

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

Relação da arquitetura branquial e ultraestrutura das células íon-transportadoras nos mecanismos fisiológicos que permitiram a invasão de meio diluído pelos *Anomura* (Crustacea, Decapoda): *Aegla franca* (Schimitt) e *Clibanarius vittatus* (Bosc)

CLÁUDIA DOI ANTUNES

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

RIBEIRÃO PRETO - SP

2011



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

Relação da arquitetura branquial e ultraestrutura das células íon-transportadoras nos mecanismos fisiológicos que permitiram a invasão de meio diluído pelos Anomura (Crustacea, Decapoda): *Aegla franca* (Schimitt) e *Clibanarius vittatus* (Bosc)

CLÁUDIA DOI ANTUNES

Orientador: JOHN CAMPBELL MCNAMARA

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

RIBEIRÃO PRETO - SP

2011

Antunes, Cláudia Doi

Relação da arquitetura branquial e ultraestrutura das células íon-transportadoras nos mecanismos fisiológicos que permitiram a invasão de meio diluído pelos Anomura (Crustacea, Decapoda): *Aegla franca* (Schmitt) e *Clibanarius vittatus* (Bosc)

Ribeirão Preto, 2011

128 págs.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Biologia Comparada

Orientador: McNamara, John Campbell

Agradecimentos

Agradeço a todos que me ajudaram e apoiaram das várias maneiras possíveis. Seja em nível de suporte técnico, orientação, amizade, financiamento, tornar os dias agradáveis, conselhos, ouvidos, etc. Agradeço por ter tido a oportunidade de realizar este trabalho e por ter amadurecido após essa fase desafiadora de minha vida.

Agradeço:

Ao Programa de Pós-graduação em Biologia Comparada da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto.

À coordenadora da Pós-graduação em Biologia Comparada Prof. Dra. Márcia Gentile Bitonde.

Ao Prof. Dr. John Campbell McNamara pela oportunidade, orientação, pelas discussões e correções.

À FAPESP pelo auxílio financeiro e pela bolsa de mestrado concedida.

Ao Centro de Biologia Marinha da USP e seus técnicos por me ajudarem nas coletas.

Ao Laboratório de Microscopia Eletrônica da Unesp Jaboticabal e seus técnicos por me permitirem utilizar o microscópio eletrônico de transmissão.

Ao Prof. Dr. Marcos Rossi da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, pela gentileza ao dispor o microscópio eletrônico de transmissão e seu microscópio eletrônico de varredura, sem ele provavelmente não teria terminado esta dissertação.

Ao técnico Rodrigo Silva do Departamento de Química desta faculdade pelas dicas sobre o microscópio eletrônico de varredura.

Aos meus colegas e amigos do laboratório: Susie, Sarah, Rogério e Samuel. Sentirei muita falta de todos.

Aos meus colegas de bloco: Dona Nina e Álvaro.

À minha grande amiga Pâmela (Fô), uma das poucas pessoas que com a frase: "Calma, vai dar certo!" conseguia me acalmar nos momentos de ansiedade.

Aos meus amigos que me deram muitos momentos incríveis durante todo o período que passei nesta faculdade.

À Elaine Ribeiro pelos vários conselhos.

À minha família que eu amo e tanto me apóia. Vocês são os melhores!

Ao meu querido Bob que torce por mim, me incentiva e me dá forças para continuar lutando na vida.

"A única certeza é a de que não temos certeza"

Autor desconhecido

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1. Resumo / Abstract..... | 9 |
| 2. Introdução..... | 13 |
| 3. Objetivos..... | 29 |
| 3.1 Objetivo geral..... | 29 |
| 3.2 Objetivos específicos..... | 29 |
| 4. Material e Métodos..... | 31 |
| 4.1 Coleta e manutenção..... | 31 |
| 4.2 Coloração por prata..... | 33 |
| 4.3 Microscopia de varredura..... | 34 |
| 4.4 Preparação das brânquias para microscopia de varredura..... | 34 |
| 4.5 Análise ao microscópio eletrônico de varredura..... | 36 |
| 4.6 Preparação das brânquias para microscopia eletrônica de transmissão..... | 37 |
| 4.6.1 Grupos controle (A. franca em água doce / C. vittatus em 35 ‰) ... | 37 |
| 4.6.2 Grupos experimentais (A. franca em 25 ‰/ C. vittatus em 15 ‰) ... | 37 |
| 4.6.3 Fixação primária, lavagem e fixação secundária..... | 39 |
| 4.6.4 Desidratação, infiltração e inclusão em resina..... | 39 |
| 4.7 Microtomia..... | 40 |
| 4.8 Ultramicrotomia..... | 41 |
| 5. Resultados..... | 42 |
| 5.1 Organização geral das brânquias de Aegla franca..... | 42 |
| 5.2 Coloração por prata..... | 52 |
| 5.3 Microanatomia interna dos filamentos de A. franca..... | 54 |
| 5.4 Ultraestrutura das células epiteliais dos filamentos branquiais de Aegla franca..... | 59 |
| 5.5 Alterações na microanatomia e ultraestura do epitélio lamelar de Aegla franca aclimatados a uma salinidade elevada (água do mar 25 ‰)..... | 67 |
| 5.6 Organização geral das brânquias de Clibanarius vittatus..... | 71 |
| 5.7 Coloração por nitrato de prata..... | 80 |
| 5.8 Clibanarius vittatus em água do mar a 35 ‰..... | 81 |
| 5.8.1 Microanatomia interna das lamelas branquiais de C. vittatus..... | 81 |

| | |
|--|-----|
| 5.8.2 Ultraestrutura das células epiteliais das lamelas branquiais de <i>C. vittatus</i> | 86 |
| 5.9 Acclimação por 10 dias a uma salinidade reduzida (água do mar diluída a 15 ‰) | 94 |
| 5.9.1 Alterações na microanatomia do epitélio lamelar de <i>Clibanarius vittatus</i> | 94 |
| 5.9.2 Alterações na ultraestrutura do epitélio lamelar de <i>Clibanarius vittatus</i> | 99 |
| 6. Discussão..... | 109 |
| 6.1 <i>Aegla franca</i> | 110 |
| 6.2 <i>Clibanarius vittatus</i> | 116 |
| 6.3 Um assopro evolutivo | 121 |
| 7. Conclusão | 124 |
| 8. Bibliografia | 126 |

1. Resumo / Abstract

Os crustáceos exibem diversos padrões de regulação osmótica e são as brânquias que absorvem íons do meio externo mais diluído. As células branquiais que realizam o transporte iônico apresentam evaginações apicais e invaginações basais de membrana associadas à mitocôndrias, que fornecem ATP à Na^+/K^+ -ATPase, inserida nas invaginações basais. A Na^+/K^+ -ATPase é fundamental na regulação anisomótica extracelular. Objetivamos gerar conhecimento para a discussão das estratégias adaptativas funcionais que permitiram a ocupação de meio diluído pelos anomuros, a partir de informações sobre o tipo de brânquia e a ultraestrutura das células íon-transportadoras em *Aegla franca* (Aeglididae), forte hiperregulador, e *Clibanarius vittatus* (Diogenidae), fraco-hiperregulador. Os animais foram aclimatados no laboratório e os tecidos íon-transportadores localizados pela técnica de coloração por prata. As brânquias foram dissecadas, fixadas e avaliadas em nível de microscopia ótica, eletrônica de varredura e transmissão. *A. franca* apresenta tricobrânquias, e há diferenças funcionais entre as artrobrânquias e pleurobrânquias. A arquitetura do filamento branquial se dá por um epitélio simples, abaixo da cutícula, formado por células pilares nas regiões laterais. O septo divide o espaço da hemolinfa em canal aferente e eferente e formam as lacunas laterais. A presença de evaginações apicais e invaginações basais associados a mitocôndrias

sugere ocorrência de transporte iônico. Após aclimatação por 10 dias em água do mar a 25 ‰, não houve redução dessas estruturas subcelulares, o que sugere secreção de Cl⁻, já que esta espécie hiporregula cloreto nesta salinidade. *C. vittatus* apresenta filobrânquias e aparentemente as artrobrânquias possuem maior relevância na osmorregulação. A arquitetura se dá por um epitélio simples abaixo da cutícula, formado por células pilares e suas franjas, há um septo intralamelar. As estruturas celulares são poucas, raramente encontram-se mitocôndrias e as invaginações são muito escassas. O espaço subcuticular é pequeno e há desmossomos entre franjas adjacentes. A região do pericário é rica em invaginações basais e mitocôndrias. Após aclimatação por 10 dias em água do mar a 15 ‰ houve surgimento de numerosas invaginações de membrana e aumento de mitocôndrias no septo. Nas células pilares houve aumento das evaginações apicais, e os desmossomos apareceram seguidos de uma junção septada interdigitada. Essas mudanças estão relacionadas com o transporte ativo de sal em meio diluído, já que permitem alojar enzimas ionotransportadoras, e isto é o que aparentemente permite a penetração e permanência de *C. vittatus* em meio de baixa salinidade.

Palavras chave: osmorregulação, brânquias, ultraestrutura, Na⁺/K⁺-ATPase, *Anomura*

Crustaceans exhibit different patterns of osmotic regulation and are the gills that absorb ions from the external environment more diluted. The gill cells that carry out ion transport present apical evaginations and basal membrane invaginations associated with mitochondria, which provide ATP to Na⁺/K⁺-ATPase inserted in the basal infoldings. The Na⁺/K⁺-ATPase is critical in extracellular anisosmotic regulation. We aim to generate knowledge for the discussion of functional adaptive strategies that allowed the occupation of dilute medium by Anomura, from information about the gill type and ion-transporting cells ultrastructure in *Aegla franca* (Aeglididae), strong-hyperregulator and *Clibanarius vittatus* (Diogenidae), weak-hyperregulator. The animals were acclimated in the laboratory and ion-transporters tissues located by silver staining technique. Gills were dissected, fixed and evaluated at the optical microscopy, scanning electron and transmission. *A. franca* presents trichobranchia, and there are functional differences between the arthrobranchias and pleurobranchias. The architecture of the gill filament is given by a simple epithelium, below the cuticle, formed by pillar cells on the lateral sides. The septum divides the hemolymph space in the afferent and efferent channels and forms lateral gaps. The presence of apical evaginations and basal invaginations associated with mitochondria suggests the occurrence of ion transport. After acclimatization for 10 days in seawater at 25 ‰ S, no reduction of these sub cellular structures happened, which suggests secretion of Cl⁻, since

this specie hyporegulates chloride in this salinity. *C. vittatus* presents phyllobranchia and apparently the arthrobranchias have greater relevance in osmoregulation. The architecture is given by a simple epithelium under the cuticle, formed by pillar cells and its flanges, there is an intralamelar septum. The cellular structures are few, rarely are mitochondria and infoldings are very scarce. The subcuticular space is small and there are desmosomes between adjacent flanges. The perikaryum region is rich in basal invaginations and mitochondria. After acclimatization for 10 days in seawater at 15 ‰ S had the emergence of numerous membrane invaginations and increase of mitochondria number in the septum. In pillar cells showed an increase in apical evaginations and desmosomes appeared followed by a septate junction intercalated. These changes are related to salt active transport in dilute medium, as they allow host ion-transport enzymes, and apparently this is what allows the penetration and retention of *C.vittatus* in the low salinity medium.

Words key: *osmoregulation, gills, ultrastructure, Na⁺/K⁺-ATPase, Anomura*

2. Introdução

Os crustáceos ocupam uma grande variedade de ambientes aquáticos, inclusive aqueles onde a salinidade pode mudar substancialmente ao longo do dia, como estuários e a zona entre-marés (Mantel e Farmer, 1983; Péqueux, 1995; Taylor e Taylor, 1992). De uma maneira geral, a salinidade do fundo dos oceanos permanece estável, entre 34-35 ‰, já a superfície sofre variação devido às precipitações pluviométricas e à evaporação. As zonas costeiras recebem águas de rios, sendo que nos estuários a salinidade pode variar entre seus limites máximo e mínimo diversas vezes num mesmo dia. Lagoas também são ambientes que sofrem com a variação da salinidade. No entanto, todos os habitats nesse meio variável abrigam uma ampla diversidade de espécies de crustáceos, inclusive aqueles onde a água apresenta baixa salinidade e também onde há apenas água doce, como rios, riachos e lagos. Ainda deve-se mencionar as espécies anfíbios, semi-terrestres e terrestres que são particularmente bem sucedidas (Thurman, 2003).

Tal distribuição dos Crustáceos é subsidiada pelo fato que estes exibem muitos padrões de regulação osmótica, sendo aqueles que toleram uma limitada variação osmótica e iônica do meio externo designados estenoalinos, e os que apresentam tolerância a amplas variações de salinidade designados eurialinos (Mantel e Farmer, 1983; Péqueux, 1995). A relação mantida entre a osmolalidade do fluido extracelular ou interno e a externa do meio ambiente é normalmente

expressa em termos de grau de osmoconformação e/ou osmorregulação. Em um osmoconformador a concentração osmótica interna acompanha a do meio externo ao longo de exposição a diferentes salinidades. Em espécies osmorreguladoras a concentração osmótica interna se mantém relativamente constante, superior (hiperosmótica) ou inferior (hiposmótica) à do meio externo (Mantel e Farmer, 1983; Péqueux, 1995). Ocorrem ainda vários padrões de capacidade regulatória intermediária, e também padrões mistos, de hiper- e hipo-regulação.

Em água doce, todos os crustáceos são hiperosmóticos em relação ao seu meio externo, e ainda, são confrontados com a constante perda difusiva de íons e ganho osmótico de água (Péqueux, 1995; Freire et al, 2008). Esses fluxos se dão pelos epitélios em contato direto ou indireto com o meio externo, como a parede do corpo, o intestino, os órgãos excretores e particularmente as brânquias (Péqueux, 1995). Ainda, são amenizados pela redução da permeabilidade à água e/ou íons. Embora produzam urina isosmótica à hemolinfa de modo geral, alguns lagostins e certos camarões são capazes de produzir uma urina hiposmótica à hemolinfa ao excretar a carga hídrica. Além disso, crustáceos de água doce apresentam uma notável capacidade de captura ativa compensatória de íons do meio externo (Mantel e Farmer, 1983; Péqueux, 1995). Dentro da câmara branquial encontram-se as brânquias, órgãos que funcionam como uma interface seletiva que

absorve íons como Na^+ , Cl^- e Ca^+ do meio externo mais diluído (Mantel e Farmer, 1983; Taylor e Taylor, 1992; Péqueux, 1995; Kirscher, 2002; Freire et al, 2008)

O número de pares de brânquias varia muito entre as espécies, sendo estas inseridas próximas à base dos apêndices torácicos: 3 pares de maxilípedes e 5 pares de pereiópodos. Dependendo do local de sua inserção, as brânquias podem ser distinguidas como pleurobrânquia, quando inserida à parede do corpo acima da base do membro; artrobrânquia, inserida na membrana artrodial entre a parede do corpo e a coxa; e podobrânquia, inserida na própria coxa (Figura 1). No entanto, essa diferenciação em ponto de inserção não corresponde necessariamente à diferenciação microanatômica ou funcional entre as brânquias. Ainda, outra estrutura, o epipodito, pode estar presente na coxa e pode formar um apêndice comum com a podobrânquia. Exerce papel como um acessório importante na ventilação e na manutenção das brânquias (Taylor e Taylor, 1992; Freire et al, 2008), bem como órgão transportador de íons em algumas espécies (Haond et al, 1998).

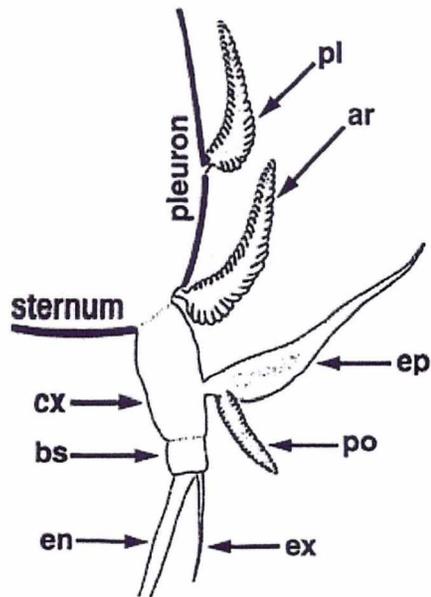


Figura 1. Esquema ilustrando os diferentes locais de inserção das brânquias em crustáceos decápodes. O lado direito das partes lateral e ventral da parede do corpo do cefalotórax (pleura e esterno) está desenhado de forma a ilustrar os pontos de inserção da artrobrânquia, pleurobrânquia e podobrânquia. (**cx**) coxa; (**bs**) base; (**en**) endopodito; (**ex**) exopodito; (**ep**) epipodito; (**po**) podobrânquia; (**ar**) artrobrânquia; (**pl**) pleurobrânquia (Hong, 1988).

O tipo de amplificação da área de superfície das brânquias que dá origem a morfologias variadas também difere bastante entre os decápodes e permite uma classificação adicional das brânquias (Figura 2). As dendrobrânquias ocorrem em camarões Peneídeos e Sergestídeos. O eixo central dessas brânquias sustenta lâminas bi-seriais secundárias as quais se curvam ao redor e se encontram na ponta. Filamentos terciários se projetam dessas lâminas e se bifurcam pelo

menos duas vezes (Figura 2 A). As tricobrânquias são encontradas, por exemplo, em Parastacidae e Palinura. Nessas brânquias o eixo central sustenta numerosos filamentos tubulares não ramificados. As brânquias são bilateralmente simétricas e os filamentos se encontram alinhados em fileiras (Figura 2 B). As filobrânquias são encontradas na maioria dos braquiúros, alguns anomuros, galatheídeos e camarões carídeos. O eixo central é aplanado e sustenta lamelas achatadas em cada lado do eixo (Figura 2 C). Separações regulares são mantidas por fileiras de nódulos nas margens e/ou algumas vezes no meio das lamelas.

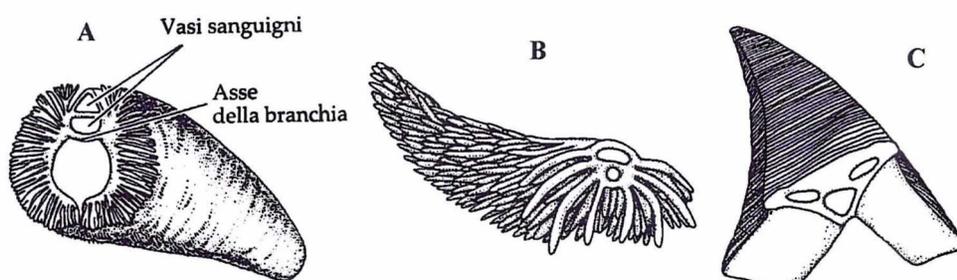


Figura 2. Esquemas representando os diferentes tipos morfológicos de brânquias de crustáceos decápodes. A) Dendrobrânquia. B) Tricobrânquia. C) Filobrânquia. (Ruppert e Barnes, 2005).

Os crustáceos decápodes são primariamente aquáticos e são revestidos por um exoesqueleto quitinoso. A elevada permeabilidade de suas brânquias os predispõem a trocas gasosas e a fluxos passivos e ativos de íons, amônia e outros solutos. Estudos que empregam a

deposição de prata associada ao cloreto (Morse et al, 1970; Dickson et al, 1991; Taylor e Taylor, 1992) localizaram outros órgãos dentro da câmara branquial como branquiostegito e epipoditos que também participam do processo de transporte iônico. Dessa forma, as brânquias e os branquiostegitos, podem contribuir concomitantemente aos processos respiratórios, osmótico e iônico, excretório e de regulação ácido-base (Dickson et al, 1991; Taylor e Taylor, 1992; Haond et al, 1998; Lignot et al, 1999).

Muitos estudos têm investigado as estruturas osmorregulatórias de crustáceos. A maioria foi realizada nos Brachyura devido à sua disponibilidade e pelo fato de constituir um modelo adequado para investigações da osmorregulação, já que muitos são fortes hiperosmorreguladores (Copeland e Fitzjarrel, 1968; Luquet et al, 1997; Martinez et al, 1999; Genovese et al, 2000; Onken e McNamara, 2002; Luquet et al, 2002; Augusto et al, 2007; Antunes e McNamara, 2008). Nos caranguejos, as brânquias são diferenciadas em anterior e posterior, sendo que as anteriores, revestidas de epitélio fino, realizam predominantemente os processos de troca gasosa, e as posteriores, caracterizados por um epitélio espesso, efetuam o processo de transporte iônico (Taylor e Taylor, 1992; Péqueux, 1995; Freire et al, 2008). Nos camarões palemonídeos não há distinção do epitélio branquial em anterior/posterior, fino/espesso. O epitélio que constitui as lamelas está organizado de forma que o espesso septo intralamelar contínuo se

conecta com as células pilares, ambos desempenhando papel nas trocas iônicas (Freire e McNamara, 1995; McNamara e Lima, 1997; McNamara e Torres, 1999; Belli et al, 2009). Nos crustáceos tricobranquiados não é evidente uma separação espacial das funções das brânquias e as outras estruturas dentro da câmara branquial (Taylor e Taylor, 1992).

As células que realizam o transporte iônico (Figura 3), independentemente de sua localização, se caracterizam por apresentar uma superfície apical com evaginações de membrana que aumentam em muito sua área de superfície, e uma superfície basal caracterizada por profundas invaginações de membrana às quais se associam mitocôndrias (Copeland e Fitzjarrel, 1968; Taylor e Taylor, 1992; Péqueux, 1995; Freire et al, 2008). A Na^+/K^+ -ATPase, que é uma proteína íon-transportadora, se localiza nas membranas das invaginações basais que faceam a hemolinfa (Towle e Kays, 1986; McNamara e Torres, 1999; Lignot e Charmantier, 2001). As mitocôndrias fornecem o ATP que sustentam a atividade hidrolítica desta enzima (Pequex, 1995, Masui et al, 2005).

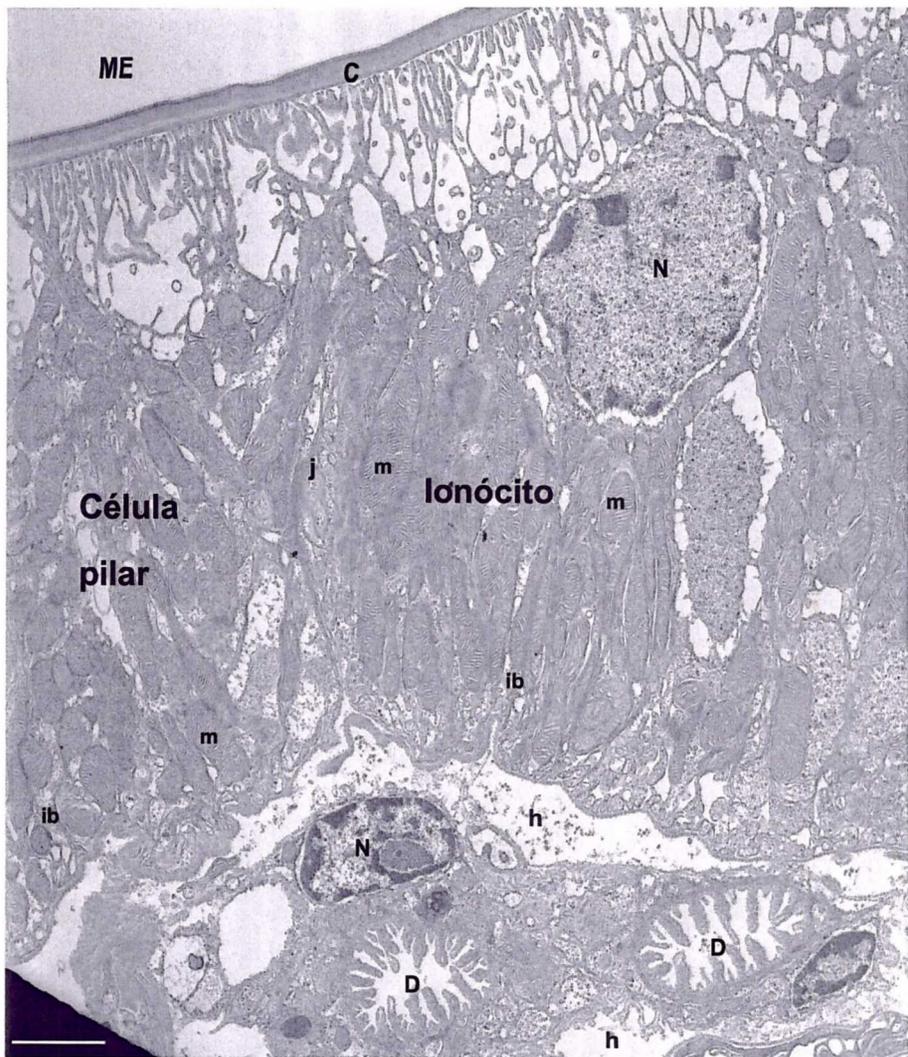


Figura 3. Transecto do epitélio espesso de um siri-azul, *Callinectes danae*, aclimatado a meio diluído de 15 ‰, ilustrando a organização ultraestrutural do epitélio. Célula pilar, ionócito, espaço da hemolinfa (h) e septo (s). Junção (j) entre célula pilar e ionócito, espaço subcuticular (es), invaginações basais (i) nos ionócitos, ductos (D) no septo, espaço da hemolinfa (h), mitocôndrias (m), núcleo (N), cutícula (C) e meio externo (ME) Barra de escala = 1,5 µm (Antunes e McNamara, 2008).

Nos modelos de regulação anisomótica extracelular desenvolvidos em crustáceos fortes hiperreguladores, que penetram em água doce, o mecanismo de transporte de sal se encontra ativo. O circuito formado entre o efluxo de K^+ das células epiteliais para a hemolinfa, por gradiente de concentração, através dos canais de K^+ nas membranas das invaginações basais, e a Na^+/K^+ -ATPase que transporta 3 Na^+ do citosol para a hemolinfa e 2 K^+ da hemolinfa para o citosol, contribui para gerar uma diferença de potencial elétrico negativo no citosol basal das células (Figura 4). A enzima anidrase carbônica intracelular, produz H^+ e HCO_3^- a partir de $H_2O + CO_2$ presentes no citosol. A bomba de prótons ou a V-ATPase, presente nas membranas das evaginações apicais, ao transportar os prótons H^+ , oriundos da hidratação do CO_2 , para o meio externo faz com que o HCO_3^- que acumula intracelularmente possa ser trocado via o antiportador apical Cl^-/HCO_3^- , ocasionando a absorção apical de Cl^- (Figura 4). O Cl^- que se acumula no citosol sai pelos canais de Cl^- presentes nas invaginações basais. A saída de prótons (cargas positivas) devido à atividade da V-ATPase, produz uma diferença de potencial no citosol apical, impulsionando por gradiente elétrico a entrada de Na^+ para o citosol via canais de Na^+ sensíveis a amiloride presentes nas membranas das evaginações apicais. O Na^+ segue para a hemolinfa (meio extracelular) via a Na^+/K^+ -ATPase localizada nas invaginações da

membrana basal (Figura 4) (Onken e Riestenpatt, 1998; Zare e Greenaway, 1998; Freire et al., 2008) (Figura 4).

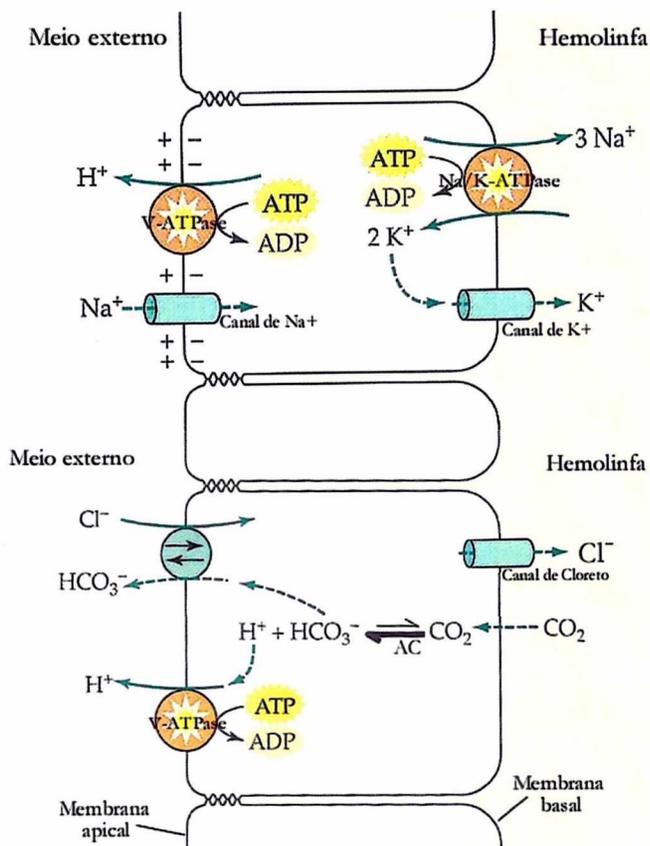


Figura 4. Modelo de regulação anisomótica extracelular em crustáceo forte hiper-regulador. A atividade da Na^+/K^+ -ATPase, sustentada pelo canal basal de K^+ , proporciona um gradiente elétrico negativo no citosol basal e transporta o Na^+ que entrou via canal apical para a hemolinfa ocasionado pela atividade da V-ATPase. A anidrase carbônica (AC) acelera a produção de H^+ e HCO_3^- proporcionando o acúmulo dos mesmos no citosol. A V-ATPase bombeia os prótons para o meio externo e o $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ ao transportar o HCO_3^- para fora da célula concomitantemente transporta Cl^- para o citosol. O Cl^- segue para a hemolinfa via canal basal de Cl^- .

