UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FFCLRP - DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA COMPARADA

**O cotransportador Na^+ , K^+ , 2Cl^- e a secreção de cloreto branquial
em camarões Palaemonidae (Decapoda, Crustacea):
padrões moleculares, fisiológicos e evolutivos**

Anieli Cristina Maraschi

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia,
Ciências e Letras de Ribeirão Preto da USP, como
parte das exigências para a obtenção do título de
Doutor em Ciências, Área: Biologia Comparada

RIBEIRÃO PRETO - SP

2018

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FFCLRP - DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA COMPARADA

O cotransportador Na^+ , K^+ , 2Cl^- e a secreção de cloreto branquial
em camarões Palaemonidae (Decapoda, Crustacea):
padrões moleculares, fisiológicos e evolutivos

Anieli Cristina Maraschi

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia,
Ciências e Letras de Ribeirão Preto da USP, como
parte das exigências para a obtenção do título de
Doutor em Ciências, Área: Biologia Comparada

Orientador: Prof. Dr. John Campbell McNamara

RIBEIRÃO PRETO - SP

2018

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Maraschi, Anieli Cristina

O cotransportador Na^+ , K^+ , 2Cl^- e a secreção de cloreto branquial em camarões Palaemonidae (Decapoda, Crustacea): padrões moleculares, fisiológicos e evolutivos.

121 p. : il. ; 30 cm

Tese de Doutorado apresentada ao Departamento de Biologia da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Biologia Comparada.

Orientador: McNamara, John Campbell.

1. Osmorregulação. 2. Transportadores iônicos. 3. Expressão proteica.
4. Expressão gênica. 5. Imunofluorescência 6. Crustáceos decápodes
7. Filofisiologia 8. Métodos comparativos filogenéticos

FOLHA DE APROVAÇÃO

Anieli Cristina Maraschi

O cotransportador Na^+ , K^+ , 2Cl^- e a secreção de cloreto branquial em camarões Palaemonidae (Decapoda, Crustacea): padrões moleculares, fisiológicos e evolutivos.

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da USP, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Ciências, Área: Biologia Comparada

Aprovado em:

Banca examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha mãe Angélica pelo exemplo de força e valentia, pelo apoio inesgotável em todas as minhas escolhas e sobretudo pelo amor e incentivo acadêmico. Aos meus avós Neiva e Celso pelo amor depositado e por sempre acreditarem no meu trabalho e nos meus sonhos.

Agradeço ao meu orientador e professor John pela oportunidade, pelo acolhimento, pelo carinho e dedicação. Aos seus ensinamentos acadêmicos, científicos, teóricos e práticos. Por esses quatro anos de muito aprendizado e toda experiência compartilhada no Ushuaia. Foi um imenso prazer trabalhar e ter a honra de aprender com você.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Comparada, incluindo professores, colegas e a querida Vera, pela oportunidade de convivência, formação, disponibilidade de recursos, financiamento de congressos, dedicação e cordialidade.

Agradeço à FAPESP pela bolsa de doutorado e todo recurso disponibilizado para o desenvolvimento do projeto com exclusividade e extrema dedicação.

Aos meus amigos irmãos Mariana Velloso Capparelli e Fabrício Freitas Fernandes por TUDO que não caberia aqui. Os melhores presentes que Ribeirão me deu, dois grandes parceiros, para qualquer hora, para qualquer coisa.

Aos meus amigos e colegas de Ifc: Susie, parceira das manhãs, obrigada pela paciência, empenho e cuidado; Rogério Faleiros, o colega que virou irmão, obrigada por me receber com maior afeto e zelo, por me ensinar muito, ou quase tudo, sobre biologia molecular; Milene Mantovani pela companhia e cafezinhos na med, pela disponibilidade em me ajudar sempre que solicitei; Samuel Faria, valeu demais pelos cafés, pelas prosas científicas, e por toda ajuda e empenho em solucionar minhas questões imaturas sobre métodos comparados; ao casal de paraíbas mais gente boa de Ribeirão, Daniel e Sayane; Elaine pelo acolhimento e carinho; aos alunos de IC, Paola e Yoshi, pelo pouco tempo de convívio, porém agradável e de aprendizado.

À toda vizinhança do bloco 15, como Álvaro, Dona Nina, Andreia, Cidinha, Ricardo... por toda a ajuda e agradável convivência nesses quatro anos.

À família Ifco pelo carinho sempre presente. Profas. Viviane e Carolina, por prontamente apoiarem meu projeto, ajuda nas coletas e espaço. Ao casal de Drs. mais animados Gi e Marcos, pelo apoio nas ideias iniciais, coleta e planejamento. À Dra. Silvia pela parceria sempre, conversas e ajuda intercontinental. Ao Léo pela ajuda nas coletas e boas risadas.

Ao laboratório de imunologia, coordenado pelo amigo e Prof. Ademilson Panunto Castelo, pela boa convivência, cafés e boas conversas. Agradeço também pela disponibilidade no uso do equipamento de PCR em tempo real que operou toda a parte de expressão gênica do projeto.

Aos técnicos dos laboratórios de biologia celular do Departamento de Medicina da USP, Vani e Bete, pela atenção às minhas dúvidas, pelos ensinamentos e disponibilidade do uso do criostato e microscópio confocal. À técnica do laboratório multiusuário de microscopia multifoton e amiga Dra. Roberta Rosales, pelas boas horas no microscópio, pela atenção e paciência, cuidado com meu material e companhia.

Ao Centro de Biologia Marinha da USP, CEBIMar, pelo apoio ao meu projeto e pela sempre prazerosa estadia em suas dependências. Agradeço aos técnicos Elso e Joseilto pelo apoio nas coletas e por toda cordialidade.

Aos meus queridos amigos da vida Perciformes, Rodrigo, Bela e Perci. Obrigada pelo apoio, pela visita, boas viagens, conversas e amor.

Ao grupo das minas Fogs, Marina e Dani, por dividirem bons momentos, jantinhas, experiências e reflexões.

Aos amigos PegasUSP por compartilharem comigo o prazer e amor pelas corridas, por me ajudarem a conquistar metas antes inalcançáveis, e pela parceria dentro e fora da pista.

A todos meus familiares e amigos que de alguma forma apoiaram, incentivaram e contribuíram na minha longa e curta caminhada de quatro anos de doutorado.

E finalmente à Ju e a Foca. A família que se constrói, ao companheirismo, cuidado, amor e resiliência. Sem vocês nada que se sonha teria razão de sonhar e motivo de se fazer concreto. Dedico a vocês esta obra.

“Queremos ter certezas e não dúvidas, resultados e não somente experiências, mas nem sempre percebemos que as certezas só podem surgir através das dúvidas e os resultados somente através das experiências.”

- Carl Jung

RESUMO

MARASCHI, A.C. O cotransportador Na^+ , K^+ , 2Cl^- e a secreção de cloreto branquial em camarões Palaemonidae (Decapoda, Crustacea): padrões moleculares, fisiológicos e evolutivos. 2018. 121f. Tese (Doutorado). Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

Como resultado do seu passado evolutivo, a família dos camarões Palaemonidae reúne representantes de ambientes osmóticos dos mais variados. Sejam de ambientes marinhos, estuarinos ou dulcícolas, estáveis ou variáveis, as espécies destes camarões mantêm a concentração osmo-iônica da hemolinfa independente da concentração do meio. Essas espécies hiper-regulam a osmolalidade e íons da hemolinfa em meio diluído e água doce e hipo-regulam em meio concentrado ou água do mar. Um importante local de transporte iônico envolvido na regulação osmo-iônica é o epitélio branquial, pois nas membranas de seus ionócitos constituintes encontra-se um conjunto de transportadores que efetuam o movimento transepitelial de íons. Dentre estes transportadores, o simportador Na^+ , K^+ , 2Cl^- (NKCC) é considerado ter um papel na secreção de sal, objetivo primário dessa investigação. Espécies representativas de habitat marinho do gênero *Palaemon* foram coletadas em regiões de estuário e de poça de maré, e de habitat dulcícola do gênero *Macrobrachium* foram coletadas em rios que desembocam no mar e também em riachos continentais sem influência do aporte salobro. Avaliou-se os limites letais de salinidade superior (LSS_{50}) das espécies marinhas *P. northropi* e *P. pandaliformis* e dulcícolas diádromas *M. acanthurus*, *M. olfersi*, *M. amazonicum* que dependem de água salobra para completo desenvolvimento larval, e hololimnéticas *M. potiuna* e *M. brasiliense* com ciclo reprodutivo completo em água doce. Objetivou-se aqui (i) caracterizar os mecanismos de hiperregulação (condição controle de 18 ‰ *P. northropi*, 17 ‰ *P. pandaliformis*, água doce <0,5 ‰ nas espécies de *Macrobrachium*) e hiporegulação [a curto (24 h) e longo prazo (120 h) em salinidade correspondente a 80% da LSS_{50}] da osmolalidade e $[\text{Cl}^-]$ da hemolinfa, da expressão gênica e proteica e a localização por imunofluorescência do NKCC nos ionócitos branquiais; (ii) da existência de um padrão filogenético nesses parâmetros; e (iii) testar as hipóteses de um efeito da salinidade na evolução da expressão gênica e proteica desse simportador. As espécies de *Palaemon* apresentaram os maiores limites de tolerância ao aumento da salinidade, assim como exibiram uma maior capacidade hiporegulatória a longo prazo (120 h) comparada aos representantes de *Macrobrachium*. Dentre as espécies de *Macrobrachium*, os limites de tolerância foram maiores nas espécies diádromas do que nas hololimnéticas. Os parâmetros LSS_{50} , osmolalidade e $[\text{Cl}^-]$ da hemolinfa demonstraram-se estruturados na filogenia, sendo as semelhanças compartilhadas justificadas pela estreita proximidade entre as espécies. As análises filogenéticas revelaram que a capacidade hiper-regulatória da $[\text{Cl}^-]$ da hemolinfa foi correlacionada com a expressão gênica do simportador NKCC nas brânquias, enquanto que a síntese proteica do NKCC parece estar associada à hiper-regulação da osmolalidade da hemolinfa. A avaliação da localização do NKCC por imunofluorescência demonstrou que o simportador está distribuído em ambas as células que compõem o epitélio das brânquias, as células pilares e células do septo intralamelar. A localização na porção inferior das franjas e no corpo da célula pilar e por toda célula do septo não diferiu entre as espécies, e também não diferiu entre as condições controle e a curto e longo prazo em salinidade elevada. Esses resultados em conjunto sugerem a importância do NKCC também na captação de sal pelas brânquias. Houve um aumento da síntese proteica do NKCC nas brânquias dos representantes de *Macrobrachium*, exceto *M. potiuna*, quando em salinidade elevada. Observou-se que este aumento é explicado pela proximidade filogenética entre as espécies. Não houve mudança na transcrição de RNAm para o NKCC apesar do aumento na síntese proteica, o que sugere uma possível regulação pós-transcricional. A reconstrução da história evolutiva da osmorregulação, incorporando o conceito de “filofisiologia”, revelou a existência de mecanismos em nível molecular, celular e sistêmico que evoluíram acompanhando os eventos cladogenéticos dos Palaemonidae durante a irradiação e ocupação de diferentes nichos osmóticos.

Palavras-chave: Osmorregulação; Transportadores iônicos; Expressão proteica; Expressão gênica; Imunofluorescência; Crustáceos decápodes; Filofisiologia; Métodos comparativos filogenéticos.

ABSTRACT

MARASCHI, A.C. The $\text{Na}^+,\text{K}^+,2\text{Cl}^-$ cotransporter and the gill chloride secretion in Palaemonid shrimps (Decapoda, Crustacea): molecular, physiological and evolutionary patterns. 2018. 121f. Thesis (Doctoral). Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

Owing to their evolutionary history, the shrimp family Palaemonidae includes species from widely distinct osmotic environments. Whether from marine, estuarine, or fresh waters, inhabiting stable or variable osmotic niches, these shrimps maintain the osmotic-ionic concentration of their hemolymph independently of the concentration of the external medium. These species hyper-regulate hemolymph osmolality and ions in dilute medium and fresh water and hypo-regulate this fluid in concentrated medium or seawater. The gill epithelium constitutes an important interface of ion transport, and its constituent ionocytes express an ensemble of ion transporters that enable active transepithelial ion movements. The $\text{Na}^+,\text{K}^+,2\text{Cl}^-$ cotransporter (NKCC) is thought to play a significant role in compensatory salt secretion. Species representative of the marine habitat (*Palaemon*) were collected from estuaries and tidal pools; diadromous species from the fresh water habitat (*Macrobrachium*) were collected near the mouths of rivers that flow into the sea, while hololimnetic species were collected in continental streams lacking the influence of brackish waters. The critical upper salinity limits (LSS_{50}) of the marine species *P. northropi* and *P. pandaliformis* and the diadromous freshwater species *M. acanthurus*, *M. olfersi*, *M. amazonicum* that depend on brackish water for complete larval development, and the hololimnetic *M. potiuna* and *M. brasiliense* that complete their reproductive cycle entirely in fresh water were established. Our objectives were to characterize the mechanisms of hyper-regulation (control condition 18 ‰ *P. northropi*, 17 ‰ *P. pandaliformis*, fresh water <0.5 ‰ for *Macrobrachium*) and hypo-regulation [short-term (24 h) and long-term (120 h) at salinities corresponding to 80% of LSS_{50}] of hemolymph osmolality and $[\text{Cl}^-]$, gene and protein expression, and NKCC localization for immunofluorescence in the gill ionocytes; (ii) the existence of a phylogenetic pattern in these parameters; and (iii) to test hypotheses for a salinity effect on the evolution of the gene and protein expression of this symporter. The species of *Palaemon* had the highest tolerance limits to increased salinity, and also exhibited a greater hypo-regulatory capacity for long-term acclimation compared to the species of *Macrobrachium*. Among the *Macrobrachium* species, the LSS_{50} were higher in the diadromous species than in the hololimnetic species. The parameters LSS_{50} and osmolality and $[\text{Cl}^-]$ of the hemolymph were phylogenetically structured, similarities being shared by closely related species. The hyper-regulatory capacity of hemolymph $[\text{Cl}^-]$ correlated with NKCC gene expression in the gills, while NKCC protein synthesis appears to be associated with hyper-regulation of hemolymph osmolality. Immunofluorescence analysis showed that the NKCC was located in both cell types that constitute the gill epithelium, the pillar cells and the septal cells. The location of the NKCC in the lower flanges and perikarya of the pillar cells and throughout the septal cells, did not differ among species, and also did not differ among control conditions or short and long-term exposure at high salinity. These results together also suggest the importance of the NKCC in salt uptake by the gills. When in high salinity there was an increase in NKCC protein synthesis in the gills of the *Macrobrachium* species, except for *M. potiuna*. This increase can be explained by the phylogenetic proximity among those species, which excludes adaptive inferences. There was no change in NKCC mRNA transcription, which suggests possible post-transcriptional regulation. The reconstruction of the evolutionary history of osmoregulation, incorporating the concept of “phylophysiology”, revealed the existence of mechanisms at the molecular, cellular and systemic levels that have evolved accompanying the cladogenetic events of the Palaemonidae during their radiation and occupation of different osmotic niches.

Keywords: Osmoregulation; Ionic transporters; Protein expression; Gene expression; Immunofluorescence; Decapod Crustacea; Phylophysiology; Comparative phylogenetic methods.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Parte inferior, ilustração de uma lamela branquial isolada de uma pleurobrânquia de camarão palemonídeo, arranjo do canal da hemolinfa e o canal marginal periférico. Acima, o corte transversal da lamela mostrando as células pilares (CP), septo intralamelar (S) e canal marginal (CM) (Adaptado de Maraschi et al. 2015). 22
- Figura 2.** Modelo hipotético para a captura e secreção de sal em camarões palemonídeos de água doce. 24
- Figura 3.** Estimativa do estado ancestral (setas) por análise de parcimônia para osmolalidade do habitat (mOsm/kg H₂O, lado esquerdo, salinidade de 1 ‰ = 30 mOsm/kg H₂O) e osmolalidade da hemolinfa (mOsm/kg H₂O, lado direito) em um clado de camarões palemonídeos (modificado de Pereira 1997) com *Alpheus viridari* e *Crangon crangon* como grupos-externos (Bracken et al. 2009). C, D, F, H e I são clados (= agrupamentos naturais) considerados particularmente relevantes para evolução da osmorregulação em Palaemonidae. Modificado de McNamara e Faria (2012). 25
- Figura 4.** Curvas de sobrevivência (%) de *P. northropi*, camarão marinho de poça de maré, submetido às salinidades de 40 (●), 45 (○), 48 (▼) e 50 (Δ) ‰ durante 120 h (n = 8, cada). O tempo 0 h corresponde à salinidade 18 ‰ (n=8). A análise probit estima 50% de sobrevivência em 43,1 ‰S (LSS₅₀) após 120 h. 53
- Figura 5.** Curvas de sobrevivência (%) de *P. pandaliformis*, camarão estuarino, submetido às salinidades de 33 (●), 35 (○), 39 (▼) e 42 (Δ) ‰ durante 120 h (n = 8, cada). O tempo 0 h corresponde à salinidade 17 ‰ (n=8). A análise probit estima 50% de sobrevivência em 39,7 ‰S (LSS₅₀) após 120 h. 54
- Figura 6.** Curvas de sobrevivência (%) de *M. acanthurus*, camarão dulcícola diádromo, submetido às salinidades de 28 (●), 30 (○), 31 (▼) e 33 (Δ) ‰ durante 120 h (n = 8, cada). O tempo 0 h corresponde à condição controle em água doce (n=8). A análise probit estima 50% de sobrevivência em 31,4 ‰S (LSS₅₀) após 120 h. 55
- Figura 7.** Curvas de sobrevivência (%) de *M. olfersi*, camarão dulcícola diádromo, submetido às salinidades de 24 (●), 26 (○), 28 (▼) e 30 (Δ) ‰ durante 120 h (n = 8, cada). O tempo 0 h corresponde à condição controle em água doce (n=8). A análise probit estima 50% de sobrevivência em 28 ‰S (LSS₅₀) após 120 h. 56
- Figura 8.** Curvas de sobrevivência (%) de *M. amazonicum*, camarão dulcícola diádromo/hololimnético, submetido às salinidades de 16 (●), 22 (○), 25 (▼) e 28 (Δ) ‰ durante 120 h (n = 8, cada). O tempo 0 h corresponde à condição controle em água doce (n=8). A análise probit estima 50% de sobrevivência em 25 ‰S (LSS₅₀) após 120 h. 57
- Figura 9.** Curvas de sobrevivência (%) de *M. potiuna*, camarão dulcícola hololimnético, submetido às salinidades de 22 (●), 25 (○), 28 (▼) e 31 (Δ) ‰ durante 120 h (n = 8, cada). O tempo 0 h corresponde à condição controle em água doce (n=8). A análise probit estima 50% de sobrevivência em 24 ‰S (LSS₅₀) após 120 h. 58

Figura 10. Curvas de sobrevivência (%) de *M. brasiliense*, camarão dulcícola hololimnético, submetido às salinidades de 19 (●), 22 (○), 25 (▼) e 27 (Δ) ‰ durante 120 h (n = 8, cada). O tempo 0 h corresponde à condição controle em água doce (n=8). A análise probit estima 50% de sobrevivência em 24,7 ‰S (LSS₅₀) após 120 h. 59

Figura 11. Osmolalidade (mOsm/kg H₂O) e concentração de cloreto (mM) da hemolinfa, e conteúdo hídrico muscular (%) de *P. northropi* nas condições controle (0 horas, 18 ‰S, ~540 mOsm/kg H₂O e ~288 mM Cl⁻) (n = 6-9) e experimental (indicado pelas setas no eixo a direita: Osm_{Ex} 35 ‰S; ~1050 mOsm/kg H₂O e Cl⁻_{Ex} ~560 mM Cl⁻) (correspondente à 80% da LSS₅₀) durante 24 e 120 h (n = 7-10, cada). Dados da osmolalidade e [Cl⁻] da hemolinfa são expressos como a média ± erro padrão da média, e teor hídrico como a média da porcentagem. #significativamente diferente de ambos os grupos anteriores. 60

Figura 12. Osmolalidade (mOsm/kg H₂O) e concentração de cloreto (mM) da hemolinfa, e conteúdo hídrico muscular (%) de *P. pandaliformis* nas condições controle (0 horas, 17 ‰S, ~510 mOsm/kg H₂O e ~272 mM Cl⁻) (n = 8) e 32 ‰S (indicado pelas setas no eixo a direita: Osm_{Ex} ~960 mOsm/kg H₂O e Cl⁻_{Ex} ~512 mM Cl⁻) (correspondente à 80% da LSS₅₀) durante 24 e 120 h (n = 9, cada). Dados da osmolalidade e [Cl⁻] da hemolinfa são expressos como a média ± erro padrão da média, e teor hídrico como a média da porcentagem. 61

Figura 13. Osmolalidade (mOsm/kg H₂O) e concentração de cloreto (mM) da hemolinfa, e conteúdo hídrico muscular (%) de *M. acanthurus* nas condições controle (0 horas, água doce) (n=8) e 25 ‰S (indicado pelas setas no eixo a direita: Osm_{Ex} ~750 mOsm/kg H₂O e Cl⁻_{Ex} 400 mM Cl⁻) (correspondente à 80% da LSS₅₀) durante 24 e 120 horas (n = 8, cada). Dados da osmolalidade e [Cl⁻] da hemolinfa são expressos como a média ± erro padrão da média, e teor hídrico como a média da porcentagem. 62

Figura 14. Osmolalidade (mOsm/kg H₂O) e concentração de cloreto (mM) da hemolinfa, e conteúdo hídrico muscular (%) de *M. olfersi* nas condições controle (0 horas, água doce) (n=8) e 22 ‰S (indicado pelas setas no eixo a direita: Osm_{Ex} ~660 mOsm/kg H₂O e Cl⁻_{Ex} ~352 mM Cl⁻) (correspondente à 80% da LSS₅₀) durante 24 e 120 h (n = 8, cada). Dados da osmolalidade e [Cl⁻] da hemolinfa são expressos como a média ± erro padrão da média, e teor hídrico como a média da porcentagem. 63

Figura 15. Osmolalidade (mOsm/kg H₂O) e concentração de cloreto (mM) da hemolinfa, e conteúdo hídrico muscular (%) de *M. amazonicum* nas condições controle (0 horas, água doce) (n=8) e 20 ‰S (indicado pelas setas no eixo a direita: Osm_{Ex} ~600 mOsm/kg H₂O e Cl⁻_{Ex} ~320 mM Cl⁻) (correspondente à 80% da LSS₅₀) durante 24 e 120 h (n = 8, cada). Dados da osmolalidade e [Cl⁻] da hemolinfa são expressos como a média ± erro padrão da média, e teor hídrico como a média da porcentagem. 64

Figura 16. Osmolalidade (mOsm/kg H₂O) e concentração de cloreto (mM) da hemolinfa, e conteúdo hídrico muscular (%) de *M. potiuna* nas condições controle (0 horas, água doce) (n=8) e 19 ‰S (indicado pelas setas no eixo a direita: Osm_{Ex} ~570 mOsm/kg H₂O e Cl⁻_{Ex} 304 mM Cl⁻) (correspondente à 80% da LSS₅₀) durante 24 e 120 h (n = 8, cada). Dados da osmolalidade e [Cl⁻] da hemolinfa são expressos como a média ± erro padrão da média, e teor hídrico como a média da porcentagem. 65

Figura 17. Osmolalidade (mOsm/kg H₂O) e concentração de cloreto (mM) da hemolinfa, e conteúdo hídrico muscular (%) de *M. brasiliense* nas condições controle (0 horas, água doce) (n = 8) e 20 ‰ (indicado pelas setas no eixo a direita: Osm_{Ex} ~600 mOsm/kg H₂O e Cl⁻_{Ex} ~320 mM Cl⁻) (correspondente a 80% da LSS₅₀) durante 24 e 120 horas (n = 8, cada). Dados da osmolalidade e [Cl⁻] da hemolinfa são expressos como a média ± erro padrão da média, e teor hídrico como a média da porcentagem..... 66

Figura 18. Expressão relativa de RNAm do simportador NKCC das brânquias do camarão marinho *P. northropi* nas condições controle (0 horas, 18 ‰) e quando exposto a 35 ‰ após 24 e 120 horas (média ± erro padrão; n = 5-6). Os valores da expressão foram normalizados pela expressão de RNAm da proteína ribossomal L10 nas mesmas amostras e calibrados pelo grupo controle (0 horas, água doce). Não houve diferença estatística entre os grupos..... 69

Figura 19. Expressão relativa de RNAm do simportador NKCC do camarão marinho *P. pandaliformis* nas condições controle (0 horas, 17 ‰) e quando exposto a 32 ‰ após 24 e 120 horas (média ± erro padrão; n = 5-6). Os valores da expressão foram normalizados pela expressão de RNAm da proteína ribossomal L10 nas mesmas amostras e calibrados pelo grupo controle (0 horas, água doce). Não houve diferença estatística entre os grupos..... 70

Figura 20. Expressão relativa de RNAm do simportador NKCC do camarão dulcícola *M. acanthurus* nas condições controle (0 horas, água doce) e quando exposto a 25 ‰ após 24 e 120 horas (média ± erro padrão; n = 5). Os valores da expressão foram normalizados pela expressão de RNAm da proteína ribossomal L10 nas mesmas amostras e calibrados pelo grupo controle (0 horas, água doce). Não houve diferença estatística entre os grupos.... 70

Figura 21. Expressão relativa de RNAm do simportador NKCC do camarão dulcícola *M. olfersi* nas condições controle (0 horas, água doce) e quando exposto a 22 ‰ após 24 e 120 horas (média ± erro padrão; n = 5-8). Os valores da expressão foram normalizados pela expressão de RNAm da proteína ribossomal L10 nas mesmas amostras e calibrados pelo grupo controle (0 horas, água doce). Não houve diferença estatística entre os grupos.... 71

Figura 22. Expressão relativa de RNAm do simportador NKCC do camarão dulcícola *M. amazonicum* nas condições controle (0 horas, água doce) e quando exposto a 20 ‰ após 24 e 120 horas (média ± erro padrão; n = 4-8). Os valores da expressão foram normalizados pela expressão de RNAm da proteína ribossomal L10 nas mesmas amostras e calibrados pelo grupo controle (0 horas, água doce). Não houve diferença estatística entre os grupos..... 71

Figura 23. Expressão relativa de RNAm do simportador NKCC do camarão dulcícola *M. potiuna* nas condições controle (0 horas, água doce) e quando exposto a 19 ‰ após 24 e 120 horas (média ± erro padrão; n = 5-8). Os valores da expressão foram normalizados pela expressão de RNAm da proteína ribossomal L10 nas mesmas amostras e calibrados pelo grupo controle (0 horas, água doce). Não houve diferença estatística entre os grupos.... 72

Figura 24. Expressão relativa de RNAm do simportador NKCC do camarão dulcícola *M. brasiliense* nas condições controle (0 horas, água doce) e quando exposto a 20 ‰S após 24 e 120 horas (média ± erro padrão; n = 5). Os valores da expressão foram normalizados pela expressão de RNAm da proteína ribossomal L10 nas mesmas amostras e calibrados pelo grupo controle (0 horas, água doce). Não houve diferença estatística entre os grupos.... 72

Figura 25. Título do simportador NKCC (média ± erro padrão, n = 8) nas brânquias do camarão marinho *P. northropi* nas condições controle (0 horas, 18 ‰S) e quando exposto a 35 ‰S após 24 e 120 horas. A expressão proteica é dada como a razão entre a proteína alvo e a β-actina, uma proteína de referência, na mesma amostra, e calibrada pelo grupo controle (Tempo = 0). Não houve diferença significativa entre os grupos. 74

Figura 26. Título do simportador NKCC (média ± erro padrão, n = 8) nas brânquias do camarão estuarino *P. pandaliformis* nas condições controle (0 horas, 17 ‰S) e quando exposto a 32 ‰S após 24 e 120 horas. A expressão proteica é dada como a razão entre a proteína alvo e a β-actina, uma proteína de referência, na mesma amostra, e calibrada pelo grupo controle (Tempo = 0). Não houve diferença significativa entre os grupos. 74

