Leonardo Crisóstomo Lúcio

**Efeitos da salinidade sobre o estresse osmótico na composição
lipídica da membrana plasmática de brânquias do caranguejo
*Ucides cordatus***

**Salinity effects and osmotic stress on the lipid composition of
the gills plasma membrane of the crab *Ucides cordatus***

São Paulo

2015

Leonardo Crisóstomo Lúcio

**Efeitos da salinidade sobre o estresse osmótico na composição
lipídica da membrana plasmática de brânquias do caranguejo
*Ucides cordatus***

**Salinity effects and osmotic stress on the lipid composition of
the gills plasma membrane of the crab *Ucides cordatus***

Dissertação apresentada ao Instituto
de Biociências da Universidade de
São Paulo, para a obtenção de Título
de Mestre em Fisiologia Animal, na
Área de Fisiologia Geral.

Orientador(a): Flávia P. Zanotto

São Paulo

2015

Lúcio, Leonardo Crisóstomo

Efeitos da salinidade sobre o estresse osmótico na composição lipídica da membrana plasmática de brânquias do caranguejo *Ucides cordatus*, 88 p.

Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Fisiologia Geral.

1. Composição lipídica 2. Membrana plasmática 3. *Ucides cordatus*

I. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Fisiologia Geral.

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr.(a).

Orientador(a)

*Trabalho dedicado à Wilson Crisóstomo,
Dalvina Antonia, Maurício Lúcio,
Simone Lúcio e Murillo Gadelha,
com todo meu amor.*

Agradecimentos

Agradeço à Universidade de São Paulo, especialmente ao Instituto de Biociências (Departamento de Fisiologia Geral), por ter permitido a realização deste trabalho.

À minha orientadora, Dr^a Flávia Pinheiro Zanotto. Flávia, obrigado por acolher meu sonho. Obrigado pela orientação, dedicação, empenho e paciência. Suas qualidades vão além de ser uma exímia pesquisadora e professora.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, pelo auxílio financeiro no desenvolvimento deste trabalho.

À Dr^a Renata Guimarães Moreira, pelo espaço que me foi dado dentro de seu laboratório. Obrigado pela confiança.

Devo agradecer a Dr^a. Cristiéle Ribeiro e a Dr^a. Aline Dal Olio Gomes, que foram de uma importância incomensurável para a conclusão deste trabalho. Obrigado pelo acompanhamento e apoio até aqui.

Aos meus amigos de laboratório Priscila, Patrícia, Liv, Marina, Hermann, Jaqueline, Nílvea, Vinícius, Isa e Cassiana. Sem a companhia

diária e a ajuda de vocês eu não teria ido tão longe. Agradeço muito a solidariedade e a disposição de todos. Levarei vocês comigo, sempre.

Ao meu grande amigo Luis Henrique agradeço pela grande ajuda e pela imensa atenção que deu a este trabalho, e também pelas longas conversas, que de certa maneira nos ajudava a compreender e encontrar soluções para os nossos problemas.

À minha amiga e parceira Mariana Góes, agradeço por toda a nossa jornada até aqui. O Instituto de Biociências nos uniu e não foi por acaso. A sua amizade é muito importante pra mim.

À minha grande amiga Amanda Ribeiro, que durante todo este período esteve do meu lado, nos bons momentos e aqueles não tão bons, mas sempre com um sorriso no rosto, alegrando o dia-a-dia de qualquer um que estivesse a sua volta. Su, você é incrível.

As minhas queridas amigas e funcionárias do Departamento de Fisiologia, Jucineia, Ideilda, Elaine e Roseli. Vocês são muito especiais. Agradeço muito por toda ajuda, competência e bom humor que sempre tiveram. Deus coloca pessoas iluminadas em nossos caminhos para facilitar a nossa jornada; tenho certeza que vocês são essas pessoas.

À minha família, sou muito abençoado por acordar e vê-los dia após dia; vocês são a maior benção e graça da minha vida.

Índice

I. Introdução	9
1. Manguezal	9
2. Crustáceos	11
3. <i>Ucides cordatus</i>	12
4. Bânquias	13
5. Balanço hídrico	15
6. Osmorregulação	18
7. Na ⁺ -K ⁺ - ATPase	21
8. Membrana Plasmática	23
9. Fosfolipídios	25
10. Fatores ambientais	32
II. Materias e Métodos	
1. Coleta e manutenção dos animais	35
2. Desenho experimental	36
3. Coleta dos tecidos	37
4. Análise dos ácidos graxos	37
5. Cromatografia de camada delgada (Separação de clases)	37
6. Metilação e Cromatografia gasosa	38
7. Osmolalidade total	39
8. Na ⁺ -K ⁺ -ATPase	40

9. Análise estatística	42
III. Resultados	43
1. Teste 6 horas	43
1.1. Osmolalidade	43
1.2. Ácidos graxos	44
2. Teste 120 horas	47
2.1. Osmolalidade	47
2.2. Ácidos graxos	51
3. Na ⁺ -K ⁺ -ATPase	60
IV. Discussão	62
V. Conclusões	67
VI. Resumo	69
VII. Abstract	71
VIII. Referências bibliográficas	73

I. Introdução

1. Manguezal

O manguezal define-se por ser um ecossistema em que consiste em plantas/árvores que crescem na interface entre a terra e o mar, em latitudes tropicais e subtropicais, e está entre os ecossistemas mais produtivos do mundo que enriquece as águas costeiras. As plantas do mangue se encontram, em geral, associadas a microorganismos e fungos. As plantas, junto com os animais, constituem a comunidade da floresta do mangue, e esta comunidade, em conjunto com fatores abióticos, constituem o ecossistema do mangue, o qual, por sua vez, encontra-se exposto a condições de alta salinidade, extremo de marés, ventos fortes, altas temperaturas e umidade, bem como solo anaeróbio (KATHIRESAN & BINGHAM, 2001).

As florestas de manguezais são ecossistemas produtivos encontrados ao longo da zona costeira do Brasil até Santa Catarina, e constituem fontes de materiais aproveitáveis pelo homem, tais como madeira, produtos medicinais, corantes naturais, peixes, crustáceos e moluscos. Para as populações ribeirinhas do nordeste brasileiro, os caranguejos *Brachyura* constituem a maior fonte econômica dessas populações, e as principais

espécies comercializadas são: caranguejo guaiamum (*Cardisoma guamhumi*), siri (*Callinectes spp*) e o caranguejo-uça (*Ucides cordatus*) (ALVES *et al.*, 2005).

Uma das principais características de áreas estuarinas, mangues e lagos costeiros é a variação da concentração de oxigênio no ambiente, que afeta direta e indiretamente os organismos de modo geral. A capacidade de tolerar variações da concentração de oxigênio no ambiente é um dos pré-requisitos para os organismos viverem em tais habitats (MACIEL *et al.*, 2008), uma vez que os estuários são, também, ambientes transitórios entre água salgada e doce, apresentando grandes flutuações de salinidade e temperatura, sendo o mangue um ambiente caracterizado por flutuações periódicas de salinidade, temperatura e exposição ao ar. A sobrevivência de organismos em tal ambiente favoreceu a evolução de mecanismos comportamentais e/ou fisiológicos para minimizar os efeitos dessas alterações (BAMBER & DEPLEDGE, 1997; VITALE *et al.*, 1999). Nesses habitats ocorre uma grande diversidade de espécies, como animais osmorreguladores – caranguejos eurialinos, os quais sobrevivem em um ambiente físico geralmente hostil devido à baixa salinidade ou flutuação desta. Tais habitats são locais de poluição de origem antropogênica, provocada por compostos, como metais (LUCU & TOWLE, 2003).

As regiões estuarinas e costeiras recebem despejos de poluentes, tanto de fontes específicas quanto de não específicas. Os portos marítimos, em especial as cidades costeiras ou outras áreas industriais que se encontram ao longo da costa, recebem despejos crônicos de metais (FERRER *et al.*, 2006) e os mangues, devido à sua proximidade a centros populacionais e regiões industrializadas, têm recebido, constantemente, dejetos contendo metais. Como consequência, os sedimentos podem ser fontes significativas de contaminação por esses metais (RIVAL *et al.*, 1996; TAM & YAO, 1998; KATHIRESAN & BINGHAM, 2001).

2. Crustáceos

Os crustáceos formam um grupo muito diverso de organismos que ocorre em uma ampla variedade de ambientes, incluindo água doce, marinha e ambiente terrestre. O grande número de espécies encontradas nestes ambientes tão distintos entre si é, em grande parte, decorrente de uma plasticidade fisiológica observada nesse grupo taxonômico como um todo (AHEARN *et al.*, 1999; MARTINEZ *et al.*, 1999). As mudanças funcionais observadas nesses organismos envolvem adaptações das células epiteliais encontradas nas brânquias, tegumento, hepatopâncreas e glândula antenal, permitindo, desse modo, a regulação feita pelo animal para a passagem de moléculas e íons entre o meio externo e a hemolinfa. Tais

adaptações podem ocorrer à nível molecular, celular ou tecidual, e tais especializações teciduais podem ser modificadas por meio de controle hormonal sistêmico (AHEARN et al., 1999; MARTINEZ et al., 1999; RINDERHAGEN *et al.*, 2000).

3. *Ucides cordatus*

O caranguejo *Ucides cordatus* é uma espécie semi-terrestre, habitante exclusivamente da área de manguezais, distribuindo-se no Atlântico Ocidental, desde a Flórida até o Uruguai, e ilhas do Caribe (NORDHAUS, 2003). Estes animais constroem tocas no sedimento do manguezal, com aproximadamente 2 m de profundidade durante as marés baixas, protegendo-se contra predadores e a dessecação (NORDHAUS, 2003; CASTILHO-WESTPHAL *et al.*, 2008). Alimentam-se de folhas do mangue, que são coletadas e consumidas diretamente ou armazenadas em suas tocas. Este processo de consumo direto das folhas contribui para a diminuição do aporte de matéria orgânica para o estuário, preservando assim os nutrientes presentes no mangue (NORDHAUS, 2003). Dessa forma, o *Ucides cordatus* desempenha uma importante função na degradação das folhas através do processo de digestão voltando ao ambiente parcialmente digeridas, em forma de matéria orgânica fecal. Nesta condição o consumo é facilitado aos organismos detritívoros,

auxiliando a colonização de microorganismos, e acelerando o ciclo de nutrientes no interior do manguezal (NORDHAUS, 2003).

4. Brânquias

Crustáceos da região estuarina apresentam, como resultado do processo de seleção natural, diversos mecanismos de regulação para viver entre os ambientes aquático e terrestre, e são conhecidos como organismos hiperosmorreguladores ou hiper-hipoosmorreguladores. Nos dois casos, suas brânquias apresentam diversas modificações morfofisiológicas. Muitos órgãos se encontram envolvidos na osmorregulação dos crustáceos, incluindo, além das brânquias, a glândula antenal, parte do intestino e o hepatopâncreas (TSAI & LIN, 2007). A perda de íons por difusão devido ao aumento da permeabilidade das brânquias pode explicar a menor habilidade de algumas espécies em osmorregular, o que lhes impõe um limite para a invasão do ambiente de água doce, em contraste com o que ocorre em espécies hiperosmorreguladoras, as quais são aptas a invadir esse ambiente (LUCU & TOWLE, 2003).

As brânquias são apêndices modificados dos epipoditos, apresentando uma fina cutícula e ampla superfície de contato, as quais facilitam as trocas gasosas (RINDERHAGEN *et al.*, 2000). Essas características permitem que ocorra um contato íntimo das brânquias com a água do meio externo, facilitando, também, a regulação iônica e osmótica,

bem como a excreção de produtos do metabolismo, funções estas relacionadas entre si (WOOD, 1992; MARTINEZ *et al.*, 1999, BHAVAN & GERALDINE, 2000; LUCU & TOWLE, 2003; MONTEIRO *et al.*, 2005; ROMANO & ZENG, 2007; YANG *et al.*, 2007). Tais funções estão presentes tanto em crustáceos osmorreguladores quanto osmoconformadores (REBELO *et al.*, 2000), possuindo importante papel na osmorregulação dos crustáceos aquáticos (TSAI & LIN, 2007). As brânquias estão expostas ao ambiente externo e, conseqüentemente, expostas diretamente à água contaminada por poluentes (BURY *et al.*, 1999; McGEER *et al.*, 2000; WU & CHEN, 2004; MONTEIRO *et al.*, 2005; ROMANO & ZENG, 2007).

Para os caranguejos, quanto mais terrestre é a espécie, menor é o número de pares de brânquias (GRAY, 1957; HAWKINS & JONES, 1982). A área de superfície das brânquias aumenta conforme os caranguejos se desenvolvem (de juvenis a adultos), com um aumento progressivo da área de superfície de cada lamela branquial, e não no número total de lamelas. Conforme o caranguejo cresce, há o aumento da área de superfície de suas brânquias, porém não é diretamente proporcional ao aumento da massa corpórea. As áreas massa-específicas (área dividida pela massa corpórea) das brânquias são maiores em caranguejos aquáticos e menores em caranguejos terrestres. A redução do número de brânquias

também está relacionada com a redução da atividade e necessidade de oxigênio. No entanto, de acordo com TAYLOR & TAYLOR (1992), a relação entre tamanho das brânquias e habitat, ou atividade, é mais bem relacionada com a área de superfície do que com o número de brânquias.