No modelo de transporte ativo em fracos hiperreguladores, que não penetram em água doce, a chave é o co-transportador eletroneutro $\text{Na}^+/\text{K}^+/2\text{Cl}^-$ na membrana apical. Canais de K^+ apicais hiperpolarizam a negatividade celular apical e suprem o co-transportador $\text{Na}^+/\text{K}^+/2\text{Cl}^-$ com o K^+ . A diferença de potencial positiva gerada através da membrana apical com o citosol pelo K^+ pode servir como uma força que dirige a absorção paracelular de Na^+ . A atividade da Na^+/K^+ -ATPase na membrana basal gera o gradiente de Na^+ para o meio extracelular, a hemolinfa. Neste modelo parte da absorção eletroneutra de NaCl também depende de um suprimento de H^+ e HCO_3^- gerados pela hidratação de CO_2 pela anidrase carbônica (AC) e ocorre via anti-portadores Na^+/H^+ e anti-portadores $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ apicais (Figura 5) (Onken et al, 2003; Freire et al, 2008). Ainda é incerto se o aumento no nível de atividade da Na^+/K^+ -ATPase em meio diluído é resultado de nova síntese dessa proteína, ou devido a um processo pós-transcricional ou aumento da velocidade da atividade enzimática (Towle et al, 2001; Masui et al, 2005).

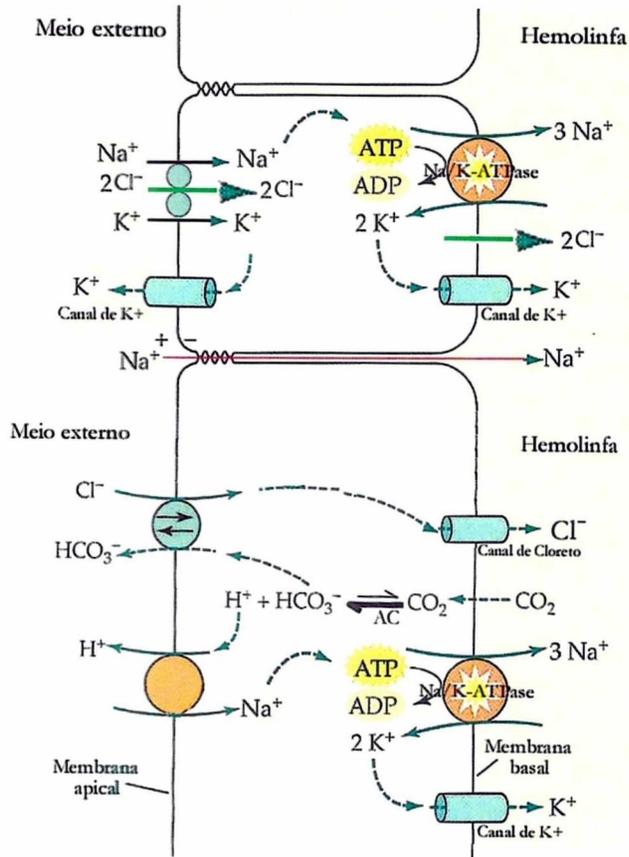


Figura 5. Modelo de regulação anisomótica extracelular em fraco-hiperregulador. Presença do co-transportador $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ na membrana apical. O K^+ que entra sai novamente para o meio externo por canais de K^+ apical. O Na^+ que entra no citosol segue para a hemolinfa via a Na^+/K^+ -ATPase. Também há H^+ e HCO_3^- gerado pela atividade da anidrase carbônica (AC) que suprem os anti-transportadores Na^+/H^+ e $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ apicais responsáveis pela absorção eletroneutra de Na^+ e Cl^- . Há passagem paracelular de Na^+ .

Nos braquiúros hiperreguladores as células íon-transportadoras respondem com marcantes alterações morfológicas quando estes são

aclimatados em meio diluído, apresentando considerável plasticidade ultraestrutural, embora a arquitetura do epitélio não se modifique. Em *Carcinus maenas* (Compère et al, 1989), *Uca uruguayensis* (Luquet et al, 1997), *Chasmagnathus granulatus* (Genovese et al, 2004) e *Callinectes danae* (Antunes e McNamara, 2008), ocorre um espessamento do epitélio com o desenvolvimento das evaginações apicais e invaginações basais que aumentam em número e comprimento. Há também aumento no número de mitocôndrias, as quais fornecem o ATP usado na atividade fosfolipídica da Na⁺/K⁺-ATPase em baixa salinidade (Burnet e Towle, 1990; Masui et al, 2002; Lucu e Towle, 2003; Masui et al, 2005; Leone et al, 2005; Freire et al, 2008).

A infraordem dos Anomura é a mais diversificada morfologicamente e ecologicamente dentre a ordem dos Decapoda. Ela possui representantes que habitam biótipos dos mais variados com espécies adaptadas a ambientes terrestres ou semi-terrestres, outras restritas à água doce e ainda espécies exclusivamente marinhas ou estuarinas (Melo, 1999; Forest et al, 2000; Scelzo et al, 2004). Dentro deste grupo encontram-se as espécies *Aegla franca* (Aeglidae) e *Clibanarius vittatus* (Diogenidae) que estudamos aqui.

A família Aeglidae, com um único gênero representante, *Aegla*, são únicos do ponto de vista ecológico, pois constitui a única família de Anomura restrito à água doce. Biogeograficamente a família é endêmica da região temperada da América do sul, e possui morfologia

típica e única (Martin e Abele, 1986). Atualmente são conhecidas 61 espécies, registradas desde a Ilha de Madre de Dios, Última Esperanza, Chile, até o município de Franca, São Paulo, Brasil. São encontradas desde 320 metros de profundidade, em lagos chileno, e até 4500 metros de altitude na Cordilheira dos Andes. Durante o dia vivem abrigados sob rochas e restos vegetais provenientes da mata ciliar, e durante a noite saem para se alimentar. Geralmente formam apenas populações pequenas (Bond-Buckup e Buckup, 1994; Pérez-Lousada et al, 2002; Bond-Buckup, 2003; Teodósio, 2007). A classificação tradicional remetia os aeglídeos próximos aos galateídeos marinhos, porém, sabe-se que as brânquias de *Aegla* são tricobrânquias e a sua carapaça é subdividida por uma série de suturas. Dessa forma, essas e outras características os colocam com grau de parentesco mais próximo aos caranguejos ermitões (Martin e Abele, 1986; Teodósio, 2007).

A descrição original de *Aegla franca* (Schmidt, 1942) foi feita com base em espécimes coletados em 1910 no município de Franca, São Paulo. Até recentemente nenhuma amostra de *A. franca* havia sido coletada em detrimento da degradação ambiental na região nas últimas décadas. No entanto, há pouco tempo houve a redescoberta de populações sobreviventes. Atualmente a ocorrência conhecida de *A. franca* é limitada a seis pequenos córregos, sendo a área de ocupação da espécie fragmentada (Bueno et al, 2007). Para a família Aeglidae, *A. franca* representa o limite setentrional de sua distribuição

geográfica, e sua área restrita de ocupação levou esta espécie a ser incluída na categoria 'vulnerável' de espécies em extinção (Bueno et al, 2007).

A. Franca é um forte hiper-osmorregulador, a osmolalidade de sua hemolinfa é 410 mOsm/kg de H₂O e apresenta 203 mM de Cl⁻ em água doce (Faria et al, 2010). Apesar de habitar ambiente de água doce, esta espécie é capaz de sobreviver em salinidades de até 28 ‰ (Faria et al, 2010). *A. franca* hiper-osmorregula bem sua hemolinfa até 15 ‰, a partir daí sua osmorregulação é fraca até o ponto isosmótico (916 mOsm/ kg de H₂O, 31 ‰) (Faria et al, 2010).

Clibanarius vittatus (Bosc, 1802), um hermitão da família Diogenidae, habita as conchas vazias de gastrópodes. Distribui-se desde a costa atlântica da América do Norte até o Atlântico Sul, sendo comumente encontrado em praias e mangues (Narchi, 1973). É uma das espécies de diogenídeo mais tolerante às alterações de salinidade do meio, sendo encontrado em ambientes com ampla variação da salinidade (Sharp e Neff, 1979). É sabido que em populações da América do Norte ocorre migração sazonal para as águas mais profundas durante o inverno, comportamento que protege estes animais das águas superficiais que apresentam temperaturas muito baixas (Fotheringham, 1975). Também ocorre segregação sexual causada por essa migração diferencial entre os sexos (Lowery e Nelson, 1988). Diferentemente de outros hermitões como *Pagurus bernhardus*,

um osmoconformador (Shumway, 1978), que pela concha regula melhor a osmolalidade da hemolinfa e o teor de água nos tecidos do que quando desprovido desta, *C. vittatus* não apresenta resposta osmótica diferente dentro ou fora da concha, diante da flutuação da salinidade externa (Sabourin e Stickle, 1980). Young (1979) e Sharp e Neff (1980) demonstram que populações de *C. vittatus* de regiões distintas, o estuário de North Inlet, Estados Unidos e a Costa do Golfo do México, apresentam as respostas osmorregulatórias semelhantes e correspondem ao padrão de crustáceos eurialinos, hiperreguladores em meio diluído.

C. vittatus hiper-osmorregula bem sua hemolinfa em meios diluídos de 5, 10 e 15 ‰, (575 mOsm/kg de H₂O, 641 mOsm/kg de H₂O, 645 mOsm/kg de H₂O respectivamente), acima de 15 ‰ há o aumento na osmolalidade da hemolinfa de acordo com o aumento da salinidade do meio externo, apresenta fraco poder osmorregulatório. Até a salinidade de 50 ‰ a hemolinfa de *C. vittatus* encontra-se levemente hiperosmótica em relação ao meio externo (Sharp e Neff, 1980).

3. Objetivos

3.1 Objetivo geral

Estudos realizados em nosso laboratório demonstraram que *Aegla franca* (Schmitt, 1942) é capaz de sobreviver em água do mar a 25‰ S, e ainda, se comporta como um hiperregulador em salinidades até essa concentração (Faria et al, 2010). *Clibanarius vittatus* (Bosc) um hiperregulador, capacidade osmorregulatória semelhante à de espécies de brachyúros hiperreguladores (Young, 1979, Sabourin e Stickle, 1980). Buscando os subsídios morfológicos da capacidade de regulação anisomótica extracelular já conhecida para fortes e fracos hiperreguladores, investigamos aqui a arquitetura das brânquias e a ultraestrutura do epitélio branquial em *Aegla franca* e *Clibanarius vittatus*. Objetivamos gerar conhecimento para a discussão e compreensão das estratégias adaptativas funcionais que permitiram a ocupação de meio diluído pelos crustáceos decápodes anomuros, a partir de informações sobre o tipo de brânquia e a ultraestrutura das células íon-transportadoras nessas duas espécies de Anomura.

3.2 Objetivos específicos

- Caracterizar as brânquias em tricobrânquia, dendrobrânquia ou filobrânquia e averiguar a localização da sua inserção em cada espécie.
- Identificar os epitélios íon-transportadores pela técnica de coloração por prata.

- Caracterizar detalhadamente a arquitetura superficial e sua organização por meio de microscopia eletrônica de varredura.
- Caracterizar a arquitetura do epitélio branquial por microscopia de luz.
- Proporcionar uma descrição ultraestrutural minuciosa das células do epitélio branquial responsável pela iono-osmorregulação por microscopia eletrônica de transmissão.
- Comparar a ultraestrutura dessas células em animais aclimatados a meio salino diferente daquele do habitat usual com a de animais mantidos no seu meio normal.

4. Material e Métodos

4.1 Coleta e manutenção

As coletas de *Aegla franca* e *Clibanarius vittatus* foram realizadas com a autorização do IBAMA (licença 18559-1, Registro 3594969) respectivamente no município de Claraval, MG, Fazenda Barro Preto, 20° 18' 47'' S e 47° 16' 37'' O, e no Mangue do Araçá, 23° 48' 55'' S e 45° 24' 29'' O, localizado no Canal de São Sebastião, litoral norte de São Paulo, respectivamente.

As coletas de *Aegla franca* foram realizadas no período de janeiro a maio de 2009. Os aeglídeos foram capturados em um pequeno riacho (Figura 6) debaixo das pedras utilizando-se peneiras. Foram coletados cerca de 15 animais, de aproximadamente 3 a 4 cm de comprimento. O transporte até o laboratório foi realizado em galões de 30 l contendo água do local da coleta, arejados com bombas a pilha. No Laboratório de Fisiologia de Crustáceos, do Departamento de Biologia, da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto (FFCLRP-USP), os animais foram depositados em tanques plásticos contendo aproximadamente 60 l de água de mina (grupo controle), aerada continuamente. Foram alimentados a cada 2 dias com carne bovina e pequenos pedaços de cenoura. Num segundo momento outros exemplares foram transferidos para água salgada a 25 ‰ (grupo experimental) e tratados da mesma maneira.



Figura 6. Foto de trecho típico do riacho na Fazenda Barro Preto, município de Claraval (MG), local onde foi coletado *Aegla franca*.

As coletas de *C. vittatus* foram realizadas no período de fevereiro a março de 2010. Os hermitões foram capturados manualmente durante os períodos de maré baixa (Figura 7). Foram coletados cerca de 20 animais e estes foram transportados até o Laboratório de Fisiologia de Crustáceos, do Departamento de Biologia, da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto (FFCLRP-USP). Os animais foram depositados em tanques plásticos contendo aproximadamente 60 l de água do mar 35 ‰ (grupo controle), trazidos do local de coleta, aerada continuamente, sendo alimentados a cada 2 dias com carne bovina. Após aclimação por 3 dias, foram fixados para análise, e os exemplares do grupo experimental foram transferidos para água do mar diluído (15 ‰), onde permaneceram por 10 dias e tratados da mesma maneira.



Figura 7. Foto do mangue do Araçá durante maré baixa, no Canal de São Sebastião, litoral norte de São Paulo, local onde foi coletado *Clibanarius vittatus*.

Primeiramente os espécimes de *Aegla franca* e *Clibanarius vittatus* foram visualizados em lupa a fim de se conhecer e obter uma noção geral da organização das brânquias.

4.2 Coloração por prata

Tanto *A. franca* quanto *C. vittatus* advindos diretamente da água de seus respectivos ambientes de coleta foram corados com nitrato de prata antes de se avaliar a micro- e a ultraestrutura das brânquias de ambas as espécies. Utilizada para localizar e identificar rapidamente epitélios que realizam transporte iônico, essa técnica escurece seletivamente as áreas de superfície que são permeáveis ao cloreto e onde se depositam íons de prata. Tais áreas são muitas vezes os próprios sítios de transporte iônico (Koch, 1934). Os íons de cloreto ao longo do epitélio do animal se combinam com os íons de prata, de uma solução

de AgNO_3 , e forma AgCl_2 . O revelador fotográfico reage com os sais de prata enegrecendo a região.

Espécimes intactos de ambas as espécies foram lavadas por 5 minutos em água destilada para remover íons, ficaram submersos por 10 minutos em solução 0,05% de AgNO_3 , e, submersos por 5 minutos em revelador Kodak Dektol. Por fim foram lavados novamente em água destilada.

Retirou-se a carapaça dorsal de ambas as espécies e as brânquias foram analisadas e fotografadas em Lupa Leica MZ 16 acoplado a uma câmera Leica DFC 500, usando software IM 50 Versão 5 Release 247 no Laboratório de Entomologia da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

4.3 Microscopia de varredura

Foi utilizada a microscopia de varredura com o intuito de se proporcionar uma visualização geral e também detalhada da arquitetura de superfície e da organização das brânquias de *Aegla franca* e *Clibanarius vittatus*.

4.4 Preparação das brânquias para microscopia de varredura

Para *A. franca* foi preparada uma solução fixadora primária, de pressão osmótica efetiva (POE) de 485 mOsm/kg de H_2O , composta de KCl 5 mM, MgCl_2 1 mM, CaCl_2 1 mM, NaCl 19,3 mM, glutaraldeído 300 mM e p-formaldeído 200 mM, tamponada com cacodilato de sódio

100 mM. Também foi preparada uma solução estoque em concentração dupla contendo KCl 10 mM, MgCl₂ 2 mM, CaCl₂ 2 mM e NaCl 270 mM, tamponada com cacodilato de sódio 200 mM, para compor a solução de lavagem e o fixador secundário (POE = 970 mOsm/kg de H₂O). O pH foi ajustado a 7,4 para todas as soluções.

Para a solução de lavagem, a solução estoque (2x) foi diluída 1:1 com água destilada. Para obter o fixador secundário a solução estoque (2x) foi diluída 1:1 com tetróxido de ósmio 2% em água destilada.

Os espécimes a serem examinados permaneceram em gelo picado por aproximadamente 1 h a fim de anestesiá-los. Foi retirada a carapaça dorsal e dissecados o conjunto de brânquias do quarto pereiópodo, ou seja, uma artrobrânquia anterior, uma pleurobrânquia e uma artrobrânquia posterior, apenas do lado direito. Foi retirado também todo o conjunto branquial do lado esquerdo do animal. A dissecação foi realizada super-perfundindo constantemente as brânquias com o fixador primário sob placa de Petri preenchida com parafina sobre gelo picado.

As brânquias foram fixadas por 1 h a 4 °C em fixador primário, e em seguida foram lavadas sobre gelo por três vezes, por 5 min cada em solução de lavagem. Na fixação secundária, as brânquias permaneceram imersas durante 1 h em recipientes sobre gelo contendo

o fixador secundário (tetróxido de ósmio a 1 % em tampão cacodilato 1:1).

Durante a desidratação, as brânquias passaram em etanol a 50, 70 e 95 % durante 10 min cada, e duas vezes em etanol a 100 % durante 15 min cada. A desidratação em aparelho de ponto crítico de secagem com dióxido de carbono líquido e o recobrimento com ouro-paládio por 120 s foram realizados no Laboratório de Microscopia Eletrônica da UNESP em Jaboticabal.

Os procedimentos para *Clibanarius vittatus* foram os mesmos, porém a solução fixadora primária preparada foi de POE de 1200 mOsm/kg de H₂O, composta de KCl 15 mM, MgCl₂ 25 mM, CaCl₂ 15 mM, NaCl 210 mM, glutaraldeído 350 mM e p-formaldeído 200 mM, tamponada com cacodilato de sódio 100 mM. Também foi preparada uma solução estoque de concentração dupla contendo KCl 30 mM, MgCl₂ 50 mM, CaCl₂ 30 mM e NaCl 420 mM, tamponada com cacodilato de sódio 200 mM, para compor a solução de lavagem e o fixador secundário (POE = 2400 mOsm/kg de H₂O). Foram dissecados uma câmara branquial inteira e a 8ª, 9ª e 13ª brânquias.

4.5 Análise ao microscópio eletrônico de varredura

As análises das brânquias de *Aegla franca* foram realizadas no Laboratório de Microscopia Eletrônica de Varredura, do Departamento de Química da FFCLRP-USP, empregando-se um microscópio de varredura Zeiss, modelo EVO 50, em alto vácuo a 10⁻⁵ torr.

As análises das brânquias de *C. vittatus* foram realizadas no microscópio de varredura Zeiss, em alto vácuo a 10^{-5} torr, no Laboratório de Patologia Cardíaca do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

4.6 Preparação das brânquias para microscopia eletrônica de transmissão

4.6.1 Grupos controle (*A. franca* em água doce / *C. vittatus* em 35 ‰S)

Foram preparados um fixador primário, ($POE_{A.franca} = 485$ mOsm/kg de H_2O ; $POE_{C.vittatus} = 1200$ mOsm/kg de H_2O) e uma solução tampão estoque em concentração dupla ($POE_{A.franca} = 970$ mOsm/kg de H_2O ; $POE_{C.vittatus} = 2400$ mOsm/kg de H_2O) para a solução de lavagem e o fixador secundário.

As concentrações dos sais, aldeídos e tampão foram as mesmas utilizadas para as soluções fixadoras na microscopia eletrônica de varredura de ambas as espécies (ver seção 3.4). O pH das soluções foram ajustados a 7,4.

4.6.2 Grupos experimentais (*A. franca* em 25 ‰S/ *C. vittatus* em 15 ‰S)

O fixador primário para *Aegla franca* aclimatado em água a 25 ‰S, $POE_{A.franca} = 800$ mOsm/kg de H_2O , continha KCl 10 mM, $MgCl_2$ 2 mM, $CaCl_2$ 2 mM, NaCl 180 mM, Glutaraldeído 300 mM e P-formaldeído 200 mM tamponado com 100 mM de cacodilato de sódio. Para *C. vittatus* aclimatado em água do mar diluída em 15 ‰S, $POE_{C.vittatus} = 700$ mOsm/kg de H_2O o fixador continha, KCl 10 mM, $MgCl_2$ 20 mM, $CaCl_2$ 10

mM, NaCl 75 mM, Glutaraldeído 350 mM e P-formaldeído 200 mM tamponado com 100 mM de cacodilato de sódio. O pH das soluções foi ajustado a 7,4.

A solução tampão estoque (2x) de *Aegla franca*, $POE_{A.franca} = 800$ mOsm/kg de H₂O, continha o dobro da concentração dos sais acima citados adicionado 630 mM de NaCl e tampão cacodilato de sódio 200 mM. Para *C. vittatus* (2x), $POE_{C.vittatus} = 700$ mOsm/kg de H₂O, continha o dobro da concentração dos sais acima citados adicionado 300 mM de NaCl e tampão cacodilato de sódio 200 mM.

Para preparação da solução de lavagem, a solução tampão estoque (2x) foi diluída 1:1 com água destilada. Para preparar o fixador secundário a solução tampão estoque (2x) foi diluída 1:1 com tetróxido de ósmio a 2 % em água destilada. Em todas as soluções o pH também foi ajustado a 7,4.

Para anestesiá-los os espécimes estes permaneceram em gelo picado por 3 min antes de ser realizada a dissecação. Em *A. franca* a carapaça dorsal foi retirada e foi dissecado o conjunto de brânquias do segundo e do quarto pereiópodo, ou seja, duas artrobrânquias anteriores, duas pleurobrânquias e duas artrobrânquias posteriores, sob placa de Petri preenchida com parafina sobre gelo. Em *C. vittatus* foram dissecados as 8^a, 9^a e 13^a brânquias. As conchas foram primeiramente trincadas utilizando-se uma morsa e dessa forma os

animais eram retirados. A dissecação inicial foi feita rapidamente, superfundindo as brânquias com fixador primário.

4.6.3 Fixação primária, lavagem e fixação secundária

As brânquias foram fixadas por 1 h e 30 min a 4 °C em fixador primário, em seguida foram lavadas sobre gelo por três vezes, por 5 min cada em solução de lavagem. Na fixação secundária, as brânquias permaneceram imersas durante 1 h em recipientes sobre gelo contendo o fixador secundário (tetróxido de ósmio 1% em tampão).

4.6.4 Desidratação, infiltração e inclusão em resina

As brânquias foram desidratadas em etanol a 50, 70 e 95% durante 10 min cada, e, duas vezes em etanol a 100% durante 15 min cada. Em seguida, permaneceram em solução de transição altamente miscível com a resina epóxi Araldite 502, o óxido de propileno, por duas vezes durante 15 min cada em temperatura ambiente.

Para infiltração as brânquias foram submersas em uma mistura de óxido de propileno e resina epóxi Araldite 502 (Pelco) para microscopia eletrônica de transmissão, na proporção 1:1, durante 1 h em temperatura ambiente. Em seguida, metade do volume foi substituído por resina pura, na proporção Araldite 2: óxido de propileno 1. Os recipientes contendo a resina e as brânquias permaneceram em um misturador giratório durante 8 h.

As brânquias foram incubadas em resina pura durante 1 h em estufa a 45 °C e transferidas para resina nova em formas de borracha de silicone com rótulos individuais. As brânquias foram orientadas de forma que pudessem ser seccionadas em diversas orientações principalmente transversal e longitudinal a seu eixo longo. Por fim, a resina foi polimerizada por 3 dias em estufa a 60 °C.

4.7 Microtomia

Os blocos de resina polimerizada foram aparados manualmente com uma gilete e seccionados em um ultramicrotomo Sorval Porter-Blum MT2-B com navalhas de vidro. Os cortes a 400 nm foram transferidos para lâminas de microscópio e corados com azul de metileno e azul de toluidina a 1%, ambos em borato de sódio aquoso a 1%, em chama de lamparina.

Os cortes de *A. franca* foram analisados em um microscópio Leica DM 5000 acoplado a uma câmera digital Leica DFD 300FX no Laboratório de Histologia da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, USP. Foi utilizado o software Leica Qwin para realização das medidas. Os cortes de *C. vittatus* foram analisados em um microscópio Leica DM 5500 acoplado a uma câmera digital Leica DFC 425. O Software utilizado para realização das medidas foi o Leica Application Suite Version 3.3.0 em nosso laboratório.

4.8 Ultramicrotomia

Os cortes finos, de 60 nm de espessura, foram feitos com navalha de diamante no ultramicrótomo Leica Reichert Ultracut S e recolhidos sobre telas de cobre de malha de 300 nm. As telas foram contrastadas com acetato de uranila aquoso 1% por 15 min e citrato de chumbo 2% (Reynolds, 1963) por 10 min.

Parte do material de *Aegla franca* foi examinado em um microscópio eletrônico JEOL JEM 1010 a uma voltagem acelerante de 100 kV (Laboratório de Microscopia Eletrônica, UNESP, Jaboticabal), e parte foi examinado em um microscópio eletrônico JEOL JEM 1110 a uma voltagem acelerante de 100 kV (Laboratório de Microscopia da FMRP).

A observação do material de *C. vittatus* foi realizado no microscópio eletrônico ZEISS EM 109 a uma voltagem acelerante de 80 kV, acoplado à uma câmera Olympus VELETA TEM CCD, Software iTEM 5.1 do Laboratório de Patologia Cardíaca do Departamento de Patologia da FMRP.

5. Resultados

5.1 Organização geral das brânquias de *Aegla franca*

A câmara branquial de *Aegla franca* está localizada dorsalmente e lateralmente embaixo da carapaça mediana e dos branquiostegitos no cefalotórax do animal (Figura 8). As brânquias se orientam da região posterior para a anterior, provavelmente otimizando o contato da superfície com a água. Os representantes dessa família nadam em sentido anterior-posterior, sendo que o fluxo da água que entra na câmara branquial se dá no sentido posterior-anterior (Figura 9 A e B).

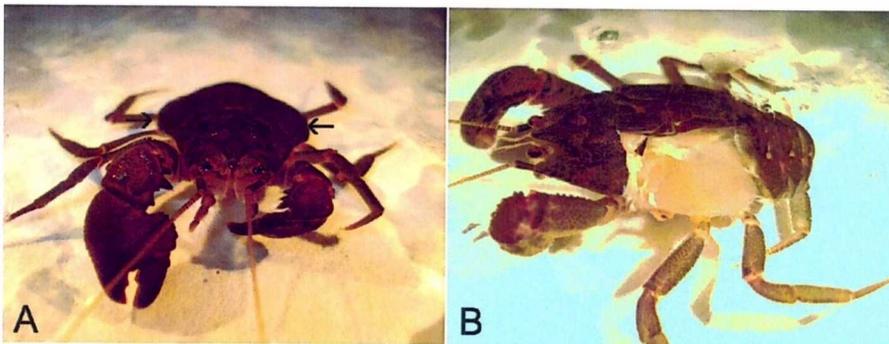


Figura 8. A) Fotografia de *Aegla franca* em vista frontal. Reparar nas extensões laterais dorsais do branquiostegito (**setas**) que alojam as brânquias. **B)** Fotografia de *A. franca* após remoção do branquiostegito esquerdo ilustrando a região da câmara branquial do lado esquerdo e as suas tricobrânquias.