Figura 27. Título do simportador NKCC (média ± erro padrão, n = 8) nas brânquias do camarão dulcícola *M. acanthurus* nas condições controle (0 horas, água doce) e quando exposto a 25 ‰S após 24 e 120 horas. A expressão proteica é dada como a razão entre a proteína alvo e a β-actina, uma proteína de referência, na mesma amostra, e calibrada pelo grupo controle (Tempo = 0). #significativamente diferente de ambos os grupos anteriores. .. 75

Figura 28. Título do simportador NKCC (média ± erro padrão, n = 8) nas brânquias do camarão dulcícola *M. olfersi* nas condições controle (0 horas, água doce) e quando exposto a 22 ‰S após 24 e 120 horas. A expressão proteica é dada como a razão entre a proteína alvo e a β-actina, uma proteína de referência, na mesma amostra, e calibrada pelo grupo controle (Tempo = 0). 75

Figura 29. Título do simportador NKCC (média ± erro padrão, n = 8) nas brânquias do camarão dulcícola *M. amazonicum* nas condições controle (0 horas, água doce) e quando exposto a 20 ‰S após 24 e 120 horas. A expressão proteica é dada como a razão entre a proteína alvo e a β-actina, uma proteína de referência, na mesma amostra, e calibrada pelo grupo controle (Tempo = 0). 76

Figura 30. Título do simportador NKCC (média ± erro padrão, n = 8) nas brânquias do camarão dulcícola *M. potiuna* nas condições controle (0 horas, água doce) e quando exposto a 19 ‰S após 24 e 120 horas. A expressão proteica é dada como a razão entre a proteína alvo e a β-actina, uma proteína de referência, na mesma amostra, e calibrada pelo grupo controle (Tempo = 0). Não houve diferença estatística entre os grupos. 76

Figura 31. Título do simportador NKCC (média ± erro padrão, n = 8) nas brânquias do camarão dulcícola *M. brasiliense* nas condições controle (0 horas, água doce) e quando exposto a 20 ‰S após 24 e 120 horas. A expressão proteica é dada como a razão entre a proteína alvo e a β-actina, uma proteína de referência, na mesma amostra, e calibrada pelo grupo controle (Tempo = 0). 77

Figura 32. Imunolocalização do simportador NKCC nas lamelas branquiais do camarão marinho *P. northropi* nas condições (A) controle (0 horas, 18 ‰) (n = 4) e quando exposto a 35 ‰ após (B) e 24 ou (C) 120 horas (n = 4, cada); em (D) a imagem aumentada em 4 x na condição 35 ‰ por 120 h. As setas brancas indicam a presença do NKCC (em verde, anti-mouse secundário conjugado com FITC) no corpo das células pilares (CP) e nas células do septo intralamelar (CS), aponta para o canal marginal (CM) e para o espaço da hemolinfa (H). O núcleo das células aparece em azul (DAPI). Barra de escala = 20 µm..... 80

Figura 33. Imunolocalização do simportador NKCC nas lamelas branquiais do camarão estuarino *P. pandaliformis* nas condições (A) controle (0 horas, 17 ‰) (n = 4) e quando exposto a 32 ‰ após (B) e 24 ou (C) 120 horas (n = 4, cada); em (D) a imagem aumentada em 4 x na condição 32 ‰ por 24 h. As setas brancas indicam a presença do NKCC (em verde, anti-mouse secundário conjugado com FITC) no corpo das células pilares (CP) e nas células do septo intralamelar (CS). O núcleo das células aparece em azul (DAPI). Barra de escala = 20 µm. 81

Figura 34. Imunolocalização do simportador NKCC nas lamelas branquiais do camarão dulcícola *M. acanthurus* nas condições (A) controle (0 horas, água doce) (n = 4) e quando exposto a 25 ‰ após (B) e 24 ou (C) 120 horas (n = 4, cada); em (D) a imagem aumentada em 4 x na condição 25 ‰ por 24 h. As setas brancas indicam a presença do NKCC (em verde, anti-mouse secundário conjugado com FITC) no corpo das células pilares (CP) e nas células do septo intralamelar (CS). O núcleo das células aparece em azul (DAPI). Barra de escala = 20 µm. 82

Figura 35. Imunolocalização do simportador NKCC nas lamelas branquiais do camarão dulcícola *M. olfersi* nas condições (A) controle (0 horas, água doce) (n = 4) e quando exposto a 22 ‰ após (B) e 24 ou (C) 120 horas (n = 4, cada); em (D) a imagem aumentada em 4 x na condição 22 ‰ por 120 h. As setas brancas indicam a presença do NKCC (em verde, anti-mouse secundário conjugado com FITC) no corpo das células pilares (CP) e nas células do septo intralamelar (CS). O núcleo das células aparece em azul (DAPI). Barra de escala = 20 µm. 83

Figura 36. Imunolocalização do simportador NKCC nas lamelas branquiais do camarão dulcícola *M. amazonicum* nas condições (A) controle (0 horas, água doce) (n = 4) e quando exposto a 20 ‰ após (B) e 24 ou (C) 120 horas (n = 4, cada); em (D) a imagem aumentada em 4 x na condição 20 ‰ por 24 h. As setas brancas indicam a presença do NKCC (em verde, anti-mouse secundário conjugado com FITC) no corpo das células pilares (CP) e nas células do septo intralamelar (CS). O núcleo das células aparece em azul (DAPI). Barra de escala = 20 µm. 84

Figura 37. Imunolocalização do simportador NKCC nas lamelas branquiais do camarão dulcícola *M. potiuna* nas condições (A) controle (0 horas, água doce) (n = 4) e quando exposto a 19 ‰ após (B) e 24 ou (C) 120 horas (n = 4, cada); em (D) a imagem aumentada em 4 x na condição 19 ‰ por 120 h. As setas brancas indicam a presença do NKCC (em verde, anti-mouse secundário conjugado com FITC) no corpo das células pilares (CP) e nas células do septo intralamelar (CS). O núcleo das células aparece em azul (DAPI). Barra de escala = 20 µm. 85

Figura 38. Imunolocalização do simportador NKCC nas lamelas branquiais do camarão dulcícola *M. brasiliense* nas condições (A) controle (0 horas, água doce) (n = 4) e quando exposto a 22 ‰ após (B) e 24 ou (C) 120 horas (n = 4, cada); em (D) a imagem aumentada em 4 x na condição 20 ‰ por 120 h. As setas brancas indicam a presença do NKCC (em verde, anti-mouse secundário conjugado com FITC) no corpo das células pilares (CP) e nas células do septo intralamelar (CS). O núcleo das células aparece em azul (DAPI). Barra de escala = 20 µm. . 86

Figura 39. Reconstrução do parâmetro LSS₅₀ (Limite letal de salinidade superior) em espécies representantes da família Palaemonidae (clado modificado de Pereira, 1997). A análise demonstra a semelhança compartilhada por espécies estreitamente próximas (autocorrelação significativa obtida através do Índice I de Moran, I= 0,97; P= 0,001). 88

Figura 40. Reconstrução do parâmetro Osmolalidade da hemolinfa (mOsm/kgH₂O) em espécies representantes da família Palaemonidae (clado modificado de Pereira, 1997) na condição controle (18 ‰ em *P. northropi*, 17 ‰ em *P. pandaliformis*, e água doce em todas as espécies de *Macrobrachium*, tais salinidades estipuladas como controle são representativas das salinidades encontradas nos respectivos habitats das espécies amostradas). A análise mostra a semelhança compartilhada por espécies estreitamente próximas (autocorrelação significativa obtida através do Índice I de Moran, I= 0,78; P= 0,03). 89

Figura 41. Reconstrução do parâmetro concentração de Cl⁻ da hemolinfa (mM) em espécies representantes da família Palaemonidae (clado modificado de Pereira, 1997) na condição controle (18 ‰ em *P. northropi*, 17 ‰ em *P. pandaliformis*, e água doce em todos *Macrobrachium*, tais salinidades estipuladas como controle são representativas das salinidades encontradas nos respectivos habitats das espécies amostradas). A análise mostra a semelhança compartilhada por espécies estreitamente próximas (autocorrelação significativa obtida através do Índice I de Moran, I= 0,71; P= 0,03). 89

Figura 42. Reconstrução do parâmetro expressão proteica do NKCC em brânquias de representantes da família Palaemonidae (clado modificado de Pereira, 1997) em salinidade superior por 120 h (80% da LSS₅₀). A análise mostra a semelhança compartilhada por espécies estreitamente próximas (autocorrelação significativa obtida através do Índice I de Moran, I= 0,87, P= 0,02). 90

Figura 43. Análise diagnóstica das reações de PCR em gel de agarose a 1% exemplificando o sucesso da extração e do tratamento das amostras com DNase em *P. pandaliformis* (raias 3 a 8) amplificadas com o par de *primers* PRL10. M corresponde ao marcador molecular 1 kb DNA Ladder Plus (Life Technologies). Controle negativo (raia 1) não contém o molde. Controle positivo feito com cDNA branquial de *Uca burgersi* amplificados com o par de *primers* do gene PRL10 (raia 2), amplicon de ~300 pb. As bandas <100 pb observadas em cada raia correspondem aos *primers* PRL10_Cs_F/ PRL10_Cs_R utilizados em saturação. 119

Figura 44. Análises das reações de PCR em gel de agarose a 1%, correspondente à amplificação do cDNA total branquial de *M. potiuna* (raias 3 a 8) com o par de *primers* do gene PRL10 mostrando amplicons de ~300 pb. M corresponde ao marcador molecular 1 kb DNA Ladder Plus (Life Technologies). Controle negativo (raia 1) não contém o molde. Controle positivo (raia 2) feito com cDNA branquial de *Uca burgersi* amplificado com o par de *primers* do gene PRL10. As bandas <100 pb observadas em cada raia correspondem aos *primers* PRL10_Cs_F/ PRL10_Cs_R utilizados em saturação. 119

Figura 45. Eletroforese em gel de agarose a 1% do produto da PCR diagnóstica das culturas de *E. coli* (3-5 µL do inóculo após crescimento por 16 h a 37 °C e 180 rpm) candidatas a conterem o fragmento de interesse (proteína ribossomal L10 [PRL10] ~300 pb) inicialmente amplificados a partir de cDNA branquial de *P. pandaliformis* (raias 3 a 5). M corresponde ao marcador molecular 1 kb DNA Ladder Plus (Life Technologies). Controle negativo (raia 1) não contém o molde. Controle positivo feito com cDNA branquial de *Uca burgersi* (raia 2). 120

Figura 46. Eletroforese em gel de agarose a 1% do produto da PCR diagnóstica das culturas de *E. coli* (3-5 µL do inóculo após crescimento por 16 h a 37 °C e 180 rpm) candidatas a conterem o fragmento de interesse (simportador Na⁺,K⁺,2Cl⁻ ~450 pb) inicialmente amplificados a partir de cDNA branquial de *M. brasiliense* (raias 2 e 3) e *M. amazonicum* (raias 4 e 5). M corresponde ao marcador molecular 1 kb DNA Ladder Plus (Life Technologies). Controle negativo (raia 1) não contém o molde. 120

Figura 47. Padrão de bandas que revelam a expressão proteica do simportador Na⁺, K⁺, 2Cl⁻ (131 kDa) e da subunidade Ab-5 da proteína normalizadora β-actina (42 kDa) das brânquias dos camarões marinho *P. northropi* e *P. pandaliformis*, e do camarão dulcícola diádromo *M. olfersi* na condição controle (18 ‰S em *P. northropi*, 17 ‰S em *P. pandaliformis* e água doce <0,5 ‰S em *M. olfersi* durante 120 h) e em exposição a salinidade elevada (35 ‰S em *P. northropi*, 32 ‰S em *P. pandaliformis*, 22 ‰S em *M. olfersi*) por 24 ou 120 h. 121

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Valores compilados do cálculo do Limite Letal Superior de Salinidade (LSS₅₀) e da Salinidade Experimental correspondente a 80% do valor da LSS₅₀, para as espécies: marinha de poça de maré *P. northropi*; marinha estuarina *P. pandaliformis*; dulcícolas diádromas *M. acanthurus*, *M. olfersi* e *M. amazonicum*; e hololimnéticas *M. brasiliense* e *M. potiuna*. 35

Tabela 2. Sequência dos *primers* para o gene PRL10 baseado na sequência de cDNA de *Callinectes sapidus* (Wynn et al. 2004) para amplificar parcialmente o gene da proteína ribossomal L10 (PRL10_Cs_F e PRL10_Cs_R) utilizada como gene de referência (Faleiros et al. 2017); sequência dos *primers* degenerados utilizados para amplificar o gene do simportador Na⁺,K⁺,2Cl⁻ (NKCC_Mk F/R 1 utilizado para amplificar o NKCC em *M. acanthurus*, *M. amazonicum*, *M. brasiliense* e *M. potiuna*; NKCC_Mk F/R 2 utilizado em *M. olfersi*, *P. northropi* e *P. pandaliformis*) baseado na sequência completa de *Macrobrachium koombooloomba* (sequência ainda não depositada, gentilmente cedida pelos autores; Rahi et al. 2017). 38

Tabela 3. Sequência de bases dos pares de primers específicos usados para quantificar a expressão gênica (RT-PCR em tempo real) para o simportador NKCC (*P. northropi* NKCC_Pn_F/R; *P. pandaliformis* NKCC_Pp_F/R2; *M. acanthurus* e *M. amazonicum* NKCC_Mac_F/R; *M. olfersi* NKCC_Molf_F/R; *M. brasiliense* NKCC_Mb_F/R2; *M. potiuna* NKCC_Maustr_F/R; Moshtaghi 2016) e par de primers genérico/específico para camarões palemonídeos para o gene PRL10 (PRL10_Pal_F e PRL10_Pal_R; Faleiros et al. 2017). Os primers foram obtidos por meio do aplicativo on-line Primer-Blast (Primer Analysis Software – copyright 1989-91 por Wojciech Ruchlik) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). 44

Tabela 4. Dados compilados da LSS₅₀ (‰), salinidade experimental de 80% do valor da LSS₅₀ (‰), osmolalidade (mOsm/kg H₂O) e concentração de cloreto (mM) da hemolinfa, e conteúdo hídrico muscular (%) dos camarões palemonídeos utilizadas neste estudo. Controle de 5 dias em 18 ‰S *P. northropi*, 17 ‰S *P. pandaliformis*, água doce *Macrobrachium*; e 24 e 120 horas nas respectivas salinidades experimentais. A estatística aplicada corresponde a análises intraespecíficas entre tempos de exposição..... 68

Tabela 5. Dados da salinidade experimental (‰), expressão relativa gênica e proteica do simportador NKCC das sete espécies de camarões palemonídeos utilizadas neste estudo. Os valores foram normalizados pelo gene e proteína constitutiva, e calibrados em relação ao controle para conduzir a comparação estatística. Condições controle (5 dias em 18 ‰S para *P. northropi*, 17 ‰S para *P. pandaliformis*, água doce para as espécies do gênero *Macrobrachium*) e experimental (24 e 120 horas nas respectivas salinidades experimentais). 78

Tabela 6. Valores da expressão gênica e proteica do simportador NKCC normalizados pela expressão do gene (PRL10) ou proteína (actina) constitutiva das brânquias das espécies de palemonídeos utilizados neste estudo para aplicação dos métodos comparados. Condições controle (5 dias em 18 ‰ para *P. northropi*, 17 ‰ para *P. pandaliformis*, água doce para as espécies do gênero *Macrobrachium*) e experimental (24 e 120 horas nas respectivas salinidades experimentais). 91

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
1.1 Os Palemonidae	19
1.2 Osmorregulação	20
1.3 O simportador Na^+ , K^+ , 2Cl^- (NKCC)	27
2 OBJETIVOS	30
2.1 Objetivo Geral	30
2.2 Objetivos Específicos	30
3 MATERIAL E MÉTODOS	31
3.1 Coleta, transporte e experimentação das espécies	31
3.2 Mortalidade, determinação do limite letal superior de salinidade (LSS_{50}) e salinidade experimental	33
3.3 Medidas da Osmolalidade e $[\text{Cl}^-]$ na hemolinfa	36
3.4 Conteúdo hídrico muscular	36
3.5 Preparo das amostras de tecido branquial para sequenciamento e análises de expressão gênica	37
3.5.1 Extração do RNA total	37
3.5.2 Transcrição reversa (RT) do RNAm e síntese de cDNA	37
3.5.3 Clonagem dos fragmentos parciais de cDNA e sequenciamento	39
3.5.4 PCR quantitativo (PCR em Tempo Real)	45
3.6 Preparo das amostras para análise da expressão proteica do Na^+ , K^+ , 2Cl^- por <i>Western blotting</i>	46
3.7 Preparo das amostras de tecido branquial para localização do simportador Na^+ , K^+ , 2Cl^- por imunofluorescência	48
3.8 Análise estatística	49
3.9 Análise filogenética	50
3.9.1 Sinal filogenético	50
3.9.2 Correlações filogenéticas	50
4 RESULTADOS	53
4.1 Mortalidade e estimativa do limite letal superior de salinidade (LSS_{50})	53
4.2 Osmolalidade e $[\text{Cl}^-]$ da hemolinfa, e conteúdo hídrico muscular	60
4.3 Análise quantitativa da expressão de RNAm do simportador Na^+ , K^+ , 2Cl^- das brânquias	69

4.4 Expressão proteica do simportador Na^+ , K^+ , 2Cl^- nas brânquias	73
4.5 Imunolocalização do simportador Na^+ , K^+ , 2Cl^- nas brânquias.....	79
4.6 Análises comparativas filogenéticas.....	87
4.6.1 Sinal filogenético: Índice I de Moran	87
4.6.2 Análises de correlação evolutiva: análise de variância	90
5 DISCUSSÃO	92
6 CONCLUSÕES.....	107
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	109
APÊNDICE	119

1 INTRODUÇÃO

O subfilo Crustacea reúne representantes de ambientes dos mais variados. A ocupação dos ambientes terrestres ou aquáticos, marinhos ou dulcícolas, certamente está associada a interação dos organismos com os fatores bióticos e abióticos, sendo determinante do processo de invasão de um habitat (Begon et al. 2007; Faria et al. 2017). A água, por exemplo, é um componente fundamental dos fluidos intracelulares e extracelulares que sustenta e ao mesmo tempo limita à condição da vida. O movimento da água entre o meio interno e o meio externo, seja de maneira obrigatória seja de forma regulada, representa um desafio aos organismos. A concentração iônica determina a intensidade e a direção de fluxo dos íons e da água (Péqueux 1995; Schmidt-Nielsen 2002; Willmer et al. 2005; McNamara e Faria 2012), sendo a homeostase hidroeletrolítica, portanto, um dos determinantes fisiológicos do potencial de diversificação de nichos.

As espécies apresentam demandas de condições ambientais às quais são melhores adaptadas, ou seja, uma faixa ótima de um determinado parâmetro na qual desempenham de maneira mais eficaz seus atributos fisiológicos e ecológicos (Begon et al. 2007). A ocupação de ambientes com diferentes concentrações osmo-iônicas pode gerar ajustes pontuais a nível de organismo, como alterações fisiológicas e regulação homeostática (Freire et al. 2008a; McNamara e Faria 2012; Thabet et al. 2017). A colonização e adaptação ao ambiente dulcícola incide também na evolução de parâmetros reprodutivos, como redução na fecundidade relativa e mudança no tamanho e número de ovos, abreviação dos estágios larvais, e surgimento de ovos lecitotróficos que aumentam a aptidão e sobrevivência da prole em novos ambientes (Pileggi e Mantelatto 2010; Anger 2013; Vogt 2013). Esse conjunto de respostas fisiológicas e morfológicas associado à evolução em um habitat pode determinar o grau de eurialinidade e, conseqüentemente, o aumento do potencial de dispersão

biogeográfica e invasão de novos ambientes (Lee et al. 2011; Velotta et al. 2016). Pode refletir, também, em mudanças em nível evolutivo para um grupo, a exemplo da ocupação do ambiente dulcícola por espécies de camarões palemonídeos, originárias de águas salobras (Faria et al. 2011; McNamara e Faria 2012).

1.1 Os Palaemonidae

A família de camarões Palaemonidae inclui representantes de nichos osmóticos dos mais diversos, desde ambientes osmoticamente estáveis, como o marinho e dulcícola, até habitats com variação diária e sazonal de salinidade, e.g., *Palaemon longirostris* e *P. pandaliformis*, espécies estuarinas; e *Palaemon affinis*, *P. elegans*, *P. northropi*, *P. ritteri*, *P. serratus*, espécies marinhas de poças-de-marés (Freire et al. 2003; Augusto et al. 2009). Além disso, muitas espécies transitam entre a água doce, salobra e marinha (*P. pandaliformis*, Freire et al. 2003).

As espécies do gênero *Macrobrachium* Bate, 1868 obtiveram maior sucesso na colonização de habitats estuarinos e dulcícolas, reunindo espécies de hábito diádromo, migratório ou hololimnético. Não existe representante de *Macrobrachium* verdadeiramente marinho, embora *M. equidens* ocupe água salobra (Denne, 1968) e *M. intermedium* ocorre também em água do mar (revisado em Anger 2013). Dentre as espécies diádromas tratadas neste estudo, as quais possuem desenvolvimento larval estendido e que dependem de águas salobras para completo desenvolvimento, estão *M. acanthurus*, *M. olfersi* e *M. amazonicum* [*M. acanthurus*, por exemplo, possui desenvolvimento larval completo em 16 ‰ (Quadros et al. 2004)]. As espécies hololimnéticas *M. potiuna*, *M. brasiliense*, como também *M. australiense* e *M. koombooloomba*, apresentam ciclo de vida completo em água doce e

desenvolvimento larval abreviado (Teixeira e Sá 1998; Melo 2003; Pileggi e Mantelatto 2010; Anger 2013).

1.2 Osmorregulação

O ambiente marinho possibilitou aos organismos disporem de elevada permeabilidade osmótica e iônica, tornando o fluido extracelular essencialmente isosmótico em relação ao meio. Cabe às células individuais exibirem um mecanismo próprio de regulação de volume para o controle e a manutenção das suas funções vitais, chamada de regulação isosmótica intracelular (IIR) (Florkin e Schoffeniels 1969; Freire et al. 2008b; Foster et al. 2010). As espécies de ambientes diluído e dulcícola apresentam redução da permeabilidade osmótica e iônica epitelial branquial, bem como mecanismos hiper-osmoregulatórios efetuados pela absorção ativa de NaCl, predominantemente pelas brânquias, junto à excreção de água pelas glândulas antenais (Péqueux 1995; Kirschner 2004; Freire et al. 2008a; McNamara e Faria 2012). A hipo-osmoregulação em ambiente marinho, estuarino ou salobro, ao contrário da hiper-regulação em habitat dulcícola, caracteriza-se pela secreção ativa de NaCl, principalmente pelas brânquias. Tais mecanismos proporcionam a manutenção aproximadamente constante da concentração, composição iônica e volume do fluido extracelular independente da concentração iônica do ambiente, processo denominado de regulação anisosmótica extracelular (AER) (Péqueux 1995; Freire et al. 2008a; McNamara e Faria 2012; Thabet et al. 2017).

O sucesso na colonização de ambientes dulcícolas é bem conhecido no grupo dos crustáceos. O controle homeostático frente aos desafios osmóticos se dá por meio de diferentes ajustes osmorregulatórios, e.g., a redução da permeabilidade dos epitélios de troca e a atividade e expressão de um conjunto de transportadores de membrana presentes nas células

ionotransportadoras especializadas do epitélio branquial (Péqueux 1995; Kirschner 2004; Freire et al. 2008a; McNamara e Faria 2012; Roy e Bhoite 2015).

As brânquias dos camarões palemonídeos são do tipo pleurobrânquia. Elas apresentam simetria bilateral ao longo do eixo longitudinal dorso-ventral. As células pilares com extensas franjas apicais, imediatamente abaixo de uma cutícula fina, formam evaginações e folhetos, e compõem o epitélio lamelar. A base dessas células está em contato com o septo intralamelar, que divide a lamela em dois compartimentos simétricos. A membrana das células do septo é caracterizada por invaginações tipicamente justapostas paralelamente com à membrana das mitocôndrias. A hemolinfa percorre lacunas que se intercalam entre as células pilares e células do septo, a partir do canal marginal aferente para o eferente (Fig. 1) (Freire et al. 2008a; McNamara et al. 2015). Esse arranjo celular favorece a troca iônica e gasosa entre o meio externo, citoplasma destas células e a hemolinfa.

Nas células pilares e do septo estão presentes muitos dos transportadores iônicos essenciais para os mecanismos osmorregulatórios, além do papel funcional na excreção de amônia, troca gasosa e regulação do pH e equilíbrio ácido-base (Freire et al. 2008a; Henry et al. 2012; Larsen et al. 2014; McNamara et al. 2015). O delineamento de modelos de transporte iônico neste epitélio contribui em muito para a compreensão das adaptações à vida em ambientes osmoticamente distintos, com diferenças interespecíficas associadas à história de vida dos organismos (Freire et al. 2003; Faria et al. 2011; McNamara e Faria 2012; McNamara et al. 2015).

Figura 1. Parte inferior, ilustração de uma lamela branquial isolada de uma pleurobrânquia de camarão palemonídeo, arranjo do canal da hemolinfa e o canal marginal periférico. Acima, o corte transversal da lamela mostrando as células pilares (CP), septo intralamelar (S) e canal marginal (CM) (Adaptado de Maraschi et al. 2015).

Os diferentes padrões e processos osmorregatórios contemplam diferentes arranjos de transportadores presentes no epitélio branquial de representantes de locais e de linhagens diferentes, desde osmoconformadores marinhos, hiper-/hipo-osmorreguladores de ambientes costeiros, do entre-marés ou estuarinos, até espécies hiper-osmoreguladoras dulcícolas (McNamara e Faria 2012). Em se tratando de espécies dulcícolas, o mecanismo de hiper-osmorregulação é melhor entendido no grupo dos crustáceos decápodes de epitélios pouco permeáveis (“*tight epithelia*”) ou de alta resistência (Péqueux 1995; Kirschner 2004; Freire et al. 2008a; McNamara e Faria 2012). Neste tipo de regulação, o transporte iônico branquial

requer a ação conjunta das bombas eletrogênicas $V(H^+)$ -ATPase (VAT) e Na^+/K^+ -ATPase (NKA), para geração de gradientes eletroquímicos e consequente absorção de íons Na^+ por canais apicais de Na^+ , e íons Cl^- através do trocador apical Cl^-/HCO_3^- . Os íons H^+ e HCO_3^- são disponibilizados pela enzima anidrase carbônica (AC) intracelular, responsável pela catalisação da reação reversível de hidratação do CO_2 (Ver Figura 2, parte superior, absorção) (Péqueux 1995; Kirschner 2004; Freire et al. 2008a; McNamara e Faria 2012; Maraschi et al. 2015).

No que tange o objetivo principal do presente trabalho, o mecanismo de transporte iônico responsável pela **hipo-osmorregulação** em camarões palemonídeos em ambiente marinho ou hiper-osmótico, não está muito claro e pressupõe-se que a participação da NKA e do cotransportador $Na^+, K^+, 2Cl^-$ (NKCC) fundamente o transporte transcelular de Cl^- e paracelular de Na^+ , resultando na secreção de NaCl (Ver Figura 2, parte inferior, secreção). A NKA, localizada na membrana das células do septo intralamelar, direciona três íons Na^+ para o meio extracelular em troca de dois íons K^+ desse fluido para o meio intracelular. O K^+ é reciclado para o meio extracelular via canais basais de K^+ . O gradiente de Na^+ gerado pela NKA, bem como o influxo passivo à hemolinfa desse íon do meio ambiente, ocasiona a entrada de Na^+ , e particularmente de Cl^- , através do cotransportador NKCC, também localizado na membrana das células do septo intralamelar ou das franjas inferiores das células pilares. O efluxo do Cl^- se dá através de canais apicais nas células pilares, gerando uma voltagem transepitelial negativa do lado externo, o que contribui para o efluxo de Na^+ pela via paracelular (Figura 2, parte inferior, secreção) (Freire et al. 2008a; McNamara e Faria 2012).

