al. Cell volume regulation: osmolytes, osmolyte transport, and signal transduction. **Review Physiology Biochemistry Pharmacology**, v. 148, p. 1–80, 2003.

WILLMER, P., STONE G., JOHNSTON I. Environmental Physiology of Animals, 2<sup>nd</sup> edition, Blackwell, Oxford, 2004.

WRIGHT D. A., ZAMUDA C. D. Copper accumulation by two bivalve molluscs: salinity effect is independent of cupric ion activity. **Marine Environmental Research**, v. 23, p. 1-14, 1987.