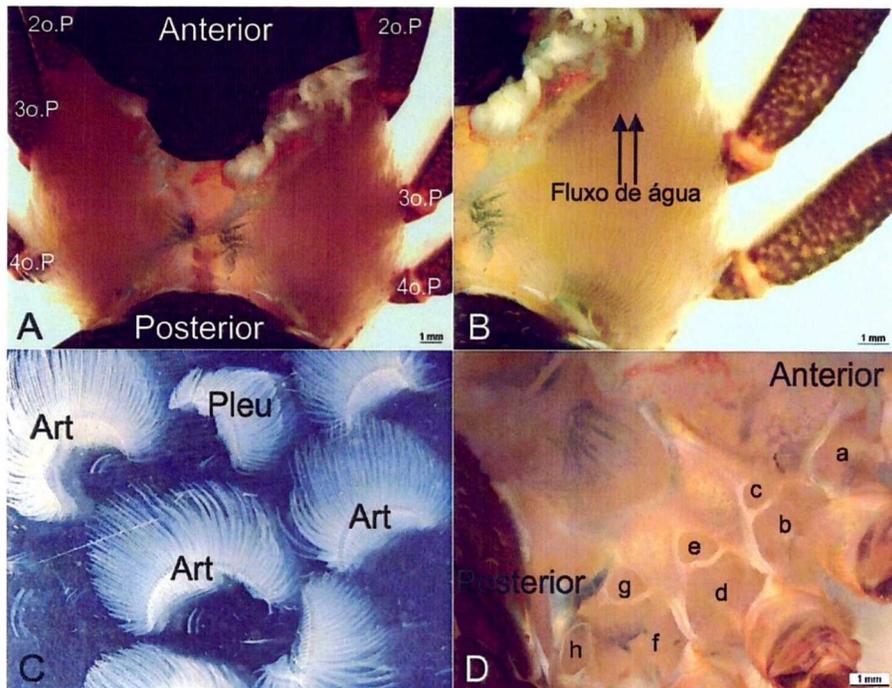


Figura 9. **A)** Fotomicrografia do cefalotórax de *A. franca* após a retirada de branquiostegitos laterais, mostrando a disposição e a bilateralidade das brânquias. **2^o p**, **3^o p** e **4^o p** representam respectivamente os 2^o, 3^o e 4^o pereiópodos. **B)** Fotomicrografia da câmara branquial direita de *A. franca*. Percebe-se que os filamentos das tricobrânquias se orienta da região posterior para a anterior, o que aparentemente otimiza o contato da água com a superfície da brânquia, devido ao sentido do fluxo da água pela câmara branquial (**setas**). **C)** Fotomicrografia de tricobrânquias recém dissecadas de um mesmo indivíduo, em placa de Petri com água. A pleurobrânquia (**Pleu**) e a artrobrânquia (**Art**) apresentam o mesmo arranjo básico, porém há nítida diferença em tamanho. **D)** Fotomicrografia da placa pleural direita de *A. franca* mostrando a localização das inserções das brânquias já removidas. (**a**) inserção de 2 artrobrânquias do 1^o pereiópodo, (**b**) inserção de 2 artrobrânquia do 2^o pereiópodo, (**c**) inserção de pleurobrânquia do 2^o pereiópodo, (**d**) inserção de 2 artrobrânquias do 3^o pereiópodo. (**e**) inserção de pleurobrânquia do 3^o pereiópodo, (**f**) inserção de 2 artrobrânquias do 4^o pereiópodo, (**g**) inserção de pleurobrânquia do 4^o pereiópodo, (**h**) inserção de 1 pleurobrânquia do 5^o pereiópodo. A inserção da primeira brânquia do 3^o maxilípede não está visível.

Aegla franca possui 26 brânquias, dispostas nas duas câmaras branquiais, isto é, 13 pares de brânquias. A primeira é uma artrobrânquia inserida no terceiro maxilípede. O primeiro pereiópodo possui duas artrobrânquias arranjadas serialmente, sendo a mais anterior menor que a mais posterior. O segundo, terceiro e quarto pereiópodos possuem uma artrobrânquia anterior, uma pequena pleurobrânquia e uma artrobrânquia posterior, sendo que a pleurobrânquia sai de uma abertura oval na placa pleural. O quinto pereiópodo sustenta apenas uma pequena pleurobrânquia (Figura 9 C e D).

Cada brânquia possui uma base de inserção no corpo do animal da qual sai o eixo branquial. A base da brânquia é inserida à parede do corpo do animal e os filamentos se apresentam livres dentro de toda a câmara branquial. Dessa forma, os filamentos ficam orientados em sentido posterior para anterior, o que permite contato direto de todo o filamento com a água que entra na câmara branquial em sentido posterior-anterior (Figura 10). Os filamentos branquiais que se originam do eixo branquial, são longos e parecem dedos que se projetam radialmente em forma de leque (Figura 9 D, Figura 11 e Figura 13).



Figura 10. Microscopia eletrônica de varredura da câmara branquial esquerda ilustrando a disposição das tricobrânquias de *Aegla franca*. **A)** Posicionamento das tricobrânquias de acordo com os pereiópodos. Barra de escala = 0,8 mm. **B)** Detalhe das bases das brânquias inseridas, saindo da placa pleural. Barra de escala = 340 μ m.

Cada brânquia apresenta a base do eixo branquial inserido na pleura lateral do corpo do animal e de onde se originam os filamentos branquiais (Figura 11 B e C). Nessa região do eixo a cutícula não se

apresenta de forma lisa e uniforme como no filamento, ela possui um aspecto laminado (Figura 11 C). Internamente, é nessa região que se encontram os canais do eixo branquial, por onde percorre hemolinfa, e que se ramificam e adentram os filamentos branquiais (Figura 13).

Os filamentos branquiais são tubulares e ovais. Aparentemente, na parte próxima, junto ao eixo, a parede do filamento é mais rígida, ou por causa da cutícula ou pela espessura do epitélio, já que ocorre uma nítida região de transição no filamento em torno de 1,5 a 2,0 mm da sua inserção no eixo (Figura 11 D).

O comprimento dos filamentos é variável, e varia ainda com o tamanho e tipo de brânquia e com o tamanho do animal. No entanto, pode-se perceber que em cada brânquia individual, tanto em pleurobrânquia quanto em artrobrânquia, existem filamentos mais curtos externos e filamentos mais alongados internamente na brânquia (Figura 11 A e B e Figura 12). Nota-se a presença de protuberâncias semi-esféricas nas bases dos filamentos externos curtos (Figura 14 A e B), aparentemente ausentes dos filamentos internos longos (Figura 14 C). De uma maneira geral, essas mesmas estruturas semi-esféricas também estão presentes no eixo branquial, como também na placa pleural na câmara branquial. Elas medem em torno de 46 μm de diâmetro e se caracterizam por apresentar uma única abertura lateral (Figura 15).

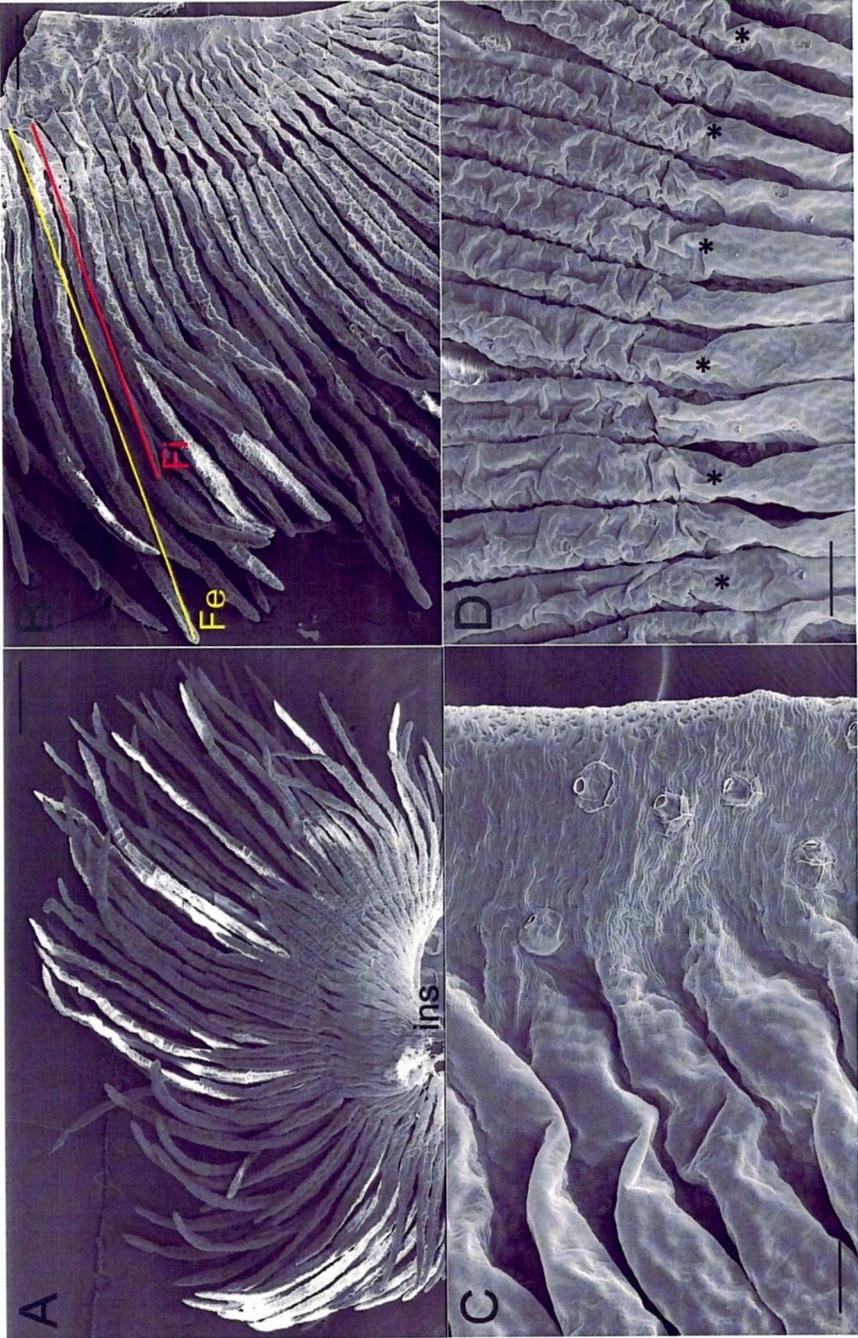


Figura 11. Microscopia eletrônica de varredura de artrobrânquia do 4^o pereiópodo de *Aegla franca*. **A)** Região da inserção (*ins*) da brânquia no animal. Note que os filamentos saem radialmente do eixo branquial, parecido dedos. Barra de escala = 715 μm . **B)** Detalhe dos filamentos ou trícans da brânquia. Observe que há filamentos externos mais curtos (linha vermelha) e filamentos internos mais compridos (linha amarela), e que ambos originam da base da brânquia no eixo branquial. Barra de escala = 555 μm . **C)** Detalhe da origem dos filamentos no eixo branquial no qual alojam-se delicadas estruturas arredondadas (*setas*), alguma colapsadas. A cutícula no eixo branquial apresenta aspecto laminado. Barra de escala = 72 μm . **D)** Detalhe da região de transição do filamento entre a região proximal lisa e a porção distal enrugada. A transição do aspecto liso para rugoso do filamento é bem demarcado (*). Barra de escala = 158 μm .

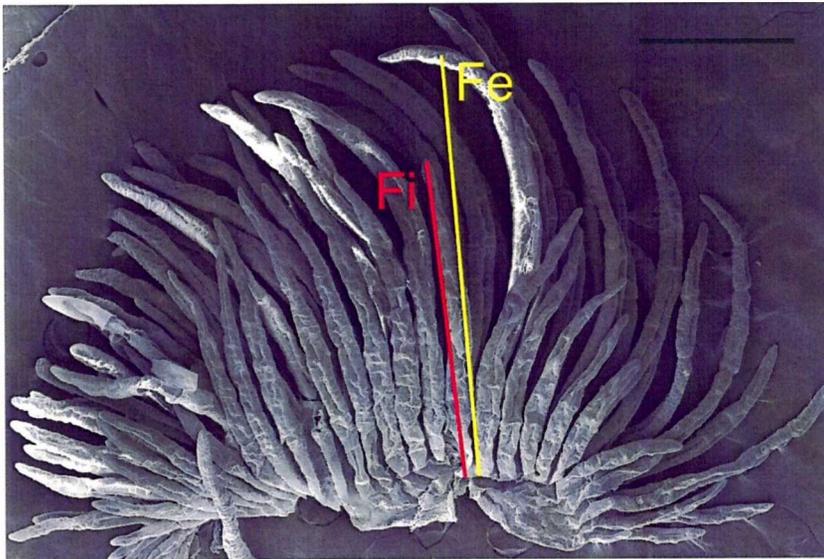


Figura 12. Vista em microscopia eletrônica de varredura de pleurobrânquia do 4^o pereiópodo de *A. franca*. Também é formada por um eixo branquial na base da brânquia, da qual saem os filamentos ou trícans. Há filamentos externos (linha vermelha) mais curtos e filamentos internos (linha amarela) mais alongados. Barra de escala = 790 μm .

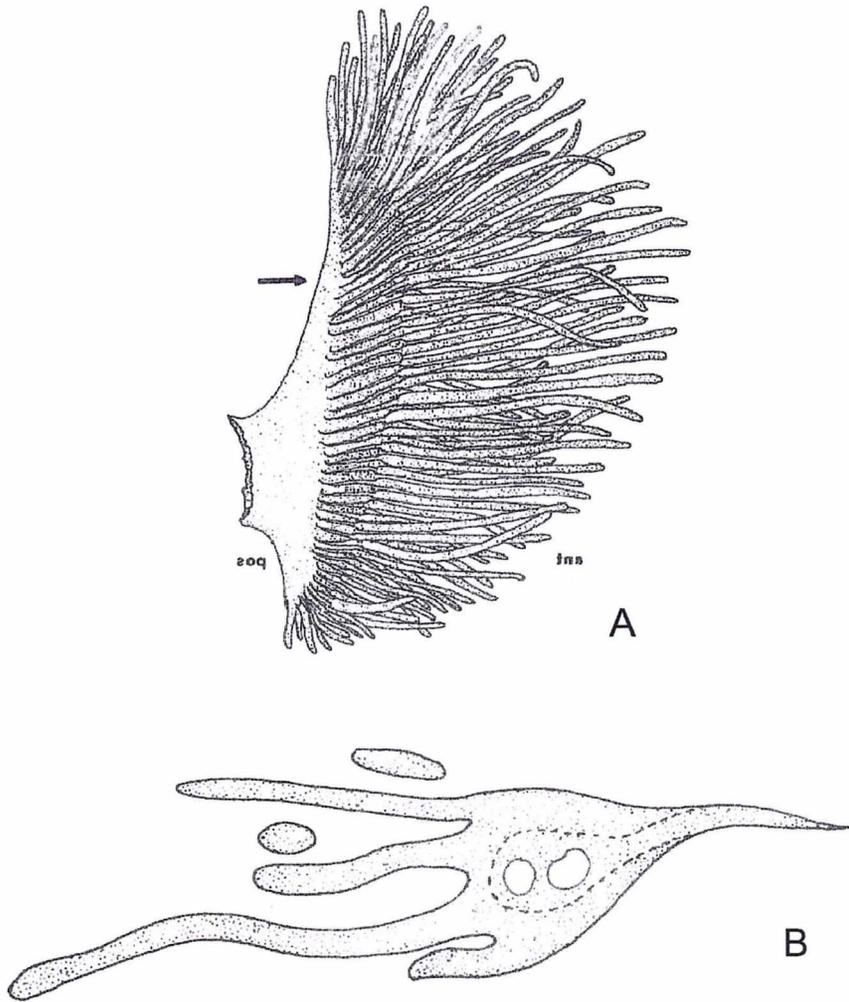


Figura 13. A) Desenho de artrobrânquia anterior do segundo pereiópodo de *A. platensis*. **B)** Desenho da brânquia seccionada transversalmente (transecto indicado pela seta em A). A linha tracejada indica a área do eixo branquial (Martin e Abele, 1988).

O filamento branquial é revestido externamente pela cutícula fina logo abaixo da qual se encontram as células pilares que o revestem internamente (Figura 16 A). As células pilares estão organizadas de

forma que suas franjas apicais sustentam a cutícula e formam um labirinto de lacunas laterais por onde percorre hemolinfa oriunda dos canais centrais do filamento (Figura 16 B).

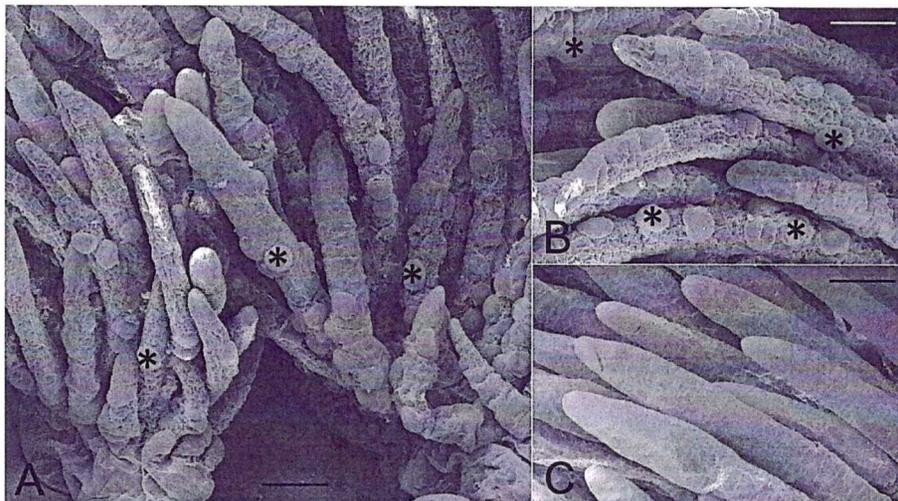


Figura 14. Microscopia eletrônica de varredura mostrando parte do conjunto branquial. **A)** Detalhe da base dos filamentos externos curtos inserindo na placa pleural. Há a presença de numerosas estruturas semi-esféricas (*). Barra de escala = 114 μm . **B)** Detalhe das extremidades dos filamentos externos mais curtos. Note a presença de estruturas semi-esféricas anexadas nos filamentos. Barra de escala = 85 μm . **C)** Detalhe das extremidades dos filamentos internos mais longos. Aparentemente a superfície desses filamentos é menos rugosa do que dos filamentos externos, e as estruturas circulares estão ausentes. Barra de escala = 85 μm .

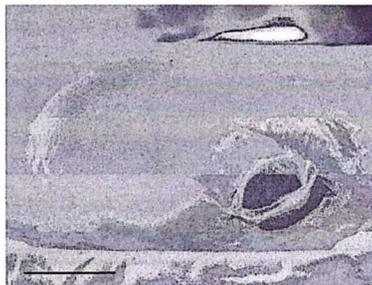


Figura 15. Microscopia eletrônica de varredura mostrando a estrutura semi-esférica do filamento braquial ampliada, e sua abertura em detalhe. Barra de escala = 15 μm .

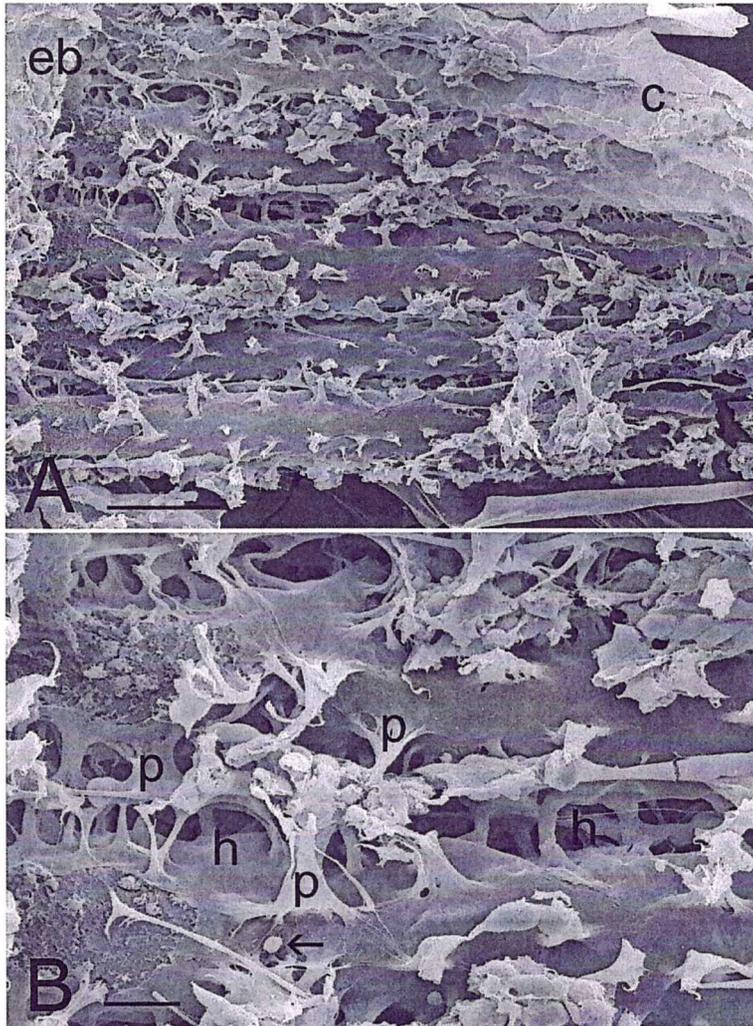


Figura 16. Vista em microscopia eletrônica de varredura de artrobrânquia anterior do 4^o pereiópodo de *A. franca*, mostrando os trícans internamente logo abaixo da cutícula. **A)** Cutícula (c), eixo branquial (eb). Barra de escala = 153 μ m. **B)** Abaixo da cutícula estão as células pilares (p) que sustentam as laculas por onde também percorre a hemolinfa (h) nos filamentos. Há a presença de alguns hemócitos (seta). Não é possível observar a parte interna do filamento contendo os canais centrais (aférente e eferente), pois o epitélio formado pelas bases das células pilares e lâmina basal o recobre. Barra de escala = 33 μ m.

5.2 Coloração por prata

A coloração com nitrato de prata mostrou que as brânquias de *A.franca* não são funcionalmente homogêneas (Figura 17). Há diferenças marcantes na deposição de cloreto de prata entre cada uma das brânquias e em uma mesma brânquia. Essa técnica mostrou que apenas a região mais dorsal das artrobrânquias transporta cloreto (Figura 17 A e C), enquanto que todos os filamentos das pleurobrânquias estão relacionados com o processo de transporte iônico (Figura 17 B).

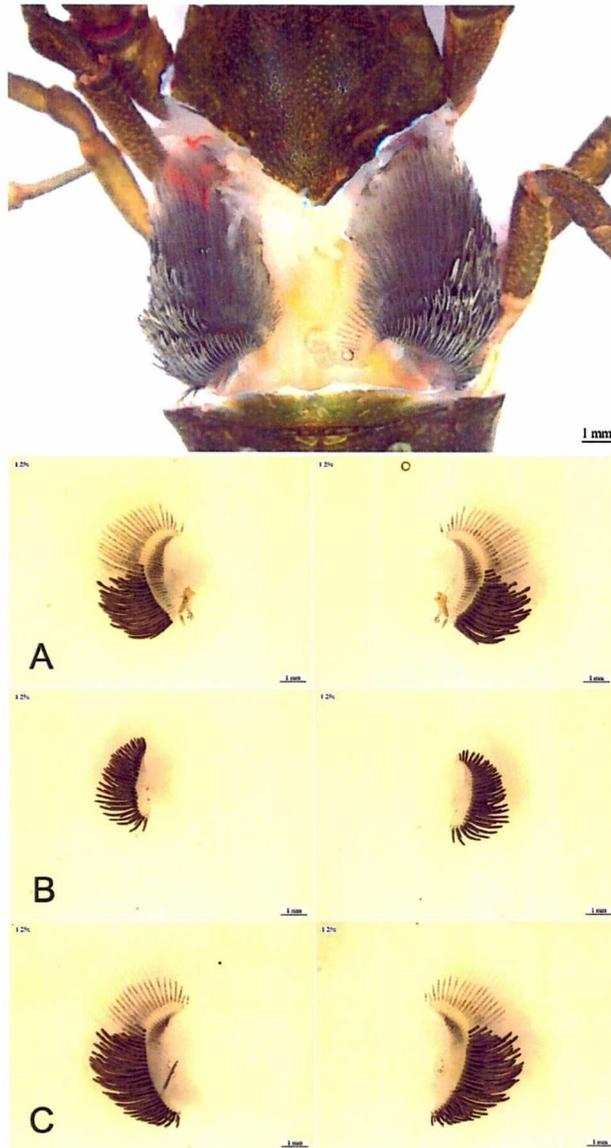


Figura 17. Fotomicrografia do cefalotórax sem a carapaça e os braquiostegitos laterais de *A. franca* após tratamento com AgNO_3 mostrando as brânquias e evidenciando os filamentos branquiais (acinzentados) que apresentam transporte iônico. **(A, B, C)** Conjunto branquial do 4o. pereiópodo. **A)** Artrobrânquia anterior do quarto pereiópodo. **B)** Pleurobrânquia do quarto pereiópodo. **C)** Artrobrânquia posterior do quarto pereiópodo.

5.3 Microanatomia interna dos filamentos de *A. franca*

Cada filamento branquial deriva individualmente do eixo branquial. De maneira geral, internamente, o epitélio do septo axial se estende ao longo de todo o filamento, dividindo-o internamente em dois canais, aferente dorsalmente, e o eferente ventralmente (Figura 18). Ambos os canais são revestidos por um epitélio simples que consiste das franjas apicais das células pilares envolto por uma fina cutícula (≈ 1 μm de espessura), de fácil visualização nos cortes transversais dos filamentos (Figuras 19, 20 e 21). A organização geral do epitélio não varia entre os filamentos externos menores e os internos maiores.

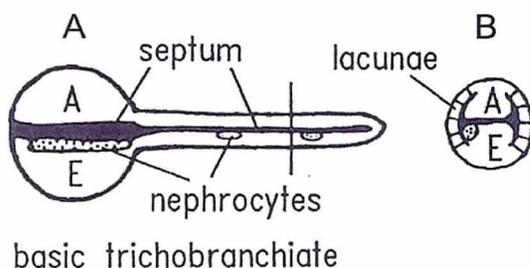


Figura 18. Esquema que relata morfologia interna de tricotricobranquia em plano longitudinal (A) e transversal (B). O tecido que forma o septo é colocado em preto. Nefrocitos beirando estão em pontilhado (Taylor e Taylor, 1992).

Nas artrobrânquias, as células do epitélio que revestem o filamento logo abaixo da cutícula, são as células pilares. O septo que divide o filamento internamente em dois canais assimétricos, aferente menor dorsal e o eferente maior ventral, também se estende pelas laterais dentro desses canais. Porém, esta extensão do septo sobre qual

se inserem as células pilares não reveste completamente nos pólos dorsal e ventral do filamento (Figura 19 A e B). Nas regiões laterais as células pilares se organizam de forma que projetam suas abas apicais lateralmente até encontrar com as abas apicais das células adjacentes. Essas projeções são expansões apicais das células pilares. Os pericários das células pilares se projetam em direção ao lúmen do filamento e se encontram com a extensão lateral anelar do septo que contorna as laterais do canal aferente e principalmente do canal eferente. Essa arquitetura forma lacunas laterais entre os pericários das células pilares ao longo do filamento, por onde há a passagem de hemolinfa (Figura 19).

Observa-se nos cortes transversais que a área do canal eferente é maior que o canal aferente e ainda, a extensão do septo se estende muito mais para as laterais do canal eferente do que para o canal aferente (Figura 19 B). Nos pólos dorsal e ventral do filamento respectivo a ambos os canais, não há continuidade da expansão do septo, desse modo não há as lacunas por onde percorre hemolinfa nesses pólos. Há apenas a continuidade do epitélio simples, subjacente à cutícula, que vem das laterais do filamento.

Nos cortes longitudinais dos filamentos das artrobrânquias (Figura 19 C) visualiza-se nitidamente o epitélio simples lateral composto de células pilares e suas abas que vão de encontro com as abas das células adjacentes. A região dos pericários projeta em direção ao eixo

axial do septo formando as lacunas laterais (Figura 19 C). É possível observar que o septo que separa o canal aferente do eferente é contínuo por todo o filamento internamente, o que impede a passagem de hemolinfa entre ambos os canais no meio do filamento (Figura 19 C).