Figura 2. Modelo hipotético para a captura e secreção de sal em camarões palemonídeos de água doce. Os transportadores são separados espacialmente em duas células epiteliais distintos: células pilares e as do septo. Uma das forças motrizes na captação de sal (parte superior absorção) é a Na^+/K^+ -ATPase localizada nas invaginações da membrana das células do septo ricas em mitocôndrias. A outra é o potencial elétrico provido pela $\text{V}(\text{H}^+)$ -ATPase localizada na membrana apical das células pilares. Na^+ adentra o citoplasma apical das células pilares por canais de Na^+ , difunde para as células do septo, fornecendo Na^+ para a Na^+/K^+ -ATPase; o Cl^- adentra por um antiportador apical $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$, saindo à hemolinfa ou via canais de Cl^- na membrana inferior da franja da célula pilar, ou por canais basais de Cl^- para as células do septo. Na secreção de sal (parte inferior secreção), o Cl^- entra diretamente nas células do septo ou na franja das células pilares pelo simportador $\text{Na}^+-\text{K}^+-2\text{Cl}^-$, direcionado pelo gradiente de Na^+ . Sai por canais de Cl^- na membrana apical das franjas, criando um potencial elétrico negativo no espaço subcuticular abaixo da cutícula que direciona o efluxo de Na^+ pela via paracelular. As cutículas que recobrem o epitélio não estão representadas (McNamara e Faria 2012).

As espécies do gênero *Macrobrachium* são hiper-osmorreguladores fortes e mantêm um elevado gradiente osmo-iônico quando em água doce (~400 mOsm/kg H_2O ; Moreira et al. 1983; Freire et al. 2003; Faleiros et al. 2010; Maraschi et al. 2015; Faleiros et al. 2017; Freire et al. 2018). Isso se deve aos mecanismos de captação iônica junto da redução da permeabilidade do

epitélio branquial (Freire et al. 2008a; McNamara e Faria 2012; McNamara et al. 2015). Um estudo da evolução da osmorregulação da família Palaemonidae (McNamara e Faria 2012) propõe que a fixação deste valor reduzido da osmolalidade da hemolinfa em um ancestral de *Macrobrachium* ocorreu como condição adaptativa e conservada, a partir de um ancestral originado em ambiente estuarino ou salobro (17 ‰, 510 mOsm/kg H₂O) com osmolalidade da hemolinfa de ~660 mOsm/kg H₂O (Fig. 3). Além do poder hiper-osmorregulatório, algumas espécies também exibem elevado poder hipo-osmorregulatório (Freire et al. 2003), porém é pouco significativo quando comparado à capacidade hipo-regulatória de espécies como *Palaemon northropi* e *Palaemon pandaliformis* (Freire et al. 2003; Faleiros et al. 2017) supostamente em decorrência da perda do valor adaptativo da capacidade de secretar sal em habitat dulcícola (McNamara e Faria 2012; McNamara et al. 2015). Embora seja um mecanismo bastante explorado em diferentes grupos, são poucas as fundamentações acerca do mecanismo intra- e interespecífico de secreção de sal e evolução dentre os palemonídeos (McNamara e Faria 2012).

Figura 3. Estimativa do estado ancestral (setas) por análise de parcimônia para osmolalidade do habitat (mOsm/kg H₂O, lado esquerdo, salinidade de 1 ‰ = 30 mOsm/kg H₂O) e osmolalidade da hemolinfa (mOsm/kg H₂O, lado direito) em um clado de camarões palemonídeos (modificado de Pereira 1997) com *Alpheus viridari* e *Crangon crangon* como grupos-externos (Bracken et al. 2009). C, D, F, H e I são clados (= agrupamentos naturais) considerados particularmente relevantes para evolução da osmorregulação em Palaemonidae. Modificado de McNamara e Faria (2012).

O estudo do transporte em tipos celulares específicos e aspectos funcionais de transportadores como a NKA, VAT, anidrase carbônica, em resposta aos desafios osmóticos, lideram as pesquisas osmorregulatórias, já que genes que codificam para essas proteínas estão entre os mais expressos envolvidos na osmorregulação (Moshtaghi et al. 2016; Rahi et al. 2017). Estas proteínas ião-transportadoras são abundantes nas células das brânquias (McNamara e Torres 1999; Faleiros et al. 2010; Boudour-Bouchecker et al. 2014; Maraschi et al. 2015; Faleiros et al. 2017) e são responsáveis pelo estabelecimento de gradientes eletroquímicos através das membranas de modo geral (Figura 2, Péqueux 1995; Freire et al. 2008a; McNamara e Faria 2012; Havird et al. 2013). Devido a tais características, a atividade enzimática, a expressão e a localização das isoformas dessas proteínas tem contribuído com estudos em grupos diversos, constatando-se alteração na expressão gênica e proteica, na atividade enzimática e localização da proteína como resposta de ajuste à concentração do meio circundante (Lima et al. 1997; Santos et al. 2007; Belli et al. 2008; Faleiros et al. 2010; Boudour-Bouchecker et al. 2014; França et al. 2013; Havird et al. 2013; Maraschi et al. 2015; Faleiros et al. 2017; Freire et al. 2018).

De forma geral em palemonídeos, o aumento da salinidade resulta em alterações genéricas na atividade e/ou expressão gênica da NKA branquial. Nas espécies *M. acanthurus* (25 ‰, Faleiros et al. 2017; 20 ‰, Freire et al. 2018) e *M. amazonicum* (25 ‰, Faleiros et al. 2010) foi observada uma redução abrupta (3 a 6 h) da atividade e/ou expressão da NKA; em *P. northropi* (50 ‰, Faleiros et al. 2017) e *M. australiense* (6 h a 10 ‰, Moshtaghi 2016) houve incremento desses parâmetros.

Acerca da VAT branquial, a expressão gênica reduz-se e a atividade permanece inalterada em *M. acanthurus* (25 ‰, Faleiros et al. 2017; Freire et al. 2018). Já em *M. amazonicum* (20 ‰, Faleiros et al. 2010) e *M. australiense* (5 e 10 ‰, Moshtaghi 2016) a expressão gênica branquial aumentou a curto prazo (1-6 h), retornando a valores baixos e

próximos ao controle em água doce após período prolongado (5 a 10 dias). Em *P. northropi* (50 %, Faleiros et al. 2017) não houve alteração na expressão gênica branquial da bomba.

1.3 O simportador Na^+ , K^+ , 2Cl^- (NKCC)

O cotransportador eletroneutro NKCC está presente nas membranas de uma grande variedade de células epiteliais que participam do transporte de sal, e ainda em células não epiteliais, nas quais participa da regulação de volume celular (Péqueux 1995; Russell 2000; Hoffmann et al. 2007). Em peixes, esse transportador se destaca em pesquisas que avaliam diferentes padrões de expressão (Scott et al. 2008; Kang et al. 2010), imunolocalização (Yang et al. 2011) e regulação (Flemmer et al. 2010) em resposta a exposição à diferentes salinidades. Porém, há poucas informações sobre o NKCC quando comparado à NKA, pois o cotransportador não responde a ensaios enzimáticos simples.

O NKCC é um dos membros da família dos cotransportadores de Cl^- acoplado a cátions (CCC, *cation-coupled Cl^- cotransport*) (Russell 2000). A análise por semelhança acomoda três membros desta família que utilizam o transporte acoplado ao Na^+ concomitante ao transporte de K^+ (isoformas NKCC1 e NKCC2) ou independente de K^+ (NCC1) (revisado em Isenring e Forbush 2001). No que se refere às diferentes isoformas do NKCC e o seu papel no transporte de sal, de modo geral, a isoforma NKCC1 é encontrada na membrana basal de epitélios secretores, e assim é devidamente chamada de isoforma secretora. A isoforma NKCC2 é conhecida por residir na membrana apical das células do tecido epitelial renal e é caracterizada por ser uma isoforma de absorção (Russell 2000; Hass e Forbush 2000). Ambas as isoformas apresentam locais de interação sensíveis a componentes derivados do ácido sulfamóilbenzóico, como os inibidores bumetanida e furosemida (Russell 2000; revisado em Isenring e Forbush 2001). A afinidade por íons e por inibidores pode diferir

entre espécies (Isenring e Forbush 2001). Ainda a nível gênico, em enguias, a isoforma NKCC1 se expressa por dois genes distintos, com NKCC1a encontrada em muitos tecidos e NKCC1b expressa principalmente no cérebro (Cutler e Cramb 2002).

Apesar de ainda muito escassos, existem alguns dados que relacionam a expressão do cotransportador NKCC com o mecanismo de secreção e/ou absorção de sal em crustáceos (Luquet et al. 2005; Towle et al. 2011; Barman et al. 2012; Havird et al. 2014; 2016; Lv et al. 2016; Moshtaghi 2016). A caracterização da expressão gênica do NKCC em diferentes fases do ciclo de muda foi descrita no caranguejo *Scylla paramamosain*, atribuindo ao simportador um papel importante na absorção iônica pelas brânquias, especialmente nos estágios pós-muda (Xu et al. 2017).

A diversidade de padrões osmorregulatórios em palemonídeos tem subsidiado a formulação de modelos hipotéticos de transporte branquial na área de fisiologia osmorregulatória comparada, baseados em ideias atuais e em resultados originais (McNamara e Faria 2012). As bases moleculares da osmorregulação, envolvendo atividade, expressão e localização de proteínas de membrana têm sido amplamente investigadas a fim de elucidar os mecanismos de transporte de sal em meio hipo- ou hiper-osmótico (Péqueux 1995; Kirschner 2004; Freire et al. 2008a; McNamara e Faria 2012). Particularmente na hipo-osmorregulação, tal mecanismo é bem conhecido em peixes teleósteos (Marshall e Grosell 2005; Evans et al. 2005; Gonzalez et al. 2012) e parece ser recorrente em invertebrados e vertebrados de modo geral (revisado em McNamara e Faria 2012). Os estudos “filofisiológicos” que caracterizam modelos espécie-específicos em crustáceos decápodes, com o auxílio da ferramenta da sistemática filogenética, possibilitam delinear análises comparativas e evolutivas, e consequentemente expandir o conhecimento sobre a história evolutiva de padrões e processos osmorregulatórios (Wheatly e Gao 2004; Wowor et al. 2009; Faria et al. 2011; McNamara e Faria 2012).

Assim, com a presente proposta, pretendeu-se ampliar o conhecimento da regulação de cloreto da hemolinfa, da localização precisa do simportador NKCC no epitélio secretor branquial por meio de técnicas como imunolocalização, concomitante à utilização de ferramentas moleculares, como a identificação e quantificação da expressão a nível gênico e proteico, podendo contribuir no refinamento dos modelos teóricos de transporte (Freire et al. 2008a; McNamara e Faria 2012; Henry et al. 2012). Esses estudos fisiológicos e moleculares comparativos fornecerão a base para a reconstrução da história evolutiva da participação do NKCC na secreção de sal em camarões palemonídeos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Caracterizar os mecanismos de hiper- e hipo-regulação, particularmente de íons Cl^- , em espécies de camarões dos gêneros *Palaemon* e *Macrobrachium*, por meio da expressão e localização do cotransportador NKCC. Também testar as hipóteses de um efeito da salinidade na evolução da expressão gênica e proteica desse cotransportador e da existência de um padrão filogenético.

2.2 Objetivos Específicos

- I. Determinar o limite letal superior de salinidade (LSS_{50}) após 120 horas e estimar a salinidade experimental (80% do valor da LSS_{50}) para desafio osmótico experimental em espécies representativas de nichos osmóticos diversos em Palaemonidae;
- II. Mensurar os parâmetros sistêmicos osmolalidade e concentração de cloreto da hemolinfa, bem como o conteúdo hídrico muscular, nas condições controle e experimental de acordo com a janela de tolerância à salinidade das espécies avaliadas;
- III. Quantificar a expressão de RNAm e a síntese proteica do simportador NKCC branquial na condição controle e após 24 e 120 h em salinidade superior experimental;
- IV. Localizar o NKCC em células do epitélio branquial pela técnica de imunofluorescência na condição controle e experimental;
- V. Quantificar a autocorrelação filogenética não-estacionária nos parâmetros elencados;
- VI. Caracterizar a correlação entre expressão gênica e proteica do cotransportador e a tolerância a salinidades superiores, e da capacidade de regular a osmolalidade e concentração de cloreto da hemolinfa nos representantes palemonídeos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Coleta, transporte e experimentação das espécies

Os espécimes adultos de 7 espécies de camarões palemonídeos foram coletados em regiões de marismas em estuários, poças de maré, desembocaduras de riachos em praias ou córregos continentais. As coletas tiveram prévia autorização emitida pelo IBAMA (número de registro #29594-9). Os indivíduos foram capturados com o auxílio de peneiras de malha de aço, pelo uso de armadilhas, manualmente ou com auxílio de rede de fitoplâncton.

Os camarões:

Família Palaemonidae Rafinesque, 1815

- *Palaemon northropi* (Rankin 1898): camarão marinho com distribuição atlântico ocidental, de Bermudas ao Uruguai e no Brasil do Ceará até Santa Catarina. Os espécimes foram coligidos (~82 indivíduos, $3,2 \pm 0,2$ cm) em poças de maré (3-35 ‰) na Praia de Calhetas (23° 49' 53.44" S, 45° 31' 16.58" O), no município de São Sebastião, Litoral Norte de São Paulo, Brasil.

- *Palaemon pandaliformis* (Stimpson 1871): um pequeno camarão comumente denominado camarão fantasma, tem ampla distribuição na América Central (Cuba e Guatemala) e América do Sul (no Brasil ocorre do Ceará ao Rio Grande do Sul). Os espécimes foram coletados (~85 animais, comprimento total rostro-telson = $2,9 \pm 0,3$ cm) em meio a vegetação marginal no estuário do Rio Perequê (3-33 ‰) no município de Pontal do Paraná, Litoral do Paraná, Brasil (25° 34' 23.64" S, 48° 21' 3.43" O).

- *Macrobrachium acanthurus* (Wiegmann 1836): vulgarmente conhecido por pitú ou camarão canela, distribui-se amplamente pela porção atlântica do continente americano, desde a Carolina do Norte (EUA) até o Rio Grande do Sul (Brasil). A espécie é predominantemente

dulcícola com hábito diádromo (utiliza a água salobra para reprodução e ciclo larval completo). Os espécimes foram capturados (~ 84 animais, $5,7 \pm 0,4$ cm) em desembocaduras de riachos na praia do Guaecá ($23^\circ 49' 26,22''$ S, $45^\circ 27' 8,66''$ O), São Sebastião, Litoral Norte de São Paulo, Brasil.

- *Macrobrachium olfersi* (Wiegmann 1836): popularmente conhecido por pitú, ocorre desde a Carolina do Norte (sudoeste dos EUA) até o Rio Grande do Sul (Sul do Brasil). A espécie é também dulcícola diádroma. A captura dos espécimes (~ 77 indivíduos, $4,3 \pm 0,08$ cm) ocorreu em riachos próximos a praia de Paúba ($23^\circ 47' 48,75''$ S, $45^\circ 32' 35,16''$ O) no município de São Sebastião, São Paulo, Brasil.

- *Macrobrachium amazonicum* (Heller 1862): conhecido por camarão-da-amazônia, tem distribuição ampla na região tropical e subtropical da América do Sul (exceto Chile). Os indivíduos (~ 80 animais, $6,6 \pm 0,3$ cm), representantes de uma população continental, foram coletados no córrego da represa na Fazenda Santa Elisa ($21^\circ 06' 31,10''$ S, $48^\circ 03' 05,64''$ O), município de Sertãozinho, interior de São Paulo, Brasil.

- *Macrobrachium potiuna* (Müller 1980): vulgarmente denominado camarão de água-doce ou potiúna. Pertence a fauna endêmica brasileira, com distribuição subtropical, principalmente Sudeste e Sul. É dulcícola hololimnética. Os indivíduos foram coletados (~ 60 camarões, $4,6 \pm 0,1$ cm) em um córrego no município de Piraquara, Paraná, Brasil ($25^\circ 31' 01,25''$ S $49^\circ 00' 30,55''$ O).

- *Macrobrachium brasiliense* (Heller 1862): nome popular pitú ou camarão de água-doce, é encontrado em toda região tropical e subtropical da América do Sul (da Venezuela até o Sul do Brasil). É uma espécie dulcícola hololimnética, sendo o ciclo do desenvolvimento larval completo em água doce. Os espécimes foram coligidos (~ 65 indivíduos, $6,6 \pm 0,3$ cm) em uma pequena lagoa ($21^\circ 20' 17,35''$ S; $47^\circ 31' 22,08''$ W) no município de Serra Azul, interior de São Paulo, Brasil.

As duas espécies coletadas no estado do Paraná foram transportadas em galões de 25 L contendo água do local de coleta, com aeração constante, até o Laboratório de Fisiologia Comparativa da Osmorregulação, Universidade Federal do Paraná, Curitiba/PR, cedido gentilmente pelas Profs. Dras. Carolina Arruda Freire e Viviane Prodocimo. Os espécimes de *P. pandaliformis* e *M. potiuna* foram transferidos para o aquário estoque (25 L) e foram mantidos durante cinco dias em salinidade 17 ‰ (água do mar diluída) e água doce do local da coleta (<0,5 ‰), respectivamente, a temperatura e aeração constante.

As demais espécies de *Macrobrachium* e *P. northropi*, obtidas no Estado de São Paulo, foram transportadas em galões de 25 L contendo água do local da coleta e aeração constante até o Laboratório de Fisiologia de Crustáceos, FFCLRP/USP, Ribeirão Preto/SP. Os espécimes foram acondicionados durante cinco dias em tanques de 30 L. *M. acanthurus*, *M. olfersi*, *M. amazonicum* e *M. brasiliense* foram mantidos em água doce obtida do local de coleta (<0,5 ‰) e *P. northropi* em salinidade 18 ‰ (água do mar diluída), temperatura e aeração constante.

Todos os animais foram alimentados a cada 48 horas com fragmentos de peixe. Os fragmentos não aproveitados na alimentação eram retirados no dia posterior ao que foi colocado.

3.2 Mortalidade, determinação do limite letal superior de salinidade (LSS₅₀) e salinidade experimental

Para comparação interespecífica das habilidades osmorregulatórias entre espécies de nichos osmóticos distintos, faz-se necessário que primeiramente sejam aferidas as diferentes faixas de tolerância à salinidade para cada espécie. Uma medida comumente utilizada para se testar os limites de tolerância à salinidade corresponde ao valor do limite superior da

salinidade que é letal a 50% dos indivíduos durante um período arbitrário de exposição (LSS₅₀) (Thurman 2002; 2003; Kefford et al. 2004; Faria et al. 2017). Assim, assegura-se que o desafio salino experimentalmente estabelecido seja correspondente e confrontável entre as diferentes espécies. Tal medida também possibilita testar se há correlação entre a salinidade em que as espécies são encontradas em seus respectivos habitats e o valor obtido em laboratório da LSS₅₀ (Kefford et al. 2004).

Para determinação da curva de sobrevivência e do limite letal superior de salinidade (LSS₅₀) para cada espécie, os camarões foram divididos em grupos de dois indivíduos por aquário (2 L), quatro aquários por salinidade experimental (n = 8) durante 5 dias.

Os indivíduos de *P. pandaliformis* foram submetidos às salinidades de 33, 35, 39 e 42 ‰, enquanto que os espécimes de *P. northropi* foram expostos às salinidades de 40, 45, 48 e 50 ‰. Os indivíduos de *M. acanthurus* foram submetidos às salinidades de 28, 30, 31 e 33 ‰, *M. olfersi* à 24, 26, 28 e 30 ‰S, *M. amazonicum* à 16, 22, 25 e 28 ‰S, *M. brasiliense* à 19, 22, 25 e 27 ‰S, e *M. potiuna* à 22, 25, 28 e 31 ‰S.

Todos os aquários foram mantidos na mesma temperatura em que foram aclimatados e com aeração constante. Averiguou-se a sobrevivência dos animais a cada 12 horas. Foram considerados mortos os camarões que não retornavam à posição inicial após serem colocados em decúbito lateral.

O LSS₅₀ calculado corresponde à salinidade superior em que ocorreu 50% de mortalidade após 120 h de exposição. Foram escolhidas duas salinidades em que houve sobrevivência acima de 50% e outras duas que houve sobrevivência abaixo de 50%, após 120 h de exposição. A determinação da LSS₅₀ deu-se por meio da análise *Probit*, na qual os valores encontrados do percentual de sobrevivência foram acomodados em um modelo de regressão linear (Finney 1971; Thurman 2002; 2003). Os valores encontrados da LSS₅₀ durante 120 h foram de 43,1 ‰S para *P. northropi*, 39,7 ‰S para *P. pandaliformis*, 31,4 ‰S

para *M. acanthurus*; 28 ‰ para *M. olfersi*; 24,7 ‰ para *M. brasiliense*; 24,5 ‰ para *M. amazonicum*; e 24 ‰ para *M. potiuna*. A partir destes valores estabeleceu-se as salinidades experimentais hiper-osmóticas correspondentes a 80% dos valores da LSS₅₀ (Tabela 1).

Tabela 1. Valores compilados do cálculo do Limite Letal Superior de Salinidade (LSS₅₀) e da Salinidade Experimental correspondente a 80% do valor da LSS₅₀, para as espécies: marinha de poça de maré *P. northropi*; marinha estuarina *P. pandaliformis*; dulcícolas diádromas *M. acanthurus*, *M. olfersi* e *M. amazonicum*; e hololimnéticas *M. brasiliense* e *M. potiuna*.

Espécie	LSS ₅₀ (‰)	Salinidade Experimental (80% da LSS ₅₀) (‰)
<i>P. northropi</i>	43,1	35
<i>P. pandaliformis</i>	39,7	32
<i>M. acanthurus</i>	31,4	25
<i>M. olfersi</i>	28,0	22
<i>M. amazonicum</i>	24,5	20
<i>M. potiuna</i>	24,0	19
<i>M. brasiliense</i>	24,7	20

As espécies de palemonídeos foram submetidas às salinidades correspondentes a 80% do valor da LSS₅₀, sendo os indivíduos divididos em aquários de 2 L (dois indivíduos por aquário) nos quais permaneceram durante 24 e 120 h, constituindo os grupos experimentais (n = 8-10). Para o grupo controle os camarões foram mantidos nas condições de acondicionamento inicial (*P. northropi* em 18 ‰; *P. pandaliformis* em 17 ‰ e espécies do gênero *Macrobrachium* em água doce; todas durante 120 h).

Após o período de exposição, os animais foram anestesiados em gelo picado, durante 5 min, para posterior retirada da hemolinfa e medição da osmolalidade e concentração de Cl⁻; das brânquias para sequenciamento e expressão gênica, Western blot, e imunofluorescência; e do músculo abdominal para redução do teor hídrico. O desenho experimental foi executado

em duplicata para *P. northropi* e *P. pandaliformis* a fim de se obter material suficiente para aferir as medidas fisiológicas e executar as técnicas propostas.

3.3 Medidas da Osmolalidade e [Cl⁻] na hemolinfa

A hemolinfa foi aspirada por meio de agulha e seringa de insulina inserida na membrana artrodial entre a região do cefalotórax e do abdômen. A osmolalidade da hemolinfa foi mensurada em alíquotas de 10 µL em micro-osmômetro de pressão de vapor (Wescor Vapro 5600 Vapor Pressure). Para medir a concentração de cloreto da hemolinfa (10 µL) foi empregado o método de microtitulação (Modelo E485, Metrohm AG), utilizando S-difenilcarbazona como indicador e nitrato de mercúrio como titulante (Schales e Schales 1941, modificado por Santos e McNamara 1996).

3.4 Conteúdo hídrico muscular

Os fragmentos de músculo abdominal foram retirados, colocados em microtubos (previamente pesados = Pt) e imediatamente pesados em balança analítica (100 µg de precisão) (Analytical Plus AP250D, Ohaus, USA), obtendo-se o valor referente ao peso úmido do fragmento (Pu + Pt). Os tubos contendo os fragmentos foram colocados abertos em estufa à 60 °C durante 24 h. Após esse período os tubos foram pesados novamente, obtendo-se o valor referente ao peso seco (Ps + Pt). O peso do tubo foi descontado de cada amostra (Pu – Pt e Ps – Pt) e então calculou-se o teor de hidratação (Th, dado em %) do tecido muscular através da seguinte fórmula:

$$\text{Th (\%)} = [(Pu - Ps) / Pu] \times 100$$

3.5 Preparo das amostras de tecido branquial para sequenciamento e análises de expressão gênica

3.5.1 Extração do RNA total

As brânquias de todas as espécies foram removidas com o auxílio de lupa e microtesoura e foram homogeneizadas em *Trizol* (Life Technologies) na proporção 1:10 (a cada 100 mg de tecido utilizou-se 1 mL de *Trizol*), seguindo o protocolo estabelecido pelo fabricante. As amostras contendo RNA total branquial extraído foram quantificadas em Fluorímetro *Qubit*® 2.0 (Life Technologies) e armazenadas à -80 °C.

3.5.2 Transcrição reversa (RT) do RNAm e síntese de cDNA

O RNA total extraído e quantificado foi tratado com a enzima *DNAse I* (Life Technologies). Para assegurar que a amostra de RNA tratado estava livre de contaminação por DNA realizou-se uma reação de PCR seguida por corrida eletroforética em gel de agarose 1%. Constatado a ausência de DNA, as amostras foram submetidas à reação de síntese de cDNA, através do *kit de RT-PCR SuperScript III* (Life Technologies), pela enzima transcriptase reversa em presença de desoxinucleotídeos (dNTP, Life Technologies) em solução tampão da enzima RT-III, utilizando o Termociclador *Veriti*™ (Life Technologies). Para se certificar do sucesso da síntese de cDNA, todas as amostras foram amplificadas por PCR (*Veriti*™) usando os pares de *primers* para o gene PRL10 (descritos na Tabela 2) (Ver apêndice, Figs. 42 e 43).

Os *primers* utilizados para amplificar parcialmente o gene PRL10 (PRL10_Cs_F e PRL10_Cs_R) foram desenhados com base na sequência conservada de *Callinectes sapidus*, obtida no GenBank (AY822650, Wynn et al. 2004). O PRL10 é codificador da proteína ribossomal L10 e foi utilizado como controle interno de reação para os experimentos de PCR quantitativo (pPCR ou

PCR em Tempo Real). Estudos anteriores com camarões palemonídeos e vários caranguejos obtiveram sucesso com o uso desses *primers* (Towle et al. 2001; Faleiros et al. 2010; 2017). Os *primers* utilizados para amplificação parcial do gene NKCC foram baseados na sequência completa de *Macrobrachium koombooloomba* (sequência cedida gentilmente pelos autores; Rahi et al. 2017).

Tabela 2. Sequência dos *primers* para o gene PRL10 baseado na sequência de cDNA de *Callinectes sapidus* (Wynn et al. 2004) para amplificar parcialmente o gene da proteína ribossomal L10 (PRL10_Cs_F e PRL10_Cs_R) utilizada como gene de referência (Faleiros et al. 2017); sequência dos *primers* degenerados utilizados para amplificar o gene do simportador $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ (NKCC_Mk F/R 1 utilizado para amplificar o NKCC em *M. acanthurus*, *M. amazonicum*, *M. brasiliense* e *M. potiuna*; NKCC_Mk F/R 2 utilizado em *M. olfersi*, *P. northropi* e *P. pandaliformis*) baseado na sequência completa de *Macrobrachium koombooloomba* (sequência ainda não depositada, gentilmente cedida pelos autores; Rahi et al. 2017).

Primer		Sequência de nucleotídeos	Amplicon (pb)
PRL10_Cs_F	5'	AAGAACTGCGGCAAGGACCAGTTCC	304
PRL10_Cs_R	5'	CGGTCAAACCTTGGTAAAGCCCCACTT	
NKCC_Mk_F1	5'	ATTGCTGCTGCCACCTACAT	415
NKCC_Mk_R1	5'	TTTGGGATAGCCACAGCAGG	
NKCC_Mk_F2	5'	GTTCTAGGCCTCCGCTTGTT	561
NKCC_Mk_R2	5'	CTACGCTTCATGGCATTGGC	

O protocolo utilizado para amplificar o cDNA com *primers* para os genes PRL10 e $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ foi:

1) 94 °C	5 min
2) Desnaturação, 94 °C	5 s
3) Pareamento:	
40 °C para PRL10	45 s
55 °C para NKCC (<i>M. amazonicum</i>)	
50 °C para NKCC (demais palemonídeos)	
4) Extensão, 72 °C	1 min
5) # de ciclos das etapas 2, 3, 4	40 ciclos
6) Extensão após os ciclos, 72 °C	10 min
7) Incubação final, 4°C	tempo indefinido

Após a amplificação, os produtos da reação de PCR foram analisados através de eletroforese em gel de agarose a 1% (Life Technologies) corados com *SYBR Safe* (Life Technologies) em tampão TBE (Tris-Borato 40 mM, EDTA 1 mM, pH 8.0, Life Technologies). Os tamanhos dos fragmentos foram identificados por meio da comparação com o marcador de peso molecular *1 kb DNA Ladder Plus* (Life Technologies). O uso do transluminador de luz azul (*Safe Imager™ 2.0 Blue-Light Transluminator*) permitiu a visualização das amplificações no gel de agarose. A documentação dos géis foi registrada com o Fotodocumentador *Digimage System* (Major Science Saratoga, CA, USA) (Ver apêndice, Figs. 42 a 45).