Os crustáceos brachiuros decápodes apresentam dois tipos de brânquias: (i) anterior — epitélio com espessura de 1-5 μm , sobressaindo para o espaço da hemolinfa e responsável pelas trocas gasosas; (ii) posterior — epitélio mais espesso, com 10-20 μm , constituído por células denominadas ionócitos, devido as suas funções ionorregulatórias. Estas células possuem sistemas de folhetos apicais bem desenvolvidos, alternando com os espaços subcuticulares extracelulares. Entre estes folhetos e acima deles há um grande número de mitocôndrias e invaginações profundas, localizadas na membrana basolateral, com mitocôndrias associadas ao transporte iônico ativo (REBELO *et al.*, 2000; TSAI & LIN, 2007). Segundo PIFFER e colaboradores (1995), as brânquias anteriores são responsáveis pelas trocas gasosas, além de exercer indispensável função no transporte de ferro e cobre (YANG *et al.*, 2007), enquanto as posteriores são responsáveis pela regulação iônica e osmótica (TOWLE & WEIHRAUCH, 2001); MARTINS *et al.*, 2011).

5. Balanço hídrico

A transição da vida aquática para a vida terrestre foi um evento que esteve presente em vários momentos da evolução. Um grande número de invertebrados ocupa nichos ecológicos na interface água – terra e estes animais são capazes de se manter, ao menos temporariamente, em ambos ambientes (TRUCHOT, 1990). A água salobra é extremamente importante com implicações do ponto de vista fisiológico, pois representa uma barreira para a distribuição de muitos animais marinhos, assim como para animais de água doce, e também constitui uma transição interessante entre habitats marinhos e de água doce. Em dimensões geográficas, entretanto, a água salobra cobre menos de 1% da superfície terrestre (SCHIMIDT- NIELSEN, 2002).

A manutenção de concentrações constantes de água e soluto varia com o meio e é completamente diferente na água do mar, na água doce e no ambiente terrestre. Portanto, os animais que vivem nesses diferentes ambientes apresentam mecanismos específicos de regulação capazes de manter concentrações constantes e apropriadas em um limite bastante estreito para garantir a sua sobrevivência. Ou seja, apresentam mecanismos de regulação que garantam a homeostase do organismo (SCHIMIDT – NIELSEN, 2002).

O equilíbrio ou balanço iônico nos tecidos é de grande importância fisiológica. Certos elementos minerais, como sódio e potássio, são

importantes para a manutenção do equilíbrio ácido-base e da regulação osmótica. Por outro lado, outros minerais se encontram presentes em compostos de importância fisiológica, como o iodo na tiroxina, o ferro na hemoglobina e o cobre na hemocianina (HARPER *et al.*, 1982). Assim, como a relação entre cálcio e ferro é importante para uma ossificação normal, a relação entre potássio e cálcio no fluido extracelular também deve ser mantida para garantir a atividade normal do músculo. Portanto, nos organismos de um modo geral, parece existir um balanço fino para a manutenção de elementos minerais principais e elementos traços essenciais. Todos os elementos essenciais são tóxicos quando sua ingestão é aumentada significativamente em relação às necessidades diárias da dieta, as quais são muito variáveis entre os diferentes organismos (HARPER *et al.*, 1982).

Os íons metálicos alcalinos como magnésio, cálcio, sódio e potássio são importantes componentes estruturais e responsáveis por muitas funções fisiológicas, como a osmorregulação. Esses íons são principalmente provenientes da alimentação e da absorção, e esta, no caso de crustáceos, pode ocorrer através da superfície corporal de larvas e juvenis, devido à maior permeabilidade do exoesqueleto. Já nos indivíduos adultos, a absorção de íons metálicos ocorre durante o processo de muda e também

durante todo o período de intermuda, com gasto de energia pelas brânquias (RAINBOW, 1988).

6. Osmorregulação

Durante a evolução, os organismos aquáticos e terrestres desenvolveram diversas estratégias para a manutenção do balanço de íons provenientes do meio externo. As células selecionam os íons necessários para o seu desenvolvimento e excluem aqueles que não o são mantendo, durante a vida adulta, as concentrações iônicas em uma situação considerada ideal para cada animal (PERALES-VELA e col., 2006). A história evolutiva dos crustáceos inclui uma radiação muito ampla do ambiente marinho para a água salobra e doce assim como para o ambiente terrestre (LUCU & TOWLE, 2003). A regulação da concentração total interna de soluto em um nível diferente daquele do meio externo é um pré-requisito para a invasão do ambiente terrestre. Um epitélio com capacidade osmorregulatória pode ocorrer em diferentes estágios do desenvolvimento e em diferentes locais, usualmente em órgãos da câmara branquial (LUCU & TOWLE, 2003).

Os crustáceos apresentam vários tipos de estratégias osmorregulatórias podendo ser: osmoconformadores (não regulam a osmolalidade de seus fluidos, conformando-se à osmolalidade do meio) ou osmorreguladores (mantém a sua osmolalidade interna razoavelmente constante, independentemente do meio em que estão imersos). Entre os Crustáceos Decápodos, encontram-se desde animais marinhos eurialinos com pouca ou nenhuma capacidade osmorregulatória, portanto tolerantes a pequenas variações de salinidade, até animais estuarinos eurialinos capazes de tolerar grandes variações de salinidade do meio, e com mínimas alterações da concentração osmótica da hemolinfa (GILLES & DELPIRE, 1997; GILLES, 1997). De acordo com GILLES & DELPIRE (1997), crustáceos eurialinos apresentam dois mecanismos básicos para enfrentar um estresse osmótico: (a) regulação anisosmótica do fluido extracelular, a qual implica no controle da osmolalidade da hemolinfa independente da osmolalidade do meio externo; (b) regulação isosmótica do fluido intracelular, o que implica em um controle da osmolalidade do fluido e do volume intracelular, com o objetivo de mantê-lo isosmótico em relação ao extracelular.

O processo de regulação anisosmótica do fluido extracelular resulta de um balanço entre os fenômenos de efluxo e influxo de efetores osmóticos, principalmente íons e água. Os principais componentes

fisiológicos desse balanço entre os efetores osmóticos e a água são a permeabilidade da superfície corporal e o transporte ativo, principalmente nas brânquias, trato intestinal e órgãos excretores (GILLES & DELPIRE, 1997; GILLES, 1997).

O termo regulação isosmótica do fluido intracelular defini os mecanismos responsáveis pelo ajuste ativo da pressão osmótica intracelular em relação a novas pressões osmóticas dos fluidos corpóreos, impedindo assim grandes alterações na concentração intracelular.

Várias adaptações permitiram aos crustáceos eurialinos ocuparem habitats estuarinos e dulciaquículas: 1) redução da concentração dos líquidos corporais até valores compatíveis com a função celular; 2) redução da ingestão de água; 3) redução da permeabilidade do tegumento; 4) aumento da excreção de água através da glândula antenal; 5) presença de sistemas de transporte ativo de solutos. Por meio dessas estratégias os gastos energéticos para a manutenção de gradientes osmóticos iônicos elevados são reduzidos (MANTEL & FARMER, 1983; GILLES & DELPIRE, 1997).

Os problemas associados à manutenção de concentrações internas constantes de água e soluto variam com o meio e são completamente diferentes na água do mar, água doce e ambiente terrestre (SCHIMIDT-NIELSEN, 2002). Os animais podem minimizar as dificuldades

relacionadas com as diferenças de concentrações interna e externa por meio da redução da (i) permeabilidade e (ii) dos gradientes de concentração entre os fluidos corpóreos e o meio externo (SCHIMIDT-NIELSEN, 2002).

A salinidade é um dos principais fatores a exercer pressão seletiva nos organismos aquáticos. Seus níveis e variações têm impacto na composição da osmolaridade dos fluidos corporais dos animais e as espécies que são capazes de osmorregular de maneira eficaz são geralmente eurialinas (LUCU *et al.*, 2000).

A cutícula, a qual recobre as brânquias e o epitélio do epipodito, é considerada como uma barreira seletiva para o movimento catiônico e aniônico. Tal seletividade é mais expressa em crustáceos hiperosmorreguladores, como o caranguejo *Eriocheir* sp e *Carcinus* sp, e menos expressa em osmoconformadores, como o caranguejo *Maja squinado* e o lagostim *Nephrops norvegicus* (LUCU *et al.*, 2000). As células epiteliais das brânquias, hepatopâncreas, glândula antenal e tegumento dos crustáceos controlam os movimentos de cátions e ânions entre a hemolinfa e o meio ambiente, e ao fazê-lo regulam a atividade iônica e osmótica, a acidificação gástrica, a ecdise e a detoxificação de metais (MARTINEZ *et al.*, 1999).

Durante o processo evolutivo, para alguns grupos taxonômicos, ocorreu aumento da independência de flutuações existentes no ambiente

externo. Tal adaptação se deu por meio de uma diminuição da permeabilidade da superfície corpórea à água ou solutos, restrições na taxa de influxo e perda de íons e incremento da habilidade da tomada de iônica através do ajuste das funções de transporte iônico para as células do animal (LUCU & TOWLE, 2003).

7. Na⁺-K⁺- ATPase

Os gradientes elevados de concentração de sódio e potássio existentes através das membranas celulares são mantidos pela atividade de uma ATPase que requer energia para transportar sódio para fora da célula em troca do potássio. A energia para este transporte é fornecida pelo ATP gerado durante as reações metabólicas celulares, onde três íons sódio são bombeados para fora e dois íons potássio para dentro da célula, para cada molécula de ATP hidrolisada à ADP (adenosina trifosfato) e fosfato inorgânico (SCHIMIDT-NIELSEN, 2002).

Em animais hiperosmorreguladores, as brânquias constituem uma interface seletiva a qual absorve ativamente íons sódio e cloreto do meio externo diluído, onde a Na⁺-K⁺- ATPase é a molécula chave para este processo (MASUI *et al.*, 2003). A atividade desta ATPase parece estar ligada à captação pelos tecidos de uma variedade de solutos. Para tal, moléculas transportadoras facilitam o co-transporte específico e

compulsório do sódio e da molécula do soluto considerado para cada situação (SCHIMIDT-NIELSEN, 2002).

Membro de uma família de P-ATPases, a $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -ATPase transforma a energia química do ATP que impulsiona o transporte iônico, gerando um gradiente eletroquímico de sódio e potássio através das membranas celulares (GEERING, 2000; JORGENSEN & PEDERSEN, 2001). A enzima consiste numa cadeia α contendo um sítio de ligação de ATP, um sítio de fosforilação e ligação de resíduos e aminoácidos e uma cadeia β que atua como chaperona molecular para o correto empacotamento da cadeia α , quando necessário (MASUI e col., 2003).

A $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -ATPase, possui função essencial nos processos de demanda de energia, nas brânquias. Esta bomba foi primeiramente identificada em homogeneizado de tecido nervoso de *Carcinus maenas* por SKOU, em 1960, quando este descreveu a atividade de hidrólise de ATP, dependente da presença simultânea de sódio e potássio (LUCU & TOWLE, 2003). A $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -ATPase se encontra posicionada para bombear íons sódio do citosol, através da membrana basolateral, para o fluido extracelular, em troca de íons potássio, que se movem na direção oposta (LUCU & TOWLE, 2003).

A atividade de muitas proteínas de membrana, como a $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -ATPase, é modulada de acordo com as mudanças na composição dos

ácidos graxos presentes nos fosfolipídios de membrana (CROCKETT & HAZEL, 1997). Estes, por sua vez, são diretamente influenciados por fatores ambientais como salinidade, temperatura e pressão.

8. Membrana Plasmática

A membrana plasmática é a responsável por separar o meio intracelular do extracelular e regula a entrada e saída de partículas e substâncias da célula. O isolamento que a membrana plasmática promove é graças aos lipídios, proteínas e hidrocarbonetos presentes em sua composição. Em geral, a membrana celular é constituída por uma bicamada fosfolipídica com uma espessura de aproximadamente 5nm, responsável pela entrada e saída de partículas, protegendo o material do interior da célula para que não se misture com o exterior (JUNQUEIRA, 2005).

Os lipídios encontrados nas membranas são os principais responsáveis pela sua estrutura. Eles apresentam uma extremidade hidrofílica (solúvel em água) e outra hidrofóbica (não solúvel em água), e devido a essa formação são chamados de moléculas anfipáticas. Esses lipídios apresentam um grupo fosfato em sua composição e por isso são chamados de fosfolipídios (JUNQUEIRA, 2005).