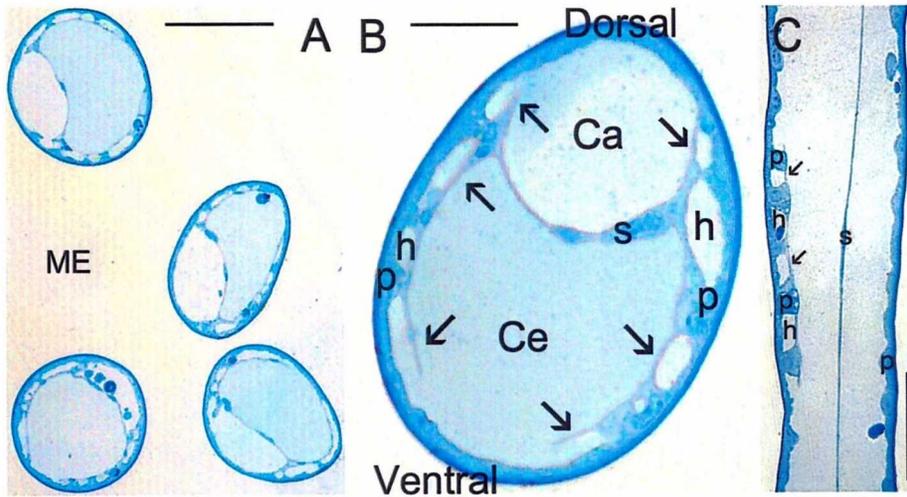


Figura 19. Filamentos de artoibrânquia do 4º pereiópodo de *Aegla franca* mantido em água do meio de coleta (água doce). **A)** Em secção transversal os filamentos são circulares a ovalados constituídos de um fino epitélio logo abaixo da cutícula. **(ME)** meio externo. Barra de escala = 105 μm . **B)** Detalhe de corte transversal. O septo (**s**) divide o espaço por onde passa a hemolinfa em canal aferente (**Ca**) na região dorsal e canal eferente (**Ce**) na região ventral do filamento. O epitélio do filamento, logo abaixo da cutícula, é constituído lateralmente de células pilares (**p**) cujas abas laterais se projetam e encontram as de outras células pilares adjacentes. O pericário das células pilares se insere na extensão do septo (**setas**) que contorna particularmente as laterais do canal eferente. Esta conformação cria lacunas laterais (**h**) entre as bases das células pilares por onde também percorre hemolinfa. A extensão do septo não alcança os extremos dorsal e ventral do filamento, nessas regiões os pericários das células pilares não se projeta para o lúmen do canal e, portanto não há lacunas. Barra de escala = 25 μm . **C)** Em corte longitudinal é possível observar que o septo (**s**) é contínuo por todo o interior do filamento. (**p**) células pilares, (**h**) lacuna onde percorre hemolinfa, (**setas**) extensão do septo. Barra de escala = 2,6 μm .

Nas pleurobrânquias a organização da arquitetura interna do filamento próximos às extremidades é ligeiramente diferente das artrobrânquias. Lateralmente há a presença de células pilares logo abaixo da cutícula, que expandem suas abas laterais até encontrar com as de células adjacentes. A região dos pericários vai de encontro com as expansões laterais do septo, formando lacunas laterais por onde percorre hemolinfa (Figura 20 A). Há um septo contínuo que se estende ao longo de todo o filamento internamente dividindo o canal central em aferente e eferente ambos simétricos (Figura 20 A e B), sendo que a extensão do septo vai simetricamente em direção a ambos os canais e aparenta ser mais espesso do que a extensão do septo descrito nas artrobrânquias (Figura 20 B). Ainda, há a presença de canais laterais entre os canais aferente e eferente, delimitados pelo septo e pelos pericários das células pilares dessa região lateral (Figura 20 B). À medida que se aproxima a parte distal, a organização da arquitetura interna dos filamentos das pleurobrânquias se tornam exatamente iguais às das artrobrânquias (Figura 20 C e D) .

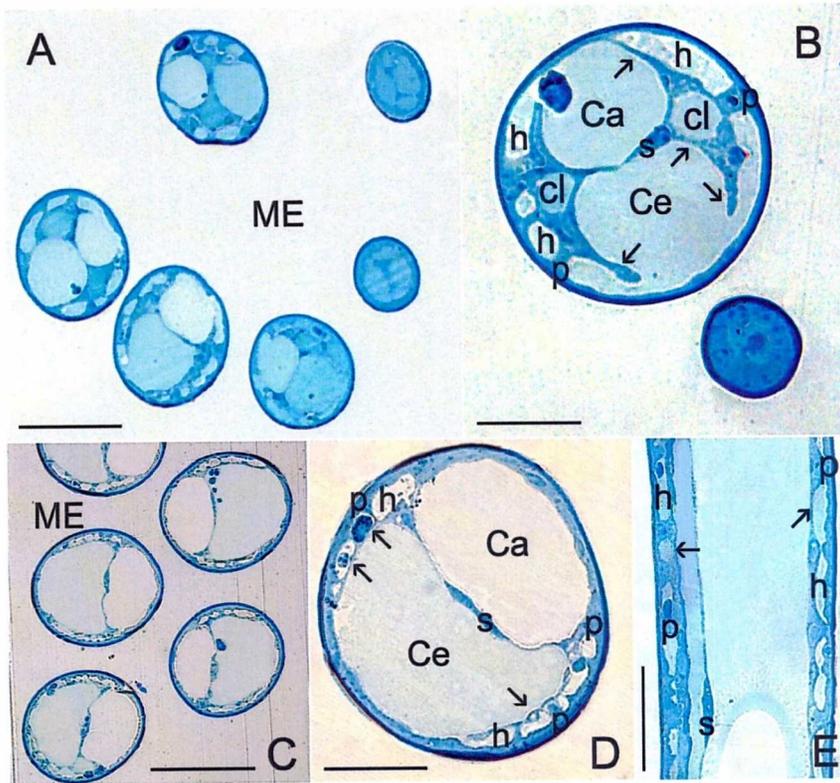


Figura 20. Filamentos de pleurobrânquias do 4º pereiópodo de *Aegla franca* mantido em água do meio de coleta (água doce). **A)** Secção transversal dos filamentos próximo à extremidade. Também são circulares a ovalados, porém a organização interna do epitélio se apresenta diferenciada dos filamentos de artrobrânquia. Barra de escala = 108 μm . **B)** Detalhe de corte transversal. Além das lacunas por onde percorre a hemolinfa (**h**) formada pelas bases das células pilares (**p**), há a presença de dois espaços nas laterais do septo (**s**), entre os canais aferente (**Ca**) e eferente (**Ce**). Esses espaços constituem os canais laterais (**cl**). Barra de escala = 34 μm . **C)** Secção transversal dos filamentos próximos ao eixo branquial. Sua organização interna se assemelha aos filamentos de artrobrânquia. Barra de escala = 102 μm . **D)** Detalhe de corte, (**setas**) extensão do septo. Barra de escala = 68 μm . **E)** Corte longitudinal dos filamentos. Os canais laterais não estão visíveis neste corte longitudinal. Barra de escala = 55 μm .

5.4 Ultraestrutura das células epiteliais dos filamentos branquiais de *Aegla franca*

Como a coloração com nitrato de prata mostrou que todos os filamentos das pleurobrânquias estão relacionados com o processo de transporte iônico, a análise da ultraestrutura foi focada apenas nos filamentos das pleurobrânquias.

A ultraestrutura apresentada pelas células pilares que compõem o epitélio branquial remete de modo geral a células que realizam transporte iônico (Figura 21). A espessura da cutícula é cerca de 534 ± 45 nm, $n=4$. As células pilares na região lateral do epitélio filamentar formam as lacunas laterais e têm espessura de aproximadamente $4,2 \pm 0,4$ μm ($n=12$) (Figura 22 A e B). Essas células apresentam expansões laterais da região apical, as franjas, que se conectam com as franjas de outras células pilares adjacentes por meio de junções intercelulares especializadas (Figura 22 A). A região do pericário basal da célula pilar se projeta e alcança a expansão anelar lateral do septo, formando as lacunas laterais por onde percorre hemolinfa (Figura 22 A e B). Essa extensão do septo não é densa e não apresenta estruturas celulares relacionadas com transporte ativo (Figura 22 B). As células pilares são caracterizadas por evaginações citoplasmáticas da membrana apical, logo abaixo da cutícula e, invaginações de membrana no lado basal, às quais estão intimamente associadas mitocôndrias (Figura 22 C). Estas bombas mitocondriais em vários momentos se apresentaram organizadas em paralelo com as invaginações delimitando toda a sua

superfície (Figura 23). Na região basal da célula pilar as invaginações de membrana apresentam $1,8 \pm 0,3 \mu\text{m}$ ($n = 12$) de comprimento (Figura 24 B), às quais estão associadas as mitocôndrias, e adentram no citosol de forma a alcançar a região apical da célula, próximo às evaginações apicais (Figura 24 C, Figura 21). Essas invaginações apresentam a mesma largura ($\approx 28 \text{ nm}$) e sua desembocadura se dá nas lacunas laterais onde percorre hemolinfa. A membrana basal é separada da hemolinfa pela presença de uma delicada lâmina basal (Figura 21, Figura 22 C, Figura 23 A, Figura 24 A e B). No entanto este padrão de riqueza de estruturas celulares não é contínuo em todo o epitélio filamentar. Em algumas regiões do epitélio logo abaixo da cutícula, as células se apresentaram mais densas e mais ricas em estruturas celulares (Figura 21).



Figura 21. Eletronmicrografia de célula pilar de epitélio de pleurobrânquia de *A. franca* mantido em meio natural, água doce. Na membrana basal, na região do corpo da célula pilar, a célula vai de encontro com a expansão lateral do septo formando a lacuna por onde percorre hemolinfa (**h**). No lado apical a membrana forma as evaginações apicais (**ea**) e forma o espaço subcuticular (**es**) abaixo da cutícula (**c**). Há algumas invaginações basais (**ib**) no ombro da célula e junto a elas algumas mitocôndrias. Há junções (**js**) entre células adjacentes. Barra de escala = 2 μ m.

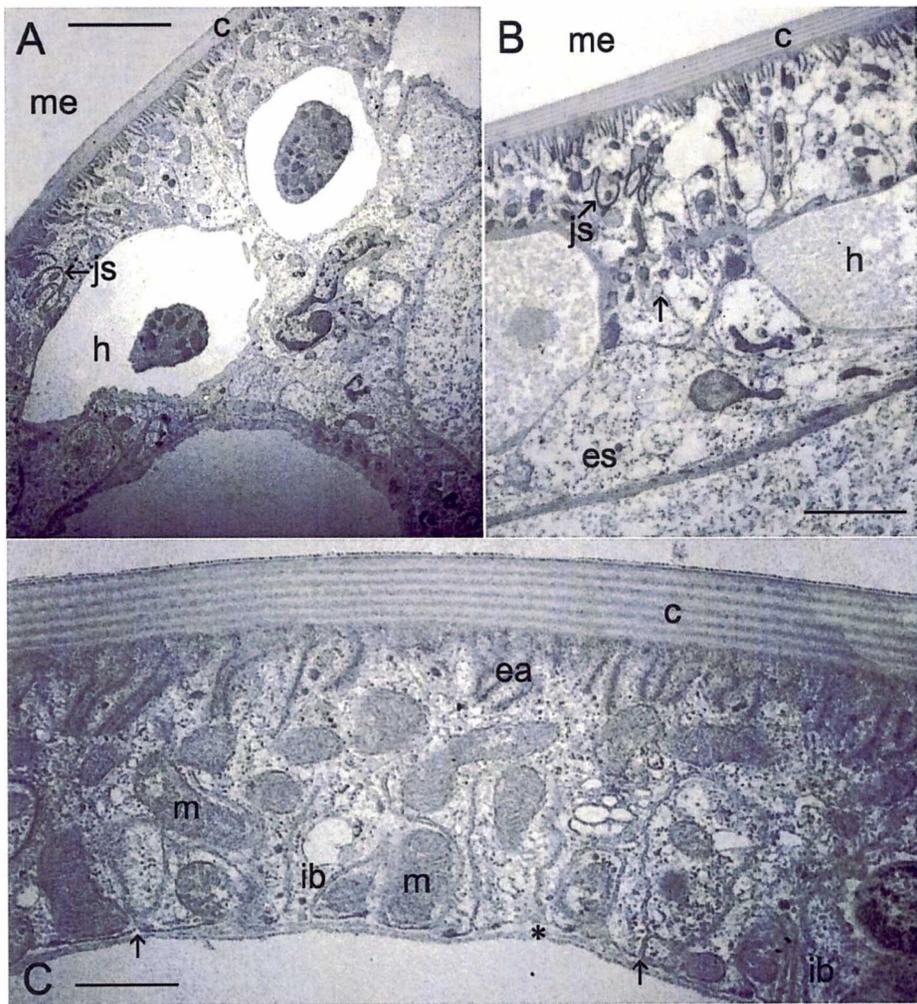


Figura 22. Eletronmicrografia de epitélio de pleurobrânquia de *Aegla franca* mantido em meio natural, água doce. **A)** Transecto da região da união entre células pilares e septo (s). As franjas das células pilares se conectam com as células pilares adjacentes por meio de junções, (js) junções septadas. O pericário basal da célula pilar alcança a extensão anelar lateral do septo, formando as lacunas por onde percorre hemolinfa (h). **(C)** Cutícula, (me) meio externo. Barra de escala = 4 µm. **B)** Região do pericário da célula pilar e as abas apicais laterais abaixo da cutícula. Encontro (seta) da célula pilar com a extensão do septo (es), formando as lacunas por onde percorre a hemolinfa. Barra de escala = 3 µm. **C)** Detalhe da 'aba' da célula pilar, que é rica em

estruturas celulares. Ocorre invaginações da membrana basal (**ib**), associadas à mitocodrias (**m**), e, evaginações da membrana apical (**ea**). As **setas** indicam a saída de íons pela membrana basal para a hemolinfa, (*) indica lâmina basal. Barra de escala = 776 nm.

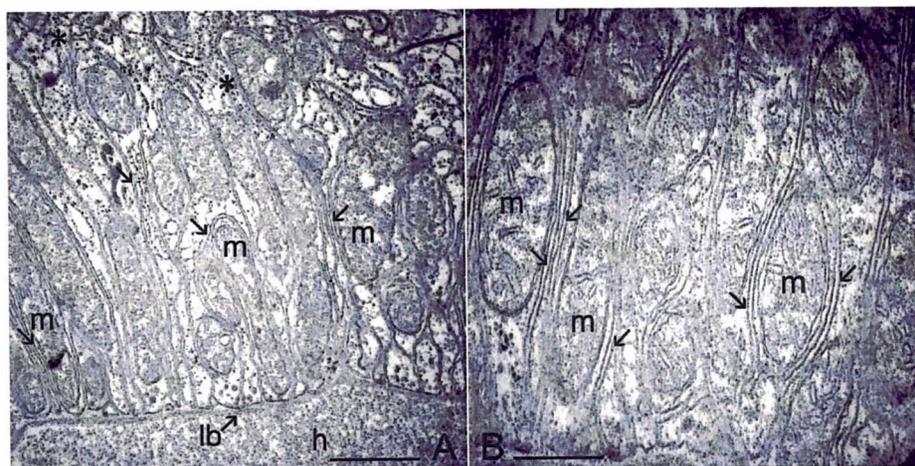


Figura 23. Eletronmicrografia detalhando célula pilar de epitélio de pleurobrânquia de *A. franca* mantido em meio natural, água doce. Destaque das bombas mitocondriais no citosol basal das células pilares. As **setas** indicam um padrão de organização das invaginações basais ao redor das mitocôndrias (**m**), curta distância entre a membrana basal e as mitocôndrias. Os (*) indicam cisternas de retículo endoplasmático rugoso, (**h**) hemolinfa, e (**lb**) é a lâmina basal. **A)** Barra de escala = 1 μ m. **B)** Barra de escala = 347 nm.

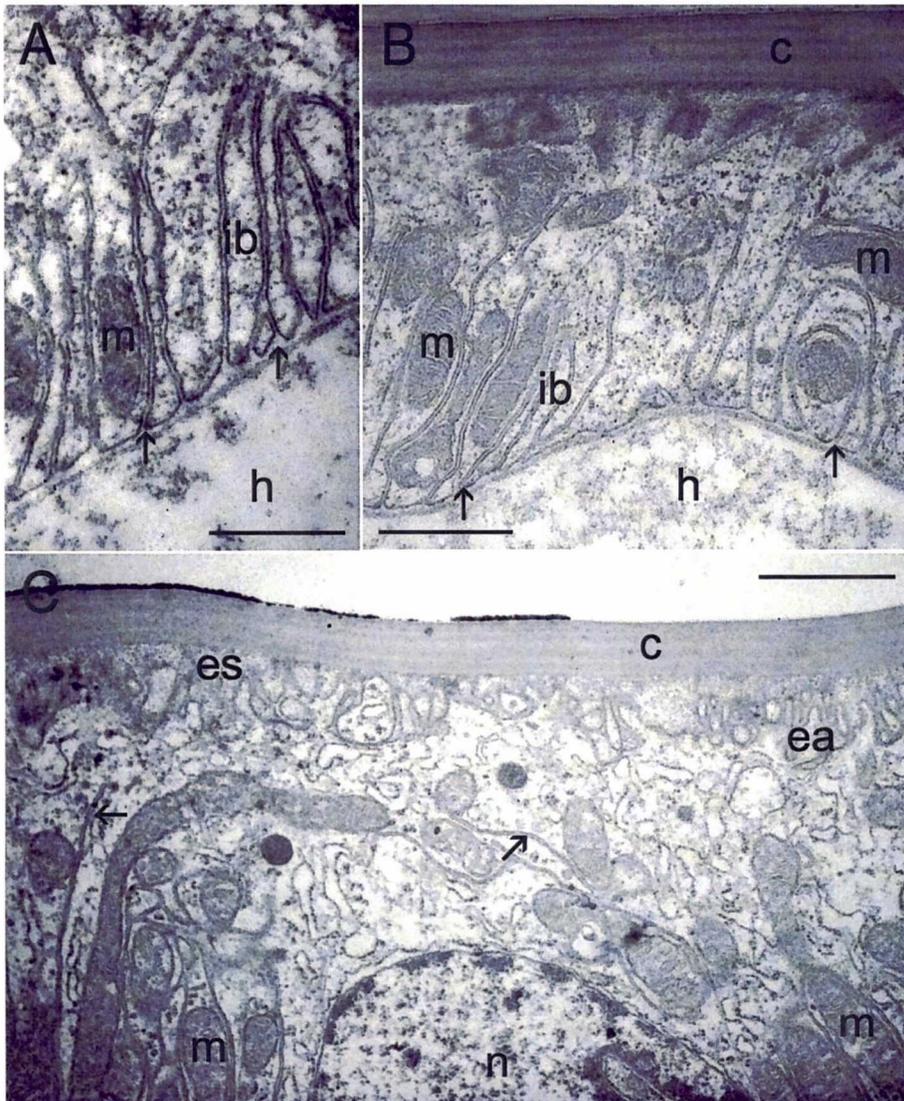


Figura 24. Eletronmicrografia detalhando célula pilar de epitélio de pleurobrânquia de *A. franca* mantido em meio natural, água doce. **A)** Detalhe da região basal onde localiza a desembocadura (**setas**) das invaginações basais (**ib**) na hemolinfa (**h**). Barra de escala = 584 nm. **B)** Mitocôndrias (**m**) associadas às invaginações de membrana e desembocadura. Barra de escala = 914 nm. **C)** Detalhe da região apical da célula, as evaginações de membrana apical (**ea**) formam um espaço subcuticular (**es**). As invaginações de membrana alcançam o citosol basal (**setas**). Mitocôndrias e o núcleo (**n**) estão presentes. Barra de escala = 1,2 μ m.

O lado apical das células pilares apresenta as evaginações apicais de comprimento em torno de 519 ± 64 nm ($n = 8$) que proporciona um espaço subcuticular de 620 ± 43 nm ($n = 5$) de altura (Figura 21 C e Figura 23 C), além de aumentar a superfície de membrana nessa região. Próximo a essas expansões apicais estão presentes algumas microvesículas citoplasmáticas de aproximadamente 260 nm de diâmetro e com conteúdo bastante denso. Lateralmente, o citoplasma apical se projeta formando as abas das células pilares que se encontram com as abas de outras células adjacentes. Esse encontro forma complexas regiões juncionais que são interdigitantes, aparecendo como estruturas meandrosas (Figura 25 A, B e C).

O septo que divide o espaço da hemolinfa em canal aferente e eferente apresenta nefrócitos recobrimo o lado do canal eferente (Figura 25 D) por onde passa hemolinfa oxigenada. Há um fino diafragma entre os processos pedicelares o que sugere filtração deste fluido.

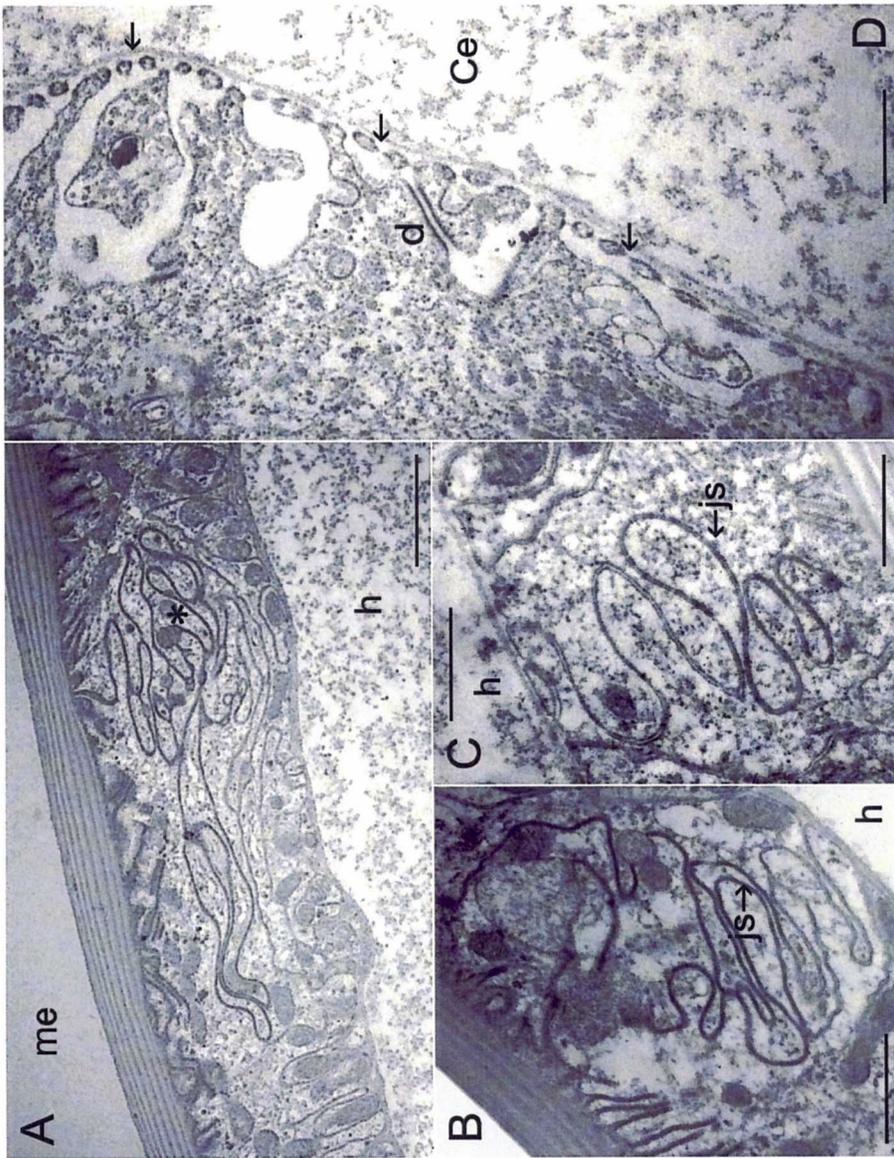


Figura 25. Eletronmicrografias de pleurobrânquia de *Aegla franca* mantido em meio natural, água doce. **A)** Transecto onde mostra grande complexo juncional (*) entre abas de células pilares adjacentes. Barra de escala = 1,7 μ m. **B e C)** Detalhe de diferentes junções septadas (js). Barra de escala B = 1 μ m, Barra de escala = 680 nm. **D)** Região do septo que faz fronteira com o canal eferente (Ce). O septo é formado em parte por nefrócitos que possuem processos pedicelares e diafragmas (setas). (d) desmossomo. Barra de escala = 594 μ m.

5.5 Alterações na microanatomia e ultraestrutura do epitélio lamelar de *Aegla franca* aclimatados a uma salinidade elevada (água do mar 25 ‰S)

Após aclimação por 10 dias em 25 ‰S não houve alterações aparentes na arquitetura dos filamentos branquiais de *A. franca* (Figura 26). Não houve diferença visível na espessura das células pilares e tampouco área relativa dos canais por onde percorre a hemolinfa pelos cortes transversais (Figura 26 A). No entanto, no corte longitudinal as células pilares aparentam estar levemente mais afinadas (Figura 26 B), porém devido à dificuldade de definir os limites com a microscopia óptica empregada não foi possível determinar sua espessura. O septo também não apresentou alterações.

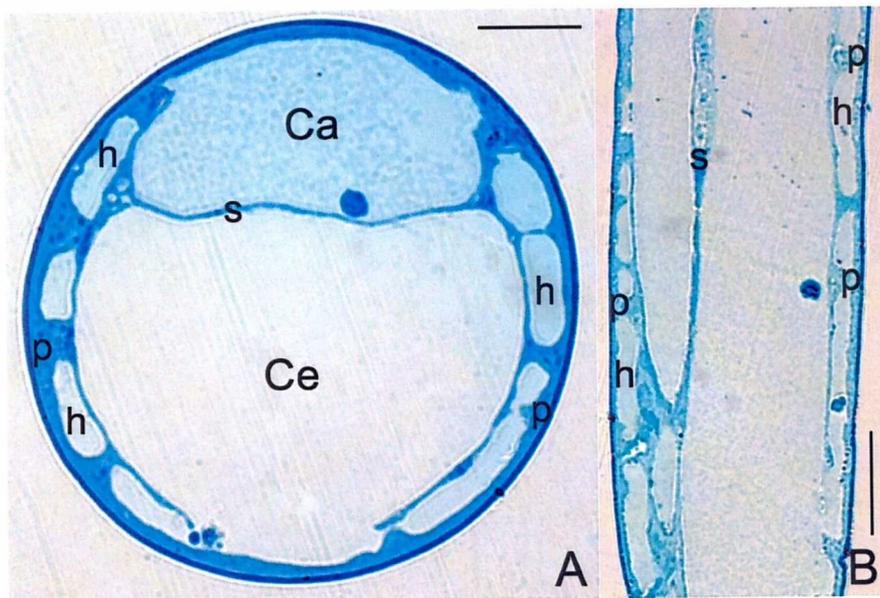


Figura 26. Filamentos de tricobrânquia de *Aegla franca* aclimatado por 10 dias em salinidade de 25 ‰S. **A)** Corte transversal de artrobrânquia anterior do 3º pereiópodo. A organização interna do filamento não se modificou após aclimação, não houve

diferença visível na espessura das células pilares (**p**) e nem no espaço da lacuna por onde percorre a hemolinfa (**h**). O septo (**s**) também não apresentou modificações. Barra de escala = 26 μm . **B)** Corte longitudinal de pleurobrânquia do 3º pereiópodo. A organização interna do filamento também não se modificou após aclimação. Barra de escala = 34 μm .

As células pilares na região da lacuna não apresentaram espessamento ou afinamento significativo após aclimação em água do mar diluída, permanecendo com cerca de $3,7 \pm 0,6 \mu\text{m}$ ($n=7$) de espessura. A cutícula ficou em torno de $471 \pm 46 \text{ nm}$ ($n=5$) de espessura. Observou-se nessas células pilares a presença destacada de inúmeras invaginações basais de $2,2 \pm 0,3 \mu\text{m}$ de comprimento que praticamente alcançam o citosol apical e, às quais se associam numerosas e alongadas mitocôndrias que se apresentaram em maior número e quantidade (Figura 27 A e B). Já as evaginações apicais não se apresentam desenvolvidas por todo o filamento: em algumas regiões ela se apresenta praticamente ausente, ou muito pequena a ponto do espaço subcuticular estar ausente (Figura 27 C); em outros pontos elas se apresentam mais desenvolvidas ($376 \pm 39 \text{ nm}$, $n= 8$) com a presença de um espaço subcuticular de $253 \pm 69 \text{ nm}$ ($n=6$) de altura (Figura 27 D, Figura 28 A). Também foram encontradas diferenças regionais nos pólos distintos no epitélio, há poucas estruturas nessas regiões. O encontro das abas das células pilares adjacentes em animais aclimatados forma regiões de extrema complexidade juncional, aparecendo como verdadeiras teias juncionais (Figura 28 B). A figura 28 C ilustra uma região interdigitante cortada transversalmente.