3.5.3 Clonagem dos fragmentos parciais de cDNA e sequenciamento

Os fragmentos obtidos a partir da amplificação por PCR foram cortados e extraídos do gel, purificados com o *PureLink Quick Gel Extract Kit* (Life Technologies), clonados em vetor *PCR 2.1 TOPO TA* (Life Technologies) e transformados em *E. coli* DH5 α termocompetente.

O sucesso da transformação e a escolha dos transformantes que continham os fragmentos de interesse amplificados foi constatado por meio do cultivo de bactérias transformadas em placa de Petri contendo meio seletivo LB Ágar (Lennox L Ágar, Life Technologies), ampicilina (200 mg/mL) (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA) na presença de X-Gal e IPTG (Life Technologies), nas quais as colônias brancas constituem as bactérias que apresentam inserto.

Pelo menos duas colônias brancas (o que corresponde a dois clones) para cada espécie foram cultivadas em 3-5 mL de meio *LB broth base* (Life Technologies) contendo ampicilina (200 mg/mL) *overnight* a 37 °C e 180 rpm. Para certificação da presença dos fragmentos de

interesse, cada cultura (2 µL) foi submetida a uma reação de PCR diagnóstica com os *primers* utilizados de acordo com o fragmento clonado (Tabela 2), seguida de corrida eletroforética em gel de agarose 1% (Ver apêndice; Figs. 44 e 45).

As amostras de DNA plasmidial dos clones selecionados contendo as sequências do PR110 e NKCC foram purificadas com *PureLink Plasmid Mini Kit* (Life Technologies) e, posteriormente, submetidas ao sequenciamento pelo método tradicional de incorporação de dideoxynucleotídeos (Sanger et al. 1977) utilizando os *primers* específicos do próprio vetor (M13F e M13R). O sequenciamento foi realizado no Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

Após o sequenciamento dos clones amplificados, foi analisada a identidade das sequências de nucleotídeos e sequências traduzidas de aminoácidos das proteínas correspondentes. Essas análises das sequências dos clones de cDNA foram realizadas pelo programa BLAST (Altschul et al. 1990) que detecta regiões de similaridade entre sequências de nucleotídeos ou aminoácidos, e as compara com sequências depositadas em bancos de dados internacionais como o GenBank (<http://www.ncbi.nih.gov/BLAST/>) (Ver alinhamento 1 a 3).

Alinhamento 1. Alinhamento de sequências parciais de nucleotídeos do gene NKCC (NKCC_Mk_F/R 1) (415 pb) a partir do cDNA das brânquias de *Macrobrachium acanthurus* (GenBank deposit MG385140), *Macrobrachium amazonicum* (MG385141), *Macrobrachium brasiliense* (MG385142) e *Macrobrachium potiuna* (MG385143).

M_acanthurus	ATCCTTCAGATCACCAGAGAGATTAGCACCAGCAACAATTCAGTTACAGCAGGGAAGAA
M_amazonicum	ATCCTTCAGATCACCAGAGAGATTAGCACCAGCCACAATTCAGTGACAGCAGGGAAGAA
M_brasiliense	ATCCTTCAGATCACCAGAGAGATTAGCACCAGCAACAATTCAGTTACAGCAGGGAAGAA
M_potiuna	ATCCTTCAGATCACCAGAGAGATTAGCACCAGCAACAATTCAGTTACAGCAGGGAAGAA

M_acanthurus	GACACCAAACACACTGAAAATGTTCTGATTGCTCCCTTCAAATCTGCGATAGTCAGCTAT
M_amazonicum	GACACCAAACACACTGAAAATGTTCTGATTGCTCCCTTCAAATCTGCGATAGTCAGCTAT
M_brasiliense	GACACCAAATACACTGAAAATGTTCTGATTGTTGCCTTCAAATCTACGATAGTCAGCTAT
M_potiuna	GACACCAAATACACTGAAAATGTTCTGATCGCTGCCTTCAAATCTACGATAGTCAGCTAT
	***** * *
M_acanthurus	CACGTTTTCCTTTAAGAGTTCAAGATTGAAGCCTAAGAATCCCTGAGCTTCTTCTTCTGT
M_amazonicum	CACGTTTTCCTTTATGACTTCAAGATTGAAGCCTAAGAATCCCTGAGCTTCTTCTTCTGT
M_brasiliense	CACATTTTCCTTTATGACTTCAAGATTGAAACCTAAAAATCCCTGAGCTTCTTCTTCTGT
M_potiuna	AACGTTTTCCTTTATGACTTGAAGATTGAAGCCCAAAAATCCCTGAGCTTCTTCTTCTGT
	** ***** ** *
M_acanthurus	GGAGGTTGGTCCAATGAATGTCCCAACGATGAAGTCTATCTGCGATCCAATCAGCAGAAA
M_amazonicum	GGAGGTTGGTCCAATGAATGCCCCAACGATGAAGTCTATCTGCGATCCGATCAGCAGAAA
M_brasiliense	GGAGGTTGGACCAATGAATGCCCCAACGATGAAGTCTATCTGCGACCCGATCAGCAGAAA
M_potiuna	GGAGGTTGGACCAATGAATGTCCCAACGATGAAGTCTATCTGCGACCCGATCAGCAGAAA
	***** ***** **
M_acanthurus	CAGGAGACCCATTTGGACCCTAGTGACCCAATCCATGCCAACAATAGCAAGAGCTAACAC
M_amazonicum	CAAGAGACCCATTTGGACCCTGGTTACCCAATCCATGCCAACAATAGCAAGAGCTAACAC
M_brasiliense	CAGGAGACCCATCTGGACCCTGGTGACCCAATCCATACCAACAATAGCAAGAGCTAACAC
M_potiuna	CAGGAGACCCATCTGGACCCTGGTGACCCAATCCATGCCAACAATAGCAAGAGCTAACAC
	** ***** **
M_acanthurus	TCCTACCAAAGTGACAGTGCCGACAACCTCTCGTGTCATTAACCTCCACCGTCGATTATCGT
M_amazonicum	TGCCACCAAAGTGACAGTGCCGACAACCTCTCGTGTCGTTAACTCCACCGTCGATTATCGT
M_brasiliense	TGCCACCAAAGTGACAGTGCCGACAATTCTCGTATCATTAACCTCCACCGTCGATTATCGT
M_potiuna	TGCCACCAAAGTGACAGTACCGACAACCTCTCGTATCGTTAACTCCACCGTCGATTATCGT
	* * *****
M_acanthurus	TGTACCGTCAAATTCATATTTCAACAAATCCTTAAGGGAATCGCAGAAACCAATG
M_amazonicum	TGTACCGTCAAATTCATATTTCAACATATCCTTAAGGGAATCGCAGAAACCAATG
M_brasiliense	TGTACCGTCAAATTCATATTTCAACAAATCCTTGAGGGAATCGCAGAAACCGATG
M_potiuna	TGTACCATTAATTCATATTTCAACATATCCTTGAGGGAATCGCAGAAACCGATG
	***** * *****

Alinhamento 2. Alinhamento de sequências parciais de nucleotídeos do gene NKCC (NKCC_Mk_F/R 2) (561 pb) a partir do cDNA das brânquias de *Palaemon northropi* (GenBank deposit MG652470), *Palaemon pandaliformis* (MG652469) e *Macrobrachium olfersi* (MG652471).

```

P_northropi      GACTTCGCCCCAGAGCATTACAAAGAACATCTCTT-TACTCGCTCTTGGACACGTCATTCA
P_pandaliformis ---GTCGGCTTCTGCATCACCAGTGCCTGCCGCTCTCTCTGCTTTTGGG--GATCCTGGG
M_olfersi        ---GTCACCGGCTGCGTCATCTGTGCCGGCCGTCCTCCCTGCTTTAGGA--GATCCTGGA
                  **  *      ** * *      *  *      *      *** * ***      ** *

P_northropi      GGGACCCCAAACCCAAAGAATCCGTAACGTACTAAGCAGGCAATCTTACAGCTGGCTGAG
P_pandaliformis  GGAC-----TTGACGATTCA-----CTGGCATTGTCATCGAGGGAAAGC
M_olfersi        GGAG-----TTGATGCTTCG-----CTGGCATTGTCATCGAGTGAGAGC
                  **              * * * *      * * * * * * * * * *

P_northropi      CCGTCATAAGATCCGT-GCCTTTTATTCTCTTGTGTTGAAGGAAGCAATTTGGAGG-----
P_pandaliformis  TGACCAGCAGACTGGTTGCGTTTCATGTCGTCAACATTGGAAGTGATGTTTGTGTCTGTG
M_olfersi        TGACCGGCAGACTGATTGCGTTTCATATCCTCAACATTGGACGTGATATTTGTGTCTGTG
                  *      ***      * * * * * *      *      *** * * * *      *

P_northropi      -----AAGGTTCCCGCAGTCTTTTCCAGCTTGTGTTAGGGAAACTGCGTCCCAACA
P_pandaliformis  CCATTCATGATAACAGGAGTATCCTCGTCTTCAATGATTGCGAGTAATCCA-----
M_olfersi        CCATTCATGATAACTGGAGTATCTTCATCTTCAATAATTTGCGAGTAATCCA-----
                  * * * * * * * * * *      * *      *** * * * *

P_northropi      TGGTTCTTCTCGGATACAAGGCTAACTGGGGCAAGTGCGAGCGTCAAGAACTGAGAGCAT
P_pandaliformis --GTCCTTGAGGAACACGTAAGATAGCCACACCAAGGTACATGTCAAGTGCTTCATGAAG
M_olfersi        --GTCCTTGAGGTACACGTAAGATAGCCACTCCAAGATACATGTCAAGAGCTTCGTGAAG
                  ** ***      * * * *      *      * *      * * * * * * * *

P_northropi      ACTTTAATACTTACGAAAGCTCTTGAC-----ATGTACCTCGGTGTGGCTATTTTGC
P_pandaliformis  TGTGTTAAAGTAAGCCTTCAGTTCTTGACGATCGCACTTGCCCCAATTTGCCTTGTATCC
M_olfersi        TGTGTTAAAGTAAGCCTTCAGTTCTTGACGCTCACACTTGCCCCAGTTTGCTTGTAGCC
                  * * * *      *      ** * * * * *      * * * * * * * * * *

P_northropi      GAGTACCTCAAGGACTGGA----T TACTCTCAGATTATTGAAGATGAGGATACTCCAGTA
P_pandaliformis  CAAAAGAACCATGTTGGGGCGCAGTTTTTCCTAAACCAACAAGCTGGAACAGGCTTCGGGA
M_olfersi        GAGAAGAACCATATTGGGACGTAGTTTTTCCTAAACCAACAAGCTGGAACAGACTACGGGA
                  * *      * *      **      * * * * * *      * * * * * * * *

P_northropi      ATCATGAATGGCACTGATAC---AAACATCACAACCAAC-----GTTGAGGACA
P_pandaliformis  ACCATCCTCCAAATTGTTTCCTTCCACGAGAGAATAAAAGGCACGGATCTTGTGACGGCC
M_olfersi        ACCTTCTCCAAAGTTGCTTCTTCTACAAGAGAGTAAAAGGCGCGGATCTTGTGACGGCT
                  * * *      ** * *      **      * *      **      *** * *

P_northropi      TAAAACGTAATCAGTCTGCCGGTCAACTTTCACTCGATGATAATGCCAGTGAAGCGTCAA
P_pandaliformis  CAACCAATTGTAAGACTGACGGGTGAGTGCATTG--CGGATTCTCTGAGTCTGGG-----
M_olfersi        CAACCAGTTGTAAGACTGACGGGTGAGTGCATTG--CGGATTCTCTGAGTTTGGG-----
                  **      * * * * * * * *      * *      *** *      *** *

P_northropi      GTCCACCAGGATCTCCCAAACAGAGAGAGCA----GCAGGTACAGGAGACGCAG--CAG
P_pandaliformis  --GTCCCTGTATGACATGACCAAGTGAAAGTAATGAGATATTCTTTGTGATACTCTGTGC
M_olfersi        --GTCCCTGAATGACATGACCGAGTGAAAGCAATGAGATGTTCTTGGTGATGCTCTGAGC
                  ** * * *      *      * * * * * *      *      *      * * * *

P_northropi      CTGAT-
P_pandaliformis  AAAGTC
M_olfersi        AAAGTC
                  *

```

Alinhamento 3. Alinhamento de sequências parciais de nucleotídeos do gene PRL10 (251 pb) a partir do cDNA das brânquias de *Palaemon pandaliformis* (GenBank deposit KP890671) e *Macrobrachium potiuna* (KU726244); e das glândulas antenais de *Macrobrachium olfersi* (GenBank deposit KT783515). As demais sequências foram retiradas do GenBank e correspondem as sequências do PRL10 (251 pb) a partir do cDNA das brânquias de *Palaemon northropi* (JN251135), *Macrobrachium acanthurus* (JN251134), *Macrobrachium amazonicum* (GU366065) e *Macrobrachium brasiliense* (JN251133); e das glândulas antenais de *Macrobrachium olfersi* (KJ081244).

P_pandaliformis	ACATCCGTGTTAGGCTTCATCCCTTCCATGTCATCCGTATCAATAAAATGTTGTCGTGTG
P_northropi	ATATCCGTGTGAGGCTTCATCCTTTCCATGTCATCCGTATCAATAAAATGTTGTCGTGTG
M_olfersi_gl	ATATCCGTGTGAGGCTTCATCCTTTCCATGTCATCCGTATCAATAAAATGTTGTCGTGTG
M_potiuna	ACATCCGTGTCAGGCTTCATCCTTTCCATGTCATCCGTATTAATAAAATGTTGTCGTGTG
M_amazonicum	ACATCCGTGTCAGGCTTCATCCTTTCCATGTCATCCGTATCAATAAAATGTTGTCGTGTG
M_acanthurus	ACATCCGTGTCAGGCTTCATCCTTTCCATGTCATCCGTATCAATAAAATGTTGTCGTGTG
M_brasiliense	ACATCCGTGTCAGGCTTCATCCTTTCCATGTCATCCGTATCAATAAAATGTTGTCGTGTG
	* ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** *****
P_pandaliformis	CTGGTGCTGATAGATTGCAGACAGGAATGCGAGGTGCCTTTGGTAAACCTCAAGGCACAG
P_northropi	CTGGTGCTGATAGATTGCAGACAGGTATGCGAGGTGCCTTCGGTAAACCCCAAGGCACAG
M_olfersi_gl	CTGGTGCTGATAGATTGCAGACAGGTATGCGAGGTGCCTTTGGTAAACCCCAAGGCACAG
M_potiuna	CTGGTGCTGATAGATTGCAGACAGGCATGCGAGGGGCCCTTTGGTAAAGCCCCAGGGAACAG
M_amazonicum	CTGGTGCTGATAGATTGCAGACAGGTATGCGAGGTGCCTTTGGTAAAGCCCCAGGGAACAG
M_acanthurus	CTGGTGCTGATAGATTGCAGACAGGTATGCGAGGTGCCTTTGGTAAAGCCCCAGGGAACAG
M_brasiliense	CTGGTGCTGATAGATTGCAGACAGGTATGCGAGGTGCCTTTGGTAAAGCCCCAAGGCACAG
	***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** *
P_pandaliformis	TTGCTCGTGTGAGAATTGGCCAGCCAATTATGTCTGTAAGAACCCATGACCGTCATAAGG
P_northropi	TTGCACGTGTAAGAATTGGTCAGCCCATTATGTCTGTAAGGACCCATGATCGACACAAGG
M_olfersi_gl	TTGCACGTGTAAGAATTGGTCAGCCCATTATGTCTGTAAGGACCCACGATCGACACAAGG
M_potiuna	TTGCACGTGTAAGAATTGGTCAGCCCATTATGTCTGTAAGGACCCACGATCGTCACAAGG
M_amazonicum	TTGCACGTGTAAGAATTGGTCAGCCCATTATGTCTGTAAGGACCCACGATCGTCACAAGG
M_acanthurus	TTGCACGTGTAAGAATTGGTCAGCCCATTATGTCTGTAAGGACCCACGATCGTCACAAGG
M_brasiliense	TTGCACGTGTAAGAATTGGTCAGCCCATTATGCCTGTAAGGACCCACGATCGTCACAAGG
	**** ***** ***** ***** ***** ***** * ***** ***** ** ** ** *
P_pandaliformis	CCCCTGTAGTTGAAGCACTAAGACGAGCTAAATTCAAGTACCCTGGACGTCAAAAGATTT
P_northropi	CTCCTGTAGTCGAGGCACTGAGACGAGCAAAGTTCAAGTACCCTGGACGTGAGAAGATTT
M_olfersi_gl	CTCCTGTAGTCGAGGCACTGAGACGAGCAAAGTTCAAGTACCCTGGACGTGAGAAGATTT
M_potiuna	CTCCTGTAGTCGAGGCACTGAGACGAGCAAAGTTTAAGTACCCAGGACGTGAGAAGATTT
M_amazonicum	CTCCTGTAGTTGAGGCCCTGAGACGAGCTAAGTTCAAGTACCCCGGACGTGAGAAGATTT
M_acanthurus	CTCCTGTAGTTGAGGCCCTGAGACGAGCAAAGTTCAAGTACCCCGGACGTGAGAAGATTT
M_brasiliense	CTCCTGTAGTCGAGGCACTGAGACGAGCAAAGTTTAAGTACCCCGGACGTGAGAAGATTT
	* ***** ** ** * ***** ** ** ***** ***** ***** *****
P_pandaliformis	ACATCTCAAGA
P_northropi	ACATCTCAAGG
M_olfersi_gl	ACATCTCAAGG
M_potiuna	ACATCTCAAGG
M_amazonicum	ACATCTCAAGG
M_acanthurus	ACATCTCAAGG
M_brasiliense	ACATCTCAAGG

Com base nessas sequências, *Primers* específicos para a PCR em tempo real para cada gene foram confeccionados por meio do aplicativo online Primer-Blast (Primer Analysis Software – copyright 1989-91 por Wojciech Ruchlik) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) (Tabela 3).

Tabela 3. Sequência de bases dos pares de primers específicos usados para quantificar a expressão gênica (RT-PCR em tempo real) para o simportador NKCC (*P. northropi* NKCC_Pn_F/R; *P. pandaliformis* NKCC_Pp_F/R2; *M. acanthurus* e *M. amazonicum* NKCC_Mac_F/R; *M. olfersi* NKCC_Molf_F/R; *M. brasiliense* NKCC_Mb_F/R2; *M. potiuna* NKCC_Maustr_F/R; Moshtaghi 2016) e par de primers genérico/específico para camarões palemonídeos para o gene PRL10 (PRL10_Pal_F e PRL10_Pal_R; Faleiros et al. 2017). Os primers foram obtidos por meio do aplicativo on-line Primer-Blast (Primer Analysis Software – copyright 1989-91 por Wojciech Ruchlik) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>).

Primer		Sequência de nucleotídeos	Amplicon (pb)
PRL10_Pal_F	5'	ATGGGCTGACCAATTCTTACAC	85
PRL10_Pal_R	5'	GTGCTGATAGATTGCAGACAGG	
NKCC_Pn_F	5'	CAAGTGCGAGCGTCAAGAAC	86
NKCC_Pn_R	5'	CTCGCAAAATAGCCACACCG	
NKCC_Pp_F2	5'	CCGCTCTCTCTGCTTTTGGGA	92
NKCC_Pp_R2	5'	GAAACGCAACCAGTCTGCTG	
NKCC_Mac_F	5'	GCACCAGCAACAATTCCAGT	84
NKCC_Mac_R	5'	TCGCAGATTTGAAGGGAGCA	
NKCC_Molf_F	5'	TTGCCCCAGTTTGCCTTGTA	94
NKCC_Molf_R	5'	TGGAGGAAGGTTCCCGTAGT	
NKCC_Mb_F2	5'	AGCAAGAGCTAACACTGCCA	128
NKCC_Mb_R2	5'	TCGGTTTCTGCGATTCCCTC	
NKCC_Maustr_F	5'	GGGTCACCAGGGTCCAGAT	180
NKCC_Maustr_R	5'	TAGCACCAGCAACAATTCCA	

3.5.4 PCR quantitativo (PCR em Tempo Real)

As análises de expressão por PCR em tempo real ou PCR quantitativo foram realizadas utilizando o aparelho da BioRad (CFX96™Real-TimeSystem, C1000 Touch) no Laboratório de Imunologia, Departamento de Biologia, FFCLRP/USP, sob os cuidados e apoio técnico do Prof. Dr. Ademilson Panunto Castello. As reações de PCR em tempo real foram executadas utilizando o Kit “Power UP SYBR® Green PCR Master Mix” (LifeTechnologies) sob instruções do próprio fabricante.

As reações foram preparadas em placas de 96 poços, onde foram adicionados a cada poço: 5 µL de “Power UP SYBR® Green PCR Master Mix (LifeTechnologies), 1,5 µL do *primer* Forward (1,33 pmol/µL) e 1,5 µL do *primer* Reverso (1,33 pmol/µL), 2 µL de cDNA (6 ng/µL) para cada condição experimental e volume final de 10 µL.

As condições de termociclagem foram: um passo inicial de 95 °C por 10 minutos, seguidos por 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos e 60 °C por 1 minuto. Após o término da reação, uma curva de dissociação foi realizada para verificar a presença de algum contaminante, formação de dímeros de *primers* e/ou amplificação de mais de 1 amplicon. As condições de termociclagem da curva de dissociação foram: um passo inicial de 65 °C por 5 segundos, subindo a cada 0,5 °C até atingir 95 °C, permanecendo em 95 °C por 5 segundos.

Para a quantificação relativa da expressão gênica nas amostras nos diferentes tratamentos e espécies, foi utilizado o método do CT comparativo. Nesse caso, faz-se um experimento de validação (curva padrão) para avaliar a semelhança entre as eficiências [$E = 10^{(-1/\text{slope})}$] das amplificações do gene alvo e do controle PRL10, onde $R^2 > 0,996$ e eficiência corresponde entre 90 e 110%. O método CT comparativo utiliza a fórmula exponencial ($2^{-\Delta\Delta CT}$) para quantificação relativa das amostras (Livak e Schmittgen 2001). Desse modo as amostras são normalizadas pelo gene constitutivo e calibradas pelo grupo controle.

Uma curva padrão para cada par de *primers* e cada espécie foi confeccionada a partir de diluição seriada de um *pool* dos cDNAs. A partir dos valores que melhor se acomodam na curva, é determinada a diluição utilizada para as amostras de cDNA individuais. A reação para cada amostra individual de brânquias foi realizada em triplicata, o que permitiu a detecção de possíveis erros na distribuição de volume nos poços, sendo descartado aquele que apresentou variação maior ou igual a 0,2 ciclo. Controles negativos foram realizados (No Template Control, NTC) sem template (cDNA), como uma forma de detectar alguma possível contaminação.

3.6 Preparo das amostras para análise da expressão proteica do Na^+ , K^+ , 2Cl^- por *Western blotting*

As proteínas do tecido branquial foram extraídas a partir do *Trizol* durante o processamento do RNA total (Life Technologies). Após a separação das fases fenol-clorofórmio, a fase aquosa contendo as proteínas foi retirada e seguiu-se o protocolo estabelecido pelo fabricante (Life Technologies). As proteínas foram isoladas, ressuspendidas em SDS 1% e armazenadas a -20 °C.

A viabilização desse protocolo possibilita a extração de mRNA para reação de PCR quantitativa e de proteínas para Western blot, reduzindo o número de animais a serem usados. Ainda, a obtenção dos resultados por ambas as técnicas será a partir de um único indivíduo, reduzindo a variabilidade e facilitando a discussão e a relação dos resultados encontrados. A quantificação das proteínas totais se deu utilizando o *kit Pierce™ BCA Protein Assay* (ThermoScientific), com leitura em microplacas no leitor de Elisa (SpectraMax M2, Molecular Devices) com absorbância a 562 nm.

Alíquotas do extrato proteico (contendo 20 µg de proteína total) foram diluídas em 10 µL de tampão de amostra e fervidas (100 °C) durante 5 min. Então foram submetidas ao gel de corrida eletroforética (acrilamida 10%) em tampão Tris-base 150 mM contendo SDS 1 mM (pH 8.8), seguido do gel de empilhamento (acrilamida 5%) também em tampão Tris-base 50 mM contendo SDS 1 mM (pH 6.8). Para a corrida, foi utilizado o tampão Tris-Glicina (pH 8.3), contendo SDS (0,1%), durante aproximadamente 4 h com corrente constante de 20 mAmp.

Após a corrida, o gel contendo os peptídeos foi submetido à transferência para a membrana de PVDF (Hybond™-P, Amersham Biosciences) (previamente incubada em Metanol P.A., seguido em água ultrapura) em câmara de Western blotting contendo tampão de transferência composto por Tris-Base (25 mM), Glicina (192 mM), SDS 10% e Metanol 20%. A transferência foi realizada em corrente de 135 mAmp *overnight* a 4°C.

A membrana foi retirada, a faixa de marcador molecular foi recortada, e então foi incubada em estufa a 37 °C por 1 h. Foi reidratada em Metanol P.A., seguida em água ultrapura, e após em tampão TBST (TSBT, *Tris-buffered saline with Tween*). A membrana foi então incluída em TBST contendo leite em pó Molico 5% por 1 h para bloqueio dos sítios não específicos. Após o bloqueio a membrana foi recortada ao meio (o que corresponde a porção onde estão as proteínas de até 70 kDa), e incubou-se a parte superior com anticorpo primário anti-NKCC (131 kDa), produzido em camundongo (T4, anti-mouse IgG, anti-cotransportador NKCC da cripta colônica humana, células T84, *Hybridoma Banks*), e a parte inferior com anticorpo primário anti-actina (42 kDa), produzido em galinha (ab-5, anti-mouse IgG, BD Biosciences). Ambos os anticorpos foram diluídos na proporção de 1:1000 em BSA (*Bovine Serum Albumin*, Sigma-Aldrich) 0,1% + TBST e incubados por 2 h.

Em seguida a membrana foi lavada com TBST e incubada com anticorpo secundário (anti-mouse IgG, produzido em cabra, conjugado com peroxidase (Sigma-Aldrich) (diluído

1:1000 em TBST + BSA 0,1%) por 2 h a temperatura ambiente. A membrana foi lavada novamente com TBST e em seguida coberta com cromógenos da peroxidase (SigmaFAST™ DAB, 3,3'-Diaminobenzidine substrato de peroxidase), permanecendo nesta solução por aproximadamente 10 min ou até o completo aparecimento das bandas das proteínas de interesse. Após a revelação, a membrana foi mergulhada em água ultrapura para interromper a reação.

A membrana foi fotodocumentada (Câmera digital Canon EOS T3i) (Ver apêndice, Fig. 46) e a expressão proteica foi quantificada por meio da análise de intensidade relativa das bandas (Taylor et al. 2013), utilizando o *software free* ImageJ (Schneider et al. 2012). Os valores da expressão proteica diferencial do NKCC foram normalizados através da comparação com a expressão da proteína actina (BD Biosciences).

3.7 Preparo das amostras de tecido branquial para localização do simportador Na^+ , K^+ , 2Cl^- por imunofluorescência

As brânquias foram retiradas com auxílio de lupa e micro-tesoura e foram fixadas em paraformaldeído 2% em tampão fosfato (PBS) por 3 h. Em seguida, o tecido foi incubado em PBS com sacarose 5% por 2 h e em PBS com sacarose 15% *overnight* a 4 °C para preservação do material durante congelamento. O material foi incluído em meio OCT (solução crioprotetora de seccionamento de temperatura ótima, Tissue-Tek) e imediatamente congelado a -20 °C com posterior armazenamento em freezer -80 °C.