Adaptações bioquímicas na hemolinfa de crustáceos eurialinos hiperosmóticos a ambientes hiposmóticos são realizadas através de alterações morfológicas na região apical e basolateral de membranas nas brânquias posteriores (BARRA *et al.*, 1983; COMPERE *et al.*, 1989; CHARMANTIER, 1998; HAONS *et al.*, 1998). Em caranguejos hiperosmóticos aclimatados em baixa salinidade, as mitocôndrias das brânquias tornam-se mais abundantes e íntimas em associação às invaginações da membrana (GOODMAN e CAVEY, 1990; LUQUET *et al.*, 2002) como também um aumento da atividade de oxidação do citocromo e alanina, que faz com que forneça um maior transporte de íons (PRESSLEY & GRAVES, 1983; WELCOMME & DEVOS, 1988).

9. Fosfolipídios

Os fosfolipídios são os componentes mais importantes das membranas celulares. As moléculas de fosfolipídios e proteínas podem se mover livremente nessas membranas, mantendo-se em constante reorganização (JUNQUEIRA, 2005).

Em animais eurialinos, o estudo do metabolismo dos fosfolipídios em fígado ou hepatopancreas; músculo e plasma ou hemolinfa baseia-se em modificações do ambiente, que podem contribuir para o entendimento do

papel da reorganização da membrana após uma mudança abrupta de salinidade e/ou temperatura (ZWINGELSTEIN e ABDUL, 1977; 1978). Durante alterações nas condições ambientais, a regulação osmótica em peixes e crustáceos requer mudanças na localização e atividade de enzimas ligadas a esses processos regulatórios (COMPERE *et al*, 1989; HOOTMAN e ERNST, 1984).

Os fosfolipídios, que são moléculas anfipáticas, tem um papel primordial para construir uma barreira intra e extra-celular de íons e solutos e de proporcionar um apropriado ambiente molecular para construção dessas novas membranas (CHAPMAN *et al*, 1982). Os fosfolipídios também tem um importante papel nas proteínas de membrana e podem modular atividades enzimáticas (HAZEL, 1972; FOURCANS & JAIN, 1974; SMITH & MILLER, 1980; VOELKER, 1984).

Os fosfolipídios formam um grupo misto de substâncias amplamente classificados em dois tipos: os fosfoglicerídeos e os esfingolipídios. Os esfingolipídios são derivados de um amino-alcool, possuindo um grupo polar, um ácido graxo e uma base esfingóide, que é uma longa cadeia hidrocarbônica derivada do d-eritro-2-amino-1,3-diol. Os fosfoglicerídeos são ésteres do glicerofosfato – um derivado fosfórico do glicerol. Os fosfoglicerídeos são componentes cruciais na manutenção da integridade estrutural e fisiológica das membranas celulares (CHAPELLE, 1986). É

relatado que brânquias de crustáceos são ricas em fosfatidilcolina (PC), fosfatidilserina (PS), fosfatidiletanolamina (PE) e difosfatidilglicerol (DPG) e são abundantes na longa cadeia de ácidos graxos poliinsaturados (20:4 e 20:5) (CHAPELLE & ZWINGELSTEIN, 1984). O PE apresenta uma carga negativa em pH neutro (ROJAS & TOBIAS, 1965) e a atividade da NKA na membrana plasmática depende, ou é modulado por lipídios negativamente carregados (SANDERMANN, 1978).

A formação de fosfatidiletanolamina como um possível regulador do transporte de sal em brânquias e intestino do peixe *Oncorhynchus mykiss* tem sido relatado (HANSEN *et al.*, 1995). Já na enguia européia (*Anguilla anguilla*) há uma maior porcentagem de fosfatidilserina e esfingomielina em órgãos osmorregulatórios. Além disso, as brânquias e intestinos de tais enguias, apresentam uma maior taxa de fosfatidiletanolamina do que fosfatidilcolina. (ZWINGELSTEIN *et al.*, 1975)

Sabe-se que adaptações a água do mar ou a água doce causam alterações importantes no metabolismo de glicerofosfolípidios (ZWINGELSTEIN e BODENNEC, 1998; ZWINGELSTEIN *et al.*, 1998a, b) e esfingolípidios (BABILI *et al.*, 1996). Tais mudanças fazem parte de mecanismos bioquímicos adaptativos que ocorrem em resposta ao estresse ambiental, provavelmente para que o animal mantenha suas funções celulares ideais (BODGANOV & DOWHAN 1999; DOWHAN &

BOGDANOV 2009). Alguns autores sugerem que os lipídios do hepatopâncreas não são mobilizados durante o estresse hiperosmótico em caranguejos eurialinos (LUVIZOTTO-SANTOS *et al.*, 2003), mas segundo ZWINGELSTEIN *et al.* (1998b), tais conclusões desses autores foram baseadas na quantificação total dos lipídios do hepatopâncreas dos caranguejos submetidos a salinidade. A quantificação dos lipídios totais não pode servir de embasamento para as supostas mudanças dinâmicas que podem ocorrer no metabolismo de lipídios individuais durante a adaptação osmótica, ainda segundo ZWINGELSTEIN *et al.* (1998b).

Mudanças na osmorregulação em ambiente aquático geram modificações na composição lipídica da membrana (particularmente o conteúdo dos fosfolipídios) na extremidade do mesmo, visto em intestino de truta (LERAY *et al.*, 1984). Além disso, diferenças na composição dos ácidos graxos têm sido observadas em órgãos osmorreguladores de peixes submetidos à água doce e água do mar (BORLONGAN & BENITEZ, 1992; HANSEN *et al.*, 1995). Estresse hiposmótico pode alterar morfológicamente a nível tecidual bem como mudanças bioquímicas e fisiológicas em células, incluindo alterações de membrana e citoplasma. Durante o estresse hiposmótico em organismos aquáticos, a regulação do volume celular depende de rápidas mudanças de transporte de íons na membrana plasmática. Após o aumento de Cl^- , K^+ e efluxo de água, pelos

seus respectivos canais, a osmolalidade intracelular é regulada (HOFFMANN, 2000) por essa redução de íons, junto com influxo de água que restaura o volume celular.

Evidências sugerem que também o DPG pode ser responsável pelo aumento da fluidez de membranas biológicas e tem a capacidade de regular a atividade de ATPases (IANNUOU & COLDING, 1979; SANTIAGO *et al.*, 1973; YAMAUCHI *et al.*, 1981). Por outro lado, o aumento da proporção do PE também pode aumentar a insaturação e fluidez da membrana. O PE é geralmente o mais insaturado dos fosfolipídios de animais marinhos (CHAPELLE, 1978; HAZEL, 1979). Interessantemente, várias observações sugerem que a NKA requer íntima associação fosfolipídica na membrana para uma completa atividade hidrolítica (CHAPELLE & ZWINGELSTEIN, 1984). Em geral, alterações nos lipídios de membrana aumentam a fluidez da mesma e tende a aumentar a atividade da $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPase. As brânquias posteriores de crustáceos, responsáveis pela osmorregulação, possuem mais fosfolipídios insaturados e suas membranas são mais fluidas no caranguejo *Eriocheir sinensis*. Postula-se que a formação do DPG nas brânquias posteriores é um indicador de um aumento da síntese de mitocôndrias, tendo como principal função produzir a energia necessária para a absorção de Na^+ . Aparentemente existe também uma correlação entre a quantidade de

renovação de PS e a atividade da $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ em brânquias posteriores de *Eriocheir sinensis* adaptados à água doce (CHAPELLE & ZWINGELSTEIN, 1984).

A influência da mudança de salinidade na composição da membrana nas brânquias de peixes não possui muitos estudos significativos. CROCKETT (1999) não encontrou nenhuma mudança significativa na composição lipídica da brânquia de enguia (*Anguilla anguilla*) após aclimação da mesma a água do mar e concluiu que a reestruturação lipídica das brânquias não é responsável pelo aumento da atividade da $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ nesta espécie. Contudo, estudos com *Poecilia* (DAIKOKU *et al.*, 1982) e trutas (PAGLIARANI *et al.*, 1991) mostram alterações no conjunto da composição lipídica após exposição à água do mar.

Se a alteração da salinidade altera a composição lipídica nas brânquias de algumas espécies de peixes, também pode levar a uma modulação da atividade da $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ nas brânquias. Portanto, o mecanismo de regulação da atividade desta enzima nas brânquias pode variar entre as espécies de peixes. Fortes osmorreguladores podem ser capazes de hiper-regular a atividade da $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ exclusivamente aumentando o número de proteínas, enquanto osmorreguladores mais fracos contam com aumento limitado do número de enzimas acompanhado por manipulações ambientais para que possa permitir a máxima atividade

da enzima, (BYSTRIANSKY e BALLANTYNE, 2007) além de precisarem de um tempo de exposição mais longo a salinidade para se adaptarem a tal mudança (HOAR, 1976; 1988).

MORRIS e colaboradores (1982) demonstraram uma certa correlação entre a aparente permeabilidade à água e a proporção de ácidos graxos insaturados presentes nas brânquias dos crustáceos anfípodas eurialinos *Cammarus duebeni*. DAKIKOKU e colaboradores (1982) relataram que em tecidos de *Poecilia reticulata*, o PE e a proporção de ácidos graxos poliinsaturados para ácidos graxos saturados aumentaram na adaptação à água do mar. Desse modo, o metabolismo não só dos fosfolipídios, mas também da $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -ATPase e outros transportadores ligados a membrana podem mudar sua atividade após aclimação a diferentes salinidades (GILLES, 1975). Estudos mostraram que o colesterol também regula a permeabilidade das membranas biológicas, afetando a viscosidade interna e de movimento molecular dos lipídios da membrana (DEMEL e De KRUYFF, 1976). Além disso, há uma ligação direta entre íons e processo de transporte de carga negativa e fosfolipídios insaturados de membrana. Foi observado que um tipo de ácido graxo insaturado, o linoléico, deve contribuir para as ligações duplas dos ácidos graxos e também pode ser considerado como um fator que afeta o comportamento

mais flexível e menos estável do sistema de membranas em brânquias posteriores (CHAPELLE & ZWINGELSTEIN, 1984).

Embora moléculas de fosfolipídios serem os principais constituintes da bicamada lipídica da membrana, outras moléculas lipídicas como colesterol e grandes cadeias de triglicérides e diglicerídeos contribuem para a manutenção do estado físico da membrana (ROY *et al.*, 1997).

10. Fatores ambientais

Muitos animais ectotérmicos respondem às alterações ambientais com adaptações de propriedades físicas em suas membranas como meio de preservar a integridade funcional e estrutural para o novo ambiente. Essa forma de adaptação é chamada de “adaptação homeoviscosa” e sua eficácia se estende para todas as células que podem variar dentre os diferentes tecidos (BUDA *et al.*, 1994, LEMIEUX *et al.*, 2008). As mudanças na

composição das membranas incluem: 1) o tipo e a quantidade de ácidos graxos insaturados; 2) a mistura de espécies moleculares compreendidas numa determinada classe de fosfolipídio; 3) o tamanho, hidrofobicidade e carga das cabeças dos fosfolipídios; 4) o balanço entre a estabilidade bilateral e a desestabilização dos lipídios; 5) a proporção de plasmalogênios e 6) a quantidade de colesterol inserido na membrana (HAZEL *et al.*, 1989).

De fato as membranas celulares são os sistemas lipídicos mais estudados em diversos contextos biológicos, tais como, adaptações às mudanças de temperatura, desidratação, dieta e suas correlações com a taxa metabólica dos animais e com a atividade de diferentes enzimas (HAZEL, 1989). Além disso, os ácidos graxos possuem grande importância como precursores de eicosanóides (prostaglandinas e leucotrienos) e sendo parte integrante das lipoproteínas (BELL *et al.*, 1986). As longas cadeias de ácidos graxos polinsaturados presentes nas membranas plasmáticas de todos os vertebrados são originadas no fígado e transportadas para os tecidos através da corrente sanguínea (BUDA *et al.*, 1994). Estes compostos desempenham um papel significativo na bioquímica das membranas e têm um impacto direto sobre processos mediados por estas, tais como osmorregulação, assimilação de nutrientes e transporte (RATNAYAKE e ACKMAN, 1979, LINKO *et al.*, 1985).

A atividade de muitas proteínas de membrana é modulada de acordo com as mudanças na composição dos ácidos graxos presentes nos fosfolipídios, como exemplo, a proporção de ácidos graxos monoinsaturados tende a ser maior em organismos com baixas taxas metabólicas, com menor quantidade de proteína de membrana (CROCKETT e HAZEL, 1997). Dentre as proteínas de membrana, sabe-se que os canais iônicos podem ter sua atividade modulada pelo perfil de ácidos graxos dos fosfolipídios (STUART *et al.*, 1998). Reduções em alguns canais correlatos com mudanças nos padrões de composição de fosfolipídios mitocondriais sugerem uma relação entre os ácidos graxos específicos na permeabilidade de determinados prótons em membranas intactas (STUART *et al.*, 1998).