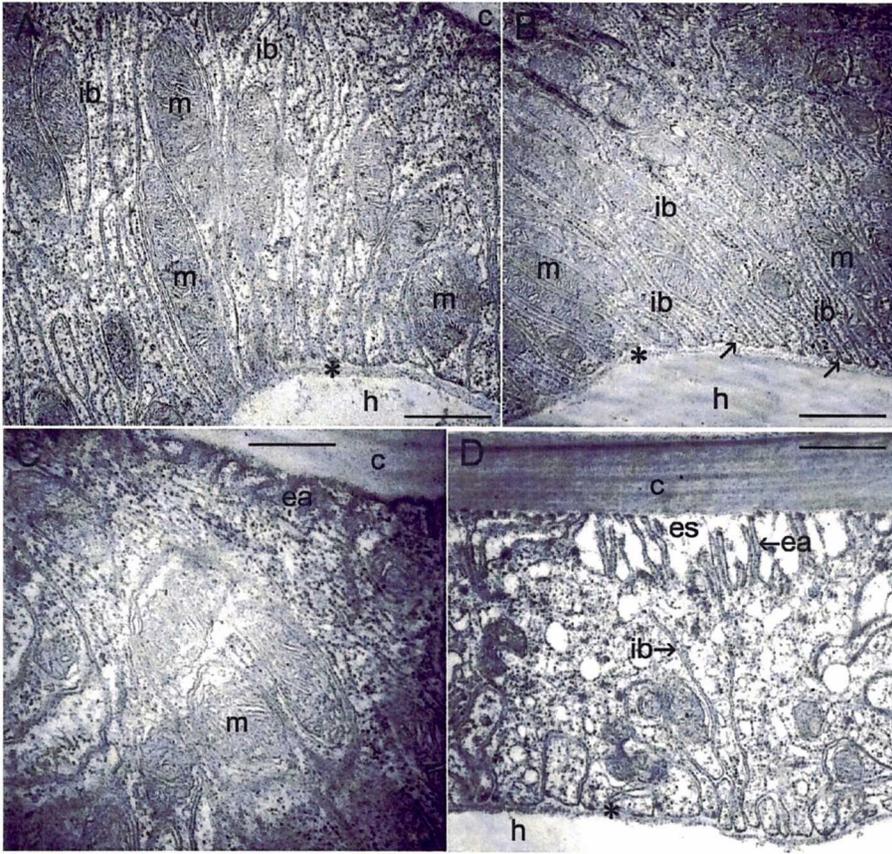


Figura 27. Eletronmicrografia de pleurobrânquia do 2º pereiópodo de *Aegla franca* aclimatado em meio 25‰ S. **A)** Transecto de franja de célula pilar na região das lacunas por onde percorre hemolinfa (**h**). A imagem mostra longas invaginações da membrana basal (**ib**) associadas à mitocôndrias (**m**), que chegam a alcançar o lado apical próximo à cutícula (**c**). (*) representa lâmina basal. Barra de escala = 690 nm. **B)** Detalhe da região basal, próximo à lacuna onde percorre hemolinfa. Há a presença de inúmeras invaginações da membrana basal associadas á mitocôndrias, estas mais circulares, provavelmente seccionadas transversalmente. As **setas** indicam a desembocadura das invaginações na hemolinfa. Barra de escala = 950 nm. **C)** Detalhe da região apical, as evaginações apicais (**ea**) não são desenvolvidas nesta região. Barra de escala = 410 nm. **D)** Região apical onde as evaginações apicais estão desenvolvidas e há aparecimento de espaço subcuticular (**es**). Barra de escala = 570 nm.

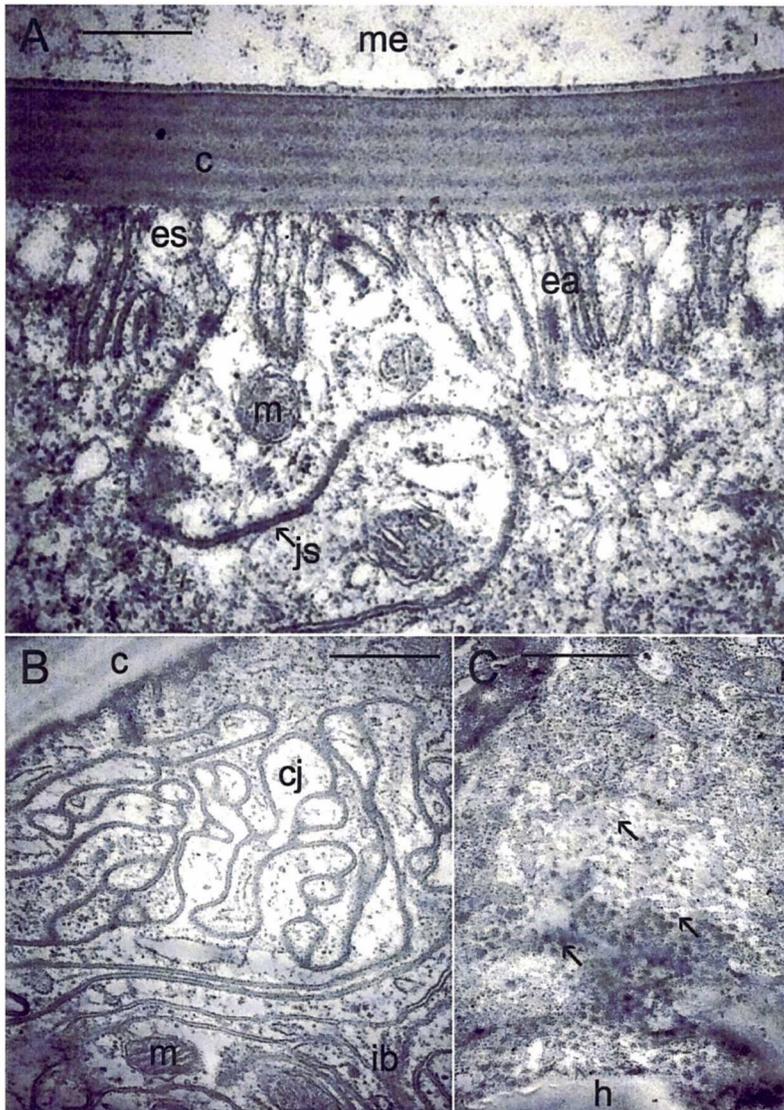


Figura 28. A) Detalhe de junção septada (**js**) entre duas células pilares na região da lacuna. Barra de escala = 300 nm. **B)** Região de complexo juncional (**cj**) entre células pilares. Há pouco espaço subcuticular, algumas mitocôndrias (**m**) e invaginações basais (**ib**). Barra de escala = 550 nm. **C)** Membrana apical de uma célula pilar intergitada com outra, formando 'dedos' cortados transversalmente (**setas**). Barra de escala = 890 nm.

5.6 Organização geral das brânquias de *Clibanarius vittatus*.

Assim como em *Aegla franca* a câmara branquial de *Clibanarius vittatus* também está localizada dorsalmente e lateralmente embaixo da carapaça mediana e dos branquiostegitos no cefalotórax do animal (Figura 29).



Figura 29. Fotomicrografia do cefalotórax de *Clibanarius vittatus* com e sem a carapaça e os branquiostegitos laterais, após tratamento com AgNO_3 .

Clibanarius vittatus apresenta um total de 13 pares branquiais sendo as mais anteriores menores do que as posteriores (Figura 30 e Figura 31). O conjunto branquial apresenta 10 artrobrânquias sendo 2 pareadas na membrana artrodial do terceiro maxilípede, 2 do quelípodo, 2 do segundo pereiópodo, 2 no terceiro pereiópodo e 2 no quarto pereiópodo. Há ainda, mais 3 pereiópodos, sendo que cada um sai dos somitos XI, XII e XIII respectivamente (Figura 31).

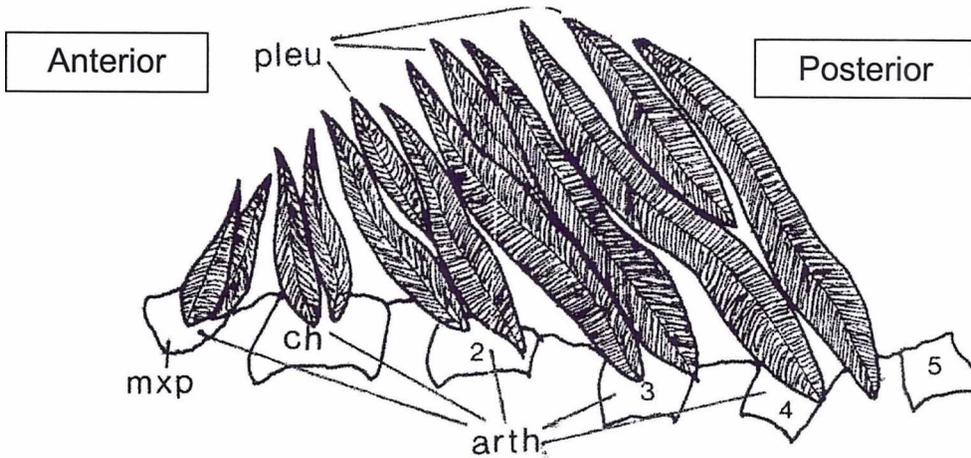


Figura 30. Treze Brânquias da câmara branquial de Diogenidae. Artrobrânquias (**arth**) pareadas na membrana artrodial do terceiro maxilípode (**mxp**), no quelípodo (**ch**), no segundo, terceiro e quarto pereiópodos. Há apenas uma pleurobrânquia (**pleu**) em cada um dos respectivos somitos XI, XII e XIII (acima dos pereiópodos 2, 3 e 4) (McLaughlin, 2003).

Cada brânquia possui uma base de inserção no corpo do animal da qual surge o eixo branquial. O eixo branquial se apresenta quadrangular em secção, nele se encontra o vaso aferente e o vaso eferente, separados por uma espessa camada de tecido conjuntivo, conhecido como o septo medial axial, que contém neutrócitos, glândulas tegumentares e outras células. Deste eixo branquial se projetam lamelas largas, o que as classificam como filobrânquias (Figura 29, Figura 31 e Figura 32). Essas lamelas são mais alongadas que as de caranguejos braquiúros e são inclinadas obliquamente para cima. Cada lamela apresenta a margem espessada, característico deste tipo de brânquia.

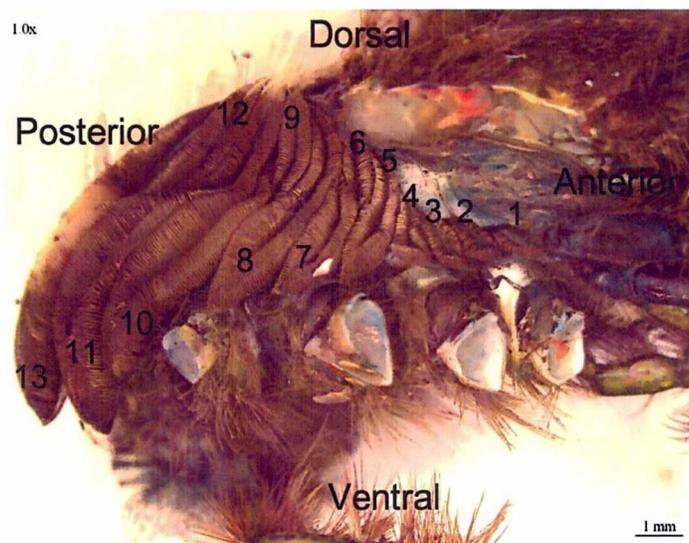


Figura 31. Fotomicrografia do cefalotórax sem a carapaça e os branquiostegiso laterais de *C. vittatus* após tratamento com AgNO_3 mostrando as 13 brânquias e suas posições dentro da câmara branquial.

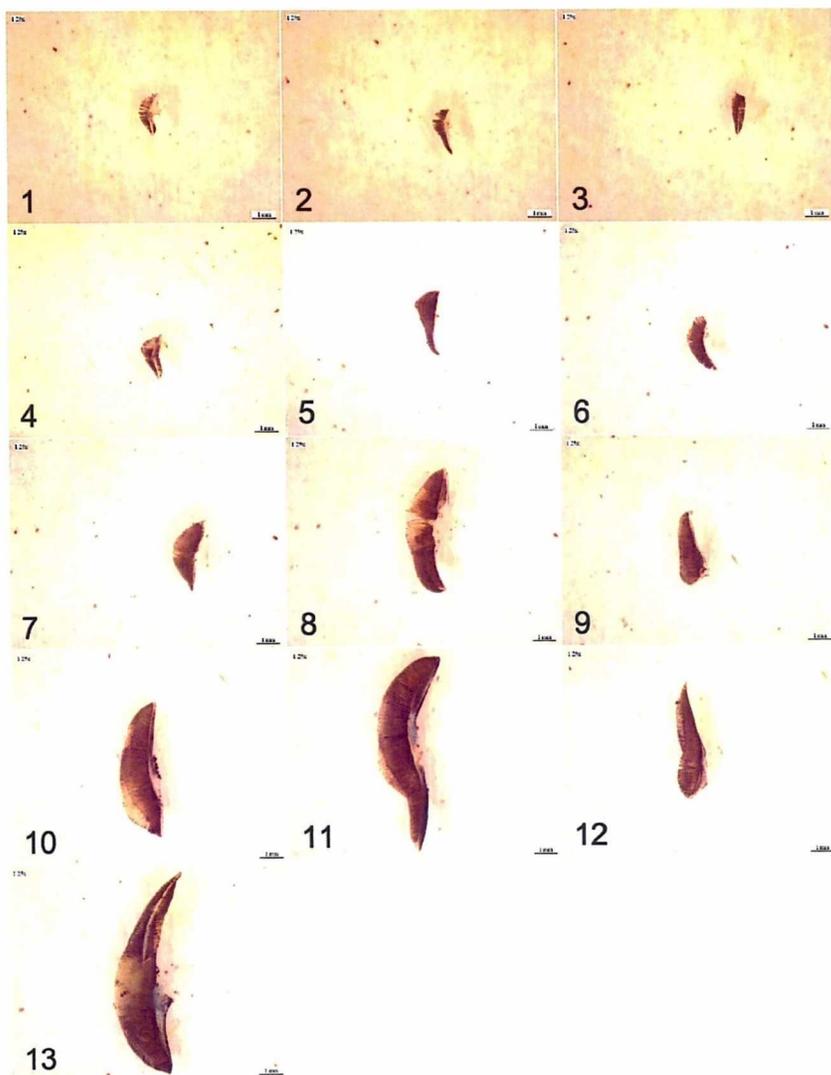


Figura 32. Fotomicrografia das 13 brânquias de *C. vittatus* após tratamento com AgNO_3 dissecadas do cefalotórax, evidenciando as lamelas branquiais (acinzentados) que apresentam transporte iônico. De 1 para 13 indicando da mais anterior para a mais posterior.

A análise das brânquias de *C. vittatus* no microscópio de varredura mostra que todas as brânquias apresentam a mesma estrutura geral, variando apenas o tamanho entre elas (Figura 32). Cada

brânquia apresenta um eixo branquial inserido na pleura lateral do corpo do animal (Figura 33). Este eixo branquial se estende ao longo de toda a brânquia e dele saem os folhetos lamelares regulares em direções opostas, que diminuem de tamanho distalmente na brânquia, e, que, são simétricos em ambos os lados do plano mediano ântero-posterior (Figura 34 e Figura 35), igualmente visto em filobrânquias de camarões palemonídeos e braquiúros. Essas lamelas opostas saem do mesmo eixo, porém são independentes. Com o microscópio eletrônico de varredura pode-se observar que as lamelas não possuem conexão entre si (Figura 34 B e Figura 35). Dentro de cada lamela existem canálculos que são os espaços por onde a hemolinfa percorre, originados a partir dos vasos aferente e eferente, localizados no eixo branquial.

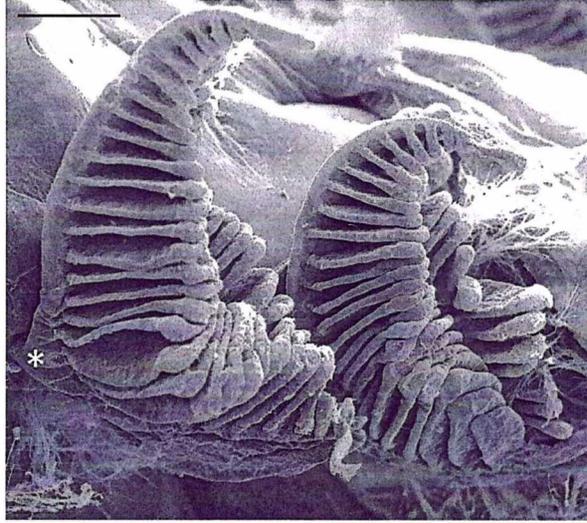


Figura 33. Vista em microscopia eletrônica de varredura das brânquias 1 e 2 mais anteriores de *Clibanarius vittatus*. (*) mostra local da inserção do eixo branquial da segunda brânquia. Barra de escala = 143 μm .

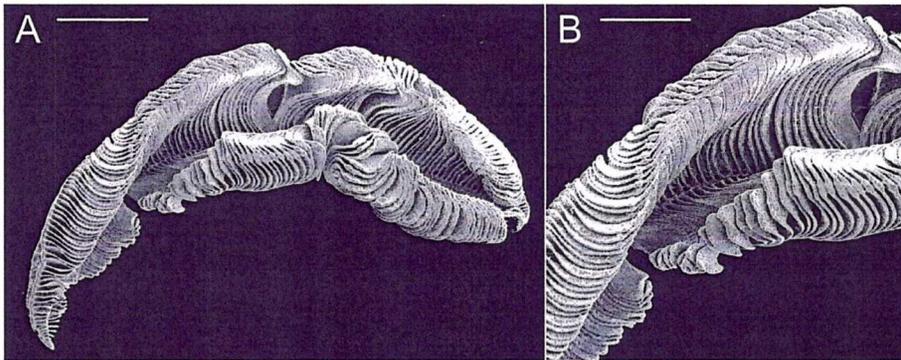


Figura 34. Microscopia eletrônica de varredura da 13ª brânquia de *Clibanarius vittatus*. **A)** Visão geral da brânquia mostrando que por toda ela as lamelas branquiais estão em direções opostas. Barra de escala = 610 μm . **B)** Detalhe do meio da brânquia ilustrando o surgimento da lamela na região interior da brânquia. Barra de escala = 390 μm .

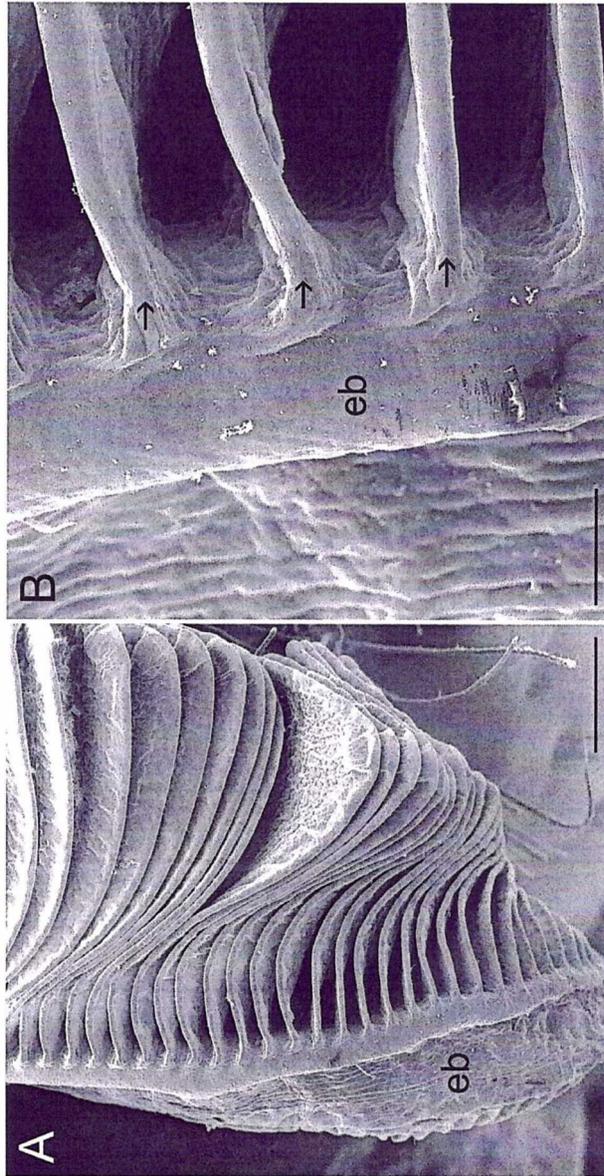


Figura 35. Microscopia eletrônica de transmissão da 10ª brânquia. **A)** Lamelas inferiores saindo do eixo branquial (**eb**). Barra de escala = 137 μ m. **B)** Detalhe das lamelas originando-se do eixo branquial (**setas**). Barra de escala = 28 μ m.

Associado à cutícula das lamelas estão presentes muitas algas (Figura 36). A cutícula se apresenta enrugada por toda a lamela branquial (Figura 37 A) e nas margens de cada lamela existem pequenos nódulos (Figura 37 B e C) que variam gradualmente sua localização de uma extremidade à outra na brânquia (Figura 34 e Figura 37 D). Estes apresentam função aparente de manter um espaço aberto entre as lamelas, o que evita a colabação entre elas na ausência de água na câmara branquial.

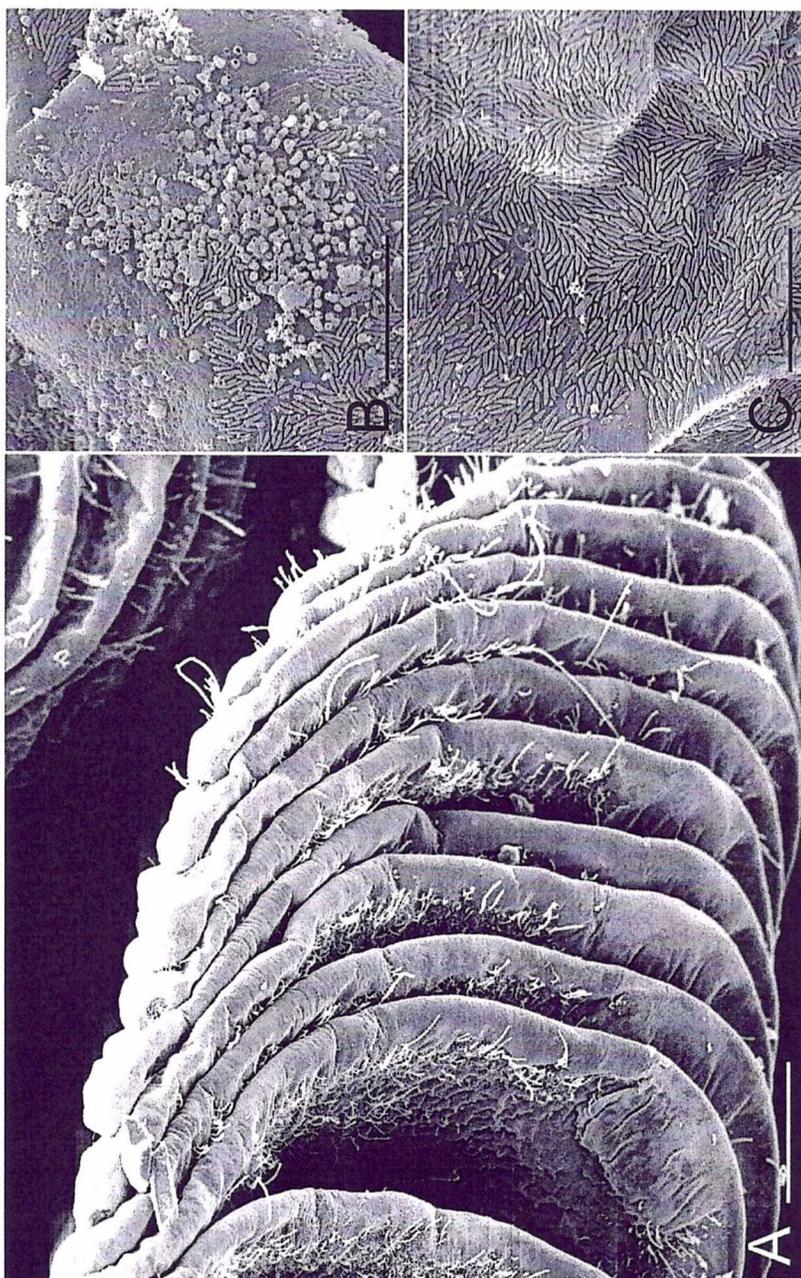


Figura 36. Microscopia eletrônica de transmissão de lamelas branquiais de *Clibanarius vittatus* mostrando as diferentes algas que se encontram associadas às lamelas branquiais. **A)** Barra de escala = 63 μm . **B)** Barra de escala = 8 μm . **C)** Barra de escala = 8 μm .

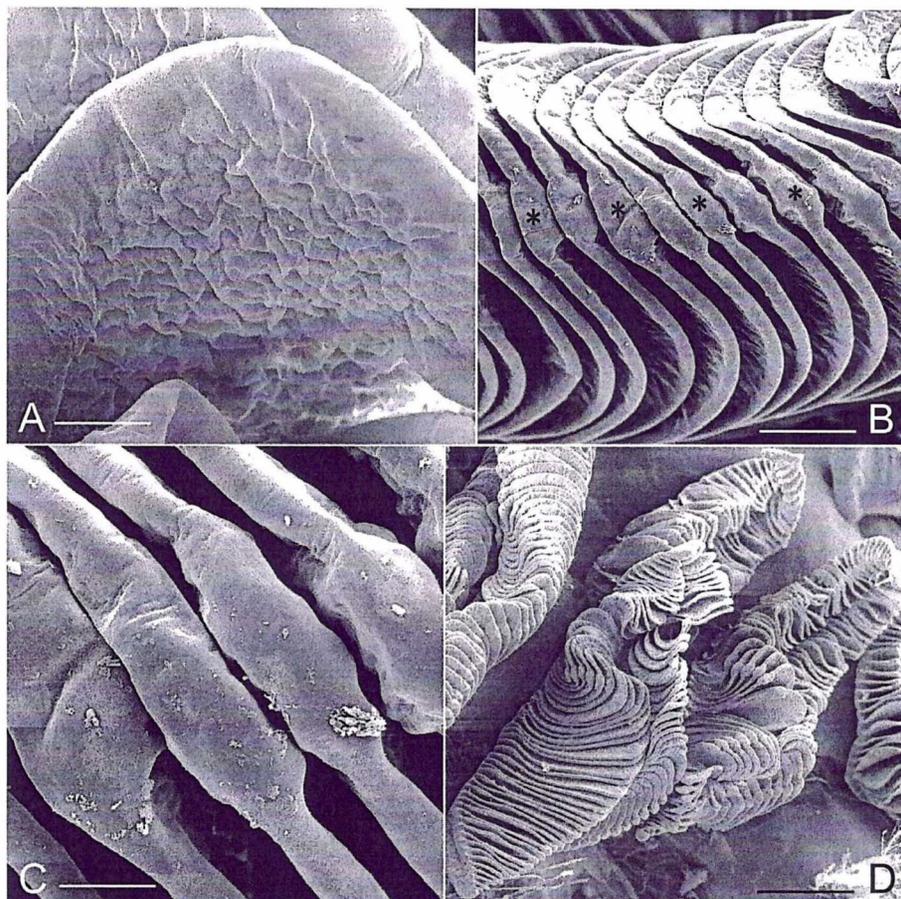


Figura 37. Microscopia eletrônica de transmissão de lamelas branquiais de *Clibanarius vittatus*. **A)** Superfície de lamela branquial ilustrando a textura rugosa da cutícula. Barra de escala = 27 μm . **B)** Detalhe de lamelas separadas pela presença de nódulos (*) em suas margens. Barra de escala = 84 μm . **C)** Detalhe dos nódulos. Barra de escala = 20 μm . **D)** 5ª e 6ª brânquias ilustrando a mudança da região dos nódulos nas lamelas ao longo de toda a brânquia. Barra de escala = 320 μm .

5.7 Coloração por nitrato de prata

A coloração com nitrato de prata mostrou que, diferentemente de *Aegla franca*, em *C. vittatus* todas as brânquias estão relacionadas com o mecanismo de transporte iônico. A prata corou todas as 26 brânquias e

de forma praticamente homogênea por toda a brânquia (Figura 31, Figura 32).