Os cortes de aproximadamente 10 µm dos blocos de OCT, contendo as lamelas branquiais de todas as espécies coletadas, foram realizados em criostato (HM 500 OM, Microm International) pertencente ao Departamento de Biologia Celular e Molecular da Faculdade de Medicina da USP-Ribeirão Preto, e foram aderidos às lâminas de vidro

previamente preparadas em 3-aminopropiltrietoxisilano (4%) diluído em acetona P.A. Foi dada a continuidade do protocolo de imunomarcação através da incubação com o anticorpo primário anti-NKCC produzido em camundongo (T4, anti-cotransportador NKCC da cripta colônica humana, células T84, Banco de Estudos de Desenvolvimento de Híbrido, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade de Iowa, EUA) e secundário anti-camundongo IgG produzido em cabra e conjugado com o fluorocromo fluoresceína (FITC) (Pierce, USA). Foi adicionado ao material uma solução de meio de montagem de histologia contendo DAPI (Fluoroshield™ com DAPI) para coloração do núcleo das células.

As lâminas foram observadas e fotografadas em microscópio confocal invertido (Axio Observer LSM 780, Zeiss) acoplado a um sistema de captação de imagem, e então foram visualizadas por meio do programa Fiji J (Schindelin et al. 2012).

3.8 Análise estatística

O efeito do tempo de exposição e cada salinidade sobre: (i) a osmolalidade e a concentração de cloreto da hemolinfa; (ii) a abundância proteica do NKCC branquial relativa; e (iii) a expressão gênica do NKCC branquial foi avaliado utilizando uma análise de variância de uma via com teste *post hoc* de *Student-Newman-Keuls* (SNK) para detectar diferenças entre as médias. O procedimento foi realizado após constatação de normalidade de distribuição dos dados e igualdade das variâncias. Foi usado um nível mínimo de significância de $P=0,05$ para todos os testes. Tais análises foram realizadas utilizando o aplicativo *Sigma Plot 11.0*, sendo os dados expressos como média $\pm$ erro padrão da média.

3.9 Análise filogenética

3.9.1 Sinal filogenético

O sinal filogenético para cada traço selecionado foi descrito por análises de autocorrelação, utilizando-se o índice I de Moran. A quantificação do sinal filogenético indica a propensão de existir maior similaridade em determinado parâmetro entre espécies estreitamente relacionadas (Rezende e Diniz-Filho 2012). O índice I de Moran varia de -1 até +1, sendo que os valores significativos positivos indicam semelhança compartilhada entre espécies estreitamente relacionadas filogeneticamente, e valores significativos negativos indicativos de dissimilaridade. Valores próximos a zero figuram ausência de sinal filogenético (Gittleman et al. 1996). As análises foram realizadas utilizando o *software* Phylogenetic Analysis in Macroecology (PAM versão 0.9 beta, Rangel et al. 2012).

3.9.2 Correlações filogenéticas

Comparações interespecíficas são frequentemente empregadas a fim de se compreender processos adaptativos e correlações entre aspectos fenotípicos obtidos a partir da fisiologia experimental *versus* uma característica abiótica do habitat, p. ex. medidas fisiológicas sistêmicas e salinidade do habitat (Garland e Adolph 1994; Rezende e Diniz-Filho 2012). O uso de espécie como unidade independente, aplicando-se a estatística convencional em análises comparadas, acaba por superestimar o número de graus de liberdade e elevar a probabilidade de erro Tipo I (rejeitar a hipótese nula quando ela é válida), reduzindo o poder estatístico. A possibilidade de se encontrar diferenças significativa nos traços fenotípicos entre espécies estreitamente relacionadas ou não é bastante suscetível a erro, estando a

hipótese nula mais próxima de encontrar diferenças do que não diferenças (Felsenstein 1985; Martins e Garland 1991; Garland e Adolph 1994; Diniz-Filho 2000).

As espécies diferem entre si como resultado de todo um processo evolutivo e as implicações desses processos devem ser consideradas. Por isso a aceitação do relacionamento filogenético entre as espécies não deve ser apenas uma informação a ser corrigida, e sim interpretada como um sinal evolutivo em diferentes escalas ao longo da evolução (Bello et al. 2015).

As análises comparativas foram estimadas empregando-se a hipótese filogenética de Pereira (1997) para as espécies da família Palaemonidae caracterizadas neste trabalho, assumindo comprimentos de ramos arbitrários (Grafen 1989). Foi utilizada a plataforma estatística *R* (R Development Core Team 2009), dispondo dos pacotes *nlme* (Pinheiro, Bates, DebRoy, Sarkar e R Core Team 2016) e *ape* (Paradis, Claude e Strimmer 2004), sempre com mínimo de significância de 0,05.

O modelo linear filogenético utilizado para se testar o efeito do tempo de exposição à salinidade superior sobre os parâmetros fisiológicos e sobre a expressão gênica e proteica do simportador NKCC das brânquias foi o pGLS (*phylogenetic generalized least squares*). Este modelo inclui a estrutura filogenética como uma matriz de covariância a um modelo linear, assumindo a dependência filogenética dos dados. Concomitante ao pGLS, foi estimada a força de seleção (α) do modelo evolutivo Ornstein-Uhlenbeck (O-U). Esse modelo limita o valor máximo e mínimo de um determinado traço e os direciona para um ponto central de variação (Diniz-Filho 2001, Revell 2012). Se o valor de α é nulo, significa que a covariância entre as espécies é resultado de mudanças evolutivas aleatórias ou resultado de mudanças probabilísticas movidas por seleção natural, assim como no modelo de movimento browniano (Hansen e Martins 1996).

As análises dos dados de expressão gênica e proteica do NKCC entre as espécies foram conduzidas das seguintes formas: (i) as amostras foram normalizadas individualmente pelo respectivo gene (PRL10) ou proteína (β -actina) constitutivos. Na expressão gênica foi aplicado a fórmula ΔCT e posteriormente $2^{-(\Delta CT)}$ e na expressão de proteínas foi utilizada a razão entre a proteína alvo e a constitutiva. Na aplicação da análise estatística intraespecífica (ANOVA 1 VIA) as amostras foram normalizadas, tal como supracitado, e posteriormente calibradas em relação ao controle. Neste caso o controle corresponde a valores ~ 1 e as medidas experimentais relativas a ele. A calibração a título de estatística intraespecífica é mais usual e assegura maior clareza quando se discute efeito entre as condições experimentais.

4 RESULTADOS

4.1 Mortalidade e estimativa do limite letal superior de salinidade (LSS₅₀)

A sobrevivência de *P. northropi* observada durante 120 h de exposição foi de 75% na salinidade de 40 ‰, 50% em 45 ‰, 25% em 48 ‰, e 0% em 50 ‰ (Fig. 4). O valor calculado a partir da análise *Probit* correspondente à LSS₅₀ foi de 43,1 ‰S. A partir destes valores estabeleceu-se a salinidade hiper-osmótica experimental de 35 ‰, correspondente a 80% da LSS₅₀.

Figura 4. Curvas de sobrevivência (%) de *P. northropi*, camarão marinho de poça de maré, submetido às salinidades de 40 (●), 45 (○), 48 (▼) e 50 (△) ‰ durante 120 h (n = 8, cada). O tempo 0 h corresponde à salinidade 18 ‰ (n=8). A análise probit estima 50% de sobrevivência em 43,1 ‰S (LSS₅₀) após 120 h.

A porcentagem de sobrevivência de *P. pandaliformis* observada durante 120 h foi de 100% na salinidade de 33 ‰, 75% em 35 ‰, 62,5% em 39 ‰, e 25% em 42 ‰ (Fig. 5). A salinidade calculada correspondente à LSS_{50} foi de 39,7 ‰. A partir destes valores estabeleceu-se a salinidade hiper-osmótica experimental de 32 ‰ (80% da LSS_{50}).

Figura 5. Curvas de sobrevivência (%) de *P. pandaliformis*, camarão estuarino, submetido às salinidades de 33 (●), 35 (○), 39 (▼) e 42 (△) ‰ durante 120 h (n = 8, cada). O tempo 0 h corresponde à salinidade 17 ‰ (n=8). A análise probit estima 50% de sobrevivência em 39,7 ‰S (LSS_{50}) após 120 h.

A sobrevivência (%) de *M. acanthurus* observada durante exposição de 120 h foi de 100% na salinidade de 28 ‰, 66,67% em 30 ‰, 50% em 31 ‰, e 16,67% em 33 ‰ (Fig. 6). O valor calculado correspondente à LSS_{50} foi de 31,4 ‰S. A partir destes valores estabeleceu-se a salinidade hiper-osmótica experimental de 25 ‰ (80% da LSS_{50}).

Figura 6. Curvas de sobrevivência (%) de *M. acanthurus*, camarão dulcícola diádromo, submetido às salinidades de 28 (●), 30 (○), 31 (▼) e 33 (Δ) ‰ durante 120 h (n = 8, cada). O tempo 0 h corresponde à condição controle em água doce (n=8). A análise probit estima 50% de sobrevivência em 31,4 ‰S (LSS_{50}) após 120 h.

Para *M. olfersi* a sobrevivência foi de 100% em salinidade de 24 ‰, 62,5% em 26 ‰, 37,5% em 28 ‰ e 25% em 30 ‰ durante 120 h de exposição (Fig. 7). O valor calculado a partir da análise *Probit* correspondente à LSS_{50} foi de 28 ‰ e a salinidade hiper-osmótica experimental foi de 22 ‰ (80% da LSS_{50}).

Figura 7. Curvas de sobrevivência (%) de *M. olfersi*, camarão dulcícola diádromo, submetido às salinidades de 24 (●), 26 (○), 28 (▼) e 30 (Δ) ‰ durante 120 h (n = 8, cada). O tempo 0 h corresponde à condição controle em água doce (n=8). A análise probit estima 50% de sobrevivência em 28 ‰S (LSS_{50}) após 120 h.

Em *M. amazonicum* a sobrevivência foi de 100% em salinidade de 16 ‰, 50% em 22 ‰, 37,5% em 25 ‰ e 25% em 28 ‰ (Fig. 8). O valor calculado a partir da análise *Probit* corresponde à LSS_{50} foi de 24,5 ‰S e a salinidade hiper-osmótica experimental estabelecida foi de 20 ‰ (80% da LSS_{50}).

Figura 8. Curvas de sobrevivência (%) de *M. amazonicum*, camarão dulcícola diádromo/hololimnético, submetido às salinidades de 16 (●), 22 (○), 25 (▼) e 28 (Δ) ‰ durante 120 h (n = 8, cada). O tempo 0 h corresponde à condição controle em água doce (n=8). A análise probit estima 50% de sobrevivência em 25 ‰S (LSS_{50}) após 120 h.

Para *M. potiuna* a sobrevivência foi de 62,5% em salinidade de 22 ‰, 50% em 25 ‰, 25% em 28 ‰ e não houve sobrevivência em 31 ‰S (Fig. 9). O valor calculado a partir da análise *Probit* correspondente à LSS_{50} foi de 24 ‰S e a salinidade hiper-osmótica experimental foi de 19 ‰ (80% da LSS_{50}).

Figura 9. Curvas de sobrevivência (%) de *M. potiuna*, camarão dulcícola hololimnético, submetido às salinidades de 22 (●), 25 (○), 28 (▼) e 31 (△) ‰ durante 120 h (n = 8, cada). O tempo 0 h corresponde à condição controle em água doce (n=8). A análise probit estima 50% de sobrevivência em 24 ‰S (LSS_{50}) após 120 h.

A sobrevivência (%) de *M. brasiliense* observada durante 120 h de exposição foi de 83,3% em salinidade de 19 ‰, 66,67% em 22 ‰, 33,3% em 25 ‰, e 0% em 27 ‰ (Fig. 10). O valor calculado a partir da análise *Probit* correspondente à LSS_{50} foi de 24,7 ‰S. A partir destes valores estabeleceu-se a salinidade hiper-osmótica experimental de 20 ‰, correspondente a 80% da LSS_{50} .

Figura 10. Curvas de sobrevivência (%) de *M. brasiliense*, camarão dulcícola hololimnético, submetido às salinidades de 19 (●), 22 (○), 25 (▼) e 27 (△) ‰ durante 120 h (n = 8, cada). O tempo 0 h corresponde à condição controle em água doce (n=8). A análise probit estima 50% de sobrevivência em 24,7 ‰S (LSS_{50}) após 120 h.

P. northropi, representante marinho, seguido de *P. pandaliformis*, estuarino, apresentaram os maiores limites letais de tolerância ao aumento de salinidade, 43,1 e 39,7 ‰S respectivamente. Dentre os *Macrobrachium*, *M. acanthurus* e *M. olfersi* foram mais tolerantes à salinidade superior: 31,4 e 28 ‰, respectivamente. A espécie diádroma, amostrada a partir de uma população continental, *M. amazonicum*, e as espécies hololimnéticas *M. potiuna* e *M. brasiliense* apresentaram valores semelhantes de tolerância à salinidade superior, 24,7, 24,5 e 24 ‰S, respectivamente.

4.2 Osmolalidade e $[Cl^-]$ da hemolinfa, e conteúdo hídrico muscular

A osmolalidade da hemolinfa de *P. northropi* foi hiper-regulada ($619 \pm 21,8$ mOsm/kg H_2O) na condição controle (18 ‰S ~ 540 mOsm/kg H_2O , já que 1 ‰S ~ 30 mOsm/kg H_2O). Após 24 h e 120 h na salinidade experimental de 35 ‰S (~ 1050 mOsm/kg H_2O) a osmolalidade da hemolinfa passou a ser fortemente hipo-regulada ($695 \pm 32,7$ e $624 \pm 15,3$ mOsm/kg H_2O , respectivamente), não havendo diferença significativa entre os grupos. A concentração de Cl^- da hemolinfa foi de 193 ± 12 mM na condição controle e manteve-se inalterada e hipo-regulada após 24 h (219 ± 20 mM) e 120 h ($237 \pm 7,9$ mM) de exposição à 35 ‰S (~ 560 mM Cl^- ; tal que 1 ‰ ~ 16 mM Cl^-). A única alteração observada foi o aumento do conteúdo hídrico muscular em 120 h (77,9%) relativo ao controle (76,4%) e a 24 h (76,45%) (Fig. 11).

Figura 11. Osmolalidade (mOsm/kg H_2O) e concentração de cloreto (mM) da hemolinfa, e conteúdo hídrico muscular (%) de *P. northropi* nas condições controle (0 horas, 18 ‰S, ~ 540 mOsm/kg H_2O e ~ 288 mM Cl^-) ($n = 6-9$) e experimental (indicado pelas setas no eixo a direita: Osm_{Ex} 35 ‰S; ~ 1050 mOsm/kg H_2O e $Cl^-_{Ex} \sim 560$ mM Cl^-) (correspondente à 80% da LSS_{50}) durante 24 e 120 h ($n = 7-10$, cada). Dados da osmolalidade e $[Cl^-]$ da hemolinfa são expressos como a média $\pm$ erro padrão da média, e teor hídrico como a média da porcentagem. #significativamente diferente de ambos os grupos anteriores.

P. pandaliformis mantém a osmolalidade da hemolinfa na condição controle (17 ‰S) ($520 \pm 2,8$ mOsm/kg H_2O) muito próxima a osmolalidade do meio externo (~ 510 mOsm/kg H_2O). Quando em 32 ‰S após 24 h a osmolalidade da hemolinfa aumentou ($585 \pm 20,3$ mOsm/kg H_2O) em relação ao controle e reduziu após 120 h ($559 \pm 7,8$ mOsm/kg H_2O), embora permaneceu hipo-regulada nesta condição (32 ‰S ~ 960 mOsm/kg H_2O). O aumento da osmolalidade da hemolinfa foi acompanhado pela redução do conteúdo hídrico muscular em 24 h (75,1%) e aumento em 120 h (79,4%) relativos ao controle (77,9%). A concentração de cloreto se manteve inalterada e hipo-regulada em todas as condições (controle: 240 ± 15 mM; 24 h: 264 ± 11 mM; 120 h: 251 ± 5 mM) (Fig. 12).

Figura 12. Osmolalidade (mOsm/kg H_2O) e concentração de cloreto (mM) da hemolinfa, e conteúdo hídrico muscular (%) de *P. pandaliformis* nas condições controle (0 horas, 17 ‰S, ~ 510 mOsm/kg H_2O e ~ 272 mM Cl^-) ($n = 8$) e 32 ‰S (indicado pelas setas no eixo a direita: $Osm_{Ex} \sim 960$ mOsm/kg H_2O e $Cl^-_{Ex} \sim 512$ mM Cl^-) (correspondente à 80% da LSS_{50}) durante 24 e 120 h ($n = 9$, cada). Dados da osmolalidade e $[Cl^-]$ da hemolinfa são expressos como a média $\pm$ erro padrão da média, e teor hídrico como a média da porcentagem. *significativamente diferente do grupo imediatamente anterior. #significativamente diferente de ambos os grupos anteriores.

Em *M. acanthurus* foi observado aumento na osmolalidade da hemolinfa após 24 h ($616 \pm 18,3$ mOsm/kg H₂O) e 120 h (593 ± 30 mOsm/kg H₂O) de exposição à 25 ‰S quando comparado ao controle em água doce ($420 \pm 14,6$ mOsm/kg H₂O). [Cl⁻] da hemolinfa aumentou após 24 h ($271 \pm 5,6$ mM) quando comparado ao controle ($138 \pm 12,8$ mM) e reduziu após 120 h ($183 \pm 15,8$ mM). A osmolalidade e [Cl⁻] da hemolinfa mantiveram-se abaixo da concentração do meio experimental nos dois tempos (24 e 120 h) (25 ‰S ~750 mOsm/kg H₂O; e ~400 mM Cl⁻). O conteúdo hídrico muscular foi reduzido após 24 h (74,4%), mas retornou para próximo dos valores do controle (75,7%) após 120 h (76,2%) (Fig. 13).

Figura 13. Osmolalidade (mOsm/kg H₂O) e concentração de cloreto (mM) da hemolinfa, e conteúdo hídrico muscular (%) de *M. acanthurus* nas condições controle (0 horas, água doce) (n=8) e 25 ‰S (indicado pelas setas no eixo a direita: Osm_{Ex} ~750 mOsm/kg H₂O e Cl⁻_{Ex} 400 mM Cl⁻) (correspondente à 80% da LSS₅₀) durante 24 e 120 horas (n = 8, cada). Dados da osmolalidade e [Cl⁻] da hemolinfa são expressos como a média ± erro padrão da média, e teor hídrico como a média da porcentagem. *significativamente diferente do grupo imediatamente anterior. #significativamente diferente de ambos os grupos anteriores.

Em *M. olfersi* foi observado aumento na osmolalidade da hemolinfa após 24 h ($648 \pm 11,6$ mOsm/kg H₂O) e 120 h ($681 \pm 6,3$ mOsm/kg H₂O) de exposição à 22 ‰S quando comparado ao controle em água doce ($451 \pm 16,5$ mOsm/kg H₂O). O mesmo foi encontrado para a [Cl⁻] da hemolinfa em 24 h ($256 \pm 7,2$ mM) e em 120 h ($261 \pm 17,8$ mM) quando comparado ao controle ($155 \pm 6,8$ mM). A [Cl⁻] foi hipo-regulada nas duas condições experimentais (24 e 120 h) (22 ‰S ~352 mM Cl⁻). A osmolalidade da hemolinfa foi hipo-regulada apenas em 24 h (22 ‰S ~660 mOsm/kg H₂O). O conteúdo hídrico muscular foi reduzido após 24 h (73,6%), mas retornou para valor próximo a condição controle (76,9%) após 120 h (75,2%) (Fig. 14).

Figura 14. Osmolalidade (mOsm/kg H₂O) e concentração de cloreto (mM) da hemolinfa, e conteúdo hídrico muscular (%) de *M. olfersi* nas condições controle (0 horas, água doce) (n=8) e 22 ‰S (indicado pelas setas no eixo a direita: Osm_{Ex} ~660 mOsm/kg H₂O e Cl⁻_{Ex} ~352 mM Cl⁻) (correspondente à 80% da LSS₅₀) durante 24 e 120 h (n = 8, cada). Dados da osmolalidade e [Cl⁻] da hemolinfa são expressos como a média ± erro padrão da média, e teor hídrico como a média da porcentagem. *significativamente diferente do grupo imediatamente anterior. #significativamente diferente de ambos os grupos anteriores.

A osmolalidade da hemolinfa de *M. amazonicum* aumentou em 24 ($566 \pm 28,8$ mOsm/kg H₂O) e 120 h ($599 \pm 18,6$ mOsm/kg H₂O) de exposição à 20 ‰S quando comparado à condição controle em água doce ($435 \pm 8,2$ mOsm/kg H₂O). A concentração de Cl⁻ da hemolinfa aumentou após 24 h ($232 \pm 9,9$ mM) e 120 h ($220 \pm 23,2$ mM) em relação ao controle ($157 \pm 2,2$ mM). O conteúdo hídrico muscular reduziu após 24 h (74,2%) e retornou a valores próximos ao controle (77,9%) após 120 h (76,8%). (Fig. 15).

Figura 15. Osmolalidade (mOsm/kg H₂O) e concentração de cloreto (mM) da hemolinfa, e conteúdo hídrico muscular (%) de *M. amazonicum* nas condições controle (0 horas, água doce) (n = 8) e 20 ‰S (indicado pelas setas no eixo a direita: Osm_{Ex} ~600 mOsm/kg H₂O e Cl_{Ex} ~320 mM Cl⁻) (correspondente à 80% da LSS₅₀) durante 24 e 120 h (n = 8, cada). Dados da osmolalidade e [Cl⁻] da hemolinfa são expressos como a média ± erro padrão da média, e teor hídrico como a média da porcentagem. *significativamente diferente do grupo imediatamente anterior.

A osmolalidade da hemolinfa de *M. potiuna* aumentou em 24 ($511 \pm 17,8$ mOsm/kg H_2O) e 120 h ($605 \pm 15,3$ mOsm/kg H_2O) quando comparado ao controle ($436,5 \pm 1,9$ mOsm/kg H_2O), assim como a concentração de Cl^- da hemolinfa em 24 ($240 \pm 6,1$ mM) e 120 h ($269 \pm 9,5$ mM) contrastada ao controle ($166 \pm 11,5$ mM). Mesmo com os aumentos observados na concentração de $[Cl^-]$ da hemolinfa em 120 h (19 % ~ 304 mM) e a perda da capacidade hipo-regulatória da osmolalidade (19 %S ~ 570 mOsm/kg H_2O), o conteúdo hídrico muscular manteve-se inalterado em ambas as condições experimentais (Fig. 16).

Figura 16. Osmolalidade (mOsm/kg H_2O) e concentração de cloreto (mM) da hemolinfa, e conteúdo hídrico muscular (%) de *M. potiuna* nas condições controle (0 horas, água doce) ($n=8$) e 19 ‰S (indicado pelas setas no eixo a direita: Osm_{Ex} ~570 mOsm/kg H_2O e Cl^-_{Ex} 304 mM Cl^-) (correspondente à 80% da LSS_{50}) durante 24 e 120 h ($n=8$, cada). Dados da osmolalidade e $[Cl^-]$ da hemolinfa são expressos como a média $\pm$ erro padrão da média, e teor hídrico como a média da porcentagem. *significativamente diferente do grupo imediatamente anterior. #significativamente diferente de ambos os grupos anteriores.

A osmolalidade da hemolinfa de *M. brasiliense* aumentou em 24 ($563 \pm 6,7$ mOsm/kg H_2O) e 120 h ($593 \pm 27,8$ mOsm/kg H_2O) quando comparado ao controle ($361 \pm 15,7$ mOsm/kg H_2O), assim como a concentração de Cl^- da hemolinfa em 24 ($250 \pm 4,7$ mM) e 120 h (271 ± 6 mM) contrastada ao controle (139 ± 4 mM). Houve perda da capacidade hiporregulatória da osmolalidade (20 ‰ ~600 mOsm/kg H_2O). O conteúdo hídrico muscular foi reduzido após 24 (76,4 %) e 120 h (76,7 %) quando comparado ao controle (78,6%) (Fig. 17).

Figura 17. Osmolalidade (mOsm/kg H_2O) e concentração de cloreto (mM) da hemolinfa, e conteúdo hídrico muscular (%) de *M. brasiliense* nas condições controle (0 horas, água doce) (n = 8) e 20 ‰S (indicado pelas setas no eixo a direita: Osm_{Ex} ~600 mOsm/kg H_2O e Cl^-_{Ex} ~320 mM Cl^-) (correspondente a 80% da LSS₅₀) durante 24 e 120 horas (n = 8, cada). Dados da osmolalidade e [Cl^-] da hemolinfa são expressos como a média ± erro padrão da média, e teor hídrico como a média da porcentagem. *significativamente diferente do grupo imediatamente anterior. #significativamente diferente de ambos os grupos anteriores.

As espécies de *Palaemon* hipo-regularam fortemente a osmolalidade e a concentração de Cl^- da hemolinfa quando em salinidade elevada por 24 e 120 h. As espécies de *Macrobrachium*, embora excelentes hiper-reguladores, não hipo-regularam a osmolalidade da hemolinfa após 120 h de exposição à salinidade elevada, exceto *M. acanthurus* que manteve a osmolalidade da hemolinfa abaixo da osmolalidade do meio externo em todos os tempos experimentais. A curto prazo, 24 horas, apenas *M. olfersi* manteve a osmolalidade da hemolinfa próxima à osmolalidade do meio. Apesar da perda da capacidade hiposmorregulatória da hemolinfa, as espécies de *Macrobrachium* demonstraram-se eficientes hipo-reguladores da concentração de Cl^- da hemolinfa em todos os tempos experimentais em salinidade elevada. A espécie *M. potiuna* foi a única que não teve alterações no conteúdo hídrico muscular após submetida à curto e longo prazo ao aumento da salinidade (Tabela 4).

Tabela 1. Dados compilados da LSS₅₀ (‰), salinidade experimental de 80% do valor da LSS₅₀ (‰), osmolalidade (mOsm/kg H₂O) e concentração de cloreto (mM) da hemolinfa, e conteúdo hídrico muscular (%) dos camarões palemonídeos utilizadas neste estudo. Controle de 5 dias em 18 ‰S *P. northropi*, 17 ‰S *P. pandaliformis*, água doce *Macrobrachium*; e 24 e 120 horas nas respectivas salinidades experimentais. A estatística aplicada corresponde a análises intraespecíficas entre tempos de exposição. *significativamente diferente do grupo imediatamente anterior. #significativamente diferente de ambos os grupos anteriores.

Espécie	LSS ₅₀ (‰)	Salinidade Experimental (‰)	Osmolalidade (mOsm/kg H ₂ O)			[Cl ⁻] da hemolinfa (mM)			Conteúdo hídrico muscular (%)		
			Controle	24 h	120 h	Controle	24 h	120 h	Controle	24 h	120 h
<i>P. northropi</i>	43,1	35	619 ± 22	695 ± 33	624 ± 15	193 ± 12	219 ± 20	237 ± 8	76,4	76,4	77,9 [#]
<i>P. pandaliformis</i>	39,7	32	520 ± 3	585 ± 20 *	559 ± 8	240 ± 15	264 ± 11	251 ± 5	77,9	75,1 *	79,4 [#]
<i>M. acanthurus</i>	31,4	25	420 ± 15	616 ± 18 *	593 ± 30	138 ± 13	271 ± 6 *	183 ± 16 [#]	75,8	74,4 *	76,3 *
<i>M. olfersi</i>	28	22	451 ± 17	648 ± 12 *	681 ± 6 [#]	155 ± 7	256 ± 7 *	261 ± 18	77,9	74,2 *	75,5 *
<i>M. amazonicum</i>	24,5	20	435 ± 8	566 ± 29 *	599 ± 19	157 ± 2	232 ± 10 *	220 ± 23	77,9	74,2 *	76,8*
<i>M. potiuna</i>	24	19	437 ± 2	511 ± 18 *	605 ± 15 [#]	166 ± 12	240 ± 6 *	269 ± 10 [#]	78,2	77,0	77,9
<i>M. brasiliense</i>	24,7	20	361 ± 16	563 ± 7 *	593 ± 29	139 ± 4	249 ± 5 *	271 ± 6 [#]	78,6	76,4 *	76,7

4.3 Análise quantitativa da expressão de RNAm do simportador Na^+ , K^+ , 2Cl^- das brânquias

A expressão relativa de RNAm do NKCC nas brânquias não foi alterada pelo aumento da salinidade nas espécies de palemonídeos testadas (Figs. 18 a 24). Embora algumas espécies apresentaram uma tendência de aumento ou redução da expressão em alguns dos tempos experimentais, p. ex. o aparente aumento em *M. amazonicum* (Fig. 22) e *M. potiuna* (Fig. 23) em 120 h de ~1,4 vezes relativo ao controle em água doce, essas diferenças não foram significativas estatisticamente ($p = 0,338$ *M. amazonicum*; $p = 0,267$ *M. potiuna*).