Sabe-se que o estresse salino acarreta alterações de grande impacto no metabolismo dos fosfolipídios de membranas plasmáticas (BABILI *et al.*, 1996). Tais mudanças fazem parte de mecanismos bioquímicos adaptativos que ocorrem frente ao estresse ambiental, provavelmente para que o animal mantenha suas funções celulares ideais (BODGANOV & DOWHAN, 1999); DOWHAN & BOGDANOV, 2009). O estresse salino também impõe alterações na regulação osmótica em crustáceos, provocando mudanças na localização e atividade de enzimas ligadas a esses processos regulatórios (COMPERE *et al.*, 1989; HOOTMAN & ERNST,

1984). Os fosfolipídios, que são moléculas anfipáticas, possuem um papel primordial para construir uma barreira intra e extra-celular de íons e solutos e proporcionar um ambiente molecular apropriado para a construção de novas membranas (CHAPMAN *et al.*, 1982).

O objetivo deste trabalho é elucidar a conformação dos fosfolipídios de membrana, no que tange aos ácidos graxos destes, em animais submetidos a diferentes salinidades, utilizando como modelo um caranguejo eurialino, *Ucides cordatus*, que é exposto naturalmente as variações de salinidade no estuário, tornando este animal um modelo ideal para o estudo da regulação dos ácidos graxos nos fosfolipídios de membrana, visto que estes desempenham um papel fundamental na permeabilidade iônica.

II. Materiais e Métodos

1. Coleta e aclimação dos animais

Os espécimes de *Ucides cordatus*, machos adultos, foram coletados no manguezal do município de Itanhaém, que se localiza na região litorânea estuarina de São Paulo (46° 47' 15" Oeste e 24° 11' 08"). Os animais foram transportados até o biotério do Departamento de Fisiologia do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo em caixas plásticas contendo uma coluna de água com oxigenação mantida por aeradores portáteis. Foram aclimatados em tanques contendo água do mar a uma salinidade de 20‰ em constante renovação e com acesso livre ao ambiente seco onde permaneceram por no mínimo uma semana antes da realização dos experimentos. Foi ofertado alimento (carne moída e alface) em dias alternados, sendo a alimentação suspensa 48 horas antes da realização dos experimentos.

Foram realizadas três coletas para a performance dos ensaios descritos a seguir.

2. Desenho experimental

Após a fase de aclimação, os animais foram, aleatoriamente, divididos de forma a não apresentarem diferenças estatisticamente

significativas nos parâmetros biométricos - comprimento total médio de $31,33 \pm 1,89$ e massa corpórea média de $166,54 \pm 6,41$ – (balança de precisão *Denver Instrument Company TR-402*) em aquários individuais de 16 L, com 5 L de água em cada aquário, para que os animais não ficassem cobertos de água (sendo este mais um fator de estresse evitado) e para não impedir a sua rotina diária de imersão e imersão. Foram mantidos em câmara climatizada (25°C), com aeração, cascalho e refúgio, sob fotoperíodo de claro/escuro 12:12 horas.

Os animais foram expostos a duas condições de regime salino: curto prazo – 6 horas e longo prazo – 120 horas. Em ambas as condições os animais foram expostos da seguinte forma:

- Controle isosmótico - animais expostos a salinidade de 20‰
- Experimental hipo-osmótico - animais expostos a salinidade de 10‰;
- Experimental hiper-osmótico - animais expostos a salinidade de 30‰

A alimentação dos animais foi suspensa durante todo o experimento, em ambos os regimes.

3. Coleta dos tecidos

Os animais foram dessensibilizados criogenicamente, à -10°C durante 15 a 20 minutos em freezer comum. Alíquotas de hemolinfa foram retiradas, com seringas inseridas no último pereiópodo. Após a retirada do fluido, os animais foram sacrificados por meio da separação manual das partes dorsal e ventral, e em seguida, retirou-se alíquotas de brânquias e hepatopâncreas para os experimentos descritos a seguir.

4. Análise dos ácidos graxos

Os lipídios totais foram extraídos dos tecidos branquiais (150mg) – n=4, com uma solução de clorofórmio: metanol: água (2: 1: 0,5) segundo o método de Folch *et al.*, (1957) adaptado por Parrish, (1998) para amostras de organismos aquáticos. O extrato lipídico total foi evaporado sob atmosfera de nitrogênio para posteriores análises cromatográficas.

5. Cromatografia de camada delgada (Separação de classes)

Para a separação de classes dos lipídios polares utilizou-se placas de cromatografia de camada delgada impregnadas com sílica (20 x 20 cm), que foram aquecidas em estufa a 100°C. O extrato de lipídios extraído anteriormente foi aplicado à base das placas para a separação das diferentes

classes de fosfolipídios, possível mediante as diferentes polaridades das classes e tempo de corrida na seguinte mistura de solventes: clorofórmio, metanol e água na proporção de 65: 35: 4 (por volume) (Christie, 1989). As bandas das diferentes classes foram reveladas com diclorofluoresceína e identificadas sob a luz ultravioleta (UV). As mesmas foram raspadas e eluídas com metanol.

6. Metilação e Cromatografia gasosa

A metilação das amostras fosfolipídicas totais foi realizada seguindo-se o método ácido proposto por Kitson *et al.*, (1996). A determinação do perfil dos ácidos graxos foi realizada por cromatografia gasosa, utilizando-se um cromatógrafo a gás acoplado a um ionizador de chama (FID) e a um auto-injetor (Varian GC 3900) e a identificação destas moléculas foi feita com base nos tempos de retenção, utilizando-se padrões compostos de metil ésteres (FAME) (SUPELCO, *37 components*, Larodan Chemical Company – Mixture Me93 e Qualmix PUFA fish M – Menhaden Oil), com resultados expressos em %.

Para a análise dos ácidos graxos foi utilizada uma programação no cromatógrafo com as seguintes características:

*Início da corrida a 170°C mantida por 1 minuto;

*Rampa de 2.5°C/minuto, até atingir a temperatura final de 220°C, que foi mantida por 5 minutos.

O injetor e o detector foram mantidos a 250°C, e foi utilizada uma coluna CP wax 52 CB, com espessura de 0,25 mm, diâmetro interno de 0,25 μ M e 30 m de comprimento, utilizando o hidrogênio como gás de arraste

O injetor e o detector foram mantidos a 250°C, e foi utilizada uma coluna CP wax 52 CB, com espessura de 0,25 mm, diâmetro interno de 0,25 μ M e 30 m de comprimento, utilizando o hidrogênio como gás de arraste.

7. Osmolalidade total

Para a determinação da osmolalidade das amostras (n= 6) de hemolinfa e água utilizou-se 10 μ L de cada alíquota para as medições em osmômetro *Vapro (Wescor) vapor pressure osmometer 5520*, com valores expressos em mmol/Kg. Os valores de osmolalidade obtidos consistem na média de três leituras com duração de um minuto cada.

8. Na⁺-K⁺-ATPase

Para a determinação da atividade da enzima Na⁺-K⁺-ATPase (n=4), as amostras foram previamente armazenadas em tampão SEI composto por 0,3 M de sacarose, 0,01 mM de Na₂EDTA, 0,03 M de imizadol, 70 µL de Triton em volume final de 200 mL à -80°C. Os órgãos foram homogeneizados em cinco vezes o seu volume, em tampão SEI, e centrifugados na Centrífuga Eppendorf *Centrifuge* 5804 R a 1500x g, durante 15 minutos, à 4°C, com consequente separação do sobrenadante.

O tampão de incubação foi composto por 100 mM NaCl, 8 mM MgCl₂, 30 mM imidazol, 0,01 mM EDTA, com volume completado para 100 mL de água MiliQ. Deste volume de 100 mL, foram retirados 20 mL do tampão de incubação para adicionar 3 mM de ATP e, posteriormente, o volume foi completado para 200 mL, sendo este dividido em duas partes de 100 mL: (i) 100 mL recebe 13 mM de KCl e (ii) recebe 2,5 mM de ouabaína.

Para a determinação da atividade, foi necessário fazer um padrão da atividade da enzima presente em rim de raro e o preparo das amostras do padrão seguiram o mesmo processo que as amostras experimentais, com

homogeneização em tampão SEI e posteriormente adicionadas às soluções contendo KCl ou ouabaína.

Para o preparo das microplacas de noventa e seis poços, foram pipetados 300 μL de água nos seis primeiros poços (A1-A6) e 10 μL do padrão fosfato 0,65 mM (*phosphorus standart solution* – 0,65 mM – Sigma Aldrich) nos poços A7-A12. Já nos poços B1-B6 foram adicionados 10 μL de homogeneizado de rim de rato e nos demais poços da microplaca foram pipetados 10 μL de cada amostra experimental, e, assim como nos demais, tudo feito em triplicata.

Nos três primeiros poços (1, 2 e 3) de cada uma das variáveis (exceto nos poços que continham água) foram pipetados 100 μL do tampão de incubação contendo KCl, enquanto que nos outros três poços (4, 5 e 6) foram pipetados 100 μL do tampão de incubação contendo ouabaína. As microplacas foram incubadas no escuro, durante 30 minutos.

Após a incubação, foram pipetados 200 μL da mistura do reagente de cor, composto por 0,66 mM H_2SO_4 , 9,2 mM de molibdato de amônia e 0,33 mM de $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ em volume de 100 mL. A esses 100 mL de solução de reagente de cor, foi adicionado ácido tricloroacético 8,6% (8,6 g em 100 mL de água MiliQ) em todos os poços, exceto nos poços A1-A6, que corresponderam ao BRANCO.

Terminada a adição do reagente de cor, as microplacas foram lidas imediatamente em espectrofotômetro μ QUANT BioTek a 620 nm. Após a leitura das placas, contendo as amostras para a determinação da atividade da Na^+/K^+ -ATPase, foi determinada a concentração protéica de cada amostra a 595 nm.

Para a determinação da atividade específica da Na^+/K^+ -ATPase foi utilizada a seguinte equação:

$$\frac{\text{Abs KCl} - \text{Abs Ouabaína}}{\text{Abs Padrão} \times (\text{Conc. Fosfato}) \times 1} \times \frac{1}{(\text{Conc. Prot.}) \times (\text{Tempo incubação})}$$

9. Análise estatística

Os valores de cada parâmetro e grupo avaliados foram comparados usando o teste de análise de variância (ANOVA- dois fatores), utilizando o programa estatístico Sigma Stat for Windows (Version 3.10 Copyright©). Todos os valores foram expressos em média $\pm$ erro padrão (EPM). O nível de significância adotado foi de 0,05.

III. Resultados

1. Teste 6 horas

1.1. Osmolalidade

A Figura 1 apresenta valores de amostras de hemolinfa dos diferentes tratamentos em relação à H₂O controle e ao controle salino (20‰). Nota-se que, para o período de 6 horas, a concentração osmótica do fluido interno do animal varia de acordo com os tratamentos. Na condição de 10‰, a osmolalidade da hemolinfa do animal está abaixo dos valores encontrados no controle (ANOVA $p < 0,05$). Já para o ensaio de 30‰, a concentração osmótica da hemolinfa do animal está acima dos valores do controle. Não houve diferença significativa para os valores de hemolinfa em 20‰ (ANOVA $p > 0,05$)

Fig. 1. Determinação da osmolaridade (mOsm/Kg . H₂O) em amostras de hemolinfa do caranguejo de mangue *Ucides cordatus* durante 6 horas nos diferentes tratamentos. Os símbolos (*, #) representam diferenças estatísticas ($p < 0,05$) entre as salinidades experimentais em relação ao controle (H₂O). As letras (a, b) representam diferenças estatísticas ($p < 0,05$) entre as salinidades experimentais em relação ao controle (20‰).

1.2. Ácidos graxos

As Figuras 2 e 3 representam, respectivamente, as porcentagens de ácidos graxos das porções fosfatidilcolina (FC) e fosfatidiletanolamina (FE) dos fosfolípidios das brânquias posteriores do caranguejo-uça (*Ucides cordatus*) em relação aos diferentes tratamentos durante o ensaio de 6 horas. Não foram observadas diferenças estatísticas em relação ao controle

entre os dois tratamentos (ANOVA $p > 0,05$) em ambas as frações: FC e FE.

Fig. 2. Porcentagem dos ácidos graxos saturados (SFA), monoinsaturados (MUFA) e poliinsaturados (PUFA) presentes na fosfatidilcolina (FC) dos fosfolipídios das brânquias posteriores em diferentes salinidades: 10‰ e 30‰ comparadas com o controle sob o tratamento de 6 horas.

Fig. 3. Porcentagem dos ácidos graxos saturados (SFA), monoinsaturados (MUFA) e poliinsaturados (PUFA) presentes na fosfatidiletanolamina (FE) dos fosfolipídios das brânquias posteriores em diferentes salinidades: 10‰ e 30‰ comparadas com o controle sob o tratamento de 6 horas.