5.8 *Clibanarius vittatus* em água do mar a 35 ‰S

5.8.1 Microanatomia interna das lamelas branquiais de *C. vittatus*

Foram analisadas as lamelas da 8ª, 9ª e 13ª brânquias de *Clibanarius vittatus*. A microscopia óptica mostrou que a arquitetura interna das lamelas das três brânquias avaliadas de *Clibanarius vittatus* se assemelha à arquitetura interna do camarão palemonídeo *Macrobrachium olfersi*. As lamelas são organizadas de forma que se têm um epitélio simples logo abaixo da cutícula, formado por células pilares e suas franjas. Estas células estão dispostas de forma organizada revestindo a parede interna das lamelas nos dois lados (Figura 38, Figura 39 e Figura 40). Entre o epitélio de cada lado, ou seja, no meio da lamela, há um septo intralamelar que é sustentado pelas projeções basais do pericário da célula pilar, e que divide o espaço por onde percorre a hemolinfa (Figura 38 C, Figura 39 C e Figura 40 C), formando os canalículos. Esses pequenos canais se conectam aos canais marginais aferente e eferente que ocorrem por toda a periferia da lamela branquial (Figura 38 A e B, Figura 41 A e B e Figura 42 A, B, D e E), até alcançarem o vaso aferente e o vaso eferente localizados no eixo branquial. Estes canais marginais não são simétricos, os cortes transversais das lamelas mostram que o canal marginal eferente externo apresenta o diâmetro ligeiramente maior que o canal marginal interno

(Figura 38 A e B, Figura 39 A e B e Figura 40 A). O septo não é contínuo, os cortes longitudinais das lamelas mostram que o septo é fenestrado e há passagem da hemolinfa de um lado para o outro.

Além da diferença de tamanho entre as três brânquias avaliadas, e, apesar da arquitetura lamelar das três brânquias serem iguais, foi observado uma leve diferença entre as três brânquias analisadas em relação a espessura de septo e espessura das franjas das células pilares, porém essas diferenças não foram passíveis de avaliação pela dificuldade de definir os limites das células com o microscópio óptico.

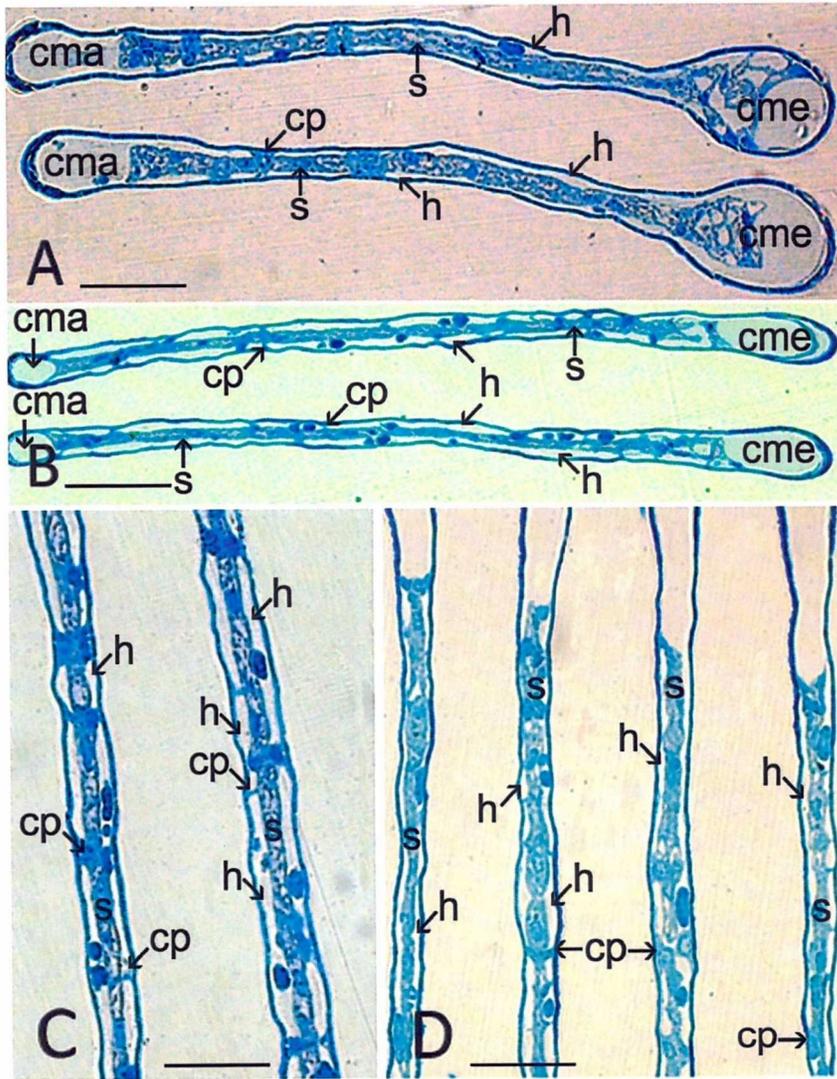


Figura 38. Microscopia óptica de oitava brânquia de *Clibanarius vittatus* mantidos em meio de 35 %_vS, cortes lamelares. A arquitetura branquial se dá pela presença de células pilares (**cp**) logo abaixo da cutícula, que pela região de seu pericário se conecta com o septo intralamelar (**s**), formando assim o espaço por onde percorre a hemolinfa (**h**), os canalicúlos. **A)** Corte transversal na região periférica da lamela. Canal marginal aferente (**cma**), canal marginal eferente (**cme**) Barra de escala = 44 μ m. **B)** Corte transversal no meio da lamela. Barra de escala = 62 μ m. **C)** Corte longitudinal da lamela. Barra de escala = 33 μ m. **D)** Detalhe do meio da lamela. Barra de escala = 25 μ m.

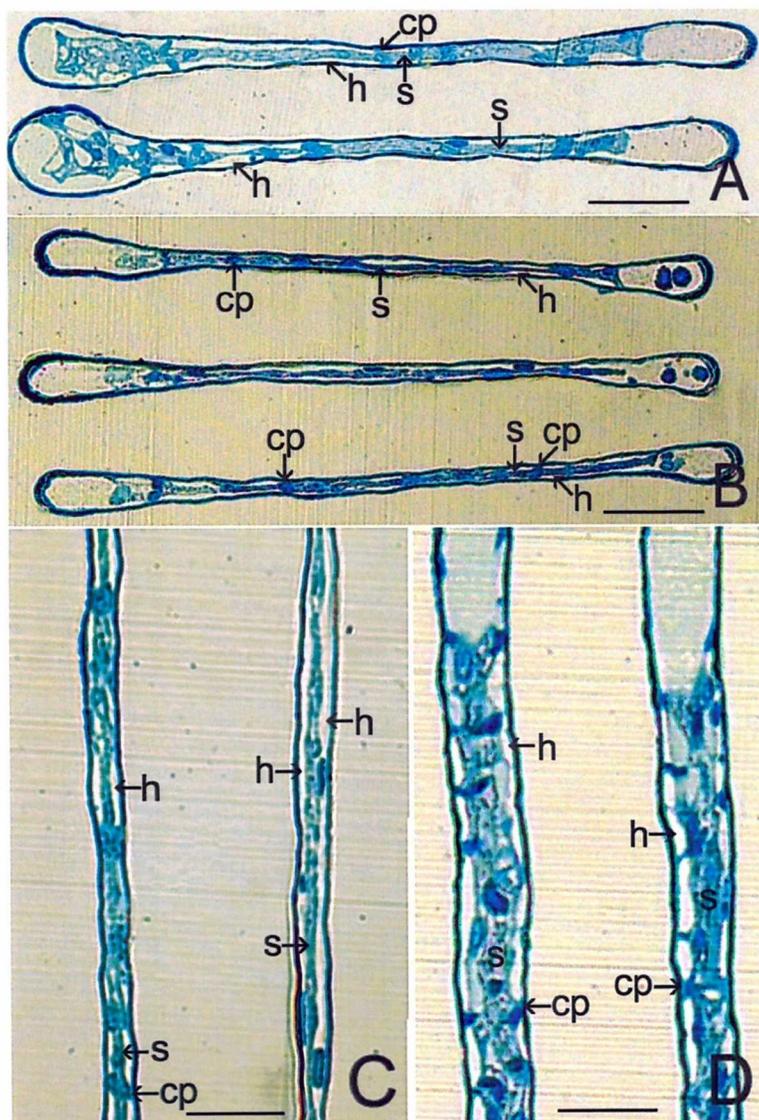


Figura 39. Microscopia óptica de nona brânquia de *Clibanarius vittatus* mantidos em meio de 35 %S, cortes lamelares. A arquitetura branquial é semelhante em todas as brânquias. Células pilares (**cp**) logo abaixo da cutícula, (**s**) septo intralamelar, (**h**) espaço por onde percorre a hemolinfa. **A)** Corte transversal na região periférica da lamela. Canal marginal aferente (**cma**), canal marginal eferente (**cme**). Barra de escala = 38 μ m. **B)** Corte transversal no meio da lamela. Barra de escala = 45 μ m. **C)** Corte longitudinal da lamela. Barra de escala = 22 μ m. **D)** Detalhe do meio da lamela, destaque para o septo. Barra de escala = 25 μ m.

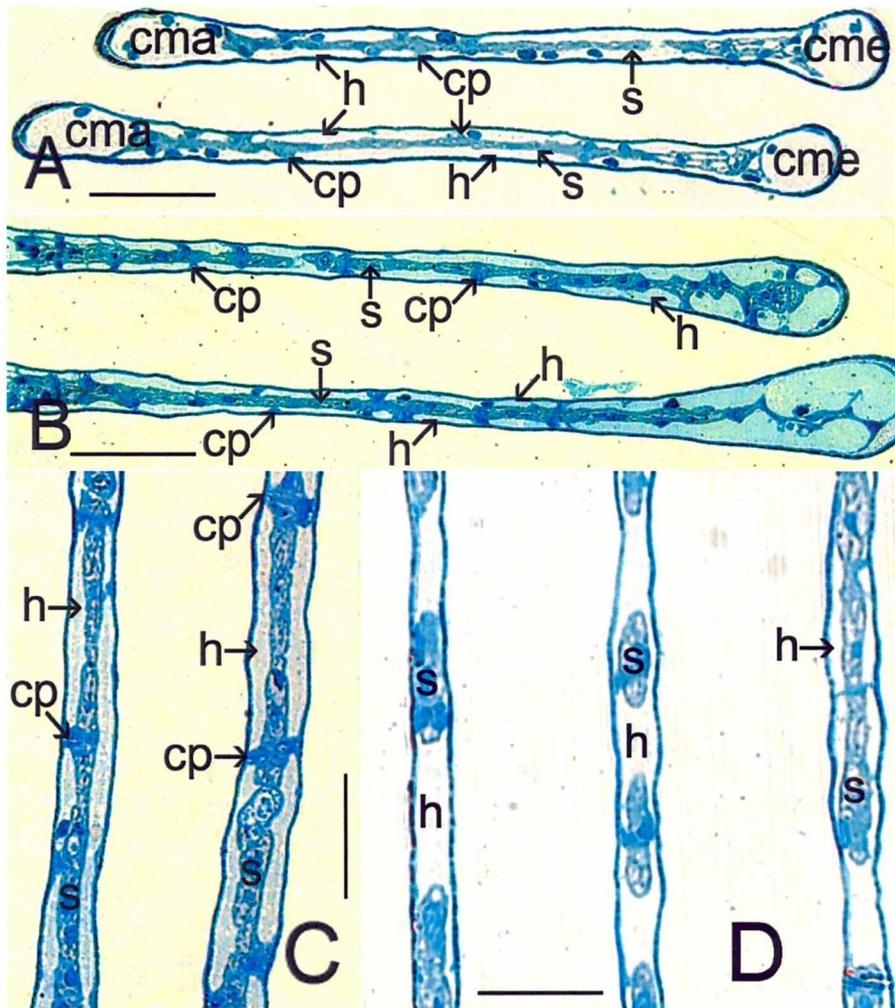


Figura 40. Microscopia óptica de décima terceira brânquia de *Clibanarius vittatus* mantidos em meio de 35 % α S, cortes lamelares. A arquitetura branquial é semelhante em todas as brânquias. Células pilares (**cp**) logo abaixo da cutícula, (**s**) septo intralamelar, (**h**) espaço por onde percorre a hemolinfa. **A)** Corte transversal na região periférica da lamela. Canal marginal aferente (**cma**), canal marginal eferente (**cme**) Barra de escala = 60 μ m. **B)** Corte transversal no meio da lamela. Barra de escala = 68 μ m. **C)** Corte longitudinal da lamela. Barra de escala = 40 μ m. **D)** Detalhe do meio da lamela, destaque para o septo. Barra de escala = 30 μ m.

5.8.2 Ultraestrutura das células epiteliais das lamelas branquiais de *C. vittatus*

A microscopia eletrônica de transmissão mostrou que a ultraestrutura das lamelas branquiais dos animais mantidos em água do mar a 35 ‰ não são homogêneas por inteiro. As franjas das células pilares que revestem a cutícula da lamela interiormente são extremamente finas, as estruturas celulares são poucas ou quase que ausentes, raramente encontra-se mitocôndrias e as invaginações de membrana são muito escassas. Algumas regiões apresentam um espaço subcuticular muito pequeno ou praticamente ausentes. Há a presença de somente pequenos desmossomos entre franjas adjacentes (Figura 41 D, Figura 42 E e Figura 43 F). Em algumas regiões das franjas foram observados 'espaços' delimitados por vesículas e material granuloso. Não está claro se isto é real e estruturado ou se houve algum artefato. Essas estruturas foram encontradas em todas as lamelas avaliadas (Figura 41 E, Figura 43 A). Na região do pericário da célula pilar, observou-se que o lado apical se desenvolve e forma evaginações, de modo que visivelmente se têm o espaço subcuticular mais evidenciado comparado com a região das franjas (Figura 41 A, Figura 42 A e Figura 43 B). Pôde-se observar também que a região do pericário é mais rica em estruturas celulares como invaginações da membrana basal, presença de mitocôndrias, núcleo, muitas vesículas, cisternas de retículo endoplasmático, citosol bastante denso, filamentos de actina próximos aos desmossomos deixando estes bem marcados

(Figura 41 A, Figura 42 A e B, Figura 43 B). Esses desmosomas 'reforçados' são responsáveis pela coesão entre a célula pilar que está na parede oposta da lamela e ainda com o septo que divide o espaço da hemolinfa. Observou-se a presença de microtúbulos nas células pilares (Figura 43 A), o que proporciona integridade ao espaço por onde percorre a hemolinfa, e possibilita estabilidade estrutural à lamela mesmo com a pressão hidrostática da hemolinfa.

A ultraestrutura do septo mostra que ele é variável ao longo da lamela. Há áreas em que se apresenta denso e rico em material granuloso, e há áreas em que se apresenta menos denso, muito vesiculado e com grande quantidade de membranas invaginadas, o que amplifica a interface do septo com a hemolinfa, e apenas algumas mitocôndrias.

Na oitava brânquia, o septo apresentou regiões muito ricas em estrutura celular, como mitocôndrias, invaginações de membrana e inclusive a presença de muitas pequenas vesículas (Figura 41 B), em outras regiões, mais distante do encontro das células pilares, foi encontrado um septo trabeculado com poucas estruturas e muitos espaços vazios delimitados por membranas (Figura 41 C). O epitélio na região das franjas se apresenta bastante fino (≈ 650 nm de espessura) (Figura 41 D). No encontro das células pilares e septo as células são densas com a presença de muitas mitocôndrias, a membrana apical bastante evaginada (Figura 41 A).

A nona brânquia não apresentou regiões no septo rico em estruturas celulares, houve praticamente a presença apenas do septo trabeculado (Figura 42 A e C). A região mais rica em estrutura é o encontro das células pilares de lados opostos da lamela (Figura 42 A e B), nessa região há presença de evaginações de membrana, surge o espaço subcuticular relativamente desenvolvido (Figura 42 F). As franjas são bastante finas (≈ 890 nm) nas quais há a presença de desmosomos nos encontros de franjas adjacentes (Figura 42 E).

A décima terceira brânquia foi a em que se encontrou o septo mais enriquecido com estruturas celulares que remetem a transporte iônico (Figura 43 C), porém ainda houve regiões em que se apresenta menos denso (Figura 43 D). Regiões do pericário da célula pilar se apresentam bastante densas em estruturas celulares, e é onde se encontra grande quantidade de evaginações apicais com a presença de espaço subcuticular (Figura 43 B e E). As franjas são finas (≈ 530 nm) e também há desmosomos fazendo a conexão entre as franjas adjacentes (Figura 43 C, E e F).

A Tabela 1 apresenta os parâmetros medidos nos epitélios lamelares de *Clibanarius vittatus*. O único parâmetro medido em que houve uma diferença significativa entre as brânquias foi a espessura do septo lamelar, sendo que há diferença entre a oitava brânquia (≈ 150 nm mais espesso) e a décima terceira e nona brânquias, porém entre a nona e a décima terceira não há diferença.

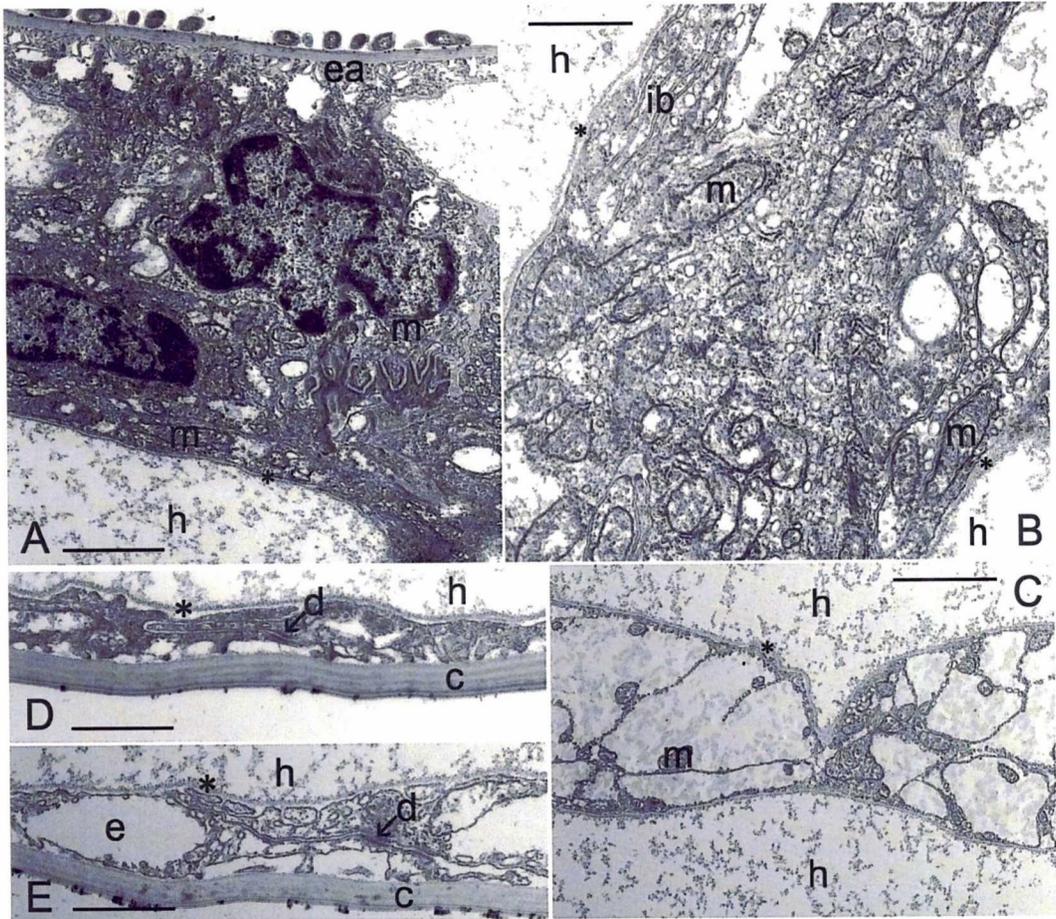


Figura 41. Eletronmicrografia de epitélio lamelar da oitava brânquia de *Clibanarius vittatus* mantido em meio de coleta, água do mar 35 ‰S. **A)** Transecto que ilustra encontro da região do pericário de células pilares de paredes opostas da lamela. Nessa região as células são densas e ricas em estruturas. No lado apical de cada célula há evaginações de membrana (**ea**) desenvolvidas formando um espaço subcuticular. Ocorre também invaginações da membrana (**ib**) basal e presença de mitocôndrias (**m**). O citoesqueleto é denso, há a presença de muitas vesículas, cisternas de retículo endoplasmático e desmossomos bem marcados. Barra de escala = 2 µm. **B)** Região do septo intralamelar, próximo ao encontro das células pilares. Nessa região ele se encontra rico em mitocôndrias e invaginações da membrana. (**h**) hemolinfa, (*) lâmina basal. Barra de escala = 840 nm. **C)** Região do septo trabeculado, há muitos espaços vazios, poucas mitôndrias. Barra de escala = 2,3 µm. **D)** Fanja da célula pilar, epitélio extremamente fino, ausência de estruturas celulares,

presença de desmossomos que faz a conexão entre células adjacentes. Barra de escala = 800 nm. **E)** Espaços (**e**) delimitados por vesículas e material granuloso, também há a presença de desmossomos nessa região. Barra de escala = 790 nm.

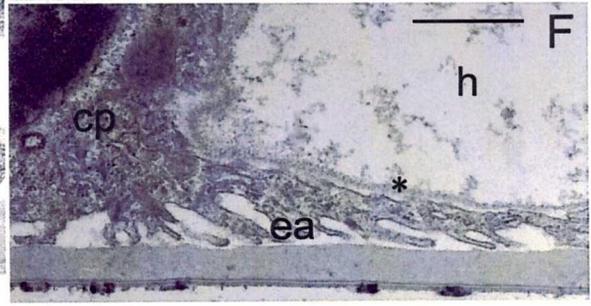
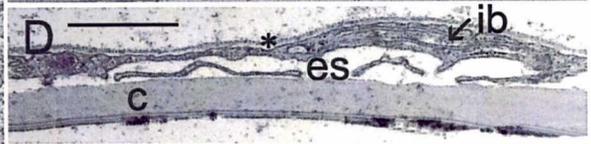
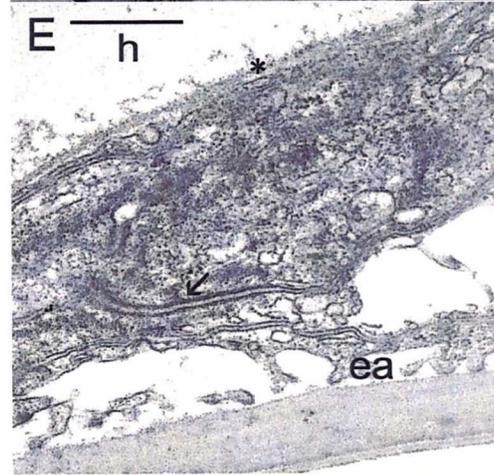
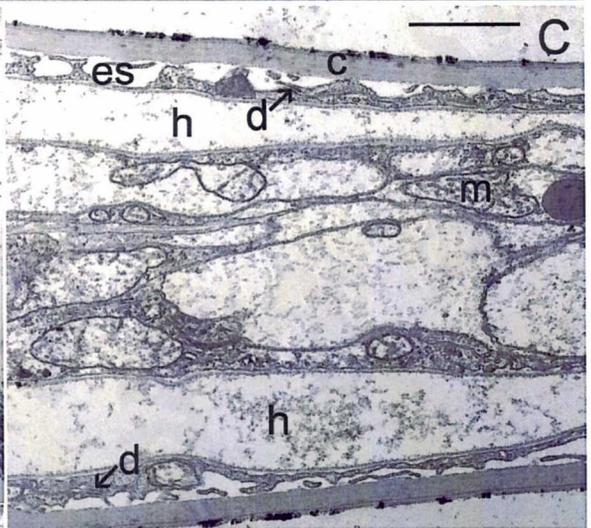
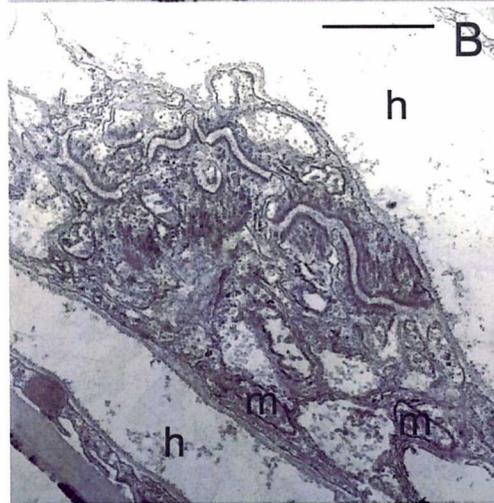
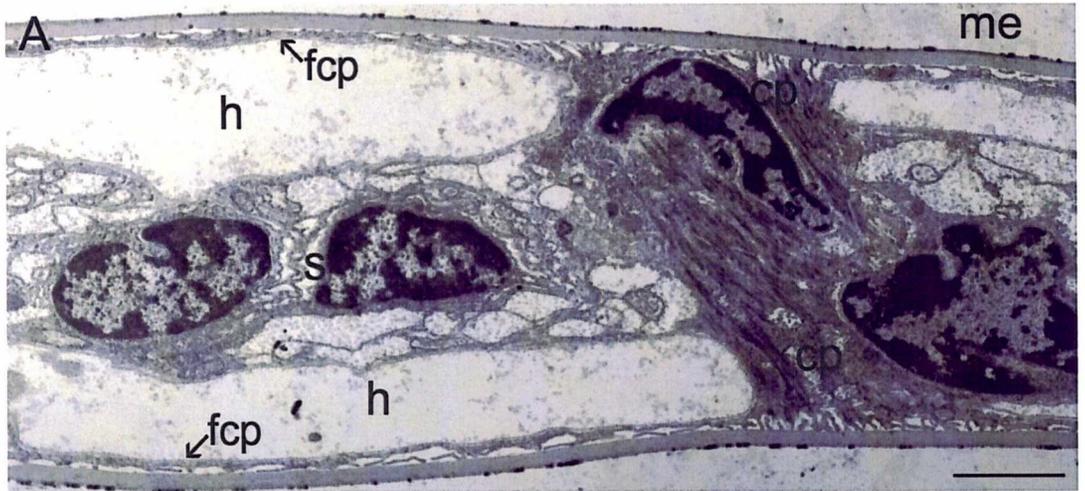


Figura 42. Eletronmicrografia de epitélio lamelar da nona brânquia de *Clibanarius vittatus* mantido em meio de coleta, água do mar 35 ‰. **A)** Transecto lamelar que mostra região de encontro de células pilares (**cp**) e septo (**s**). Região fortemente ligada por desmossomos 'reforçados'. As franjas das células pilares (**fcp**) são finas na região do espaço da hemolinfa (**h**). A cutícula (**c**) é a interface do animal com o meio externo (**me**). Barra de escala = 2,7 µm. **B)** Destaque da região de encontro do pericário das células pilares. A qual o citoesqueleto é denso com mitocôndrias (**m**) presentes, os desmossomos são bem marcados o que possibilita a estabilizar o espaço da hemolinfa contra a pressão hidrostática da hemolinfa. Barra de escala = 970 nm. **C)** Tansecto lamelar na região onde o septo é trabeculado, com muitos espaços e presença de poucas mitocôndrias. Também aparece nesta imagem as franjas das células pilares (**fcp**) finas e com poucas estruturas. Há a presença de desmossomos (**d**) que conectam as células adjacentes. Nesta região ainda há a presença de um espaço subcuticular (**es**), logo abaixo da cutícula (**c**). Barra de escala = 2,3 µm. **D)** Destaque da franja da célula pilar onde mostra que apesar de muito fino há invaginações da membrana basal (**ib**) e também um pequeno espaço subcuticular. (*) é a lâmina basal. Barra de escala = 1,6 µm. **E)** Destaque da região de desmosso (**seta**) entre franjas de células pilares adjacentes. Há a presença de uma lâmina basal em interface com a hemolinfa. As evaginações apicais são extremamente curtas nessa região (**ea**). Barra de escala = 250 nm. **F)** Destaque de região do 'ombro' da célula pilar, nesta parte as evaginações apicais são desenvolvidas e ocorre a presença do espaço subcuticular. Barra de escala = 750 nm.