A ausência de alteração na síntese de RNAm do gene NKCC pode estar associada a níveis constitutivos suficientemente altos ou a ativação por eventos pós-transcricionais, como por RNAs de interferência não codificantes.

Figura 18. Expressão relativa de RNAm do simportador NKCC das brânquias do camarão marinho *P. northropi* nas condições controle (0 horas, 18 ‰) e quando exposto a 35 ‰ após 24 e 120 horas (média $\pm$ erro padrão; $n = 5-6$). Os valores da expressão foram normalizados pela expressão de RNAm da proteína ribossomal L10 nas mesmas amostras e calibrados pelo grupo controle (0 horas, água doce). Não houve diferença estatística entre os grupos.

Figura 19. Expressão relativa de RNAm do simportador NKCC do camarão marinho *P. pandaliformis* nas condições controle (0 horas, 17 ‰S) e quando exposto a 32 ‰S após 24 e 120 horas (média ± erro padrão; n = 5-6). Os valores da expressão foram normalizados pela expressão de RNAm da proteína ribossomal L10 nas mesmas amostras e calibrados pelo grupo controle (0 horas, água doce). Não houve diferença estatística entre os grupos.

Figura 20. Expressão relativa de RNAm do simportador NKCC do camarão dulcícola *M. acanthurus* nas condições controle (0 horas, água doce) e quando exposto a 25 ‰S após 24 e 120 horas (média ± erro padrão; n = 5). Os valores da expressão foram normalizados pela expressão de RNAm da proteína ribossomal L10 nas mesmas amostras e calibrados pelo grupo controle (0 horas, água doce). Não houve diferença estatística entre os grupos.

Figura 21. Expressão relativa de RNAm do simportador NKCC do camarão dulcícola *M. olfersi* nas condições controle (0 horas, água doce) e quando exposto a 22 ‰S após 24 e 120 horas (média ± erro padrão; n = 5-8). Os valores da expressão foram normalizados pela expressão de RNAm da proteína ribossomal L10 nas mesmas amostras e calibrados pelo grupo controle (0 horas, água doce). Não houve diferença estatística entre os grupos.

Figura 22. Expressão relativa de RNAm do simportador NKCC do camarão dulcícola *M. amazonicum* nas condições controle (0 horas, água doce) e quando exposto a 20 ‰S após 24 e 120 horas (média ± erro padrão; n = 4-8). Os valores da expressão foram normalizados pela expressão de RNAm da proteína ribossomal L10 nas mesmas amostras e calibrados pelo grupo controle (0 horas, água doce). Não houve diferença estatística entre os grupos.

Figura 23. Expressão relativa de RNAm do simportador NKCC do camarão dulcícola *M. potiuna* nas condições controle (0 horas, água doce) e quando exposto a 19 ‰S após 24 e 120 horas (média $\pm$ erro padrão; $n = 5-8$). Os valores da expressão foram normalizados pela expressão de RNAm da proteína ribossomal L10 nas mesmas amostras e calibrados pelo grupo controle (0 horas, água doce). Não houve diferença estatística entre os grupos.

Figura 24. Expressão relativa de RNAm do simportador NKCC do camarão dulcícola *M. brasiliense* nas condições controle (0 horas, água doce) e quando exposto a 20 ‰S após 24 e 120 horas (média $\pm$ erro padrão; $n = 5$). Os valores da expressão foram normalizados pela expressão de RNAm da proteína ribossomal L10 nas mesmas amostras e calibrados pelo grupo controle (0 horas, água doce). Não houve diferença estatística entre os grupos.

4.4 Expressão proteica do simportador Na⁺, K⁺, 2Cl⁻ nas brânquias

As espécies da família Palaemonidae apresentaram diferentes respostas quanto a expressão proteica do cotransportador NKCC frente ao aumento de salinidade. Após serem submetidas a curto (24 h) e a longo (120 h) prazo, não houve alteração na expressão do NKCC nas espécies do gênero *Palaemon* e na espécie dulcícola hololimnética *M. potiuna* (Figs. 25, 26 e 30). Em todas as outras espécies do gênero *Macrobrachium* houve aumento da expressão da proteína NKCC frente aumento da salinidade. Em *M. acanthurus* e *M. olfersi* o aumento foi observado após 120 h de exposição a 25 e 22 ‰, respectivamente (*M. acanthurus* ~2,2 vezes e *M. olfersi* ~1,72 vezes) comparado ao controle e a 24 h (aumento de ~1,8 vezes em *M. acanthurus* e ~1,9 vezes em *M. olfersi*) (Figs. 27 e 28). Em *M. brasiliense* o aumento foi observado imediatamente após 24 h de exposição a 20 ‰ (1,6 vezes comparado ao controle), mantendo-se superior em 120 h (2,2 vezes relativo ao controle) (Fig. 31). *M. amazonicum* apresentou aumento da expressão de 2,14 vezes após 120 h de exposição a 20 ‰ apenas relativo ao controle (Fig. 29).

O aumento da síntese proteica branquial do simportador NKCC quando submetidas ao aumento de salinidade após 120 h deu-se apenas nas espécies dulcícolas que não confrontam o aumento da salinidade no meio externo em seu habitat natural. As espécies de *Palaemon* que enfrentam, em condições naturais, variações diárias e sazonais de salinidade no meio demonstraram inalteração na síntese proteica branquial do NKCC. Além disso, tal aumento nas espécies mencionadas não está associado ao aumento da expressão gênica do simportador (Tabela 5).

Figura 25. Título do simportador NKCC (média $\pm$ erro padrão, $n = 8$) nas brânquias do camarão marinho *P. northropi* nas condições controle (0 horas, 18 ‰) e quando exposto a 35 ‰ após 24 e 120 horas. A expressão proteica é dada como a razão entre a proteína alvo e a β -actina, uma proteína de referência, na mesma amostra, e calibrada pelo grupo controle (Tempo = 0). Não houve diferença significativa entre os grupos.

Figura 26. Título do simportador NKCC (média $\pm$ erro padrão, $n = 8$) nas brânquias do camarão estuarino *P. pandaliformis* nas condições controle (0 horas, 17 ‰) e quando exposto a 32 ‰ após 24 e 120 horas. A expressão proteica é dada como a razão entre a proteína alvo e a β -actina, uma proteína de referência, na mesma amostra, e calibrada pelo grupo controle (Tempo = 0). Não houve diferença significativa entre os grupos.

Figura 27. Título do simportador NKCC (média $\pm$ erro padrão, $n = 8$) nas brânquias do camarão dulcícola *M. acanthurus* nas condições controle (0 horas, água doce) e quando exposto a 25 ‰S após 24 e 120 horas. A expressão proteica é dada como a razão entre a proteína alvo e a β -actina, uma proteína de referência, na mesma amostra, e calibrada pelo grupo controle (Tempo = 0). #significativamente diferente de ambos os grupos anteriores.

Figura 28. Título do simportador NKCC (média $\pm$ erro padrão, $n = 8$) nas brânquias do camarão dulcícola *M. olfersi* nas condições controle (0 horas, água doce) e quando exposto a 22 ‰S após 24 e 120 horas. A expressão proteica é dada como a razão entre a proteína alvo e a β -actina, uma proteína de referência, na mesma amostra, e calibrada pelo grupo controle (Tempo = 0). #significativamente diferente de ambos os grupos anteriores.

Figura 29. Título do simportador NKCC (média ± erro padrão, n = 8) nas brânquias do camarão dulcícola *M. amazonicum* nas condições controle (0 horas, água doce) e quando exposto a 20 ‰S após 24 e 120 horas. A expressão proteica é dada como a razão entre a proteína alvo e a β -actina, uma proteína de referência, na mesma amostra, e calibrada pelo grupo controle (Tempo = 0). †significativamente diferente do grupo controle.

Figura 30. Título do simportador NKCC (média ± erro padrão, n = 8) nas brânquias do camarão dulcícola *M. potiuna* nas condições controle (0 horas, água doce) e quando exposto a 19 ‰S após 24 e 120 horas. A expressão proteica é dada como a razão entre a proteína alvo e a β -actina, uma proteína de referência, na mesma amostra, e calibrada pelo grupo controle (Tempo = 0). Não houve diferença estatística entre os grupos.

Figura 31. Título do simportador NKCC (média $\pm$ erro padrão, $n = 8$) nas brânquias do camarão dulcícola *M. brasiliense* nas condições controle (0 horas, água doce) e quando exposto a 20 ‰S após 24 e 120 horas. A expressão proteica é dada como a razão entre a proteína alvo e a β -actina, uma proteína de referência, na mesma amostra, e calibrada pelo grupo controle (Tempo = 0). *significativamente diferente do grupo controle.

Tabela 2. Dados da salinidade experimental (‰), expressão relativa gênica e proteica do simportador NKCC das sete espécies de camarões palemonídeos utilizadas neste estudo. Os valores foram normalizados pelo gene e proteína constitutiva, e calibrados em relação ao controle para conduzir a comparação estatística. Condições controle (5 dias em 18 ‰S para *P. northropi*, 17 ‰S para *P. pandaliformis*, água doce para as espécies do gênero *Macrobrachium*) e experimental (24 e 120 horas nas respectivas salinidades experimentais). *significativamente diferente do grupo imediatamente anterior. #significativamente diferente de ambos os grupos anteriores. † significativamente diferente do grupo controle.

Espécie	Salinidade Experimental (‰)	Expressão gênica relativa do NKCC			Expressão Proteica relativa do NKCC		
		Controle	24 h	120 h	Controle	24 h	120 h
<i>P. northropi</i>	35	1,0 ± 0,1	0,9 ± 0,1	1,1 ± 0,1	1 ± 0,1	1,2 ± 0,1	1,0 ± 0,1
<i>P. pandaliformis</i>	32	1,1 ± 0,3	0,9 ± 0,1	0,8 ± 0,1	1 ± 0,1	1,2 ± 0,3	1,0 ± 0,3
<i>M. acanthurus</i>	25	1,1 ± 0,2	0,9 ± 0,1	0,9 ± 0,2	1 ± 0,1	1,2 ± 0,3	2,2 ± 0,4 #
<i>M. olfersi</i>	22	1,0 ± 0,1	1,2 ± 0,2	0,8 ± 0,1	1 ± 0,1	0,9 ± 0,2	1,7 ± 0,3 #
<i>M. amazonicum</i>	20	1,1 ± 0,2	1,2 ± 0,2	1,5 ± 0,2	1 ± 0,2	1,7 ± 0,2	2,2 ± 0,5 †
<i>M. potiuna</i>	19	1,1 ± 0,1	1,4 ± 0,3	1,5 ± 0,2	1 ± 0,1	1,2 ± 0,3	1,5 ± 0,3
<i>M. brasiliense</i>	20	1,0 ± 0,1	1,1 ± 0,1	0,7 ± 0,1	1 ± 0,1	1,6 ± 0,2 *	1,9 ± 0,3

4.5 Imunolocalização do simportador Na^+ , K^+ , 2Cl^- nas brânquias

O epitélio das brânquias é composto por células pilares e células do septo. As células pilares dispõem de uma porção apical com extensas franjas e evaginações imediatamente abaixo de uma fina cutícula. As células pilares estão unidas umas às outras por meio de junções fortes, o que caracteriza o epitélio de baixa permeabilidade (tipo “*tight epithelium*”) ou de alta resistência. As franjas inferiores e a lateral das células pilares estão em contato com o espaço da hemolinfa. Nessa região houve intensa marcação do NKCC, o que evidencia um local de transporte (Figs. 32 a 38). O espaço da hemolinfa permeia a porção inferior da célula pilar e também a célula do septo intralamelar, caracterizando compartimentos ausentes de marcação nas imagens (indicado na Fig. 32D).

A base da célula pilar está estruturalmente associada à célula do septo por junções intercelulares. Nesta área houve intensa marcação do NKCC, logo abaixo do núcleo da célula pilar (evidenciado em azul). Em destaque a intensa marcação exemplificada na imagem com aumento de 4 vezes referente a condição experimental de 19 ‰ por 120 h em *M. potiuna* (Figs. 37 D).

As células do septo intralamelar dividem a lamela horizontalmente em dois compartimentos simétricos. A membrana dessas células contém extensas e profundas invaginações e estão associadas a muitas mitocôndrias, o que caracteriza um epitélio de transporte. O NKCC foi localizado nas células do septo em todas as espécies e em todas as condições amostradas (controle e experimental por 24 e 120 h) (Figs. 32 a 38).

Embora não quantificado, não foi possível identificar visualmente alteração no padrão de localização do NKCC quando em exposição ao aumento da salinidade entre os diferentes tempos experimentais e o controle. Em ambas as condições o NKCC demonstrou-se presente nas células do septo e no corpo e parte inferior da franja das células pilares (Figs. 32 a 38).

Figura 32. Imunolocalização do simportador NKCC nas lamelas branquiais do camarão marinho *P. northropi* nas condições (A) controle (0 horas, 18 ‰S) (n = 4) e quando exposto a 35 ‰S após (B) e 24 ou (C) 120 horas (n = 4, cada); em (D) a imagem aumentada em 4 x na condição 35 ‰S por 120 h. As setas brancas indicam a presença do NKCC (em verde, anti-mouse secundário conjugado com FITC) no corpo das células pilares (CP) e nas células do septo intralamelar (CS), aponta para o canal marginal (CM) e para o espaço da hemolinfa (H). O núcleo das células aparece em azul (DAPI). Barra de escala = 20 μ m.

Figura 33. Imunolocalização do simportador NKCC nas lamelas branquiais do camarão estuarino *P. pandaliformis* nas condições (A) controle (0 horas, 17 ‰S) ($n = 4$) e quando exposto a 32 ‰S após (B) e 24 ou (C) 120 horas ($n = 4$, cada); em (D) a imagem aumentada em 4 x na condição 32 ‰S por 24 h. As setas brancas indicam a presença do NKCC (em verde, anti-mouse secundário conjugado com FITC) no corpo das células pilares (CP) e nas células do septo intralamelar (CS). O núcleo das células aparece em azul (DAPI). Barra de escala = 20 μm .

Figura 34. Imunolocalização do simportador NKCC nas lamelas branquiais do camarão dulcícola *M. acanthurus* nas condições (A) controle (0 horas, água doce) ($n = 4$) e quando exposto a 25 ‰S após (B) e 24 ou (C) 120 horas ($n = 4$, cada); em (D) a imagem aumentada em 4 x na condição 25 ‰S por 24 h. As setas brancas indicam a presença do NKCC (em verde, anti-mouse secundário conjugado com FITC) no corpo das células pilares (CP) e nas células do septo intralamelar (CS). O núcleo das células aparece em azul (DAPI). Barra de escala = 20 μm .

Figura 35. Imunolocalização do simportador NKCC nas lamelas branquiais do camarão dulcícola *M. olfersi* nas condições (A) controle (0 horas, água doce) (n = 4) e quando exposto a 22 ‰S após (B) e 24 ou (C) 120 horas (n = 4, cada); em (D) a imagem aumentada em 4 x na condição 22 ‰S por 120 h. As setas brancas indicam a presença do NKCC (em verde, anti-mouse secundário conjugado com FITC) no corpo das células pilares (CP) e nas células do septo intralamelar (CS). O núcleo das células aparece em azul (DAPI). Barra de escala = 20 μ m.

Figura 36. Imunolocalização do simportador NKCC nas lamelas branquiais do camarão dulcícola *M. amazonicum* nas condições (A) controle (0 horas, água doce) ($n = 4$) e quando exposto a 20 ‰S após (B) e 24 ou (C) 120 horas ($n = 4$, cada); em (D) a imagem aumentada em 4 x na condição 20 ‰S por 24 h. As setas brancas indicam a presença do NKCC (em verde, anti-mouse secundário conjugado com FITC) no corpo das células pilares (CP) e nas células do septo intralamelar (CS). O núcleo das células aparece em azul (DAPI). Barra de escala = 20 μm .

Figura 37. Imunolocalização do simportador NKCC nas lamelas branquiais do camarão dulcícola *M. potiuna* nas condições (A) controle (0 horas, água doce) ($n = 4$) e quando exposto a 19 ‰S após (B) e 24 ou (C) 120 horas ($n = 4$, cada); em (D) a imagem aumentada em 4 x na condição 19 ‰S por 120 h. As setas brancas indicam a presença do NKCC (em verde, anti-mouse secundário conjugado com FITC) no corpo das células pilares (CP) e nas células do septo intralamelar (CS). O núcleo das células aparece em azul (DAPI). Barra de escala = 20 μm .

Figura 38. Imunolocalização do simportador NKCC nas lamelas branquiais do camarão dulcícola *M. brasiliense* nas condições (A) controle (0 horas, água doce) ($n = 4$) e quando exposto a 22 ‰S após (B) e 24 ou (C) 120 horas ($n = 4$, cada); em (D) a imagem aumentada em 4 x na condição 20 ‰S por 120 h. As setas brancas indicam a presença do NKCC (em verde, anti-mouse secundário conjugado com FITC) no corpo das células pilares (CP) e nas células do septo intralamelar (CS). O núcleo das células aparece em azul (DAPI). Barra de escala = 20 μm .

4.6 Análises comparativas filogenéticas

4.6.1 Sinal filogenético: Índice I de Moran

A comparação entre a variação fenotípica entre espécies revela padrões na evolução de um grupo. A tolerância à salinidade e os diferentes mecanismos osmorregulatórios exibidos por diferentes espécies, por exemplo, vem sendo testados sob o prisma da evolução da ocupação de nichos osmóticos distintos pelos crustáceos. Para isso, é crucial considerar o efeito da história filogenética do grupo na variação do caráter avaliado. O uso da estruturação filogenética nas análises comparativas modernas permite inferir com maior convicção que a variação dos caracteres representa possíveis modificações ou adaptações das espécies à dada condição.

A significância positiva encontrada no cálculo do índice I de Moran indica que as similaridades, para cada parâmetro fisiológico avaliado, dos traços compartilhados entre espécies são devidas predominantemente à proximidade filogenética entre as elas. O sinal filogenético calculado demonstrou-se positivo e significativo para a LSS₅₀ ($I = 0,97$; $P = 0,001$) (Fig. 39), para a osmolalidade da hemolinfa na condição controle ($I = 0,78$; $P = 0,03$) (Fig. 40), para a concentração de Cl^- na hemolinfa na condição controle ($I = 0,71$; $P = 0,03$) (Fig. 41) e experimental após 120 h ($I = 0,78$; $P = 0,01$), além da expressão proteica branquial do NKCC nas espécies em salinidade superior por 120 h ($I = 0,87$, $P = 0,02$) (Fig. 42).

Houve sinal filogenético negativo com tendência de significância ($I = -0,91$; $P = 0,06$) para a concentração de cloreto na hemolinfa em 24 h, indicando que as dissimilaridades encontradas entre as espécies se deve a estruturação filogenética, e deve ser avaliada com cautela devido ao número reduzido de espécies utilizados na amostragem filogenética.

Os demais parâmetros fisiológicos quantificados, a saber, osmolalidade da hemolinfa em salinidade superior por 24 e 120 h, conteúdo hídrico muscular e expressão gênica em todas as condições, e expressão proteica no controle e em salinidade superior por 24 h, não foram significativamente relacionados à filogenia ($I \rightarrow 0$; $P > 0,05$), e portanto, indicam que tais caracteres possivelmente evoluíram de maneira aleatória e independente entre as espécies, talvez dirigida por pressões ambientais relevantes, tal qual a salinidade do ambiente.

Figura 39. Reconstrução do parâmetro LSS₅₀ (Limite letal de salinidade superior) em espécies representantes da família Palaemonidae (clado modificado de Pereira, 1997). A análise demonstra a semelhança compartilhada por espécies estreitamente próximas (autocorrelação significativa obtida através do Índice I de Moran, $I = 0,97$; $P = 0,001$).

Figura 40. Reconstrução do parâmetro Osmolalidade da hemolinfa (mOsm/kgH₂O) em espécies representantes da família Palaemonidae (clado modificado de Pereira, 1997) na condição controle (18 ‰ em *P. northropi*, 17 ‰ em *P. pandaliformis*, e água doce em todas as espécies de *Macrobrachium*, tais salinidades estipuladas como controle são representativas das salinidades encontradas nos respectivos habitats das espécies amostradas). A análise mostra a semelhança compartilhada por espécies estreitamente próximas (autocorrelação significativa obtida através do Índice I de Moran, $I = 0,78$; $P = 0,03$).

Figura 41. Reconstrução do parâmetro concentração de Cl⁻ da hemolinfa (mM) em espécies representantes da família Palaemonidae (clado modificado de Pereira, 1997) na condição controle (18 ‰ em *P. northropi*, 17 ‰ em *P. pandaliformis*, e água doce em todos *Macrobrachium*, tais salinidades estipuladas como controle são representativas das salinidades encontradas nos respectivos habitats das espécies amostradas). A análise mostra a semelhança compartilhada por espécies estreitamente próximas (autocorrelação significativa obtida através do Índice I de Moran, $I = 0,71$; $P = 0,03$).

Figura 42. Reconstrução do parâmetro expressão proteica do NKCC em brânquias de representantes da família Palaemonidae (clado modificado de Pereira, 1997) em salinidade superior por 120 h (80% da LSS_{50}). A análise mostra a semelhança compartilhada por espécies estreitamente próximas (autocorrelação significativa obtida através do Índice I de Moran, $I = 0,87$, $P = 0,02$).

4.6.2 Análises de correlação evolutiva: análise de variância

Aplicou-se o modelo linear filogenético pGLS seguido de análise de variância hierárquica (pGLS ANOVA) a fim de se testar o potencial efeito da expressão gênica e proteica do simportador NKCC nas brânquias das diferentes espécies sob a regulação osmótica, particularmente de Cl^- da hemolinfa, considerando-se o efeito da filogenia em tais parâmetros.

Os valores da expressão gênica e proteica foram apenas normalizados pela expressão do gene (PRL10) ou proteína (actina) constitutiva em questão para título de comparação entre as espécies (Tabela 6).

Verificou-se uma correlação significativa entre a expressão gênica do NKCC e a concentração de Cl^- na hemolinfa apenas na condição controle (valor de $\alpha = 23,595$; $F =$

13,904; $p = 0,014$), e ausência de correlação quando em salinidade experimental ($p > 0,05$). A $[Cl^-]$ da hemolinfa não se demonstrou relacionada à expressão proteica do NKCC. Embora não significativo, presumivelmente pelo número reduzido de espécies consideradas neste estudo ($n = 7$), o efeito da expressão proteica sob a regulação osmótica da hemolinfa na condição controle será discutido com cautela ($\alpha = 0,373$; $F = 5,249$; $p = 0,071$). A osmolalidade da hemolinfa em salinidade elevada também não se demonstrou relacionada à expressão proteica do NKCC nos tempos correspondentes.

Não houve correlação significativa entre a expressão gênica e a expressão proteica em nenhuma condição.

Tabela 3. Valores da expressão gênica e proteica do simportador NKCC normalizados pela expressão do gene (PRL10) ou proteína (actina) constitutiva das brânquias das espécies de palemonídeos utilizados neste estudo para aplicação dos métodos comparados. Condições controle (5 dias em 18 ‰ para *P. northropi*, 17 ‰ para *P. pandaliformis*, água doce para as espécies do gênero *Macrobrachium*) e experimental (24 e 120 horas nas respectivas salinidades experimentais).

Espécie	Expressão Gênica do NKCC			Expressão Proteica do NKCC		
	Controle	24 h	120 h	Controle	24 h	120 h
<i>P. northropi</i>	0,04	0,03	0,04	0,93	1,11	0,88
<i>P. pandaliformis</i>	10,29	8,07	7,29	0,70	0,97	0,80
<i>M. acanthurus</i>	0,03	0,02	0,02	0,74	0,99	1,82
<i>M. olfersi</i>	0,04	0,05	0,03	0,84	0,74	1,45
<i>M. amazonicum</i>	0,02	0,02	0,02	0,65	1,09	1,41
<i>M. potiuna</i>	0,02	0,03	0,03	0,83	1,00	1,25
<i>M. brasiliense</i>	0,03	0,03	0,02	0,73	1,14	1,35

5 DISCUSSÃO

Os padrões osmorregulatórios que contribuíram para o sucesso da ocupação de nichos osmoticamente variados pelos camarões palemonídeos e a conservação da capacidade hiposmorregulatória por espécies dulcícolas foram investigados. A combinação de atributos fisiológicos com a história evolutiva compartilhada entre as espécies permitiu uma interpretação sobre o efeito da salinidade na evolução de possíveis mecanismos, como a expressão gênica e proteica do simportador Na^+ , K^+ , 2Cl^- , associados à manutenção da homeostase hidro-eletrolítica por representantes palemonídeos.

Em um estudo comparativo de padrões e processos fisiológicos deve-se considerar as diferentes janelas de tolerância, e.g. a variação de salinidade, das diferentes espécies amostradas (Faria et al. 2017). A integração entre a faixa máxima de tolerância à salinidade encontrada em laboratório e os processos osmorregulatórios, incorporados em um contexto filogenético, possibilita testar hipóteses do efeito da salinidade sobre tais parâmetros (McNamara e Faria 2012; McNamara et al. 2015). Esses estudos fisiológicos e moleculares comparativos fornecem a base para a reconstrução da história evolutiva da expressão gênica e proteica que sustentam a secreção de sal em camarões palemonídeos.

Ao estimar a sobrevivência de alguns dos representantes da família Palaemonidae frente ao desafio hiper-osmótico constatou-se que as espécies *P. northropi*, um camarão marinho de poça de maré, e *P. pandaliformis*, um camarão estuarino, apresentaram os maiores limites de tolerância à salinidade superior (LSS_{50}) de 43,1 e 39,7 ‰, respectivamente. O elevado grau de tolerância ao aumento de salinidade em *Palaemon* se estende para outras espécies que integram o gênero. *Palaemon ritteri*, por exemplo, um camarão marinho de poça de maré, apresenta LSS_{50} de 47,5 ‰ (Reynolds 1975) e *P. affinis*, encontrado em poças de

maré, manguezais e estuários, revelou sobrevivência acima de 75% em salinidade de 43 ‰ por 5 dias (Kirkpatrick e Jones 1985).

As espécies dulcícolas do gênero *Macrobrachium* diádromas coligadas em rios litorâneos, *M. acanthurus* e *M. olfersi*, mostraram valores intermediários de LSS_{50} , 31,4 e 28 ‰S, respectivamente. A população de *M. amazonicum* usada aqui, coletada em um riacho sem influência do aporte salobro, teve o valor da LSS_{50} muito próximo (24,5 ‰S) ao das espécies hololimnéticas *M. brasiliense* (24,7 ‰S) e *M. potiuna* (24 ‰S), ambas coletadas em rios continentais também sem influência do mar.

Dentre as espécies de *Macrobrachium*, gênero que reúne espécies majoritariamente dulcícolas, destaca-se *M. equidens*, um representante de ambiente salobro. O limite de tolerância ao aumento de salinidade em *M. equidens* é de cerca de 40 ‰S, quando aclimatado gradualmente à salinidade elevada (Denne 1968). Este valor é relativamente alto quando comparado ao valor da LSS_{50} de 25 ‰S exibido pela espécie dulcícola *M. australiense* aclimatada gradualmente ao aumento de salinidade (Denne 1968) e ao valor da LSS_{50} exibida pelas espécies de *Macrobrachium* tratadas neste estudo. O limite de tolerância a salinidade elevada, embora variado dentro do gênero, é preservado por espécies que não confrontam salinidades elevadas em qualquer fase do ciclo de vida, sugerindo que durante a irradiação adaptativa do grupo fixou-se algum grau de tolerância ao aumento de salinidade.