Com relação as brânquias anteriores, não foram observadas diferenças estatísticas em relação ao controle entre os dois tratamentos (ANOVA $p > 0,05$) em ambas as frações: FC e FE, como visto nas figuras 4 e 5, respectivamente.

Fig. 4. Porcentagem dos ácidos graxos saturados (SFA), monoinsaturados (MUFA) e poliinsaturados (PUFA) presentes na fosfatidilcolina (FC) dos fosfolipídios das brânquias anteriores em diferentes salinidades: 10‰ e 30‰ comparadas com o controle sob o tratamento de 6 horas.

Fig. 5. Porcentagem dos ácidos graxos saturados (SFA), monoinsaturados (MUFA) e poliinsaturados (PUFA) presentes na fosfatidiletanolamina (FE) dos fosfolipídios das brânquias anteriores em diferentes salinidades: 10‰ e 30‰ comparadas com o controle sob o tratamento de 6 horas.

2. Teste 120 horas

2.1. Osmolalidade

A Figura 6 apresenta os valores de osmolalidade em amostras de hemolinfa no ensaio hiposmótico durante as 120 horas (5 dias) deste tratamento. Os valores apresentados para a hemolinfa do animal nos dois primeiros dias tendem a ser menores comparados com o controle (ANOVA

$p < 0,05$). Não é observada diferença estatística com o controle (ANOVA $p > 0,05$) nos dias que se seguem. No último dia de experimento, em comparação com o controle, há uma diminuição da osmolalidade interna do animal.

Fig. 6. Determinação da osmolalidade (mOsm/Kg . H₂O) em amostras de hemolinfa do caranguejo de mangue *Ucides cordatus* na condição 10‰ em relação ao controle (H₂O). O símbolo (#) representa diferenças estatísticas ($p < 0,05$) entre as salinidades experimentais em relação ao controle.

Não foram observadas diferenças estatísticas (ANOVA $p > 0,05$) nas amostras de hemolinfa ao longo dos dias no tratamento 20‰ em relação ao controle, como visto na figura a seguir:

Fig. 7. Determinação da osmolalidade (mOsm/Kg . H₂O) em amostras de hemolinfa do caranguejo de mangue *Ucides cordatus* na condição 20‰ em relação ao controle (H₂O).

Para a condição 30‰, após o primeiro dia de experimento, há uma tendência ao aumento da osmolalidade do fluido interno do animal em comparação com o controle (ANOVA $p < 0,05$) até o último dia do teste (dia 5).

Fig.8. Determinação da osmolalidade (mOsm/Kg . H₂O) em amostras de hemolinfa do caranguejo de mangue *Ucides cordatus* na condição 30‰ em relação ao controle (H₂O). O símbolo (#) representa diferenças estatísticas ($p < 0,05$) entres as salinidades experimentais em relação ao controle.

Em relação ao controle 20‰, podemos observar que: para o tratamento hiperosmótico, a partir do segundo dia de experimento há um aumento que se mantém gradativo até o dia seguinte, permanecendo constante ao final das 120 horas. Já para o tratamento hiposmótico, é observado uma diminuição da osmolalidade da hemolinfa em relação ao controle logo ao final do primeiro dia de experimento. Essa diminuição tende a ser menor nas 48 e 72 horas seguintes, porém uma queda significativa da osmolalidade é vista ao final das 120 horas de experimento.

Fig. 9. Determinação da osmolalidade (mOsm/Kg . H₂O) em amostras de hemolinfa do caranguejo de mangue *Ucides cordatus* nas condições 10‰ e 30‰ em relação ao controle (20‰). O símbolo (*) representa diferenças estatísticas ($p < 0,05$) entre as salinidades experimentais em relação ao controle.

2.2. Ácidos graxos

A Figura 10 representa a porcentagem de ácidos graxos da porção fosfatidilcolina (FC) dos fosfolipídios das brânquias posteriores do caranguejo-uça (*Ucides cordatus*) em relação aos diferentes tratamentos durante o ensaio de 120 horas. Observa-se que não há diferença significativa nos ácidos monoinsaturados (MUFA) dos diferentes tratamentos, porém, há um aumento dos ácidos graxos poliinsaturados (PUFA) na salinidade 10‰ bem como uma diminuição do mesmo na salinidade 30‰ (ANOVA $p < 0,05$) (Figura 1). Com relação aos ácidos graxos saturados (SFA), há uma diminuição deste na salinidade 10‰ e um aumento observado na salinidade 30‰ (ANOVA $p < 0,05$).

Fig. 10. Porcentagem dos ácidos graxos saturados (SFA), monoinsaturados (MUFA) e poliinsaturados (PUFA) presentes na fosfatidilcolina (FC) dos fosfolipídios das brânquias posteriores em diferentes salinidades: 10‰ e 30‰ comparadas com o controle sob o tratamento de 120 horas. Os símbolos (*, #) representam diferenças significativas ($P < 0,05$) entre as salinidades para cada tipo de ácido graxo.

Nas figuras 11 e 12 estão representadas as devidas porcentagens (%) totais de ácidos graxos poliinsaturados da classe n3 da porção FC das brânquias posteriores. Observa-se que o aumento dos poliinsaturados no tratamento hiposmótico já visto na Figura 1 bem como sua diminuição no tratamento hiperosmótico se deu nas duas respectivas classes de ácidos graxos poliinsaturados: n3 (ANOVA $p < 0,05$) e n6 (Teste T $p < 0,05$) em relação ao controle.

Fig. 11. Porcentagem (%) total de ácidos graxos poliinsaturados n3 durante o tratamento de 120 horas em brânquias posteriores da porção fosfatidilcolina (FC) nos diferentes tratamentos: 10‰ e 30‰ em relação ao controle.

Fig. 12. Porcentagem (%) total de ácidos graxos poliinsaturados n6 durante o tratamento de 120 horas em brânquias posteriores da porção fosfatidilcolina (FC) nos diferentes tratamentos: 10‰ e 30‰ em relação ao controle.

Podemos afirmar pelas Figuras 13 e 14 que as diferenças encontradas nas classes n3 (Teste T $p < 0,05$) e n6 (ANOVA $p < 0,05$) dos PUFA's já mencionadas refere-se aos ácidos graxos de cadeia longa C20-22 ($p > 0,05$).

Fig. 13. Porcentagem (%) total de ácidos graxos poliinsaturados n3 durante o tratamento de 120 horas em brânquias posteriores da porção fosfatidilcolina (FC) nos diferentes tipos de ácidos graxos de cadeia curta (C18) e longa (C20-22) sob os tratamentos 10‰ e 30‰ em relação ao controle.

Fig. 14. Porcentagem (%) total de ácidos graxos poliinsaturados n6 durante o tratamento de 120 horas em brânquias posteriores da porção fosfatidilcolina (FC) nos diferentes tipos de ácidos graxos de cadeia curta (C18) e longa (C20-22) sob os tratamentos 10‰ e 30‰ em relação ao controle.

Na Figura 15 observa-se, na porção fosfatidiletanolamina (FE) dos fosfolipídios das brânquias posteriores, um aumento dos PUFA's e uma diminuição dos MUFA's na salinidade 10‰, enquanto os ácidos graxos saturados deste grupo não apresentaram variação, em relação à salinidade controle. Também é visto uma diminuição dos MUFA's, porém na salinidade 30‰, e um aumento dos ácidos graxos saturados, ao passo que para os PUFA's não há variação, em relação ao controle (ANOVA $p > 0,05$).

Fig. 15. Porcentagem dos ácidos graxos saturados (SFA), monoinsaturados (MUFA) e poliinsaturados (PUFA) presentes na fosfatidiletanolamina (FE) dos fosfolipídios das brânquias posteriores em diferentes salinidades: 10‰ e 30‰ comparadas com o controle sob o tratamento de 120 horas. Os símbolos (*, #) representam diferenças significativas ($P < 0,05$) entre as salinidades para cada tipo de ácido graxo.

O aumento dos ácidos graxos poliinsaturados no tratamento hiposmótico em relação ao controle visto na figura anterior refere-se somente aos PUFA's da classe n3 (Figura 16) e não da classe n6 (Figura 17), respectivamente (ANOVA $p > 0,05$).

Fig. 16. Porcentagem (%) total de ácidos graxos poliinsaturados n3 durante o tratamento de 120 horas em brânquias posteriores da porção fosfatidiletanolamina (FE) nos diferentes tratamentos: 10‰ e 30‰ em relação ao controle.

Fig. 17. Porcentagem (%) total de ácidos graxos poliinsaturados n6 durante o tratamento de 120 horas em brânquias posteriores da porção fosfatidiletanolamina (FE) nos diferentes tratamentos: 10‰ e 30‰ em relação ao controle.

Na figura 18 é visto que o aumento seguido de PUFA's n3 no tratamento de 10‰ se dá pelos ácidos graxos de cadeia longa C20-22 (ANOVA $p < 0,05$).

Fig. 18. Porcentagem (%) total de ácidos graxos poliinsaturados n3 durante o tratamento de 120 horas em brânquias posteriores da porção fosfatidiletanolamina (FE) nos diferentes tipos de ácidos graxos de cadeia curta (C18) e longa (C20-22) sob os tratamentos 10‰ e 30‰ em relação ao controle.

Com relação as brânquias anteriores, não foram observadas diferenças estatísticas em relação ao controle entre os dois tratamentos (ANOVA $p > 0,05$) em ambas as frações: FC e FE, como visto nas figuras 19 e 20, respectivamente.

Fig. 19. Porcentagem dos ácidos graxos saturados (SFA), monoinsaturados (MUFA) e poliinsaturados (PUFA) presentes na fosfatidilcolina (FC) dos fosfolipídios das brânquias anteriores em diferentes salinidades: 10‰ e 30‰ comparadas com o controle sob o tratamento de 120 horas.

Fig. 20. Porcentagem dos ácidos graxos saturados (SFA), monoinsaturados (MUFA) e poliinsaturados (PUFA) presentes na fosfatidiletanolamina (FE) dos fosfolipídios das

brânquias anteriores em diferentes salinidades: 10‰ e 30‰ comparadas com o controle sob o tratamento de 120 horas.

3. Na⁺-K⁺-ATPase

A análise da atividade específica da Na⁺-K⁺-ATPase no tratamento de 6 e 120 horas em brânquias anteriores não revelaram diferenças estatísticas significativas nos diferentes tratamentos (ANOVA $p > 0,05$). No entanto, em brânquias posteriores houve uma maior atividade específica da enzima no tratamento hiperosmótico durante o teste de 6 horas (A) e uma diminuição da atividade em ambos os tratamentos, 10‰ e 30‰, seguido no teste de 120 horas (B), como visto na Figura a seguir:

Fig. 21. Atividade específica da Na⁺-K⁺-ATPase – μmol Pi.h⁻¹.mg⁻¹ (de proteína) – em brânquias anteriores e posteriores do caranguejo *Ucides cordatus* durante o teste de 6 horas (A) e 120 horas (B) nas diferentes salinidades (10‰ e 30‰) em relação ao

controle (20‰). O símbolo (*) representa diferença estatística ($p < 0,05$) entre as devidas salinidades em relação ao controle.

IV. Discussão

Foi visto que as brânquias posteriores (Figuras 10 e 15) estão mais sujeitas as variações dos diferentes ácidos graxos (saturados, mono e poliinsaturados) do que as brânquias anteriores (Figuras 19 e 20) no tratamento de 120 horas. Isso porque as brânquias posteriores estão relacionadas a processos osmorregulatórios, e tais processos relacionam-se com os tipos de ácidos graxos encontrados na membrana plasmática. Este achado vai de acordo com Chapelle e Pequeux (1982) onde postularam que a composição lipídica das brânquias posteriores é maior do que em brânquias anteriores, composição essa formada por PUFA principalmente da fração FE.

A brânquia anterior é responsável, exclusivamente, por processos respiratórios, possuindo epitélios finos e baixa atividade da NKA (Genovese *et al.*, 2004), não relacionando-se, portanto, a processos osmorregulatórios ligados a lipídios de membranas. Tal hipótese também se confirma neste trabalho, onde brânquias anteriores tiveram menor atividade da NKA em comparação com brânquias posteriores (Figura 21 A, B).

Os efeitos da salinidade no padrão de distribuição dos ácidos graxos e ação de enzimas que participam da manutenção da fluidez da membrana

em diferentes organismos têm sido reportados por diversos autores (Bell *et al.*, 1986, Hazel, 1988) e também por Chapelle *et al.* (1985) onde estes sugeriram que os fosfolipídios podem ser componentes importantes nas estruturas de biomembranas, relacionadas à permeabilidade de íons e a atividade enzimática; esta última pode se correlacionar com ácidos graxos poliinsaturados (PUFA) e movimentos iônicos em brânquias posteriores de crustáceos, como uma possível adaptação a aclimatação a diferentes salinidades. Neste trabalho também observamos uma remodelação lipídica a partir de ácidos graxos poliinsaturados durante o teste de 120 horas, como visto em brânquias posteriores submetidos a baixa salinidade (10‰) em ambas as frações, FC e FE. Portanto, em uma condição hipoosmótica, talvez a membrana plasmática encontra-se mais fluida pelo aumento de PUFA, ou seja, mais permeável a solutos. Esta hipótese vai de acordo com Bystriansky e Ballantyne, (2007) onde os mesmos correlacionaram, diametralmente, com os devidos achados, uma maior fluidez de membrana pelo aumento de PUFA em trutas (*Salvelinus alpinus*).