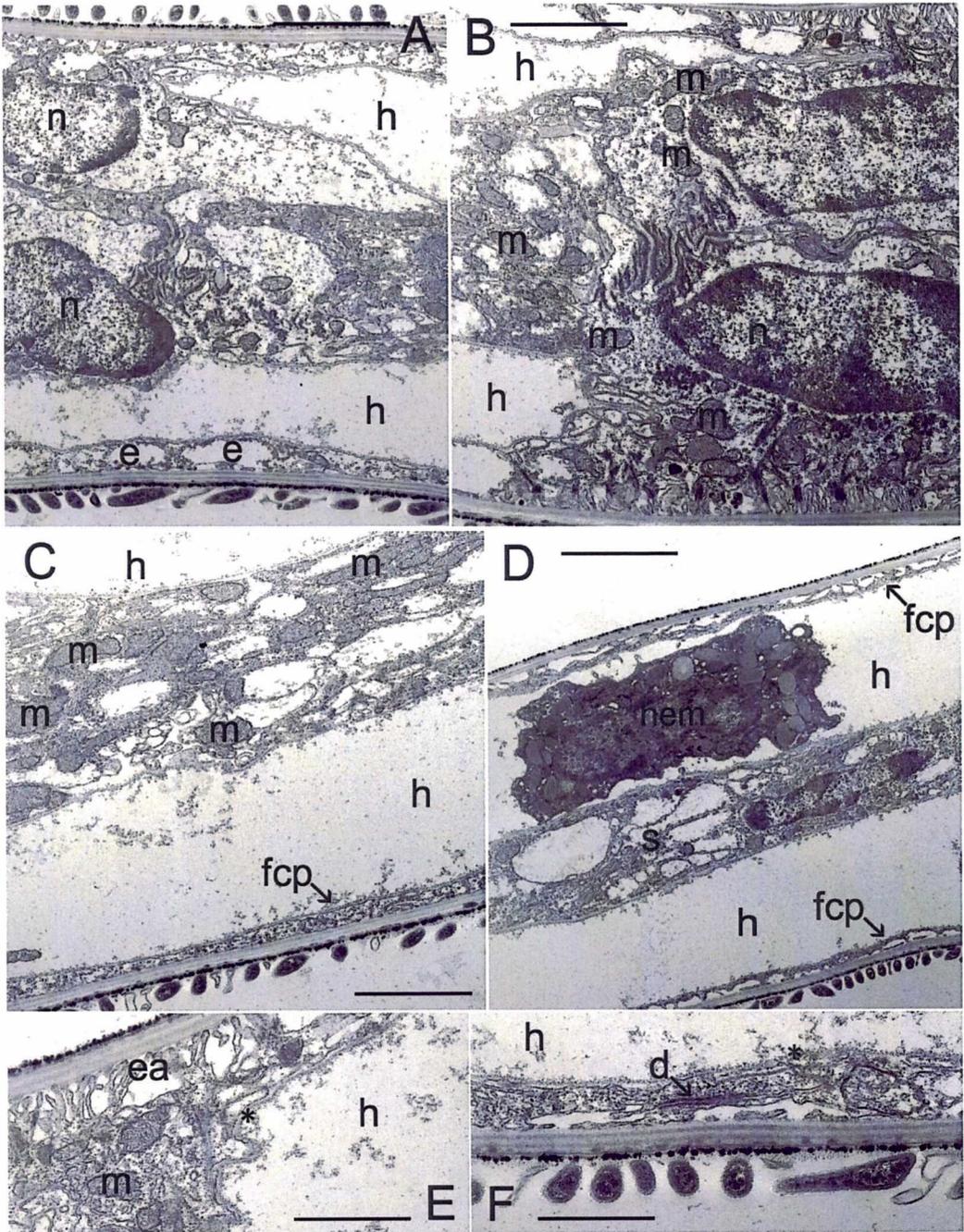


Figura 43. Eletronmicrografia de epitélio lamelar da décima terceira brânquia de *Clibanarius vittatus* mantido em meio de coleta, água do mar 35 ‰S. **A)** Transecto lamelar que mostra região de encontro de células pilares, (n) é o núcleo de cada lamelar que mostra região de encontro de células pilares, (n) é o núcleo de cada

célula, (h) espaço da hemolinfa, (e) são os espaços delimitados por vesículas. Barra de escala = 2,5 µm. **B)** Destaque da região de encontro do pericário das células pilares. A qual o citoesqueleto é denso com mitocôndrias (m) presentes. Barra de escala = 2 µm. **C)** Região do septo rico em mitocôndrias, as franjas das células pilares (fcp) são finas na região do espaço da hemolinfa. Nessa região não há evaginações de membrana e o espaço subcuticular é ausente. Barra de escala = 2,2 µm. **D)** Tansecto lamelar na região onde o septo (s) é trabeculado, com muitos espaços e presença de poucas mitocôndrias. Também aparece nesta imagem as franjas das células pilares (fcp) finas e com poucas estruturas. Nesta região ainda há a presença de um espaço subcuticular (es), logo abaixo da cutícula (c). (hem) é um hemócito. Barra de escala = 3,5 µm. **E)** Destaque de região do 'ombro' da célula pilar, nesta parte as evaginações apicais são desenvolvidas e ocorre a presença do espaço subcuticular. A lâmina basal (*) delimita o espaço da hemolinfa. Barra de escala = 1 µm. **F)** Destaque da franja da célula pilar, presença de desmossomo entre células adjacentes. Barra de escala = 1 µm.

5.9 Aclimação por 10 dias a uma salinidade reduzida (água do mar diluída a 15 ‰S)

5.9.1 Alterações na microanatomia do epitélio lamelar de *Clibanarius vittatus*

Após aclimação por 10 dias em água do mar diluída, 15 ‰S, não houve alterações aparente na arquitetura dos filamentos branquiais de *C. vittatus*. Houve algumas alterações em relação à espessura do septo e espessura das franjas das células pilares. Na oitava brânquia houve um afinamento do septo e espessamento das células pilares (Figura 44). Na nona brânquia as diferenças não são claras (Figura 45 B), apenas em algumas regiões da lamela aparentou haver espessamento das franjas das células pilares (Figura 45 C). O nódulo marginal é composto principalmente de tecido conjuntivo (Figura 45 A), assim como o canal marginal (Figura 45 D). Na décima terceira brânquia, pelos cortes transversais aparentou haver um leve

espessamento do septo (Figura 46 A e B), porém nos longitudinais o oposto parece ter ocorrido afinamento (Figura 40 D e Figura 46 C). Os canais marginais também parecem ser constituídos de tecido conjuntivo (Figura 46 C).

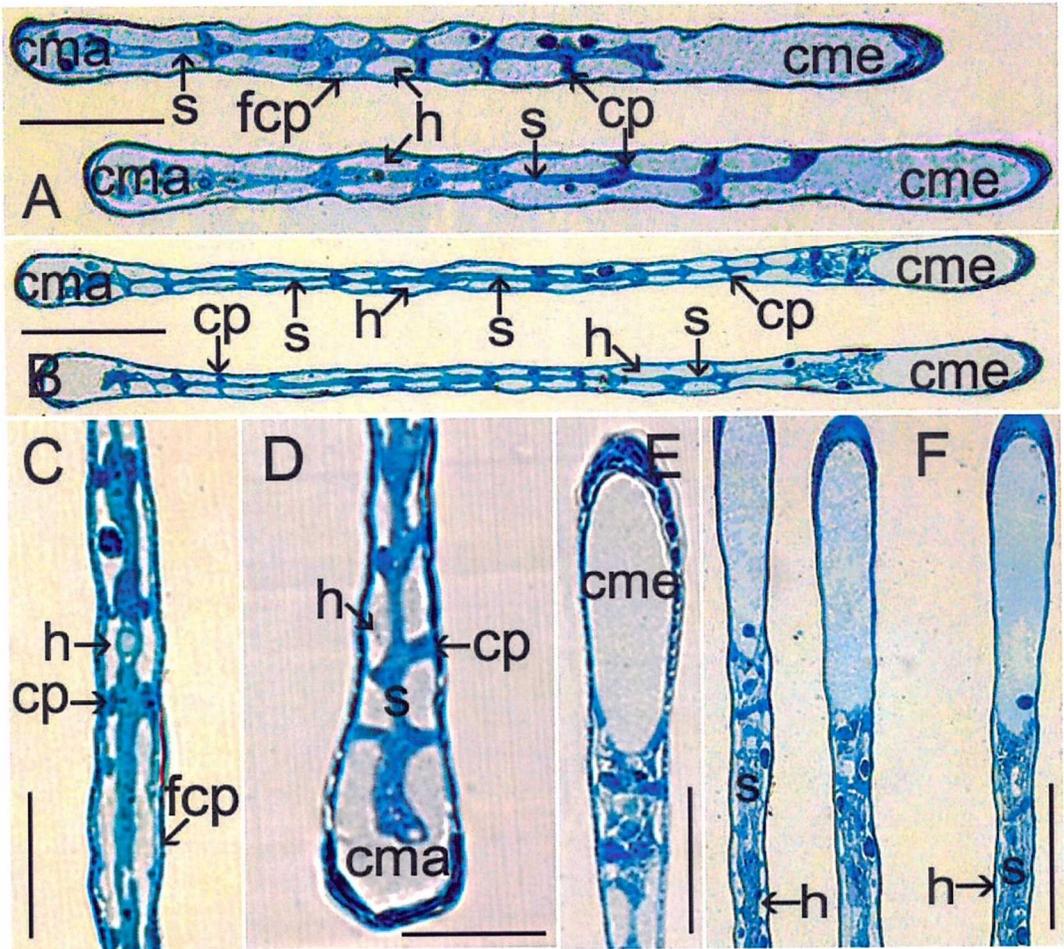


Figura 44. Microscopia óptica de oitava brânquia de *Clibanarius vittatus* mantido por 10 dias em meio diluído, cortes lamelares. A arquitetura branquial não muda após o período de aclimatação, ela permanece semelhante em todas as brânquias. Células pilares (cp) logo abaixo da cutícula, (s) septo intralamelar, (h) espaço por onde percorre a hemolinfa. **A)** Corte transversal na região periférica da lamela. Canal marginal aferente (cma), canal marginal eferente (cme) Barra de escala = 47 µm. **B)**

Corte transversal no meio da lamela. Barra de escala = 74 μm . **C)** Destaque do meio da lamela ilustra arquitetura branquial mais detalhada. Barra de escala = 30 μm . **D)** Detalhe do canal marginal aferente. Barra de escala = 30 μm . **E)** Detalhe do canal marginal eferente. Barra de escala = 37 μm . **F)** Corte longitudinal da lamela, o septo neste corte apresenta-se bastante espessado. Barra de escala = 63 μm .

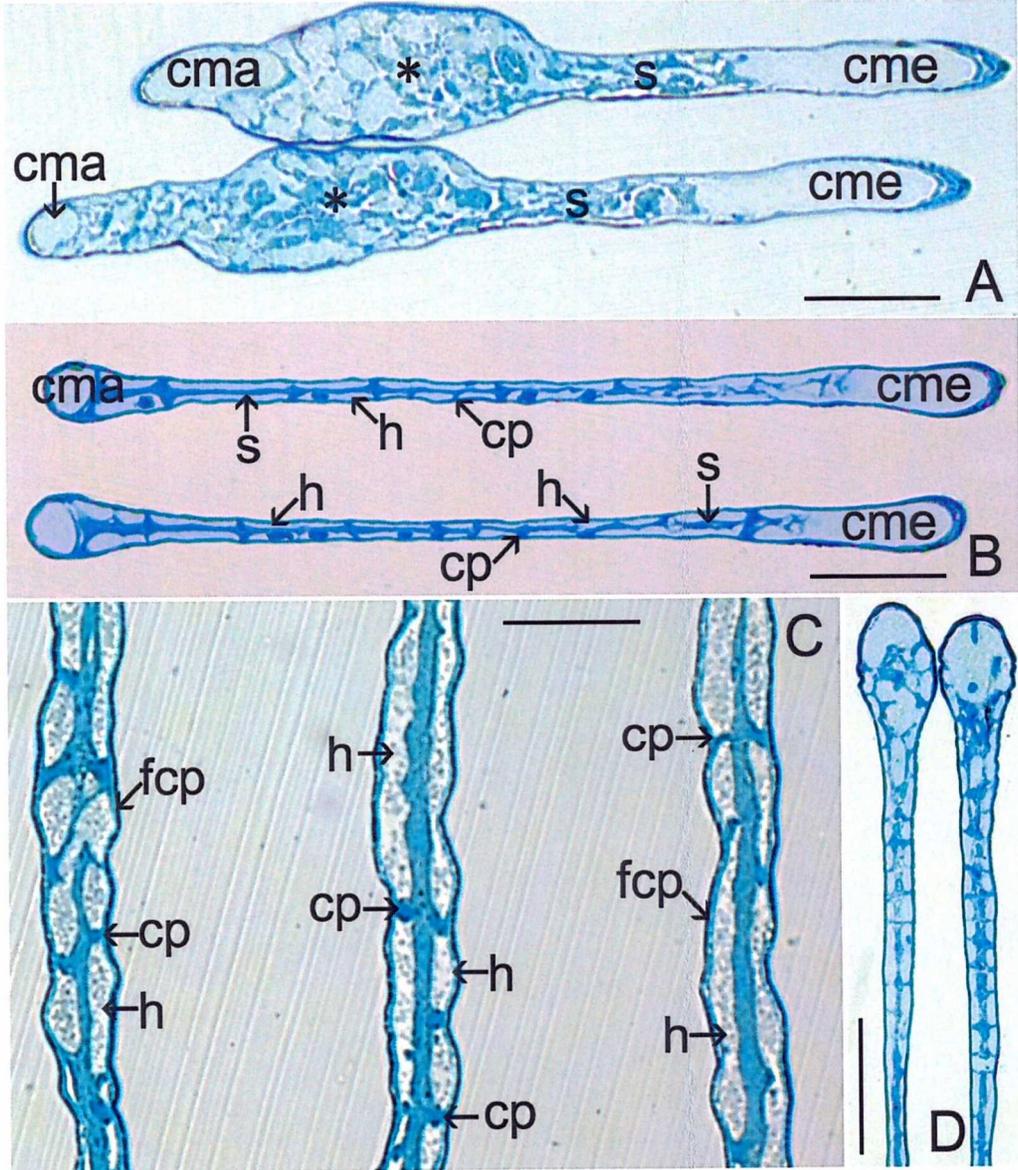


Figura 45. Microscopia óptica de nona brânquia de *Clibanarius vittatus* mantido por 10 dias em meio diluído, cortes lamelares. A arquitetura branquial não muda após o período de aclimação, ela permanece semelhante em todas as brânquias. Células pilares (**cp**) logo abaixo da cutícula, (**s**) septo intralamelar, (**h**) espaço por onde percorre a hemolinfa. **A)** Corte transversal na região do nódulo da lamela (*). Canal marginal aferente (**cma**), canal marginal eferente (**cme**). Barra de escala = 78 μm . **B)** Corte transversal no meio da lamela. Barra de escala = 48 μm . **C)** Destaque do meio da lamela, ilustra arquitetura branquial mais detalhada. Barra de escala = 26 μm . **D)** Corte longitudinal da lamela, pegando região da margem. Barra de escala = 59 μm .

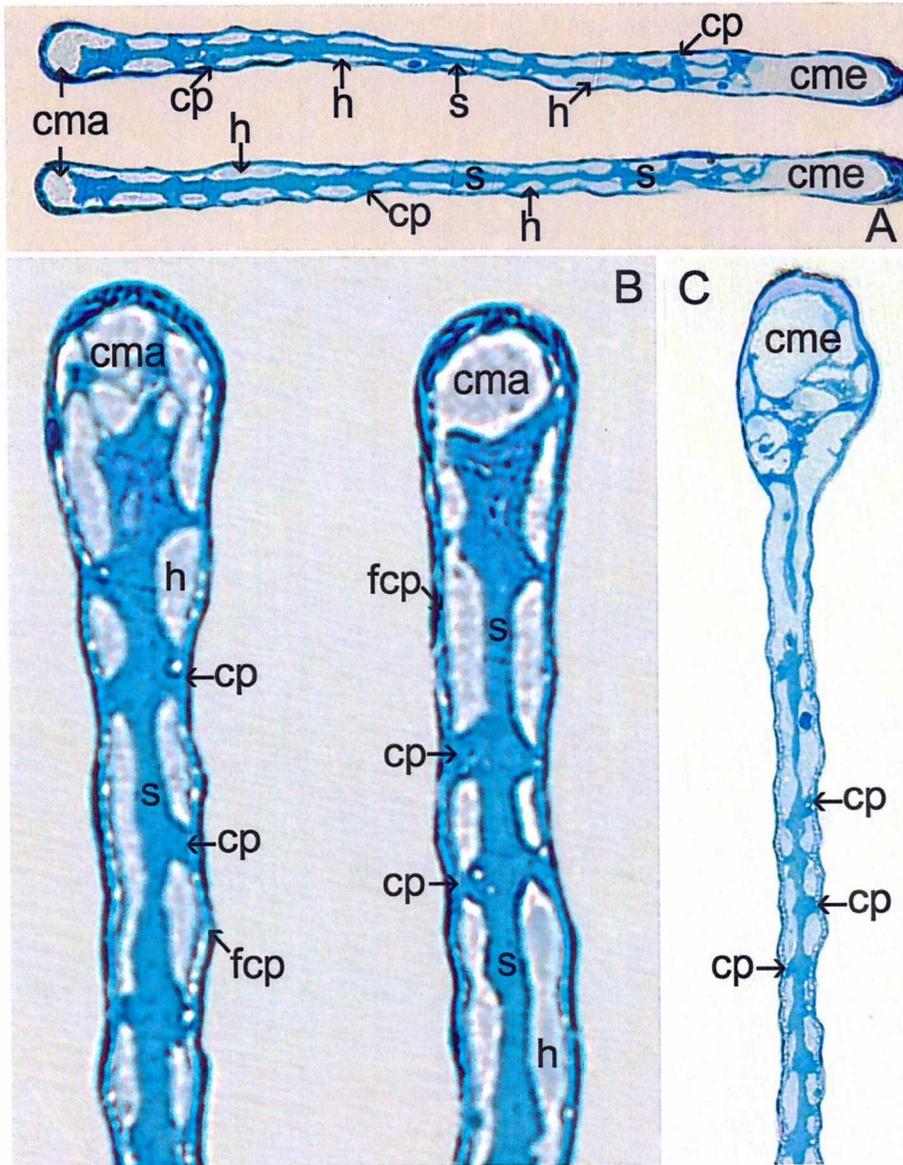


Figura 46. Microscopia óptica de décima terceira brânquia de *Clibanarius vittatus* mantido por 10 dias em meio diluído, cortes lamelares. A arquitetura branquial não muda após o período de aclimação, ela permanece semelhante em todas as brânquias. Células pilares (**cp**) logo abaixo da cutícula, (**s**) septo intralamelar, (**h**) espaço por onde percorre a hemolinfa. **A)** Corte transversal na região próxima da periferia da lamela. Canal marginal aferente (**cma**), canal marginal eferente (**cme**). Barra de escala = 50 μ m. **B)** Detalhe da estrutura do epitélio próximo ao canal

marginal, ilustra arquitetura branquial mais detalhada. Barra de escala = 16 μm . **C)** Corte longitudinal da lamela, pegando região da margem. Barra de escala = 50 μm .

5.9.2 Alterações na ultraestrutura do epitélio lamelar de *Clibanarius vittatus*

O septo foi a estrutura que mais apresentou alteração na ultraestrutura em todas as três brânquias analisadas. Nos animais aclimatados ele se apresenta muito mais denso, há um grande aumento na interface das células do septo com a hemolinfa, pois há o surgimento de numerosas invaginações de membrana profundas, às quais se associam longitudinalmente várias mitocôndrias de ambos os lados de cada invaginação (Figura 47 B, Figura 48 A e Figura 49 B e C). Foi encontrado maior número de nefrócitos no septo das lamelas dos animais aclimatados comparado aos do grupo controle. Na oitava brânquia os nefrócitos apresentavam-se em pequenos conjuntos associados (Figura 47 C e D). Já na décima terceira brânquia os nefrócitos se apresenta isolados (Figura 49 C).

A microscopia eletrônica de transmissão mostrou que houve o espessamento nas franjas das células pilares devido a um pequeno aumento do espaço subcuticular formado por evaginações semi-regulares na forma de folhetos, principalmente nas 8ª e 13ª brânquias (Figura 47 E e F, Figura 49 D). Associados às invaginações basais das franjas, que aparentemente também houve aumento, estão algumas poucas mitocôndrias, principalmente no epitélio lamelar da oitava brânquia, o que não foi facilmente encontrado nas franjas das células

pilares das brânquias de animais mantidos em água do mar. Houve também o aparecimento de junções entre as franjas das células pilares adjacentes, que consistem de um desmossomo seguido de uma junção septada interdigitada seguida de uma longa região de aposição até o espaço da hemolinfa (Figura 47 E e F, Figura 48 A e B, Figura 49 E). A região do corpo da célula pilar permaneceu bastante estruturada, houve aparentemente apenas um leve aumento na quantidade de mitocôndrias nessa região, assim como das invaginações de membrana que se estendem profundamente no citosol (Figura 47 A, Figura 48 A e Figura 49 A).

A Tabela 1 também apresenta os parâmetros medidos nos epitélios lamelares de *Clibanarius vittatus* aclimatados por 10 dias em água do mar diluída a 15 ‰. Houve diferença na espessura do epitélio entre a décima terceira brânquia aclimatada e a oitava e nona brânquias aclimatadas, entre estas duas não houve diferença. O mesmo ocorre em relação ao comprimento das evaginações apicais. No espaço por onde percorre a hemolinfa, há diferença apenas entre a nona e a décima terceira brânquia aclimatadas. Por fim, quanto à espessura do septo há diferença entre a oitava brânquia aclimatada e a nona e a décima terceira.

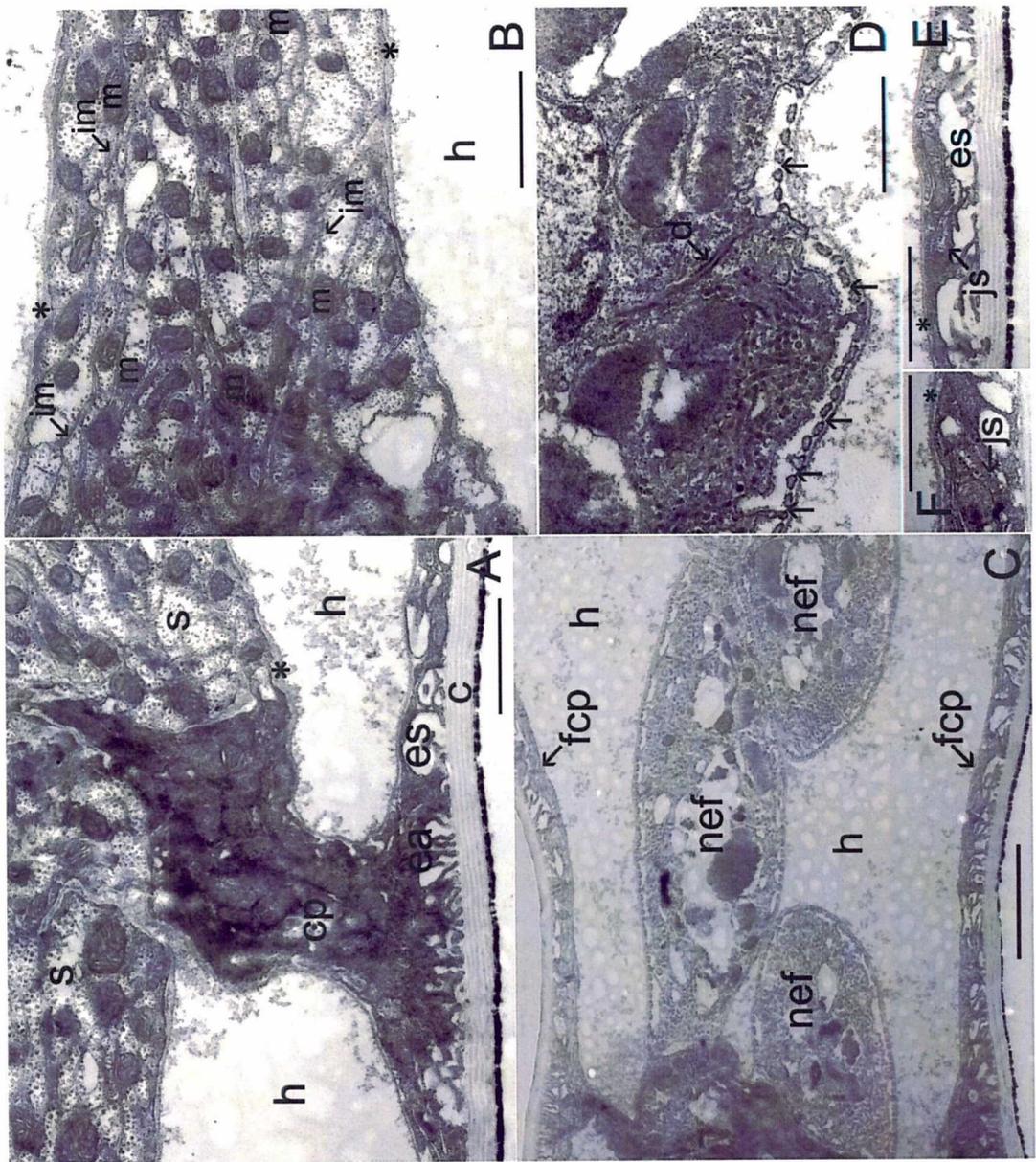


Figura 47. Eletronmicrografia de epitélio lamelar da oitava brânquia de *Clibanarius vittatus* mantido por 10 dias em água do mar diluída em 15‰S. **A)** Encontro da célula pilar (**cp**) com o septo intralamelar (**s**). As células se apresentam ricas em estruturas, há projeções da membrana apical formando as evaginações apicais (**ea**) e o espaço subcuticular (**es**). O espaço da hemolinfa (**h**) é delimitado pelas franjas das células pilares e o septo. Barra de escala = 1,5 µm. **B)** O septo intralamelar apresentou-se com

numerosas mitocôndrias (**m**) e invaginações da membrana (**im**), e ainda maior quantidade de material granuloso. (*) lâmina basal. Barra de escala = 1,5 µm. **C**) Região do septo composto por nefrócitos (**nef**) rodeados por hemolinfa. Pode-se perceber que as franjas das células pilares (**fcp**) se apresentam desenvolvidas. Barra de escala = 2,6 µm. **D**) Detalhe do nefrócito que apresentam processos pedicelares e diafragma (**setas**). Há um desmossomo (**d**) conectando nefrócitos adjacentes. Barra de escala = 1 µm. **E**) Detalhe de franja de célula pilar onde as evaginações da membrana apical proporcionam o espaço subcuticular, há ainda presença de algumas mitocôndrias (*) indica lâmina basal. Barra de escala = 1,2 µm. **F**) Detalhe de região de junção septada (**js**) entre as franjas de células pilares adjacentes. Barra de escala = 990 nm.