O efeito do aumento da salinidade sobre a sobrevivência estimada para camarões palemonídeos, interpretado em um contexto filogenético, sugere que o notável grau de tolerância ao aumento da salinidade exibida por espécies residentes de habitats salobro/marinho instáveis, acompanhado de uma tolerância limitada revelada por espécies estritamente dulcícolas, acompanhou a evolução cladogenética do grupo no decorrer da invasão de nichos osmóticos distintos.

As espécies do gênero *Palaemon*, além de mais tolerantes a salinidades mais elevadas, são fortes hiper-/hipo-osmorreguladores (Freire et al. 2003; Augusto et al. 2009; González-Ortegón et al. 2015; Faleiros et al. 2017). *Palaemon northropi* e *P. pandaliformis* demonstraram maior poder regulatório comparado às espécies do gênero *Macrobrachium*, como *M. olfersi*, *M. potiuna* e *M. brasiliense* (Freire et al., 2003; Freire et al. 2008b). Embora as espécies de *Palaemon* hiper-regulam a osmolalidade da hemolinfa em meio diluído (~salinidade >2 ‰; Kirkpatrick e Jones 1985; Freire et al. 2003; Augusto et al. 2009; Foster et al. 2010; Faleiros et al. 2017), exibem atenuada sobrevivência quando em baixa salinidade. *Palaemon pandaliformis* e *P. northropi* não sobrevivem mais que poucas horas (menos que 3 h e 2 h, respectivamente) em água doce (<0,5 ‰S) (Freire et al. 2003; Augusto et al. 2009), *P. affinis* tem baixa sobrevivência (< 35%) em 0,5 ‰S (Kirkpatrick e Jones 1985) e *P. northropi* sobrevive menos que 45% em 1 ‰S (Augusto et al. 2009), e limite letal de salinidade inferior (LSI₅₀) de 10 ‰S para *P. ritteri* (Reynolds 1974).

Para facilitar a comparação entre as medidas fisiológicas intra- e interespecíficas, empregar-se-á o cálculo de hiper-/hipo-regulação osmo-iônica pontual em cada tempo experimental (24 e 120 h) em salinidade elevada estabelecida (80% da LSS₅₀) e também na condição controle (tempo 0 h, 17 - 18 ‰S para *Palaemon*, e água doce para *Macrobrachium*). O cálculo é representado como $\Delta = [\text{osm}]_{\text{hemolinfa}} - [\text{osm}]_{\text{meio externo}}$; ou $\Delta = [\text{Cl}^-]_{\text{hemolinfa}} - [\text{Cl}^-]_{\text{meio externo}}$, onde $\Delta = 0$ denota isosmoticidade ou isocloremicidade, respectivamente; $\Delta < 0$, hipo-regulação; $\Delta > 0$, hiper-regulação. Valores que se aproximam de zero ($\Delta \rightarrow 0$) redundam em diminuição da capacidade pontual de hipo- ou hiper-regular.

A excelente capacidade hipo-regulatória da osmolalidade da hemolinfa de *P. northropi* é preservada mesmo em salinidade acima da encontrada no habitat natural da espécie (poças de maré, 3-35 ‰S, ~90 à 1050 mOsm/kg H₂O). Em salinidade de até 50 ‰S durante 10 dias, *P. northropi* manteve a osmolalidade da hemolinfa em aproximadamente 1150 mOsm/kg

H₂O, valor consideravelmente abaixo da osmolalidade do meio (~1500 mOsm/kg H₂O) (Augusto et al. 2009; Faleiros et al. 2017). Quando em 35 ‰ (~1050 mOsm/kgH₂O), *P. northropi* manteve a osmolalidade da hemolinfa em 624 mOsm/kg/H₂O (Δ = -426 mOsm/kgH₂O). *Palaemon pandaliformis* em 32 ‰ (~960 mOsm/kg/H₂O) também manteve a osmolalidade da hemolinfa hipo-regulada em 559 mOsm/kg/H₂O (Δ = -401 mOsm/kg/H₂O), assim como quando em salinidade de 35 ‰ por 17 horas [~618 mOsm/kgH₂O (Foster et al. 2010)] .

Os representantes do gênero *Macrobrachium* exibem forte capacidade hiper-osmorregulatória em água doce e variável capacidade hipo-osmorregulatória quando em salinidade elevada (Moreira et al. 1983; Freire et al. 2003; Faleiros et al. 2010; Maraschi et al. 2015). Dentre os representantes de *Macrobrachium*, *M. acanthurus* exibiu maior poder de hipo-regulação da osmolalidade por 120 h (Δ = -157 mOsm/kg H₂O) e íons Cl⁻ (Δ = -217 mM Cl⁻), embora teve uma leve perda da capacidade de regular Cl⁻ em 24 h (Δ = -129 mM Cl⁻). *Macrobrachium olfersi*, *M. amazonicum*, *M. brasiliense* e *M. potiuna* demonstraram diminuição na capacidade hipo-osmorregulatória após 120 h de exposição à salinidade elevada ($\Delta \rightarrow 0$). A perda do poder hipo-regulatório da osmolalidade da hemolinfa não foi acompanhada pela perda da capacidade hipo-regulatória da [Cl⁻] da hemolinfa após 120 h nas espécies avaliadas.

A capacidade de hipo-regular ou não [Cl⁻] da hemolinfa é fundamentada pela proximidade filogenética entre as espécies, o que não acontece com a capacidade hipo-regulatória da osmolalidade da hemolinfa. Ademais, Freire et al. (2003) encontrou notável diferença nos pontos iso-iônicos e o poder regulatório entre os íons Cl⁻ e Na⁺ em espécies representantes de palemonídeos, o que propõem mecanismos independentes de regulação desses íons. Isso motiva a presunção de que outros parâmetros regulatórios, como partículas

osmoticamente ativas, e que contribuem para a osmolalidade, p. ex. $[\text{Na}^+]$, aminoácidos livres, podem ter evoluído de maneira plástica e independente dentro do grupo.

Destaca-se também que *P. pandaliformis* mantém um menor gradiente de Cl^- ($\Delta = -261$) do que *P. northropi* ($\Delta = -323$) (Freire et al. 2003; Augusto et al. 2009; Foster et al. 2010; Faleiros et al. 2017). Esta redução é ainda mais pronunciada nas espécies dulcícolas de *Macrobrachium* quando em salinidade aumentada. No entanto a capacidade de hipo-regular Cl^- mesmo em salinidade elevada se preserva em todos os palemonídeos. A existência de significância do sinal filogenético dos parâmetros LSS_{50} , osmolalidade e $[\text{Cl}^-]$ da hemolinfa demonstra que o componente filogenético é preponderante para a variabilidade encontrada ao nível de espécie e provavelmente constituiu uma adaptação ao ambiente diluído, originada nos ramos mais profundos da filogenia, que se deu a partir de um ancestral de ambiente salobro (17 ‰) e fixou-se em nichos osmóticos distintos (Fig. 3) (McNamara e Faria 2012; McNamara et al. 2015).

Todas as espécies apresentaram alteração no conteúdo hídrico muscular como reflexo do aumento da salinidade do meio, exceto *M. potiuna*. Apesar do aumento da concentração do meio implicar em alteração na osmolalidade e $[\text{Cl}^-]$ na hemolinfa, *M. potiuna* manteve a porcentagem de hidratação do músculo inalterada, sem perda ou ganho significativo de água pelas células musculares. Essa inalteração pontual pode ser resultado da excelente capacidade de regulação isosmótica intracelular exibida pela espécie (Freire et al. 2008b; Freire et al. 2013).

A manutenção da hipo-regulação osmo-iônica da hemolinfa em Palaemonidae, mesmo em espécies de linhagens dulcícolas, certamente envolve a regulação de genes responsáveis pelo transporte iônico transepitelial (Velotta et al. 2016). Além disso, alteração na condutância a água e íons pelo epitélio das brânquias, a rápida modulação de ATPases e enzimas intracelulares, assim como respostas mais duradouras, como alteração na síntese de

transcritos e síntese proteica, compreendem alguns dos possíveis mecanismos osmo-sensíveis (Roy e Bhoite 2015).

Em ambiente diluído, o gradiente que favorece a entrada de água e saída de íons (em *Macrobrachium* essa diferença pode alcançar $\Delta = 450$ mOsm/kg H_2O , e 165 mM de Cl^-) é atenuado pela permeabilidade reduzida do epitélio branquial em água doce e a captação ativa de íons pelas brânquias, além da excreção de água pela glândula antenal (Freire et al. 2008a; McNamara e Faria 2012; Larsen et al. 2014; McNamara et al. 2015). Os ionócitos que compõem o epitélio branquial são estruturalmente e funcionalmente conectados, sendo denominados células pilares e células do septo intralamelar, formando uma ‘unidade de transporte’ entre hemolinfa e meio externo (McNamara et al. 2015).

De modo geral, a NKA está inserida exclusivamente nas invaginações da membrana das células do septo e é a principal força motriz para o transporte iônico ativo nas brânquias (Lucu e Towle 2003). A VAT está localizada predominantemente nas evaginações apicais das células pilares (Boudour-Bouchecker et al. 2014; Maraschi et al. 2015), e a enzima intracelular anidrase carbônica distribui-se predominantemente por todo citosol das células pilares (Maraschi et al. 2015). Acredita-se que a força motriz gerada pelo bombeamento de prótons pela VAT para o espaço subcuticular favorece a entrada de Na^+ na célula pilar via canal apical de Na^+ , e Cl^- via o trocador Cl^-/HCO_3^- (McNamara e Faria 2012). A constatação inédita da presença do NKCC nas células do septo e na porção basal das células pilares em todas as espécies avaliadas neste trabalho (Figs. 32 a 38) sugere que a saída de Cl^- e Na^+ a partir das células pilares para a hemolinfa se dá através do NKCC. A saída de Cl^- da célula do septo também é mediada pelo NKCC. Ainda, outros canais iônicos, como canais de sódio ou cloreto, podem estar presentes na porção basal das células pilares, sendo necessário estudo complementar sobre a localização de tais transportadores iônicos nas membranas do epitélio branquial de palemonídeos em água doce e também em condição hiper-osmótica. Os íons K^+

que acompanham o transporte de Na^+ , oriundos do NKCC ou da NKA, são reciclados via canais de K^+ . Os íons H^+ e HCO_3^- são provenientes da reação de hidratação do CO_2 catalisada pela enzima anidrase carbônica intracelular.

Quando em meio circundante salobro, a resultante do fluxo de água e íons em um palemonídeo típico de água doce é deslocada em sentido oposto. Por exemplo, a salinidade de 25 ‰ equivale a osmolalidade de $\sim 750 \text{ mOsm/kg H}_2\text{O}$, 400 mM de Cl^- e 350 mM de Na^+ . O gradiente osmótico negativo de $\sim 300 \text{ mOsm/kg H}_2\text{O}$, considerando a osmolalidade da hemolinfa de $\sim 450 \text{ mOsm/kg H}_2\text{O}$, favorece a saída de água acompanhada do influxo de íons. Dentre os possíveis mecanismos compensatórios que fundamentam a secreção de íons, particularmente de Cl^- , está o transporte mediado pelo simportador eletroneutro NKCC (McNamara e Faria 2012; Moshtaghi 2016), com papel relevante na secreção iônica branquial em peixes (Evans 2010). Para preencher a lacuna da compreensão da tolerância ao sal e da existência de hipo-regulação osmótica e iônica nos camarões palemonídeos verificou-se o efeito do aumento da salinidade em diferentes níveis na célula: transcrição, tradução e localização celular.

No cenário da transcrição gênica, o NKCC está descrito entre os genes potencialmente envolvidos na osmorregulação em representantes palemonídeos, e. g. *Macrobrachium australiense* e *M. koombooloomba* (Moshtaghi 2016; Rahi et al. 2017). A regulação transcricional do NKCC em resposta a concentração circundante vem sendo explorada em caranguejos (*Neohelice* (= *Chasmagnathus*) *granulata*, Luquet et al. 2005; *Carcinus maenas*, Towle et al. 2011; *Callinectes sapidus*, Havird et al. 2016; *Portunus trituberculatus*, Lv et al. 2016), no camarão *Halocaridina rubra* (Havird et al. 2014), em *M. rosenbergii* (Barman et al. 2010) e *M. australiense* (Moshtaghi 2016).

Há, por exemplo, um aumento de 60 vezes na expressão de RNAm do NKCC branquial no caranguejo estuarino *Neohelice* (= *Chasmagnathus*) *granulata* (Luquet et al.

2005) e 9,6 vezes em *Portunus trituberculatus* (Lv et al. 2016) após exposição à salinidade elevada (45 ‰). Ainda em caranguejo, há ausência de resposta transcricional do NKCC branquial em *Carcinus maenas* em resposta à salinidade diluída (Towle et al. 2011), o que também sugere que a participação na secreção de sal em braquiúros. Em peixes, os níveis de RNAm para a isoforma NKCC1a branquial na enguia amarela europeia (Cutler e Cramb 2002), no robalo (Lorin-Nebel et al. 2006) e em salmão do Atlântico (Mackie et al. 2007) são maiores em água do mar comparado a peixes aclimatados à água doce. Ainda, há aumento da expressão proteica do NKCC branquial no salmão do Atlântico (Pelis et al. 2001; Tipsmark et al. 2002) após transferência para água do mar. Já, a inibição do NKCC por furosemida em várias espécies de Decapoda revela forte participação do NKCC na regulação de volume intracelular e na manutenção da hidratação tecidual, revelando um papel para o cotransportador em regulação isosmótica intracelular, além do mecanismo de AER (Freire et al. 2013).

Estudos recentes com *Macrobrachium* demonstraram aumento da expressão de RNAm do NKCC nas brânquias quando experimentados em salinidade superior. Barman et al. (2012) encontrou expressão de NKCC aumentada em muitas vezes em indivíduos de *M. rosenbergii* em salinidade elevada quando comparados aos indivíduos em salinidade baixa. Além disso, Moshtaghi (2016) observou aumento de 1,7 vezes e 2 vezes em 24 h de exposição à 5 e 10 ‰, respectivamente, na expressão gênica do NKCC branquial em *M. australiense*.

Os achados anteriores demonstram a regulação positiva da expressão de RNAm do NKCC em espécies eurihalinas (Luquet et al. 2005; Towle et al. 2011; Havird et al. 2013; Barman et al. 2016; Lv et al. 2016; Moshtaghi 2016). Contudo, a história evolutiva da hiper-regulação iônica, particularmente de Cl⁻, em crustáceos em geral é pouco explorada. Nas espécies utilizadas aqui, a correlação (pGLS, ANOVA) entre a expressão gênica constitutiva

do NKCC e hiper-regulação de Cl^- na hemolinfa dos camarões foi significativa ($p = 0,014$) apenas em concentração equivalente a experimentada no habitat natural (grupos controle utilizados, 17 – 18 ‰ em *Palaemon* e água doce em *Macrobrachium*), desaparecendo em salinidade elevada por 24 e 120 horas. A hipótese pressuposta de que o aumento da salinidade reverberaria no aumento da expressão gênica do NKCC nas brânquias e que tal expressão refletiria na capacidade de secretar Cl^- não se confirmou. Esse dado implica em considerar novas possibilidades de interpretação acerca do prisma da tolerância à salinidade e seu efeito nos níveis de regulação mais profundos na cascata regulatória subcelular do NKCC.

A expressão gênica é altamente plástica e controlada por fatores externos (Wray 2013). A não sensibilização da maquinaria gênica como consequência da exposição à salinidade pode sugerir que a expressão do NKCC se preserva sempre em um nível relativamente alto, mesmo quando em água doce (*Macrobrachium*) ou próxima a isocloremicidade (*Palaemon*), pois sua função pode ser relevante também na captação de sal. Um único estudo demonstrou a expressão positiva do NKCC na espécie de camarão eurihalina *Halocaridina rubra* quando em salinidade baixa (2 ‰S) (Havird et al. 2014). A caracterização da expressão gênica do NKCC em diferentes estágios do ciclo de muda no caranguejo *Scylla paramamosain* atribuem uma importância ao simportador na captação iônica branquial, especialmente no estágio pós-muda (Xu et al. 2017). Não obstante, a ausência de alteração devido ao efeito temporal em salinidade elevada pode ser resultado da alta expressão gênica constitutiva da maquinaria osmorregulatória como uma estratégia desenvolvida de forma independente entre as espécies que ocupam e defrontam com flutuações dinâmicas de salinidade dos seus respectivos habitats.

A síntese proteica constitutiva do NKCC também, considerando-se a limitação do número reduzido de espécies avaliadas, confere a participação do simportador na manutenção da hiper-regulação da osmolalidade da hemolinfa nas espécies de camarão a partir das

condições próximas à natural, embora esse efeito tenha desaparecido com o aumento da salinidade e não se correlaciona com a habilidade hipo-regulatória da osmolalidade e concentração de Cl⁻ da hemolinfa. Não houve um padrão filogenético para a expressão proteica do NKCC na condição controle, assim como para os eventos transcricionais constitutivos, tal resultado sugere uma força adaptativa na evolução da síntese constitutiva do simportador.

A síntese proteica do NKCC demonstrou-se responsiva ao tempo de exposição ao aumento de salinidade nas espécies de *Macrobrachium* à sombra das análises intraespecíficas. As espécies dulcícolas com hábito migratório e que compartilham a dependência de água salobra para completo desenvolvimento larval *M. acanthurus*, *M. olfersi* e *M. amazonicum* exibiram aumento de até 2 vezes a disponibilidade do simportador branquial quando comparado à condição controle. A espécie dulcícola restrita *M. brasiliense*, que independe da salinidade para reprodução, também teve o nível de expressão proteica do NKCC aumentado em 1,5 vezes relativos ao controle.

A tradução do NKCC, revelada pelo aumento da quantidade de proteína do simportador, frente às possíveis alterações na concentração do meio circundante evoluiu como um evento cladogenético dentro de Palaemonidae, e parece ter sido preservada entre grande parte das espécies de *Macrobrachium* extantes (Barman et al. 2012; Moshtaghi et al. 2016). A história da osmorregulação compartilhada entre palemonídeos possivelmente comunica-se com outros padrões ecológicos e reprodutivos, como a evolução independente de diferentes tipos de ciclo de vida (e.g. desenvolvimento larval abreviado ou estendido; Pileggi e Mantelatto 2010; Anger 2013).

A disponibilidade proteica aumentada parece não ser decorrente de eventos transcricionais padrões, ao menos não na escala temporal identificada. Possivelmente eventos pós-transcricionais podem estar associados à sensibilidade osmorregulatória de

Macrobrachium em resposta ao aumento de salinidade a longo prazo. Especulações acerca dos recentes avanços sobre RNAs de interferência não codificantes, como os reguladores de genes endógenos microRNAs (miRNAs), podem revelar vias alternativas importantes na esfera de respostas osmorregulatórias (Hoppeler 2015; Carthew e Sontheimer 2016).

Apesar de que o aumento na síntese de proteínas NKCC não possui valor adaptativo e esteja vinculada a proximidade filogenética entre as espécies, é aceitável ponderar que as mudanças experimentadas por *P. northropi* e *P. pandaliformis* [perfeitamente representadas pela salinidade superior correspondente a 80% da LSS₅₀ (~35 ‰) a partir de um controle em 17 - 18 ‰] podem não ser suficientes para promover sensibilidade osmótica e mudanças significativas na síntese de proteína NKCC. *Palaemon northropi* é um camarão marinho de poça-de-maré com salinidade média diária entre 3-35 ‰, e *P. pandaliformis* residente de estuário com média de salinidade entre 3-33 ‰, estando essas condições sujeitas a mudança devido ao regime de chuvas ou evaporação concernente a temperaturas elevadas. Além do mais, sabe-se que a salinidade de partida do experimento (condição controle) e o intervalo da mudança (se abrupta ou gradual) são determinantes dos limites de tolerância e sobrevivência em determinada salinidade experimental, seja ela superior ou inferior (Schultz e McCormick 2013). Por exemplo, um estudo com *M. equidens* e *M. australiense* demonstrou que nenhuma das espécies sobrevive mais que poucas horas quando em transferência direta à mesma salinidade tolerada quando por transferência gradual (Denne 1968).

Muitos fatores podem influenciar a taxa de transporte mediada pelo simportador NKCC. Em diferentes táxons, de modo geral, o transporte via NKCC é estimulado por alteração no volume celular, particularmente redução de volume; por hormônios; fatores de crescimento; tensão reduzida de oxigênio; aumento da [Mg²⁺] e redução da [Cl⁻] intracelular (revisado em Flatman 2002). Esses eventos ocorrem via fosforilação de domínios proteicos, interações proteína-proteína e efeito direto da [Cl⁻] celular (Evans et al. 2010; Flemmer et al.

2010; Yuan et al. 2017). A fosforilação pode ocorrer em pelo menos cinco domínios da proteína, o que sugere que sua atividade depende da atividade de múltiplas proteínas de sinalização (revisado em Evans 2010). Mecanismos de regulação mais rápidos, que não a nível transcricional e traducional, como a ativação e inativação de transportadores iônicos por fosforilação podem ter se fixado como uma alternativa energeticamente econômica para espécies que experimentam variações recorrentes de salinidade no habitat natural, e.g. representantes de *Palaemon*.

Possivelmente outros genes, que não os responsáveis pela síntese de transportadores como NKA, VAT, NKCC, comuns a camarões marinhos ou dulcícolas e responsáveis pela regulação do transporte de íons, podem também responder positivamente a salinidade do meio, e.g. genes de camarões marinho, como o que codifica a proteína canal de cloreto ativado por cálcio (CaCC), *Bestrophin-2* (BEST2) regulador do NKCC; e genes de camarões dulcícolas que codificam a proteína ativadora *Ras GTPase-activating protein* (RasGAP) (Yuan et al. 2017). Ao nível celular essas proteínas podem interferir positiva ou negativamente em vias de cascatas sinalizadoras ou na regulação direta de proteínas de transporte, implicando em alterações na homeostase de íons como Na^+ e Cl^- .

Acredita-se que o mecanismo hipo-regulatório de camarões palemonídeos, tratando-se do mecanismo observado a nível de espécie, seja comum ou idêntico ao encontrado em outros crustáceos e peixes marinhos hipo-osmoreguladores de modo geral (McNamara e Faria 2012; Larsen et al. 2014). Mas, curiosamente, dados eletrofisiológicos demonstram que a voltagem transepitelial de crustáceos é externamente positiva, opondo-se ao esperado de um mecanismo semelhante ao de vertebrados (revisado em Larsen et al. 2014). Por isso, uma análise eletrofisiológica, incluindo a mensuração do fluxo iônico em tempo real de íons Cl^- , associada à uma visão abrangente de outros possíveis transportadores iônicos candidatos a compor o

mecanismo de secreção iônica ativa no epitélio branquial de camarões, podem elucidar muitas questões pertinentes a essas lacunas intransitadas.

O delineamento de modelos de transporte iônico no epitélio das brânquias de palemonídeos (Fig. 2) contribui em muito para a compreensão das adaptações à vida em ambientes osmoticamente distintos com diferenças interespecíficas associadas à história evolutiva dos organismos (McNamara e Faria 2012; McNamara et al. 2015). Os diferentes padrões e processos osmorregulatórios se manifestam em função dos diferentes arranjos de transportadores presentes no epitélio branquial de representantes de nichos e de linhagens diferentes (McNamara e Faria 2012). A localização do NKCC foi inicialmente proposta nas células do septo ou no corpo das células pilares apenas na secreção iônica (Fig. 2) (McNamara e Faria 2012). A inversão do fluxo iônico de uma condição direcionada de captação para secreção iônica (hiper-regulatória para hipo-regulatória) não ocasionou mudanças visuais na distribuição do simportador nas células das brânquias em todos os representantes de palemonídeos aqui amostrados. Encontrou-se predominância do NKCC localizado igualmente no corpo e nas franjas inferiores das células pilares e nas células do septo intralamelar. Quando em hipo-regulação, a localização do NKCC nas células do septo e no corpo das células pilares medeia o transporte de íons, particularmente de Cl^- , das células e hemolinfa para o meio externo circundante.

Assumindo a semelhança entre o mecanismo ativo de secreção de sal de invertebrados e vertebrados, acredita-se que quando em meio hiper-salino a permeabilidade branquial à água reduz-se acentuadamente (e.g. hipotetiza-se que por meio da redução da abundância de aquaporinas) (Gonzalez 2012). Ocorrem também modificações estruturais, como a redução ou desaparecimento dos extensos microvilos apicais da membrana das células pilares (McNamara e Lima 1997), reduzindo assim a superfície de troca entre o epitélio e o meio

externo. Além disso, presume-se que transportadores iônicos são mobilizados para redirecionar o fluxo de Na^+ e Cl^- para fora da célula.

O efluxo de tais íons também parece depender da atividade da NKA localizada nas células do septo intralamelar. O gradiente de Na^+ gerado pela bomba favorece o fluxo simultâneo de Na^+ , K^+ e 2 Cl^- pelo simportador NKCC localizado nas células do septo e no corpo e franja das células pilares (Figs. 32 a 38). O K^+ é reciclado via canal de K^+ . A participação da VAT no transporte iônico aparentemente é limitada à função de captura de Na^+ em palemonídeos. A expressão gênica da VAT em brânquias em *M. amazonicum* e *M. acanthurus* expostos à 25 ‰ cai a 0,3 vezes e a 0,5 vezes, respectivamente, quando comparado ao controle em água doce (Faleiros et al. 2010; Faleiros et al. 2017) e *P. northropi* demonstrou maior expressão gênica branquial da VAT em 8 ‰ quando comparado ao controle em 33 ‰ (Faleiros et al. 2017). Logo, uma possível redução na atividade da VAT apical e menor extrusão de prótons para o meio externo concede a saída de Na^+ da hemolinfa para o meio externo via paracelular, na conexão entre a porção apical de células pilares. O aumento da disponibilidade proteica do simportador em salinidade elevada sustenta maior taxa de transporte de Cl^- para o intracelular, impulsionando a saída de íons Cl^- de maneira dirigida principalmente via canal apical de Cl^- nas células pilares (Ver fig. 2).

A caracterização inédita do NKCC ao nível transcricional e traducional em camarões oriundos de nichos osmóticos diversos, somada a mensuração das medidas fisiológicas sistêmicas, elucida em parte o inexplorado mecanismo de secreção de sal e hipo-regulação em palemonídeos. A localização do NKCC nas células pilares e do septo nas brânquias, tanto em condição de hipo- quanto em hiper-regulação, sustentam a participação do simportador também na absorção de sal, e contribui com o refinamento do modelo de transporte iônico transepitelial. O efeito do tempo em salinidade elevada sobre padrões fisiológicos e a incorporação das relações hierárquicas entre as espécies delimitaram interpretações

adaptativas do papel do NKCC na absorção e secreção iônica, atribuindo possível participação em linhagens ancestrais e que acompanhou a história evolutiva da osmorregulação na família Palaemonidae.

6 CONCLUSÕES

As espécies representantes do ambiente marinho, ocupantes de estuários e poças de maré, do gênero *Palaemon* demonstraram maior tolerância ao aumento de salinidade. Dentre as espécies dulcícolas de *Macrobrachium*, as diádromas apresentaram tolerância intermediária e superior às espécies hololimnéticas.

O sinal filogenético significativo para o parâmetro LSS_{50} revela que as semelhanças entre espécies extantes são devidas à estreita proximidade entre elas. A salinidade pode ter contribuído para a evolução da colonização dos diferentes nichos osmóticos e a evolução desses parâmetros acompanhou o efeito cladogenético dentro de Palaemonidae.

As espécies de *Palaemon* exibiram maior capacidade hipo-regulatória da osmolalidade e $[Cl^-]$ da hemolinfa quando em salinidade elevada (80% da LSS_{50}) do que as espécies de *Macrobrachium*.

A existência de forte estruturação filogenética para parâmetros fisiológicos sistêmicos reforça a presunção de que a menor capacidade de hipo-regular em *Macrobrachium* provavelmente fixou-se durante o processo de colonização de ambientes dulcícolas a partir de um ancestral de ambiente salobro (17 ‰).

A capacidade hiper-regulatória da $[Cl^-]$ da hemolinfa foi correlacionada com a expressão gênica do simportador NKCC nas brânquias, enquanto que a síntese proteica do NKCC parece estar associada à hiper-regulação da osmolalidade da hemolinfa. Tais efeitos somados sugerem a importância do NKCC na captação de sal pelas brânquias e na regulação de partículas osmoticamente ativas que contribuem com a osmolalidade da hemolinfa, e.g. $[Na^+]$.