Chapelle e Pequeux (1982) postularam que o grau de insaturações de ácidos graxos poliinsaturados parece ser uma estratégia pela qual as brânquias posteriores controlam a organização e estrutura das membranas frente a grandes mudanças de salinidade. Di Costanzo *et al.* (1983) viram que a permeabilidade iônica do epitélio intestinal de truta diminuiu com a

deficiência de ácidos graxos essenciais. A deficiência de PUFA da família $n3$, como o $22:6n - 3$, induz a perda ou a redução da capacidade de regulação iônica em tal epitélio mostrando que esta família de ácidos graxos poliinsaturados ($n3$) são utilizados para o processo de remodelação lipídica da membrana plasmática. Este achado vai de acordo com os resultados encontrados nas 13 e 18 Figuras, onde a remodelação dos poliinsaturados se deu pelo, principalmente, pela família $C20:C22 n3$.

Um decréscimo significativo na atividade da NKA foi observado no teste de 120 horas na salinidade 10‰ em comparação com o controle (Figura 21, B). Tal achado pode ser explicado pela hipótese de que ao final do teste, os animais deste grupo estivessem entrando em uma regulação iso-osmótica com o meio, acarretando em uma diminuição da atividade da enzima. Esta teoria baseia-se nos trabalhos propostos por Martínez-Álvarez *et al.* (2005), onde os mesmos mostraram um declínio da atividade da NKA em estresse hipo-osmótico (15‰) nas brânquias do esturjão *Acipenser naccarii*, sugerindo que o animal estivesse em equilíbrio osmótico com o meio, não necessitando, portanto, de ajustes osmorregulatórios.

Um aumento dos ácidos graxos saturados na brânquia posterior do FE na salinidade 30‰ é observado na Figura 15 no teste de 120 horas. Fosfolipídios que contém uma longa cadeia de tais ácidos graxos formam, na estrutura da bicamada, uma estrutura rígida, que faz com que diminua a

permeabilidade a solutos (Chen *et al.*, 1971) bem como a fluidez de membranas. Chester *et al.* (1986) observaram uma forma menos fluida da membrana atribuída a suplementação por ácidos graxos saturados, utilizando o termo ‘cristalizada’ para o estado da membrana. Os autores ainda relacionaram os ácidos graxos saturados à baixa atividade da NKA, já que esta enzima é dependente do estado físico da membrana para sua atividade. Observamos esta mesma correlação entre ácidos graxos saturados na fração FE (Fig. 15) e baixa atividade da NKA (Figura 21, B) sob o estresse hiper-osmótico em brânquias posteriores durante o teste de 120 horas.

O padrão de distribuição dos diferentes ácidos graxos, saturados mono e poliinsaturados, em ambas as frações, FC e FE, em brânquias anteriores (Figuras 4 e 5) e posteriores (Figuras 2 e 3) de animais submetidos ao tratamento de 6 horas se manteve o mesmo durante o teste, podendo sugerir que circuitos de curtos períodos não são suficientes para uma remodelação lipídica dos ácidos graxos. Apesar dos ácidos graxos se manterem inalterados no teste a curto prazo, um aumento da NKA (Figura 21 A) foi observado na salinidade 30‰ em brânquias posteriores. De acordo com McCormick (1995), altas salinidades induzem um aumento nos níveis de atividade de transportadores em quase todos os peixes teleósteos. Martinez-Alvarez *et al.* (2005) também detectaram um progressivo

aumento da atividade da NKA em esturjão (*Acipenser naccarii*) onde seu maior pico atingido foi a 35%.

As frações FC e FE são os principais fosfolipídios encontrados em brânquias, sendo os ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa os mais encontrados em ambas as classes destes fosfolipídios. No entanto, há uma certa relação entre a função osmorregulatória de brânquias de crustáceos e a fração FE. Este fosfolipídio parece aumentar a associação entre proteínas de membrana e lipídios, tornando-os mais estáveis (Hansen *et al.*, 1995) por ser o fosfolipídio mais sujeito a variação nos ácidos graxos. Este padrão foi visto no FE das brânquias posteriores, onde as mesmas sofreram modificação estrutural dos ácidos graxos em relação a porção FC.

V. Conclusões

1. Foi visto que o PUFA presente nas brânquias posteriores do caranguejo de mangue *Ucides cordatus* submetido à um estresse hipo-osmótico, independente da fração (FC ou FE), apresentou um alto índice de PUFA. Este, como visto, está diretamente relacionado com a alta fluidez de membrana.
2. Em estresse hiper-osmótico, a brânquia posterior apresentou um significativo aumento de ácidos graxos saturados, possivelmente, estivesse menos fluida, consequentemente menos permeável a solutos. Esta baixa permeabilidade consequentemente diminui a atividade da NKA, como foi visto.
3. A brânquia anterior talvez não seja modulada pelos ácidos graxos em diferentes tratamentos, uma vez que ela é responsável pela função respiratória e não osmorregulatória como a brânquia posterior, não necessitando, portanto, de adaptações em níveis fisiológicos para

conformar sua estrutura lipídica em resposta à aclimação a diferentes salinidades.

4. Em uma comparação inter-branquial, brânquias posteriores possuem uma maior atividade da NKA em relação as brânquias anteriores além de também estarem mais sujeitas a variações nos ácidos graxos.
5. Aclimação a curtos períodos, como visto aqui de 6 horas, não é suficiente para remodelar os ácidos graxos das membranas plasmáticas das brânquias.

VI. Resumo

O caranguejo de mangue *Ucides cordatus* é um forte hiper-hipo-osmorregulador que se encontra iso-osmótico ao ambiente na salinidade próxima a 20‰. A osmorregulação é realizada por diversos órgãos, mas principalmente pelas brânquias posteriores, enquanto as brânquias anteriores relacionam-se com a respiração. A regulação iônica é feita por muitas enzimas, sendo a principal a Na^+/K^+ -ATPase (NKA). Tal enzima pode variar sua atividade em diversas condições ambientais, como a salinidade e/ou temperatura; é alterada por características físicas das membranas, como fluidez; e também modulada por ácidos graxos de fosfolipídios de membrana encontrados nas brânquias. O objetivo deste trabalho é elucidar a conformação dos fosfolipídios de membrana, no que tange aos ácidos graxos destes, em animais submetidos a diferentes salinidades. Os caranguejos foram divididos e submetidos a três situações ($n=4$ por grupo): controle /iso-osmótico (salinidade 20‰), hipo-osmótico (10‰) e hiper-osmótico (30‰). Um grupo de animais foi exposto a um período de curto prazo (6 horas) e outro grupo a um período de 120 horas. As brânquias foram removidas e as frações lipídicas extraídas para configurar o perfil de ácidos graxos. Após montado o perfil das classes dos ácidos graxos, os mesmos foram determinados por cromatografia gasosa. A atividade específica da NKA foi mensurada com base na diferença entre a taxa de liberação de fosfato a partir de ATP. Os resultados mostraram um aumento dos ácidos graxos poliinsaturados (PUFA) sob o estresse hipo-osmótico em brânquias posteriores em ambas as frações, fosfatidilcolina (FC) e fosfatidiletanolamina (FE), em animais submetidos ao tratamento de

120 horas. PUFA tende a aumentar a fluidez de membrana, portanto, nesta condição a membrana talvez estivesse sob tal estado, mais permeável. No estresse hiper-osmótico, por outro lado, o FE de brânquias posteriores mostrou um aumento dos ácidos graxos saturados em animais também expostos a 120 horas. Tais ácidos graxos fazem com que a conformação da membrana se torne menos fluida, e menos permeável a solutos. Não houve diferença no perfil de ácidos graxos para animais expostos a 6 horas em diferentes salinidades. A atividade da NKA variou entre as diferentes exposições.

Palavras-chave: *Ucides cordatus*; brânquias; salinidade; ácidos graxos; Na⁺-K⁺-ATPase.

VII. Abstract

The mangrove's crab *Ucides cordatus* is a good hyper-hyposmoregulator that is isosmotic in a 20‰ salinity environment. The osmoregulation is performed by many organs, however the most important structure is the posterior gills. On the other hand anterior gills are related to breathing. Ionic regulation is performed by several pumps, primarily by Na^+/K^+ - ATPase (NKA). This enzyme perform its role due to environmental conditions such as salinity and/or temperature, but also to membrane's physics characteristics such as fluidity and composition of fatty acids. The purpose of this study is to evaluate the membrane's conformation in relation to fatty acids of phospholipids, when acclimated in different salinity. The crabs were divided into three groups (n = 4 per group): isosmotic/control (20‰ salinity), hyposmotic (10‰ salinity) and a hyperosmotic (30‰ salinity). A group of animals were exposed to a short-term period (6 hours) and another group to a long-term period (120 hours). The gills were removed and had their total lipids extracted to set up the fatty acids profile (class split of phospholipid). The fatty acids profile were determined as phospholipid class by gas chromatography. The specific activity of NKA was based upon measurement of the phosphate released rate of synthesis of ATP. The results showed that phosphatidylethanolamine (PE) and phosphatidylcholine (PC) from posterior gills exposed to 10‰ salinity long-term had significantly higher levels of polyunsaturated fatty acids (PUFA). PUFA attends to increase membrane's fluidity, thus in the hyposmotic stressful situation, the membrane's conformation might be more fluid. When exposed to 30‰ salinity long term, the PE of posterior gills shows increased levels of saturated fatty

acids that implies in a less fluid membrane's conformation. There were no significant findings among fatty acids of phospholipids in gills of crabs exposed to a short-term period (6 hours). The specific activity of NKA ranged among the different salinities.

Keywords: *Ucides cordatus*, gills, salinity, fatty acids, Na⁺-K⁺-ATPase.

VIII. Referências bibliográficas

- Ahearn, G. A.; Duerr, J. M. Zhuang, Z.; Brown, R. J.; Aslamkhan, A.; Killebrew, D. A. (1999) Ion transport processes of crustacean epithelial cells. **Physiol. Biochem. Zool.** 72(1): 1-18.
- Alves, R. R. N.; Nishida, A. K.; Hernández, M. I. M. (2005) Environmental perception of gilleres of the crab “Caranguejo-uça” (*Ucides cordatus*, Decapoda, Brachyura) affecting their collection attitudes. **J. Ethnobiol. Ethnomed.** 1:10-18
- Babili, M.; Brichon, G.; Zwingelstein, G. (1996) Sphingomyelin metabolism is linked to salt transport in the gills of euryhaline fish. **Lipids.** 31:385–392.
- Bamber, S. D.; Depledge, M. H. (1997) Responses of shore crabs to physiological challenges following exposure to selected environmental contaminants. **Aquat. Toxicol.** 40: 79-92
- Barra, J. A.; Pequeux, A.; Humbert, W. (1983) A morphological study on gills of a crab acclimated to fresh water. **Tissue Cell.** 15:583-596.
- Bell, M. V.; Henderson, R. J.; Sargent, J. R. (1986) The role of polyunsaturated fatty acids in fish. **Comp. Biochem. Physiol.** 83B:711-719.
- Bhavan, P. S.; Geraldine, P. (2000) Histopathology of the hepatopancreas and gills of the prawn *Macrobrachium malcolmsonii* exposed to endosulfan. **Aquat. Toxicol.** 50(4): 331-339.

- Bogdanov, M.; Dowhan, W. (1999) Lipid-assisted protein folding. **J Biol Chem.** 274:36827–36830.
- Borlongan, I. G.; Benitez, L. V. (1992) Lipid and fatty acid composition of milkfish (*Chanos chanos*, Forsskal) grown in freshwater and seawater. **Aquaculture.** 104:79–89.
- Buda, C.; Dey, I.; Balogh, N.; Horvath, L. I.; Maderspach, K.; Juhasz, M.; Yeo, Y. K.; Farkas, T. (1994) Structural order of membranes and composition of phospholipids in fish brain cells during thermal acclimatization. **PNAS.** 91: 8234-8238.
- Bury, N. R.; Grosell, M.; Grover, A. K.; Wood, C. M. (1999) ATP-dependent silver transport across the basolateral membrane of the rainbow trout gills. **Toxicol. App. Pharmacol.** 159(1) 1-8.
- Bystriansky, J. S.; Ballantyne, J. S. (2007) Gill Na^+/K^+ -ATPase activity correlates with basolateral membrane lipid composition in seawater- but not freshwater-acclimated Arctic char (*Salvelinus alpinus*). **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.** 292:R1043-R1051.
- Carey, C.; Hazel, J. R. (1989) Diurnal variation in membrane lipid composition of sonoran desert teleosts. **J. Exp. Biol.** 147:375-391.
- Castilho-Westphal, G. G.; Ostrensky, A.; Pie, M. R.; Boeger, W. A. (2008) The state of the art of the research on the mangrove land crab, *Ucides cordatus*. **Arch. Veter. Science.** 13, n. 2.
- Chapelle, S. (1978) The influence of acclimation temperature on the fatty acid composition of an aquatic crustacean (*Carcinus maenas*). **J. Exp. Zool.** 204:337-346.
- Chapelle, S.; Abdul-Malak, N.; Zwingelstein, G. (1985) Incorporation of $\omega 6$ polyunsaturated fatty acids into phospholipids of the crab *Carcinus*

maenas. **Biochem. System. Ecol.** 13:459-465.

Chapelle, S.; Pequex, A. (1982) The distribution of fatty acids in gill phospholipids of the chinese crab *Eriocheir sinensis*. **Biochem. Syst. Ecol.** 10:71-78.

Chapelle, S.; Abdul-Malak, N.; Zwingelstein, G. (1985) Incorporation of ω 6 polyunsaturated fatty acids into phospholipids of the crab *Carcinus maenas*. **Biochem. System. Ecol.** 13:459-465.

Chapelle, S.; Zwingelstein, G. (1984) Phospholipid composition and metabolism of crustacean gills as related to changes in environmental salinities: relationship between Na^+/K^+ -ATPase activity and phospholipids. **Comp. Biochem. Physiol.** 78B:363-372.

Chapman, D.; Gomez-Fernandez, J. C.; Goni, F. M. (1982) The interaction of intrinsic proteins and lipids in biomembranes. **Trends Biochem Sci.** 7:67-70.

Charmantier, G. (1998) Ontogeny of osmoregulation in Crustaceans: a review. **Inv. Repr. Dev.** 33: 177-190.

Chen, L. F.; Lund, D. B.; Richardson, T. (1971) Essential fatty acids and glucose permeability of lecithin membranes. **Biochim. Biophys. Acta.** 280:1-16.

Chester, D. W.; Tourtellote, M. E.; Melchior, D. L.; Romano, A. H. (1986) The influence of saturated fatty acid modulation of bilayer physical state on cellular and membrane structure and function. **Biochim. Biophys. Acta.** 860:383-398.

Christie, W. W. (1989) Gas chromatography and lipids. A practical guide. **The Oily Press**, Dundee, Scotland
Coleman, R. (1973) Membrane-bound enzymes and membrane ultrastructure. **Biochim Biophys Acta.** 300:1-30.

Compere, D.; Wanson, S.; Pequeux, A.; Gilles, R.; Goffinet, G. (1989) Ultrastructural changes in the gill epithelium of the green crab *Carcinus maenas* in relation to the internal salinity. **Tissue Cell.** 21:299–318.

Crockett, E. L. (1999) Lipid restructuring does not contribute to elevated activities of Na⁺/K⁺-ATPase in basolateral membranes from the gill of seawater acclimated eel (*Anguilla rostrata*). **J Exp Biol.** 202:2385–2392

Crockett, E. L.; Hazel, J. R. (1997) Cholesterol affects physical properties and (Na⁺,K⁺)-ATPase in basolateral membranes of renal and intestinal epithelia from thermally acclimated rainbow trout. **J. Comp. Physiol. (B)** 167:344–351.

Daikoku, T.; Yano, I.; Masui, M. (1982) Lipid and fatty acid compositions and their changes in the different organs and tissues of guppy, *Poecilia reticulata*, on sea water adaptation. **Comp Biochem Physiol.** 73A:167–174.

Demel, R. A.; De Kruffy, B. (1976) The function of sterols in membranes. **Biochim. Biophys. Acta.** 457:109.

Di Costanzo, G.; Duportail, G.; Florentz, A.; Leray, C. (1983) The brush border membrane of trout intestine: influence of its lipid composition on ion permeability, enzyme activity and membrane fluidity. **Molec. Physiol.** 4:279-290.

Dowhan, W.; Bogdanov, M. (2009) Lipid-dependent membrane protein topogenesis. **Annu. Rev. Biochem.** 78:515–540.

Else, P. L.; Wu, B. J. (1999) What role for membranes in determining the higher sodium pump molecular activity of mammals compared to ectotherms? **J. Comp. Physiol. (B)** 169:296-302.

Folch, J.; Less, M.; Stanley, G.H. (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. **J. Biol. Chem.** 226:497-503.

Fourcans, B.; Jain, M. K. (1974) Role of phospholipids in transport and enzymatic reactions. **Adv. Lipid. Res.** 12:147–226.

Genovese, G.; Luchetti, C. G; Luquet, C. M. (2004) Na⁺/K⁺ -ATPase activity and gill ultrastructure in the hyper-hypo-regulating crab *Chasmagnathus granulatus* acclimated to dilute, normal, and concentrated seawater. **Mar. Biol.** 144:111-118.

Geering, K. (2000) Topogenic morifs in P ATPase. **J. Membr. Biol.** 174: 181-190.

Gilles, R. (1997) Compensatory organic osmolytes in high osmolarity and dehydration stresses: history and perspectives. **Comp. Biochem. Physiol.** 117: 279-290.

Gilles, R. (1975) Mechanisms of ion and osmoregulation. **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.** 2:259-347.

Gilles, R.; Delpire, E. (1997) Variations in salinity, osmolarity and water availability; vertebrates and invertebrates. **Comp. Biochem. Physiol.** 2: 1523-1586.

Goodman, S. H.; Cavey, M. J. (1990) Organization of a phyllobranchiate gill from the green shore crab *Carcinus maenas* (Crustacea, Decapoda). **Cell Tissue Res.** 260:495–505.

Gray, I. E. (1957) A comparative study of the gill area of crabs. **Biol. Bull.** 112: 34-42.

Hansen, H. J. M.; Olsen A. G.; Rosenkilde, P. (1995) Formation of phosphatidylethanolamine as a putative regulator of salt transport in the

gills and esophagus of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Comp. Biochem. Physiol.** 112B:161- 167.

Haons, C.; Flik, G.; Charmantier, G. (1998) Confocal laser scanning and electron microscopical studies in osmoregulatory epithelia in the branchial cavity of the lobster *Homarus gammarus*. **J. Exp. Biol.** 201:1817–1833.

Harper, H. A.; Rodwell, V. W.; Mayes, P. A. (1982) Manual de Química Fisiológica, 5ª ed, **Atheneu ed**, 736p.

Hawkin, A. J. S.; Jones, M. B. (1982) Gill area and ventilation in two mud crabs, *Helice crassa* Dama (Grapsidae) and *Macrophtalmus hirtipes* (Jacqunot) (Ocypodidae) in relation to habitat. **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.** 60: 103-118.

Hazel, J. R. (1989) Cold adaptation in ectotherms: regulation of membrane function and cellular metabolism. **Adv. Comp. Environ. Physiol.** 4: 1-50.

Hazel, J. R. (1972) The effect of temperature acclimation upon succinic dehydrogenase activity from the epaxial muscle of the common goldfish (*Carassius auratus* L.)-I. Properties of the enzyme and the effect of lipid extraction. **Comp Biochem Physiol.** 43B:837–61.

Hazel, J. R. (1979) The influence of thermal acclimation on membrane lipid composition of rainbow trout liver. **Am. J. Physiol.** 236:91-101.

Hazel, J. R. (1988) Homeoviscous adaptation in animal cell membranes. **In: Advances in Membrane Fluidity. Physiological Regulation of Membrane Fluidity:** editado por Aloia, R. C.; Curtain, C. C.; Gordon, L. M. New York: Alan, R. Liss. 3:149–188.

Hoar, W. S. (1976) Smolt transformation: evolution, behavior, physiology. **J. Fish Res. Bd. Can.** 33:1234–1252.

- Hoffmann, E. K. (2000) Intracellular signalling involved in volume regulatory decrease. **Cell. Physiol. Biochem.** 10:273–288.
- Hootman, S. R.; Ernst, S. A. (1984) Ultrastructural localization of Na^+/K^+ -ATPase in specialized membranes of salt transporting cells in marine vertebrates. **In:** (Editado por Pequeux, A.; Gilles, R.; Bolis, L.) **Osmoregulation in Estuarine and Marine Animals.** Heidelberg: Springer. 171–90.
- Horisberger, J. D. (2004) Recent insights into the structure and mechanism of the sodium pump. **Physiology.** 19:377–388.
- Iannou, P. V.; Colding, B.T. (1979) Cardiolipins: their chemistry and biochemistry. **Progr. Lipid. Res.** 17:279-318.
- Igarashi, M. A. (2008) Sinopse preliminar sobre a ocorrência de caranguejos nos manguezais do Estado do Ceará. **PUBVET**, Londrina, V. 2, N. 38, Art. 368.
- Johannsson, A.; Smith, G. A.; Metcalfe, J. C. (1981) The effect of bilayer thickness on the activity of Na^+/K^+ -ATPase. **Biochim. Biophys. Acta.** 641:416–421.
- Jorgensen, P. L.; Pedersen, P. A. (2001) Structure function relationships of Na^+ , K^+ -ATPase on Mg^{2+} binding and energy transduction in Na^+ , K^+ -ATPase. **Biochem. Biophys. Acta.** 1505: 57-74.
- Junqueira, L. C. (2005) Biologia Celular e Molecular. **Guanabara Koogan.** 8ª Edição.
- Kamemoto, F. I. (1991). Neuroendocrinology of osmoregulation in crabs. **Zool. Sci.** 8:827-833.
- Kaplan, J. H. (2002) Biochemistry of Na^+/K^+ -ATPase. **Ann. Rev. Biochem.** 71:511–535.

Kathiresan, K.; Bingham, B. L. (2001) Biology of Mangroves and Mangrove Ecosystems. **Adv. Mar. Biol.** 40: 81-251.

Kimelberg, H. K.; D. Papahadjopoulos. (1972) Phospholipid requirements for $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ activity: Head-group specificity and fatty acid fluidity. **Biochim. Biophys. Acta.** 282: 277-292.

Kirschner, L. B. (2004) The mechanism of sodium chloride uptake in hyperregulating aquatic animals. **J. Exp. Biol.** 207:1439–1452.

Kitson, G.; Larsen, B. S.; Mcewen, C. N. (1996) Gas Chromatography and Mass Spectrometry: A Practical Guide. **Academic Press: New York.** 352.

Lemieux, H.; Blier, P. U. (2008) Does membrane fatty acid composition modulate mitochondrial functions and their thermal sensitivities? **Comp. Biochem. Physiol. (A)** 149: 20-29

Leray, C.; Chapelle, S.; Duportail, G.; Florentz, A. (1984) Changes in fluidity and 22:6(n-3) content in phospholipids of trout intestinal brush-border membrane as related to environmental salinity. **Biochim. Biophys. Acta.** 778:233– 238.

Lin, H. C.; Su, Y. C.; Su, S. H. (2002) A comparative study of osmoregulation in four fiddler crabs (*Ocypodidae*: Uca). **Zoolog. Sci.** 19:643-650.

Linko, R. R.; Kaitaranta, J. K.; Vuorela, R. (1985) Comparison of the fatty acids in *Baltic herring* and available plankton feed. **Comp. Biochem. Physiol. (B)** 82: 699-705.

Lucu, C.; Devescovi, M.; Skaramuca, B.; Kozul, V. (2000) Gill Na, K-ATPase in the spiny lobster *Palinurus elephas* and other marine

osmoconformers: adaptiveness of enzymes from osmoconformity to hyperrregulation. **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.** 246: 163-178.

Lucu, C.; Towle, D. W. (2003) Na⁺ /K⁺ -ATPase in gills of aquatic crustacea. **Comp. Biochem. Physiol.** 135A:195-214.

Luquet, C. M.; Genovese, G.; Rosa, G. A.; Pellerano, G. N. (2002) Ultrastructural changes in the gill epithelium of the crab *Chasmagnathus granulatus* (Decapoda: Grapsidae) in diluted and concentrated seawater. **Mar. Biol.** 141:753–760.

Luvizotto-Santos, R.; Lee, J.; Branco, Z.; Bianchini, A.; Nery, L. (2003) Lipids as energy source during salinity acclimation in the euryhaline crab *Chasmagnathus granulata* (Dana)- 1851 (Crustacea: Grapsidae). **J. Exp. Zool. A. Comp. Exp. Biol.** 295:200–205.

Maciel, J. E. S.; Souza, F.; Valle, S.; Kucharski, L. C.; Silva, R. S. M. (2008) Lactate metabolism in the muscle of crab *Chasmagnathus granulatus* during hypoxia and post-hypoxia recovery. **Comp. Biochem. Physiol. (A)** 151: 61-65.

Mantel, L. H.; Farmer, L. L. (1983) Osmotic and ionic regulation. **The Biology of Crustacea.** 5: 53-161.

Martinez, C. B. R.; Alvares, E. P.; Haris, R. R.; Santos, M. C. F. (1999) A morphological study on posterior gills of the mangrove crab *Ucides cordatus*. **Tissue Cell.** 31(3):380-389.