As espécies *M. acanthurus*, *M. olfersi*, *M. amazonicum* e *M. brasiliense* tiveram aumento na disponibilidade proteica do NKCC quando em salinidade superior por 120 horas.

Esse efeito não se demonstra correlacionado com a capacidade de hipo-regular Cl^- da hemolinfa quando incorporada a filogenia na análise.

Tais medidas também estão estruturadas filogeneticamente, sendo que o aumento da síntese proteica do NKCC compartilhada por membros de *Macrobrachium*, seja majoritariamente explicado pela proximidade filogenética entre elas.

A síntese proteica do NKCC não foi acompanhada por aumento da transcrição gênica do NKCC em espécies representantes de *Macrobrachium*. Isso sugere uma possível regulação pós-transcricional, por exemplo, RNAs de interferência, e/ou uma regulação à nível pós-traducional, por exemplo, fosforilação de transportadores iônicos das brânquias.

O NKCC foi localizado em ambas as células que compõem o epitélio branquial. O NKCC foi identificado de forma abundante na parte inferior da franja e no corpo das células pilares. Nas células do septo intralamelar o NKCC esteve localizado de forma abundante por toda a célula. Não foi identificada diferença no padrão da localização do simportador, embora meramente visual, quando no controle ou quando em salinidade elevada. Tal achado reforça o entendimento da possível participação do NKCC na absorção assim como secreção iônica branquial em palemonídeos.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers WE, Lipman DJ**, 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol* 215: 403-410.
- Anger K**, 2013. Neotropical *Macrobrachium* (Caridea: Palaemonidae): on the biology, origin, and radiation of freshwater-invading shrimp. *J Crust Biol* 33:151–183.
- Augusto A, Pinheiro AS, Greene LJ, Laure HJ, McNamara JC**, 2009. Evolutionary transition of freshwater by ancestral marine palaemonids: evidence from osmoregulation of in a tide pool shrimp. *Aquat Biol* 7: 113-122.
- Barman HK, Patra SK, Das V, Mohapatra SD, Jayasankar P, Mohapatra C, Mohanta R, Panda RP, Rath SN**, 2012. Identification and characterization of differently expressed transcripts in the gills of freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) under salt stress. *The Scientific World J* 2012: 1-11. doi: 10.1100/2012/149361.
- Begon M, Townsend CR, Harper JL**, 2007. *Ecologia de Indivíduos a Ecossistemas*. 4ªed, Artmed, Porto Alegre.
- Belli NM, Faleiros RO, Firmino KCS, Masui DC, Leone FA, McNamara JC, Furriel RPM**, 2009. Na,K-ATPase activity and epithelial interfaces in gills of the freshwater shrimp *Macrobrachium amazonicum* (Decapoda, Palaemonidae). *Comp Biochem Physiol* 152A: 431-439.
- Bello F, Berg MP, Dias ATC, Diniz-Filho JAF, Gotzenberger L, Hortal J, Ladle RJ, Leps J**, 2015. On the need for phylogenetic ‘corrections’ in functional trait-based approaches. *Folia Geobot* 50:349-357.
- Boudour-Bouchecker N, Boulo V, Charmantier- Daures M, Grousset E, Anger K, Charmantier G, Lorin-Nebel C**, 2014. Differential distribution of V-type H⁺-ATPase and Na⁺/K⁺-ATPase in the branchial chamber of the palaemonid shrimp *Macrobrachium amazonicum*. *Cell Tissue Res* 357: 195-206.
- Bracken HD, De Grave S, Felder DL**, 2009. Phylogeny of the infraorder Caridea based on mitochondrial and nuclear genes (Crustacea: Decapoda). In: Martin JW, Felder DL, Crandall KA (eds) *Decapod crustacean phylogenetics*. Crustacean issues 18. CRC Press, Boca Raton, pp 281–305.

- Carthew RW, Sontheimer EJ**, 2009. Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell* 136:642-655.
- Cutler CP, Cramb G**, 2002. Two isoforms of the $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ cotransporter are expressed in the European eel (*Anguilla anguilla*). *Biochim Biophys Acta* 1566: 92–103.
- Denne LB**, 1968. Some aspects of osmotic and ionic regulation in the prawns *Macrobrachium australiense* (holthuis) and *M. equidens* (dana). *Comp Biochem Physiol* 26(1): 17-30.
- Diniz-Filho JAF**, 2000. Métodos filogenéticos comparativos. Holos, Ribeirão Preto.
- Diniz-Filho JAF**, 2001. Phylogenetic autocorrelation under distinct evolutionary processes. *Evolution* 55, 1104–1109.
- Evans DH**, 2010. Freshwater Fish Gill Ion Transport: August Krogh to morpholinos and microprobes. *Acta Physiol* 202: 349-359.
- Faleiros RO, Goldman MHS, Furriel RPM, McNamara JC**, 2010. Differential adjustment in gill Na^+/K^+ - and V-ATPase activities and transporter mRNA expression during osmoregulatory acclimation in the cinnamon shrimp *Macrobrachium amazonicum* (Decapoda, Palaemonidae). *J Exp Biol* 213: 3894-3905.
- Faleiros RO, Furriel RPM, McNamara JC**, 2017. Transcriptional, translational and systemic alterations during the time course of osmoregulatory acclimation in two palaemonid shrimps from distinct osmotic niches. *Comp Biochem Physiol* 212A: 97-106.
- Faria SC, Augusto AS, McNamara JC**, 2011. Intra- and extracellular osmotic regulation in the hololimnetic Caridea and Anomura: a phylogenetic perspective on the conquest of fresh water by the decapod Crustacea. *J Comp Physiol* 181B: 175–186.
- Faria SC, Provete DB, Thurman CL, McNamara JC**, 2017. Phylogenetic patterns and the adaptive evolution of osmoregulation in fiddler crabs (Brachyura, *Uca*). *PLoS ONE* 12(2):e0171870. doi:10.1371/journal.pone.0171870.
- Felsenstein J**, 1985. Phylogenies and the comparative method. *Am Nat* 125, 1-15.
- Finney DJ**, 1971. Probit analysis, 3rd edn. Cambridge University Press, Cambridge.

- Flatman PW**, 2002. Regulation of Na–K–2Cl cotransport by phosphorylation and protein–protein interactions. *Biochim Biophys Acta* 1566:140-151.
- Flemmer AW, Monette MY, Djurisic M, Dowd B, Darman R, Gimenez I, Forbush B**, 2010. Phosphorylation state of the Na⁺–K⁺–Cl[–] cotransporter (NKCC1) in the gills of Atlantic killifish (*Fundulus heteroclitus*) during acclimation to water of varying salinity. *J Exp Biol* 213: 1558-1566.
- Florkin M, Schoffeniels E**, 1969. Isosmotic intracellular regulation. In: Florkin M, Schoffeniels E, editors. *Molecular approaches to ecology*. New York: Academic Press. p 89–111.
- Foster C, Amado EM, Souza MM, Freire CA**, 2010. Do osmoregulators have lower capacity of muscle water regulation than osmoconformers? A study on decapod crustaceans. *J Exp Zool* 313A: 80–94.
- França JL, Pinto MR, Lucena MN, Garçon DP, Valenti WC, McNamara JC, Leone FA**, 2013. Subcellular Localization and Kinetic Characterization of a Gill (Na⁺, K⁺)-ATPase from the Giant Freshwater Prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *J Membrane Biol* 246: 529-543.
- Freire CA, Cavassin F, Rodrigues EN, Torres AH, McNamara JC**, 2003. Adaptive patterns of osmotic and ionic regulation, and the invasion of fresh water by the palaemonid shrimps. *Comp Biochem Physiol* 136A: 771–778.
- Freire CA, Onken H, McNamara JC**, 2008 a. A structure-function analysis of ion transport in crustacean gills and excretory organs. *Comp Biochem Physiol* 151A: 272–304.
- Freire CA, Amado EM, Souza LR, Veiga MPT, Vitule JRS, Souza MM, Prodocimo V**, 2008 (b). Muscle water control in crustaceans and fishes as a function of habitat, osmoregulatory capacity, and degree of euryhalinity. *Comp Biochem Physiol* 149: 435-446.
- Freire CA, Souza-Bastos LR, Amado EM, Prodocimo V, Souza MM**, 2013. Regulation of muscle hydration upon hypo-or hyper-osmotic shocks: Differences related to invasion of the freshwater habitat by Decapod Crustaceans. *J Exp Zool* 319A: 297-309.
- Freire CA, Maraschi AC, Lara AF, Amado EM, Prodocimo V**, 2018. Late rise in hemolymph osmolality in *Macrobrachium acanthurus* (diadromous freshwater shrimp) exposed to brackish water: Early reduction in branchial Na⁺/K⁺ pump activity but stable muscle HSP70 expression. *Comp Biochem Physiol* 216B:69-74.

- Garland TJr, Adolph SC**, 1994. Why Not to Do Two-Species Comparative Studies: Limitations on Inferring Adaptation. *Physiol Zool* 67(4): 797-828.
- Gittleman JL, Anderson CG, Kot M, Luh HK**, 1996. Phylogenetic lability and rates of evolution: a comparison of behavioral, morphological and life history traits. In: *Phylogenies and the comparative method in animal behavior*. Martins EP (Ed.). Oxford University Press, Oxford. Pages 166-205.
- Gonzalez R**, 2012. The physiology of hyper-salinity tolerance in teleost fish: a review. *J Comp Physiol B* 182: 321–329.
- González-Ortegón E, Palero F, Lejeusne C, Drake P, Cuesta JA**, 2015. A salt bath will keep you going? Euryhalinity tests and genetic structure of caridean shrimps from Iberian rivers. *Sci Total Environ* 2015, <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.06.028>.
- Grafen A**, 1989. The phylogenetic regression. *Philos Trans Roy Soc* 326B, 119–157.
- Haas M, Forbush B**, 2000. The Na-K-Cl Cotransporter of secretory epithelia. *Ann Rev Physiol* 62: 515-34.
- Hansen TF, Martins EP**, 1996. Translating between microevolutionary process and macroevolutionary patterns: the correlation structure of interspecific data. *Evolution* 50, 1404–1417.
- Havird JC, Henry RP, Wilson AE**, 2013. Altered expression of Na⁺/K⁺–ATPase and other osmoregulatory genes in the gills of euryhaline animals in response to salinity transfer: A meta-analysis of 59 quantitative PCR studies over 10 years. *Comp Biochem Physiol* 8D: 131-140.
- Havird JC, Santos SR, Henry RP**, 2014. Osmoregulation in the Hawaiian anchialine shrimp *Halocaridina rubra* (Crustacea: Atyidae): expression of ion transporters, mitochondria-rich cell proliferation and hemolymph osmolality during salinity transfers. *J Exp Biol* 217:2309-2320.
- Havird JC, Mitchell RT, Henry RP, Santos SR**, 2016. Salinity-induced changes in gene expression from anterior and posterior gills of *Callinectes sapidus* (Crustacea: Portunidae) with implications for crustacean ecological genomics. *Comp Biochem Physiol* 19D:34-44.

- Henry RP, Lucu C, Onken H, Weihrauch D**, 2012. Multiple functions of the crustacean gill: osmotic/ionic regulation, acid-base balance, ammonic excretion, and bioaccumulation of toxic metals. *Frontiers in Physiology* 3: 1-33.
- Hoffmann EK, Schettino T, Marshall WS**, 2007. The role of volume-sensitive ion transport systems in regulation of epithelial transport. *Comp Biochem Physiol* 148A: 29-43.
- Hoppeler HH**, 2015. Epigenetics in comparative physiology. *J Exp Biol* 218: 6
doi:10.1242/jeb.117754.
- Isenring P, Forbush B**, 2001. Ion transport and ligand binding by the Na-K-Cl cotransporter, structure-function studies. *Comp Biochem Physiol* 130A: 487-497.
- Kang CK, Tsai HJ, Liu CC, Lee TH, Hwang PP**, 2010. Salinity-dependent expression of a $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ cotransporter in gills of the brackish medaka *Oryzias dancena*: A molecular correlate for hyposmoregulatory endurance. *Comp Biochem Physiol* 157A: 7-18.
- Kefford BJ, Papas PJ, Metzeling L, Nuggeoda D**, 2004. Do laboratory salinity tolerance of freshwater animals correspond with their field salinity? *Environ Pollut* 129: 355-362.
- Kirkpatrick K, Jones MB**, 1985. Salinity tolerance and osmoregulation of a prawn, *Palaemon affinis* Milne Edwards (Caridae: Palaemonidae). *J Exp Mar Biol Ecol* 93:61-70.
- Kirschner LB**, 2004. The mechanism of sodium chloride uptake in hyperregulating aquatic animals. *J Exp Biol* 207: 1439-1452.
- Larsen EH, Deaton LE, Onken H, O'Donnell M, Grosell M, Dantzler WH, Weihrauch D**, 2014. Osmoregulation and Excretion. *American Physiol Society* DOI: 10.1002/cphy.c130004.
- Lee CE, Kiergaard M, Gelembiuk GW, Eads BD, Posavi M**, 2011. Pumping ions: rapid parallel evolution of ionic regulation following habitat invasions. *Evolution* 65-8:2229-2244.
- Lima AG, McNamara JC, Terra WB**, 1997. Regulation of hemolymph osmolytes and gill Na^+/K^+ -ATPase activities during acclimation to saline media in the freshwater shrimp *Macrobrachium olfersii* (Wiegmann, 1836) (Decapoda, Palaemonidae). *J Exp Mar Biol Ecol* 215: 81-91.

- Livak KJ, Schmittgen TD**, 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods*, 25: 402–408.
- Lorin-Nebel C, Boulo V, Bodinier C, Charmantier G**, 2006. The $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ cotransporter in the seabass *Dicentrarchus labrax* during ontogeny: involvement in osmoregulation. *J Exp Biol* 209: 4908–4922.
- Lucu C, Towle DW**, 2003. Na^+K^+ -ATPase in gills of aquatic crustacea. *Comp Biochem Physiol* 135A:195-214.
- Luquet CM, Weihrauch D, Senek M, Towle DW**, 2005. Induction of branchial ion transporter mRNA expression during acclimation to salinity change in the euryhaline crab *Chasmagnathus granulatus*. *J Exp Biol* 208: 3627–3636.
- Lv J, Zhang D, Liu P, Li J**, 2016. Effects of salinity acclimation and eyestalk ablation on Na^+ , K^+ , 2Cl^- cotransporter gene expression in the gill of *Portunus trituberculatus*: a molecular correlate for salt-tolerant trait. *Cell Stress and Chaperones* DOI 10.1007/s12192-016-0707-3.
- Mackie PM, Gharbi K, Ballantyne JS, McCormick SD, Wright PA**, 2007. $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ cotransporter and CFTR gill expression after seawater transfer in smolts (0+) of different Atlantic salmon (*Salmo salar*) families. *Aquaculture* 272: 625-635.
- Maraschi AC, Freire CA, Prodocimo V**, 2015. Immunocytochemical localization of V-H⁺-ATPase, Na^+/K^+ -ATPase, and carbonic anhydrase in gill lamellae of adult freshwater euryhaline shrimp *Macrobrachium acanthurus* (Decapoda, Palaemonidae). *J. Exp. Zool.* 9999:1–8.
- Martins EP, Garland TJr**, 1991. Phylogenetic analyses of correlated evolution of continuous characters: a simulation study. *Evolution* 45, 534-557.
- McNamara JC, Lima AG**, 1997. The route of ion and water movements across the gill epithelium of the fresh water shrimp *Macrobrachium olfersii* (Decapoda, Palaemonidae): evidence from ultrastructural changes induced by acclimation to saline media. *Biol Bull* 192:321–331
- McNamara JC, Torres AH**, 1999. Ultracytochemical location of Na^+/K^+ -ATPase activity and effects of high salinity acclimation in gill and renal epithelia of the freshwater shrimp *Macrobrachium olfersii* (Crustacea, Decapoda). *J Exp Biol* 284:617–628.

- McNamara JC, Faria SC**, 2012. Evolution of osmoregulatory patterns and gill ion transport mechanisms in the decapod Crustacea: a review. *J Comp Physiol* 182B: 997-1014.
- McNamara JC, Freire CA, Torres AH, Faria SC**, 2015. The conquest of fresh water by the palaemonid shrimps: an evolutionary history scripted in the osmoregulatory epithelia of the gills and antennal glands. *Biol J Linn Soc* 114, 673–688.
- Melo GAS**, 2003. Manual de identificação dos Crustacea Decapoda de água doce do Brasil. São Paulo: Edições Loyola.
- Moreira GS, McNamara JC, Shumway SE, Moreira PS**, 1983. Osmoregulation and respiratory metabolism in Brazilian *Macrobrachium* (Decapoda, Palaemonidae). *Comp. Biochem. Physiol.* 74A: 57-62.
- Moshtaghi A**, 2016. 'Identification and characterization of candidate genes influencing salinity tolerance in *Macrobrachium australiense*: a model for the molecular basis of colonization of low ionic environments'. Tese de doutorado. School of Earth, Environmental and Biological Science, Science and Engineering Faculty, Queensland University of Technology, Brisbane, Australia.
- Pelis RM, Zydlewski J, McCormick SD**, 2001. Gill $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - 2\text{Cl}^-$ cotransporter abundance and location in Atlantic salmon: effects of seawater and smolting. *Am. J. Physiol.* 280: R1844–R1852.
- Pequéux A**, 1995. Osmotic regulation in crustaceans. *J Crust Biol* 15: 1-60.
- Pereira G**, 1997. A cladistic analysis of the freshwater shrimps of the family Palaemonidae (Crustacea, Decapoda, Caridea). *Acta Biol Venezuel* 17: 1–69.
- Pileggi LG, Mantelatto FL**, 2010. Molecular phylogeny of the freshwater prawn genus *Macrobrachium* (Decapoda, Palaemonidae), with emphasis on the relationships among selected American species. *Invert Syst* 24:194–208.
- Quadros MLA, Maciel C, Santos S, Sampaio I**, 2004. Reprodução do camarão canela - *Macrobrachium acanthurus* em condições controladas de laboratório e montagem de um atlas para identificação de estágios larvais. *Rev Cient da UFPA* 4:1-11.
- Rangel TF, Diniz-Filho JA**, 2012. Phylogenetic Analysis in Macroecology, PAM freeware application, v0.9 beta, http://projetos.extras.ufg.br/diniz/COMPBIO/PAM_Tutorial2012.docx

- Rahi ML, Amin S, Mather PB, Hurwood DA**, 2017. Candidate genes that have facilitated freshwater adaptation by palaemonid prawns in the genus *Macrobrachium*: identification and expression validation in a model species (*M. koombooloomba*). PeerJ 5:e2977; DOI 10.7717/peerj.2977.
- Revell LJ**, 2012. Phytools: an R package for phylogenetic comparative biology (and other things). Method Ecol Evol 3, 217–223.
- Reynolds WW**, 1974. Salinity tolerance of the tidepool shrimp *Palaemon ritteri* Holmes. Comp Biochem Physiol 52A:665-667.
- Rezende EL, Diniz-Filho JAF**, 2012. Phylogenetic Analyses: Comparing Species to Infer Adaptations and Physiological Mechanisms. Compr Physiol 2:639-674.
- Roy R, Bhoite S**, 2015. Compensatory Adjustment in Chloride Cells During Salinity Adaptation in Mud Crab, *Scylla serrata*. Proc Zool Soc 69: 242-248.
- Russell MJ**, 2000. Sodium-potassium-chloride cotransport. Physiol Rev 80: 211 - 276.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson A**, 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc Nat Acad Sci (USA) 74: 5463-5467.
- Santos FH, McNamara JC**, 1996. Neuroendocrine modulation of osmoregulatory parameters in the freshwater shrimp *Macrobrachium olfersii* (Wiegmann) (Crustacea, Decapoda). J Exp Mar Biol Ecol 206: 109–120.
- Santos LCF, Belli NM, Augusto A, Masui DC, Leone FA, McNamara JC, Furriel RPM**, 2007. Gill Na⁺,K⁺-ATPase in diadromous, freshwater palaemonid shrimps: Species-specific kinetic characteristics and α -subunit expression. Comp Biochem Physiol 148A: 178-188.
- Schales O, Schales SS**, 1941. A simple and accurate method for the determination of chloride in biological fluids. J Biol Chem 140: 878–883.
- Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, et al.**, 2012, "Fiji: an open-source platform for biological-image analysis", *Nature methods* 9(7): 676-682, PMID 22743772 (on Google Scholar).
- Schmidt-Nielsen K**, 2002. Fisiologia Animal: adaptação e meio ambiente. 5.ed. São Paulo: Santos.

- Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW**, 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature methods* 9(7): 671-675, PMID 22930834 (on Google Scholar).
- Schultz ET, McCormick SD**, 2013. Eurihalinity in an evolutionary context. Department of Ecology and Evolutionary Biology, University of Connecticut.
- Scott GR, Baker DW, Schulte PM, Wood CM**, 2008. Physiological and molecular mechanisms of osmoregulatory plasticity in killifish after seawater transfer. *J Exp Biol* 211: 2450-2459.
- Taylor SC, Berkelman T, Yadav G, Hammond M**, 2013. A Defined Methodology for Reliable Quantification of Western Blot Data. *Mol Biotechnol* 55(3):217-226.
- Teixeira RL, Sá HS**, 1998. Abundância de macrocrustáceos decápodos nas áreas rasas do Complexo Lagunar Mundaú/Manguaba. *Rev Bras Biol* 58:393–404.
- Thabet R, Ayadi H, Koken M, Leignel V**, 2017. Homeostatic responses of crustaceans to salinity changes. *Hydrobiologia* 799: 1-20.
- Thurman CL**, 2002. Osmoregulation in six sympatric fiddler crabs (genus *Uca*) from the northwestern Gulf of Mexico. *Mar Ecol* 23:269-284.
- Thurman CL**, 2003. Osmoregulation by six species of fiddler crabs (*Uca*) from the Mississippi delta area in the northern Gulf of Mexico. *J Exp Mar Biol Ecol* 291:233-253.
- Tipsmark CK, Madsen SS, Seidelin M, Christensen AS, Cutler CP, Cramb G**, 2002. Dynamics of $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ cotransporter and Na^+, K^+ -ATPase expression in the branchial epithelium of brown trout (*Salmo trutta*) and Atlantic salmon (*Salmo salar*). *J Exp Zool* 293: 106–118. 20
- Towle DW, Henry RP, Terwilliger NB**, 2011. Microarray-detected changes in gene expression in gills of green crabs (*Carcinus maenas*) upon dilution of environmental salinity. *Comp Biochem Physiol* 6D: 115-125.
- Velotta JP, Wegrzyn JL, Ginzburg S, Kang L, Czesny S, O'Neill RJ, McCormick SD, Michalak P, Schultz ET**, 2016. Transcriptomic imprints of adaptation to fresh water: parallel evolution of osmoregulatory gene expression in the Alewife. *Mol Ecol* 26:831-848.

- Vogt G**, 2013. Abbreviation of larval development and extension of brood care as key features of the evolution of freshwater Decapoda. *Biological Reviews* 88: 81-116. doi: 10.1111/j1469-185X.2012.00241.x.
- Xu BP, Tu DD, Yan MC, Shu MA, Shao QJ**, 2017. Molecular characterization of a cDNA encoding Na⁺/K⁺/2Cl⁻ cotransporter in the gill of mud crab (*Scylla paramamosain*) during the molt cycle: Implication of its function in osmoregulation. *Comp Biochem Physiol* 203A: 115-125.
- Wheatly M, Gao Y**, 2004. Molecular biology of ion motive proteins in comparative models. *J Exp Biol* 207: 3253–3263.
- Willmer P, Stone G, Johnston I**, 2005. Environmental physiology of animals. 2 ed. Blackwell Science, Oxford, UK, 754 p.
- Wowor D, Muthu V, Meier R, Balke M, Cai Y, Ng PKL**, 2009. Evolution of life history traits in Asian freshwater prawns of the genus *Macrobrachium* (Crustacea: Decapoda: Palaemonidae) based on multilocus molecular phylogenetic analysis. *Mol Phylogenet Evol* 52: 340–350.
- Wray GA**, 2013. Genomics and the Evolution of Phenotypic Traits. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 44:51–72.
- Wynn A, Shafer TH, Coblenz FE**, 2004. Sequência parcial do gene PRL10 de *Callinectes sapidus* depositada no banco de dados Genbank (accession #AAV71145). http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=Protein&list_uids=56112341&dopt=GenPept.
- Yang WK, Kang CK, Chen TY, Chang WB, Lee TH**, 2011. Salinity-dependent expression of the branchial Na⁺/K⁺/2Cl⁻ cotransporter and Na⁺/K⁺-ATPase in the sailfin molly correlates with hypoosmoregulatory endurance. *J Comp Physiol* 181B: 953-964.
- Yuan J, Zhang X, Liu C, Duan H, Li F, Xiang J**, 2017. Convergent Evolution of the Osmoregulation System in Decapod Shrimps. *Mar Biotechnol* 19:76-88.

APÊNDICE

FIGURAS DE GEL DE ELETROFORESE

Figura 43. Análise diagnóstica das reações de PCR em gel de agarose a 1% exemplificando o sucesso da extração e do tratamento das amostras com DNase em *P. pandaliformis* (raias 3 a 8) amplificadas com o par de *primers* PRL10. M corresponde ao marcador molecular 1 kb DNA Ladder Plus (Life Technologies). Controle negativo (raia 1) não contém o molde. Controle positivo feito com cDNA branquial de *Uca burgersi* amplificados com o par de *primers* do gene PRL10 (raia 2), amplicon de ~300 pb. As bandas <100 pb observadas em cada raia correspondem aos *primers* PRL10_Cs_F/ PRL10_Cs_R utilizados em saturação.

Figura 44. Análises das reações de PCR em gel de agarose a 1%, correspondente à amplificação do cDNA total branquial de *M. potiuna* (raias 3 a 8) com o par de *primers* do gene PRL10 mostrando amplicons de ~300 pb. M corresponde ao marcador molecular 1 kb DNA Ladder Plus (Life Technologies). Controle negativo (raia 1) não contém o molde. Controle positivo (raia 2) feito com cDNA branquial de *Uca burgersi* amplificado com o par de *primers* do gene PRL10. As bandas <100 pb observadas em cada raia correspondem aos *primers* PRL10_Cs_F/ PRL10_Cs_R utilizados em saturação.

Figura 45. Eletroforese em gel de agarose a 1% do produto da PCR diagnóstica das culturas de *E. coli* (3-5 μ L do inóculo após crescimento por 16 h a 37 °C e 180 rpm) candidatas a conterem o fragmento de interesse (proteína ribossomal L10 [PRL10] ~300 pb) inicialmente amplificados a partir de cDNA branquial de *P. pandaliformis* (raias 3 a 5). M corresponde ao marcador molecular 1 kb DNA Ladder Plus (Life Technologies). Controle negativo (raia 1) não contém o molde. Controle positivo feito com cDNA branquial de *Uca burgersi* (raia 2).

Figura 46. Eletroforese em gel de agarose a 1% do produto da PCR diagnóstica das culturas de *E. coli* (3-5 μ L do inóculo após crescimento por 16 h a 37 °C e 180 rpm) candidatas a conterem o fragmento de interesse (simportador Na^+ , K^+ , 2Cl^- ~450 pb) inicialmente amplificados a partir de cDNA branquial de *M. brasiliense* (raias 2 e 3) e *M. amazonicum* (raias 4 e 5). M corresponde ao marcador molecular 1 kb DNA Ladder Plus (Life Technologies). Controle negativo (raia 1) não contém o molde.

Figura 47. Padrão de bandas que revelam a expressão proteica do simportador Na^+ , K^+ , 2Cl^- (131 kDa) e da subunidade Ab-5 da proteína normalizadora β -actina (42 kDa) das brânquias dos camarões marinho *P. northropi* e *P. pandaliformis*, e do camarão dulcícola diádromo *M. olfersi* na condição controle (18 ‰S em *P. northropi*, 17 ‰S em *P. pandaliformis* e água doce <0,5 ‰S em *M. olfersi* durante 120 h) e em exposição a salinidade elevada (35 ‰S em *P. northropi*, 32 ‰S em *P. pandaliformis*, 22 ‰S em *M. olfersi*) por 24 ou 120 h.