Martínez-Álvarez, R. M.; Sanz, A.; García-Gallego, M.; Domezain, A.; Domezain, J.; Carmona, R.; Ostos-Garrido, M.; Morales, A. E. (2005) Adaptive branchial mechanisms in the sturgeon *Acipenser naccarii* during acclimation to saltwater. **Comp. Biochem. Physiol. (A)** 141:183-190.

- Martins, C. D. M. G.; Barcarolli, I. F.; De Menezes, E. J.; Giacomini, M. M.; Wood, C. M.; Bianchini, A. (2011) Acute toxicity, accumulation and tissue distribution of copper in the blue crab *Callinectes sapidus* acclimated to different salinities: *in vivo* and *in vitro* studies. **Aquat. Toxicol.** 101(1): 88-99.
- Massuí, D. C.; Furriel, R. P. M.; McNamara, J. C.; Mantelatto, F. L. M.; Leone, F. A. (2003) Modulation by ammonium ion of gill microsomal Na, K-ATPase in the swimming crab *Callinectes danae*: a possible mechanism for regulation of ammonia excretion. **Comp. Biochem. Physiol. (C)** 132(4): 471-482.
- McGeer, J. C.; Szebedinszky, C.; McDonald, D. G.; Wood, C. M. (2000) Effects of chronic sublethal exposure to waterborne Cu, Cd or Zn in rainbow trout: tissue specific metal accumulation. **Aquat. Toxicol.** 50(3): 245-256.
- Monteiro, S. M.; Mancera, J. M.; Fontaínhas-Fernandes, A.; Sousa, M. (2005) Copper induced alterations of biochemical parameters in the gill and plasma of *Oreochromis niloticus*. **Comp. Biochem. Physiol. (C)** 141(4): 375-383.
- Morris, R. J.; Lockwood, A. P. M.; Dawson, M. E. (1982) An effect of acclimation salinity on the fatty acid composition of the gill phospholipids and water flux of the amphipod crustacean *Gammarus duebeni*. **Comp. Biochem. Physiol.** 72A:497–503.
- Morth, J. P.; Pedersen, B. P.; Toustrup-Jensen, M. S.; Sorensen, T. L. M.; Petersen, J.; Andersen, J. P.; Vilsen, B.; Nissen, P. (2007). Crystal structure of the sodium-potassium pump. **Nature.** 450:1043–1050.
- Nordhaus, I. (2003) Feeding ecology of the semi-terrestrial crab. *U. cordatus* (Decapoda: Brachyura) in a mangrove forest in northern Brazil.

Tese (Doutorado em Ciências Naturais) – Zentrum für Marine Tropenökologie, Universität Bremen. 217.

Onken, H.; McNamara, J. C. (2002) Hyperosmoregulation in the red freshwater crab *Dilocarcinus pagei* (Decapoda, Trichodactylidae): Structural and functional asymmetries of posterior gills. **J. Exp. Biol.** 205:167-175.

Onken, H.; Riestenpatt, S. (2002) Ion transport across posterior gills of hyperosmoregulating shore crabs (*Carcinus maenas*): amiloride blocks the cuticular Na⁺ conductance and induces current-noise. **J. Exp. Biol.** 205:523–531.

Onken, H.; Riestenpatt, S.; (1998) NaCl absorption across split gill lamellae of hyperegulating crabs: transport mechanisms and their regulation. **Comp. Biochem. Physiol.** 119A:883–893.

Pagliarani, A.; Ventrella, V.; Ballestrazzi, R.; Trombetti, F.; Pirini, M.; Trigari, G. (1991) Salinity-dependence of the properties of gill Na⁺ /K⁺ - ATPase in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Comp. Biochem. Physiol.** 100B:229–236.

Parrish, C.C. (1998) Dissolved and particulate marine classes: A review. **Mar. Chem.** 23:17-40.

Pedersen, P. L. (2007) Transport ATPases into the year 2008: a brief overview related to types, structures, functions and roles in health and disease. **J. Bioenerg. Biomembr.** 39:349–355.

Pequeux, A. (1995) Osmotic regulation in Crustaceans. **J. Crust. Biol.** 15:1-60.

- Perales-Vela, H. V.; Penã-Castro, J. M.; Cañizares-Villanueva, R. O. (2006) Heavy metal detoxification in eukaryotic microalgae (review). **Chemosp.** 64: 1-10.
- Pierrot, C.; Pequeux, A.; Thuet, P. (1995) Perfusion of gills isolated from the hyper-hyporegulating crab *Pachygrapsus marmoratus* (Crustacea, Decapoda): adaptation of a method. **Arch. Physiol. Biochem.** 103:401-409.
- Piffer, S.; Henry, R.; Docller, J.; Kraus, D. A. (1995) A comparison of the gill physiology of two euryhaline crab species, *Callinectes sapidus* and *Carcinus similis*: energy production, transport-related enzymes and osmoregulation as a function of acclimation salinity. **J. Exp. Biol.** 198: 349-358.
- Pinheiro, M. A. A.; Wunderlich, A. C.; Rodrigues, A. M. T. (2008) Biology of the mangrove uçá crab, *Ucides cordatus* (Crustacea: Decapoda: Brachyura), in Babitonga Bay. **Rev. Brasileira de Zoologia.** 25(2):188–198.
- Pressley, T. A.; Graves, J. S. (1983) Increased amino acid oxidation in the gills of blue crabs acclimated to seawater. **J. Exp. Zool.** 226:45–51.
- Ratnayake, W. N.; Ackman, R. G. (1979) Fatty alcohols in capelin, herring, and mackerel oils and muscle lipids: II. A comparison of fatty acids from wax esters with those of triglycerides. **Lipids.** 14: 804-810.
- Rainbow, P. S. (1988) The significance of trace metal concentrations in decapods. **Symp. Zool. Soc. Lond.** 59: 291-313.
- Rebello, M.; Rodriguez, E. M.; Santos, E. A.; Ansaldo, M. (2000) Histopathological changes in gills of the estuarine crab *Chasmagnathus*

granulatus (Crustacea-Decapoda) following acute exposure to ammonia.

Comp. Biochem. Physiol. (C) 125(2): 157-164.

Rinderhagen, M.; Ritterhoff, J.; Zauki, G. P. (2000) Crustaceans as bioindicators. **Biomon. Poll.** 9: 161-194.

Rival, D. M.; Lamotte, M.; Donard, O. F. X.; Soriano-Sierra, E. J. Robert, M. (1996) Metal contamination in surface sediments of mangroves, lagoons and southern Bay in Florianopolis Island. **Environ. Tecn.** 17(10): 1035-1046.

Rojas, E.; Tobias, J. M. (1965) Membrane model association of inorganic cations with phospholipid monolayers. **Biochim. Biophys Acta.** 94:394-404.

Romano, N.; Zeng, C. (2007) Ontogenetic changes in tolerance to acute ammonia exposure and associated gill histological alterations during early juvenile development of the blue swimmer crab, *Portunus pelagicus*. **Aquacult.** 266(1-4): 246-254.

Roy, R.; Das, A. B.; Ghosh, D. (1997) Regulation of membrane lipid bilayer structure during seasonal variation: a study on the brain membranes of *Clarias batrachus*. **Biochim. Biophys. Acta.** 1323:65– 74.

Sandermann, H. (1978) Regulation of membrane enzyme by lipids. **Biochim. Biophys Acta.** 515:209-237.

Santiago, E.; Lopez-Moratella, N.; Segovia, J. L. (1973) Correlation between losses of mitochondrial ATPase activity and cardiolipin degradation. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 53:439-445.

Schimidt-Nielsen, N. (2002) Fisiologia Animal – Adaptação e Meio Ambiente. 5ª ed, **Santos Livraria.** 611p.

- Smith, M. W.; Miller, N. G. A. (1980) Phospholipids and membrane function during temperature adaptation. In: **Animal and Environmental Fitness** (Editor Guilles, R.) Oxford: Pergamon Press. 521– 40.
- Skou, J. C. (1960) Further investigations on a $Mg^{2+} + Na^{+}$ activated adenosinetriphosphate, possibly related to the active, linked transport of Na^{+} and K^{+} across the nerve membrane. **Biochem. Biophys. Acta.** 42: 6-23.
- Stuart, J. A.; Gillis, T. E.; Ballantyle, J. S. (1998) Compositional correlates of metabolic depression in the mitochondrial membranes of estivating snails. **Am. J. Physiol.** 275: 1977-1982.
- Tam, N. F. Y.; Yao, M. W. Y. (1998) Normalization and heavy metal contamination in mangrove sediments. **Sci. Tot. Environ.** 216(1-2): 33-39.
- Taylor, H. H.; Taylor, E. W. (1992) Gills and lungs: the exchange of gases and ions. Em: Harrison, F. W.; Humes, A. G. Microscopic anatomy of invertebrates. **Wiley-Liss**, 10: 203-213
- Towle, D. W.; Weihrauch, D. (2001) Osmoregulation by gills of euryhaline crabs: molecular analysis of tranporters. **Am. Zool.** 41: 770-780.
- Truchot, L. P. (1990) Respiration and ionic regulation in invertebrates exposed to both water and air. **Ann. Rev. Physiol.** 52: 61-76.
- Tsai, J. R.; Lin, H. C. (2007). V-type H^{+} -ATPase and Na^{+} , K^{+} -ATPase in the gills of 13 euryhaline crabs during salinity acclimation. **J. Exp. Biol.** 210: 620-627.
- Vitalle, A. M.; Monserrat, J. M.; Castilho, P.; Rodriguez, E. M. (1999) Inhibitory effects of cadmium on carbonic anhydrase activity and ionic

regulation of the estuarine crab *Chasmagnatus granulatus* (Decapoda, Grapsidae). **Comp. Biochem. Physiol.** (C) 122(1): 121-129.

Voelker, D. R. (1984) Phosphatidylserine functions as the major precursor of phosphatidylethanolamine in cultured BHK-21 cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 81:2373–669.

Welcomme, L.; Devos, P. (1988) Cytochrome c oxidase and Na⁺ /K⁺ - ATPase activities in the anterior and posterior gills of the shore crab *Carcinus maenas* L. after adaptation to various salinities. **Comp. Biochem. Physiol.** 89B:339–341.

Wood, C. (1992) Flux measurements as indices of H⁺ and metal effects of freshwater fish. **Aquat. Toxicol.** 22: 239-263.

Wu, J. P.; Chen, H. C. (2005) Metallothionein induction and heavy metal accumulation in white shrimp *Litopenaeus vannamei* exposed to cadmium and zinc. **Comp. Biochem. Physiol.** (C) 140(3-4): 383-394.

Yamauchi, T.; Ohki, K.; Maruyama, H.; Nozawa, Y. (1981) Thermal adaptation of Tetrahymena membranes with special references to mitochondria. Role of cardiolipin in fluidity of mitochondrial membranes. **Biochim. Biophys Acta.** 649:385-392.

Yang, Z. B.; Zhao, Y. L.; Li, N.; Yang, J. (2007) Effect of the waterborne copper on the microstructures of the gill and hepatopancreas in *Eriocheir sinensis* and its induction of metallothionein synthesis. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.** 52(2): 222-228.

Zwingelstein, G.; Bodennec, J. (1998) Phospholipid metabolism in euryhaline fish and crustaceans. Effects of environmental salinity and temperature. **Recent. Res. Develop. Lipids Res.** 2:39–52.

Zwingelstein, G.; Meister, R.; Brichon, G. (1975) Metabolisme comparé des phospholipides des organes effecteurs de l'osmoregulation chez l'anguille européenne (*Anguilla anguilla*) **Biochimie**. 57:609-22.

Zwingelstein, G.; Abdul-Malak, N.; Brichon, G. (1978) Effect of environmental temperature on biosynthesis of liver phosphatidylcholine in the trout (*Salmo gairdneri*). **J. Therm. Biol.** 3:229–33.

Zwingelstein, G.; Abdul-Malak, N. (1977) Température d'adaptation et renouvellement in vivo des différentes espèces moléculaires de la lécithine des tissus de la truite arcenciel (*Salmo gairdneri* R.). **Biochimie**. 59:655–7.

Zwingelstein, G.; Brichon, G.; Bodennec, J.; Chapelle, S.; Abdul-Malak, N.; el Babili M (1998b) Formation of phospholipid nitrogenous bases in euryhaline fish and crustaceans. II. Phosphatidylethanolamine methylation in liver and hepatopancreas. **Comp. Biochem. Physiol.** 120B:475–482.

Zwingelstein, G.; Bodennec, J.; Brichon, G.; Abdul-Malak, N.; Chapelle, S.; el Babili, M. (1998a) Formation of phospholipid nitrogenous bases in euryhaline fish and crustaceans. I. Effects of salinity and temperature on synthesis of phosphatidylserine and its decarboxylation. **Comp. Biochem. Physiol.** 120B:467–473.