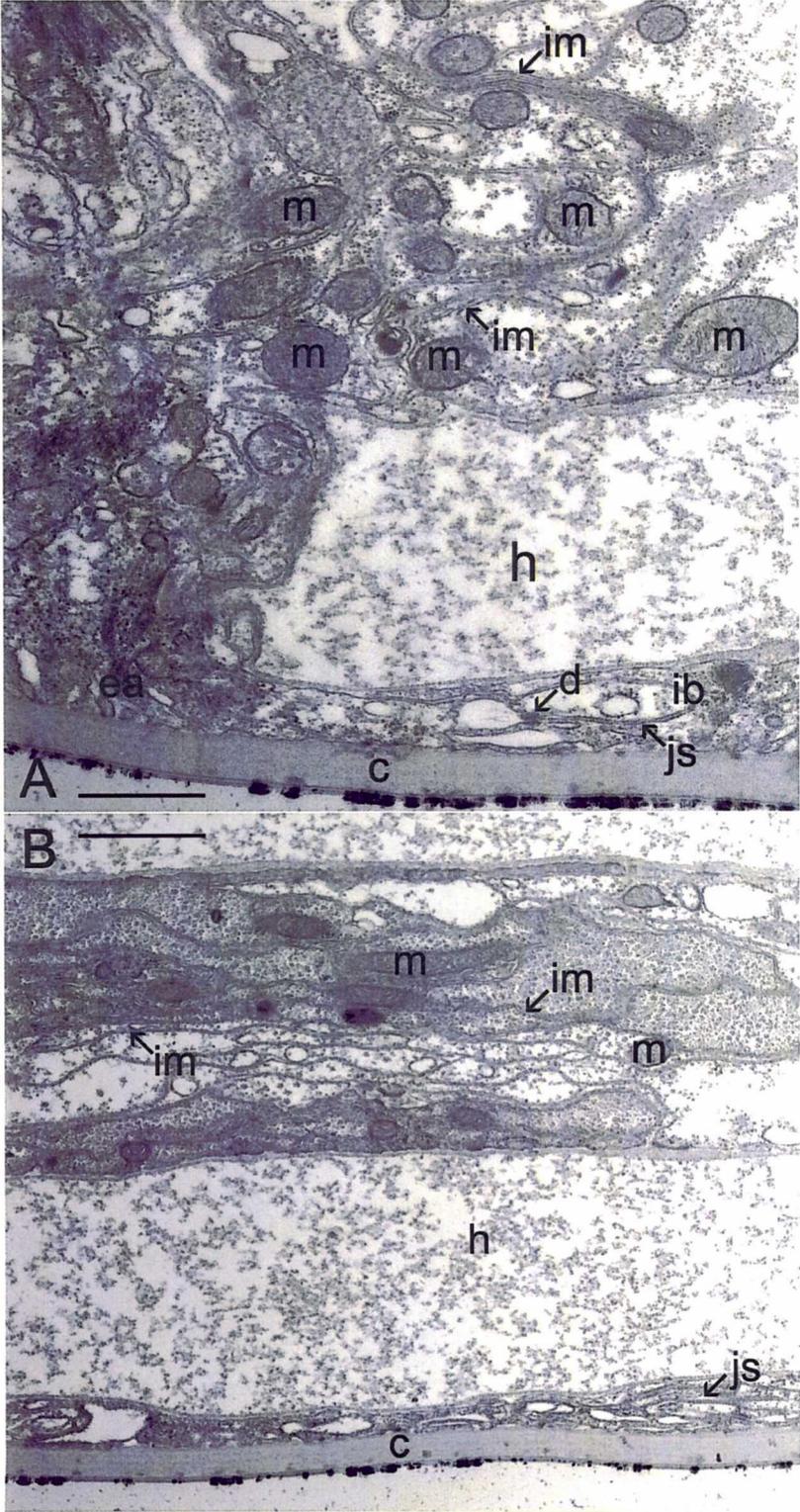


Figura 48. Eletronmicrografia de epitélio lamelar da nona brânquia de *Clibanarius vittatus* mantido por 10 dias em água do mar diluída em 15 ‰. **A)** Região de encontro de célula pilar e septo intralamelar. A membrana apical apresenta evaginações (**ea**) nessa região, lateralmente sai a franja que se conecta com a franja da célula pilar adjacente através de desmossomo (**d**) seguido de uma junção septada (**js**). Na franja há a presença de invaginações de membrana (**ib**) que amplificam a área de superfície com a hemolinfa (**h**). O septo se apresenta rico em material granuloso e mitocôndrias (**m**) associadas às invaginações de membrana (**im**). Barra de escala = 710 nm. **B)** Transecto da lamela ilustrando septo intralamelar, nesta região ele se apresenta rico em invaginações de membrana, porém menos mitocôndrias. Percebe-se que as franjas das células pilares se apresentam desenvolvidas, com o sistema de membrana mais desenvolvido. Há a presença e uma junção septada. Barra de escala = 1,3 µm.

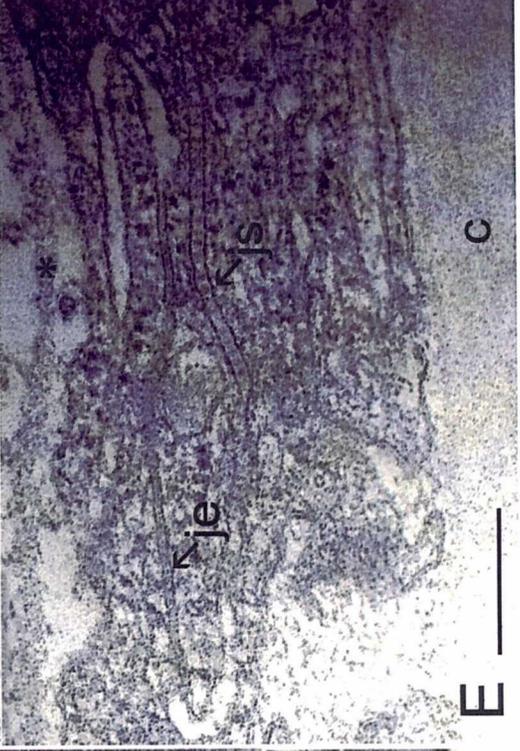
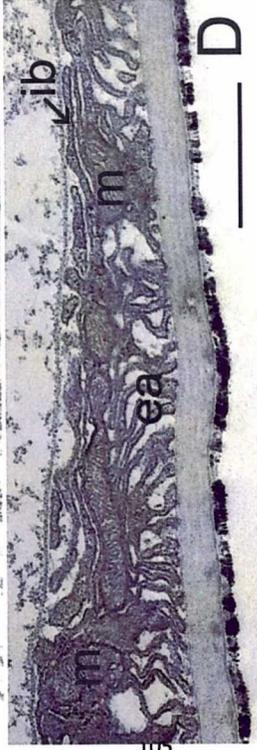
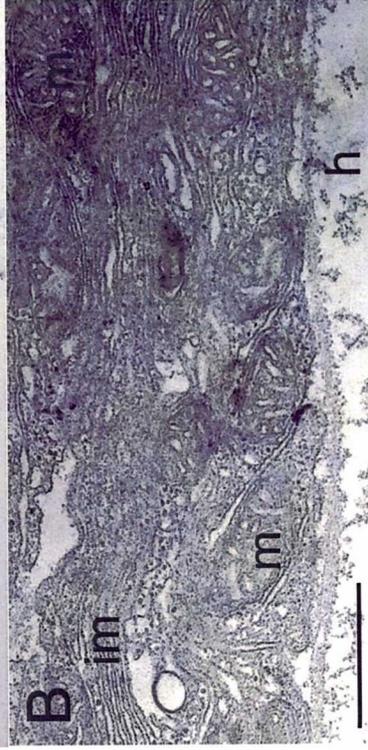
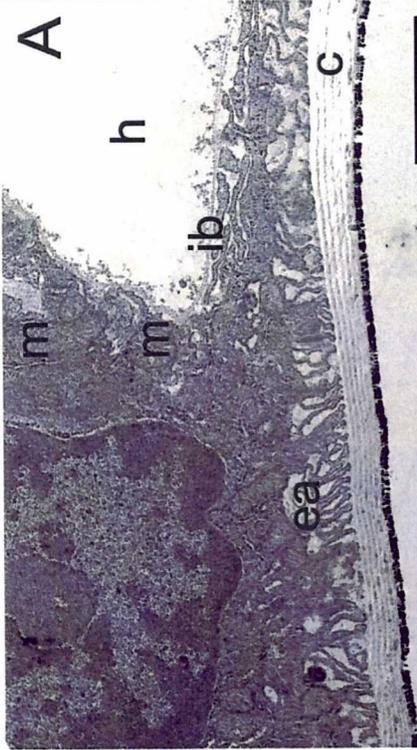


Figura 49. Eletronmicrografia de epitélio lamelar da décima terceira brânquia de *Clibanarius vittatus* mantido por 10 dias em água do mar diluída em 15 ‰S. **A)** Região do pericário de célula pilar, as evaginações da membrana apical (**ea**) estão bastante desenvolvida, há a presença de mitocôndrias (**m**) no corpo. A cutícula (**c**) separa o meio externo. Barra de escala = 3,3 µm. **B)** Septo intralamelar com sistema de invaginações de membrana desenvolvido (**im**), e a marcada presença de mitocôndrias. Barra de escala = 580 nm. **C)** Nefrócito isolado presente no septo com processos pedicelares e diafragma entre eles (**setas**) voltado para hemolinfa (**h**). Note que o septo se apresenta riqueza citoplasmática. Barra de escala = 2,3 µm. **D)** Detalhe de franja da célula pilar, há presença de mitocôndrias, invaginações basais (**ib**) e ainda evaginações picais. Barra de escala = 850 nm. **E)** Detalhe de junção septada (**js**) e junção elétrica (**je**) entre franjas adjacentes, (**c**) é a cutícula. Barra de escala = 266 nm.

Tabela 1. Parâmetros medidos nas eletronicografias dos epitélios lamelares em brânquias de *Cilbanarius vittatus* mantidos em meio de coleta, água do mar (35 ‰) ou após aclimação por 10 dias em água do mar diluída (15 ‰). Os dados são média ± erro padrão da média ($6 < N < 12$).

| | 35 ‰ | | 15 ‰ | |
|------------------------------|---------------|---------------|-------------|--------------|
| | Brânquia 13 | Brânquia 9 | Brânquia 13 | Brânquia 8 |
| Cutícula (nm) | 294 | 474,5 ± 13,8 | 510 | 277 ± 17 |
| Espessura epitélio (nm) | 528,7 ± 94,7 | 892,5 ± 189,9 | 1322 ± 76,1 | 647 |
| Comprimento evaginações (nm) | 404,9 ± 100,2 | 633,3 ± 120,2 | 875 ± 170,8 | 306,2 ± 10,6 |
| Espaço da Hemolinfa (µm) | 1,91 ± 0,2 | 2,1 ± 0,3 | 3,6 ± 0,1 | 2,6 ± 0,2 |
| Largura do septo (µm) | 2,8 ± 0,1 | 3,6 ± 0,1 | 3,4 | 6,2 ± 0,4 |

6. Discussão

As brânquias são os principais órgãos responsáveis pelo transporte de sal no processo de regulação osmótica e iônica na hemolinfa de crustáceos (Mantel e Farmer, 1983; Taylor e Taylor, 1992). Influxos iônicos, potenciais transepiteliais, e atividade enzimática têm sido avaliados nas brânquias de inúmeros crustáceos (Henry e Cameron, 1982; Towle, 1990; Onken et al, 2003; Masui et al, 2005; Gonçalves et al, 2006; Belli et al, 2009). As variações nesses parâmetros estão relacionadas com a adaptação fisiológica desses crustáceos aos seus habitats.

Pesquisas que correlacionam as modificações ultraestruturais nas células epiteliais, das brânquias de crustáceos decápodos, às salinidades experimentais de aclimação apresentam resultados variáveis. Essas variações refletem as diferenças entre as espécies e a duração do período de aclimação. As células ionotransportadoras de, por exemplo, braquiúros hiperreguladores como *Uca uruguayensis* (Luquet et al, 1997), *Chasmagnathus granulatus* (Genovese et al, 2004) e *Callinectes danae* (Antunes e McNamara, 2008) respondem com o aumento no número de evaginações apicais, junções septadas, aumento no número de invaginações e no número de mitocôndrias, mostrando grande plasticidade morfológica quando estes são aclimatados a meio diluído. Essas alterações ultraestruturais são correlacionadas com o aumento da absorção de sal em meio diluído e

com o aumento total da atividade da Na^+/K^+ -ATPase (Gilles e Pequeux, 1986; Masui et al, 2005; Antunes e McNamara, 2008).

6.1 *Aegla franca*

As brânquias de *Aegla franca* são tricobrânquias, e como tais, são caracterizadas por um eixo basal e central que suporta os trícans ou filamentos branquiais, que se projetam desse. Os filamentos individuais são tubulares, circulares ou ovais em secção. Possuem um septo central internamente que corre o comprimento do filamento, e que separa o canal aferente do canal eferente de forma assimétrica.

Verificamos que a arquitetura do filamento branquial de *A. franca* se dá por um epitélio simples, logo abaixo da cutícula, formado por células pilares nas regiões laterais. Um septo divide o espaço da hemolinfa em canal aferente e eferente, e ainda, este se estende pelas laterais do filamento que, junto com as células pilares, formam as lacunas laterais por onde também percorre hemolinfa. Na região dos 'pólos' ventral e dorsal, não há a continuidade do septo, e as lacunas laterais estão ausentes. Essa organização é a mesma encontrada em outros crustáceos tricobranquiados como *Astacus fluviatilis* (Bock, 1925), *Pacificastacus leniusculus* (Morse et al, 1970), *Procambarus clarkii* (Dickson et al, 1991), *Homarus gammarus* (Haond et al, 1998) e *Astacus leptodactylus* (Barradas et al, 1999).

Particularmente em *A. franca* há diferenças marcantes na organização das artrobrânquias e os extremos das pleurobrânquias. Na

primeira, o canal aferente e eferente são assimétricos, e o septo se prolonga mais para dentro do canal eferente (maior) do que para o canal aferente (menor). Nas extremidades das pleurobrânquia os canais são do mesmo tamanho, o septo se estende para os dois lados, formando-se ainda canais laterais. Na região mais próxima ao eixo branquial a estrutura se assemelha à das artrobrânquias. Evidentemente a circulação da hemolinfa dentro desses filamentos se dá de maneira diferente; porém, com relação à circulação da água sobre e entre os trícans, aparentemente, não há diferença. Provavelmente há uma diferença na relação de área de superfície e volume, já que a artrobrânquia é maior que a pleurobrânquia.

A diferença estrutural de cada filamento é talvez o que permite diferenças funcionais entre ambos conforme mostrado pela técnica de coloração por nitrato prata, já que há uma correlação do depósito de prata com as regiões onde há provável captura ativa de sais, ou seja, há um destaque da área onde há alta permeabilidade iônica, que pode ser um potencial sítio de transporte (Koch, 1934). No caso em *Aegla franca* a coloração por prata indicou que apenas os filamentos mais ventrais das artrobrânquias e que todos os filamentos das pleurobrânquias é que transportam íons.

A presença de estruturas semi-esféricas nas bases dos filamentos externos curtos, eixo branquial, placa pleural e câmara branquial sugere que estes poderem ser sensores de oxigênio, já que estão confinados à

câmara branquial. Em alguns crustáceos como *Carcinus maenas* (Goldman e Cavey, 1990), *Ucides cordatus* (Martinez et al, 1999), a lagosta *Nephrops norvegicus* (Laverak e Saier, 1993), são encontrados espinhos de forma irregular no eixo branquial no lado do canal eferente, e é sugerido que essas projeções apresentam, além de elementos de estabilidade mecânica, um papel sensorial devido à presença de feixes de neurônios próximos a vasos sanguíneos (Laverak e Saier, 1993; Martinez et al, 1999).

Aegla franca é um forte hiperosmorregulador e hiperregulador de cloreto em água doce, já que apresenta a osmolalidade de sua hemolinfa em 410 mOsm/kg de H₂O nesse meio (Faria et al, 2010). No entanto, seu epitélio branquial comparado com o epitélio de caranguejos braquiúros hiperosmorreguladores, não apresentou riqueza e abundância em organelas tipicamente relacionadas ao transporte iônico em meio diluído. Nosso estudo em *Aegla franca* dirigiu-se ao epitélio branquial, focado particularmente no epitélio dos trícans das pleurobrânquias.

A presença de evaginações no lado apical e invaginações associados a mitocôndrias no lado basal das células pilares sugerem a ocorrência de transporte iônico. No entanto, o epitélio que apresenta essas estruturas é fina (4 µm). As organelas e as invaginações e evaginações são muito menos abundantes comparados com o epitélio branquial espesso transportador de crustáceos decápodes

hiperreguladores. Em *Callinectes danae*, por exemplo, as brânquias posteriores apresentam regiões específicas nas lamelas com epitélio espesso composto de ionócitos, sendo este aproximadamente três vezes mais espesso (13 μm) do que a região do epitélio fino ($\approx 4 \mu\text{m}$) aparentemente respiratório (Antunes e McNamara, 2008).

Vários estudos demonstraram que espécies tricobranquiados nem sempre apresentam um epitélio com características de transporte iônico em todas as brânquias, e/ou tampouco em todos os filamentos das mesmas. No lagostim de água doce, *Procambarus clarkii*, por exemplo, a presença de tecido íono-transportador se dá em todas as brânquias, exceto na sexta pleurobrânquia, e somente na área mais central dos filamentos (Dickson et al, 1991). Na lagosta marinha, *Homarus gammarus*, o epitélio transportador é encontrado no epipodito e no branquiostegito e não nos filamentos branquiais (Haond et al, 1998).

Apesar de não ter encontrado um epitélio realmente espesso como em braquiúros, encontramos diferenças regionais em pólos distintos no epitélio quanto à densidade de organelas celulares. A presença de algumas estruturas típicas de epitélio que realiza transporte ativo como aumento de membrana apical e basal junto às mitocôndrias, faz-nos concluir que de fato essas células realizam algum transporte iônico.

O septo que separa o canal aferente do eferente se apresentou fino, o que possibilita talvez trocas passivas entre ambos os canais (Dickson et al, 1991). Não diferentemente de outros tricobranquiados, nefrócitos apresentam-se distribuídos ao longo do septo no lado que limita o canal eferente (Taylor e Taylor, 1992; Haond, 1998).

Enfim, a ausência de uma abundante maquinaria de transporte no epitélio dos filamentos branquiais de *Aegla franca* que habitam rios e riachos, nos leva a concluir que talvez haja outros mecanismos importantes envolvidos no processo de captura de sal nesta espécie, já que ela é um forte-hiperosmorregulador. Pode ser que haja a produção de uma urina hiposmótica, como ocorre em alguns lagostins já que são dotados de uma glândula antenal bem desenvolvida (Prosser, 1973; Péqueux, 1995). Pode ser ainda, que outros epitélios dentro da câmara branquial sejam mais especializados na realização do transporte iônico, como os filamentos das pleurobrânquias e o branquiostegito, já que o epipodito é reduzido, praticamente ausente.

Com relação à quantidade considerável das estruturas subcelulares presentes nas células do epitélio branquial dos animais aclimatados, na salinidade de 25 ‰ (750 mOsm/kg de H₂O, 400 mM Cl⁻), embora levemente hiperosmótica, *Aegla franca* hiporregula cloreto (341 mM Cl⁻) (Faria et al, 2010), de forma que ocorre então a secreção deste íon. Como nesta salinidade *A. franca* apresenta osmolalidade de 796 mOsm/kg de H₂O, isto demonstra que Cl⁻ é hipo-regulado

independentemente de Na^+ (Faria et al, 2010), que provavelmente é transportado passivamente para fora da hemolinfa, por difusão.

De modo geral, tanto em vertebrado quanto em invertebrado, a secreção de Cl^- se dá pela presença do co-transportador $\text{Na}^+/\text{K}^+/2\text{Cl}^-$ na membrana basal da célula pilar, e a presença de um canal de Cl^- na membrana apical. O transporte de Cl^- se dá pela atividade da Na^+/K^+ -ATPase, presente nas membranas das invaginações basais, que utiliza ATP que é fornecido pelas mitocôndrias no citosol basal. A Na^+/K^+ -ATPase, ao hidrolizar o ATP, transporta 3Na^+ para a hemolinfa e 2K^+ para o citosol, isto cria um forte gradiente eletroquímico que favorece a difusão de Na^+ da hemolinfa para o citosol. O Na^+ entra na célula via o simportador $\text{Na}^+/\text{K}^+/2\text{Cl}^-$ e junto entra 1 íon de K^+ e 2 íons de Cl^- . A entrada de Cl^- na célula cria um gradiente eletroquímico negativo que favorece a difusão deste íon para fora da célula, e isto se dá via canal de Cl^- apical. O K^+ acumulado dentro da célula pela atividade da Na^+/K^+ -ATPase e do $\text{Na}^+/\text{K}^+/2\text{Cl}^-$, recicla para hemolinfa por meio de canais de K^+ na membrana basal. Essa secreção de Cl^- cria um gradiente eletroquímico transepitelial que promove o movimento de Na^+ paracelularmente, levando à secreção desacoplada de Cl^- e Na^+ (Péqueux, 1995; Freire et al, 2008). Em *A. franca* são as células pilares dos trícans que realizam essa função.

6.2 *Clibanarius vittatus*

Como um caranguejo hermitão diogenídeo, *Clibanarius vittatus* apresenta filobrânquias e possui 13 pares branquiais (Martin e Abele, 1986; McLaughlin, 2003). Verificamos que a arquitetura lamelar de *C. vittatus* é similar à de camarões palemonídeos (Figura 50). Há um simples epitélio logo abaixo da cutícula formado por células pilares. Essas células sustentam um septo intralamelar que divide o espaço da hemolinfa, e nas extremidades estão localizados os canais marginais aferente e eferente, que não são simétricos (Freire e McNamara, 1995; McNamara e Lima, 1997; Belli et al 2009). Nas extremidades das lamelas, há a presença de nódulos que ajudam a manter o espaço entre as lamelas (Goodman e Cavey, 1990, Taylor e Taylor, 1992; Martinez et al, 1999; Luquet et al, 2000).

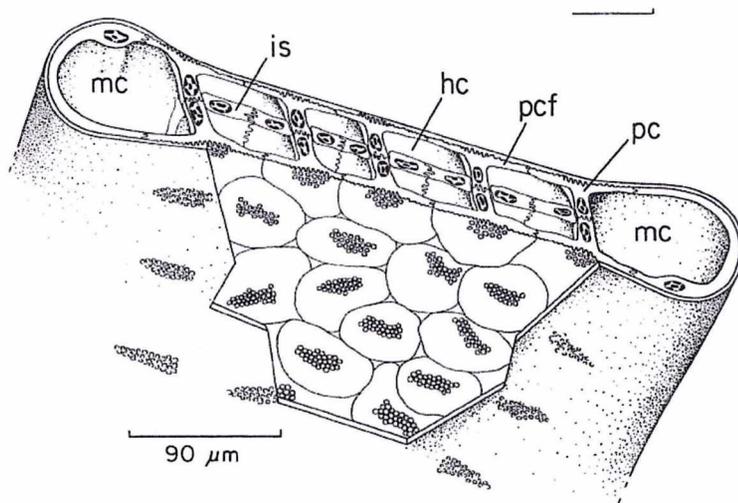


Figura 50. Esquema representando uma reconstrução tridimensional de uma lamela de filobrânquia de *Macrobrachium olfersi* seccionada transversalmente ao longo de seu eixo mais curto. Células pilares (**pc**), franja das células pilares (**pcf**), canal onde percorre hemolinfa (**hc**), septo intralamelar (**is**), canal marginal (**mc**) (Freire e McNamara, 1997).

As brânquias de *C. vittatus* crescem em tamanho da mais anterior para a mais posterior por tipo de brânquia, artrobrânquia e pleurobrânquia. O nosso estudo se focou na oitava, nona e décima terceira brânquias, sendo artrobrânquia, pleurobrânquia e artrobrânquia respectivamente. Anatomicamente, as lamelas das três brânquias não apresentaram diferenças visíveis, o que variou foi a espessura do epitélio, ou seja, as franjas das células pilares, e a espessura do septo. Aparentemente a nona brânquia apresenta o septo mais estreito. Após aclimação por 10 dias em água do mar diluída em 15 ‰ houve algumas modificações. O septo da oitava e décima terceira brânquia se afinou e as franjas das células pilares se espessaram.

A ultraestrutura mostra que o septo intralamelar da oitava e da décima terceira brânquia são mais ricos em estruturas celulares de transporte iônico do que o septo intralamelar da nona brânquia. O fato da oitava e décima terceira brânquias serem artrobrânquias e a nona ser pleurobrânquia nos fazem pensar que provavelmente há maior atividade de transporte iônico nas artrobrânquias. Em salinidade de 35

‰S (1050 mOsm/kg de H₂O) a concentração da osmolalidade da hemolinfa de *C. vittatus* é 1139 mOsm/kg de H₂O (Young 1979), portanto o animal mantém sua hemolinfa acima do ponto isosmótico. O fato de ter sido marcadamente presente um septo trabeculado nas lamelas branquiais de todas as brânquias e maior concentração das estruturas celulares próximos ao corpo das células pilares, faz-nos pensar que o septo próximo ao corpo das células pilares é quem realiza transporte ativo de captura de sais do meio externo e que mantém este gradiente hiper-osmótico. McNamara e Lima (1997), McNamara e Torres (1999) e Belli et al (2009) sugerem um modelo de rota iônica no epitélio branquial de camarões de água doce do gênero *Macrobrachium* no qual a Na⁺/K⁺-ATPase localizada nas invaginações de membrana do septo cria a força eletromotriz que dirige o movimento de Na⁺ para dentro do citoplasma das células pilares via canais ou trocadores iônicos nas membranas das evaginações apicais. O Na⁺ se move então através de junções basais da célula pilar e entra no citoplasma do septo intralamelar e posteriormente é bombeado para a hemolinfa via as saídas das finas invaginações do septo. Movimentos de água e íons via paracelular são impedidos por fortes junções nas franjas das células pilares (Figura 51).

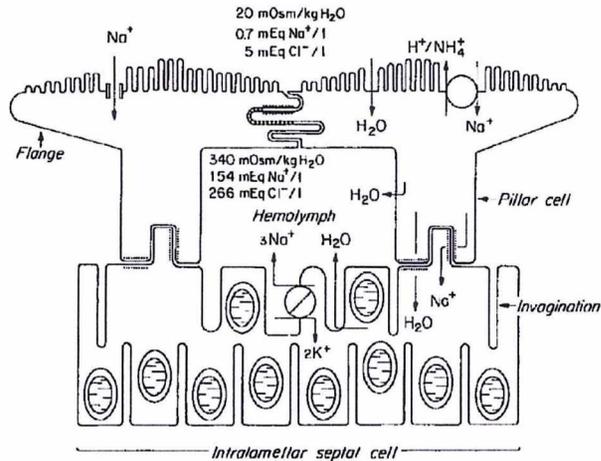


Figura 51. Modelo de movimento de Na^+ e água através de células pilares e células do septo intralamelar de lamela branquial de *Macrobrachium olfersi* quando mantidos em água doce (<0.5‰ S) (McNamara e Torres 1999).

Como as franjas das células pilares encontradas nas lamelas das brânquias de *C. vittatus* são muito finas ao longo da lamela, pode-se pensar que nela ocorrem as trocas gasosas. A presença de desmossomos sugere a reduzida possibilidade de movimentos de água e íons via paracelular. A ausência de estruturas celulares nas franjas e em algumas regiões no septo, ambos localizados distantes dos corpos das células pilares, indicam talvez que a atividade de transporte iônico não ocorra nessas regiões. Infere-se, portanto que as brânquias de *C. vittatus* apresentem diferenciações funcionais regionais numa mesma lamela. O modelo proposto para *Macrobrachium* citado acima é similar para *C. vittatus*, porém apenas nas proximidades dos pericários das células pilares e septo.

Após aclimatação em água do mar diluída em 15 ‰S por 10 dias, o septo foi quem apresentou maior alteração na sua ultraestrutura. Ele se apresentou mais denso e rico em invaginações de membrana e mitocôndrias. Houve também um pequeno aumento no espaço subcuticular presente nas franjas das células apicais devido ao desenvolvimento das evaginações apicais, e o surgimento de invaginações de membrana associado à mitocôndrias, porém poucas. Isso sustenta seu maior gradiente osmótico em salinidade de 15 ‰S (≈ 450 mOsm/kg de H_2O), já que a osmolalidade da hemolinfa é hiperosmótica (655 mOsm/kg de H_2O). Quando olhamos para o Cl⁻ em 15‰ S (≈ 250 mM) *C. vittatus* se apresenta iso-iônico (Young, 1979), portanto a atividade de captura de Na⁺ se acentua nesse meio mais diluído, o que é corroborado pelo aumento de estruturas relacionadas ao transporte de sódio em meio diluído. A presença de desmossomos agora seguidos de junções provavelmente impede a entrada de água e saída de íons da hemolinfa via paracelular, já que esses animais foram mantidos em meio hiposmótico.

Foram encontrados nefrócitos nos septos dos animais aclimatados. De maneira geral os nefrócitos estão presentes nas brânquias de todos os decápodes. Foram encontrados nefrócitos tanto no septo das tricobrânquias de *Aegla franca* quanto no septo interlamelar das filobrânquias de *Clibanarius vittatus*. São células vacuolizadas, geralmente restritas a áreas banhadas por hemolinfa

oxigenada, ou seja, no lado eferente, e podem ser encontrados isolados ou agrupados (Taylor e Taylor, 1992; Maina, 1998; Martinez et al, 1999). Ultraestruturalmente, os nefrócitos lembram os podócitos glomerulares de vertebrados, já que seus processos pedicelares e seus finos diafragmas são propostos como dispositivos filtradores (Goodman e Cavey, 1990; Taylor e Taylor, 1992). A abundante presença de nefrócitos no septo de lamelas aclimatadas, pode estar relacionada à uma maior filtração da hemolinfa, talvez pelo aumento do metabolismo por hiperregular.

Como *C. vittatus* ocupa regiões estuarinas, poderia-se ter aclimatado os animais em salinidades ainda mais diluídas, e assim averiguar quão plástica são as células do septo em participar do processo osmorregulatório já que a princípio, uma considerável parte dele não apresenta estruturas de transporte iônico.

6.3 Um assopro evolutivo

As dendrobrânquias refletem a condição mais primitiva de morfologia branquial, e especula-se que elas deram origem às tricobrânquias (Martin e Abele, 1986). Sendo assim, leva-se em conta que as tricobrânquias são primitivas em relação às filobrânquias. As filobrânquias de *Clibanarius vittatus* se assemelham muito às brânquias de camarões palaemonídeos, que representa uma situação intermediária entre o plano das tricobrânquias e as filobrânquias de braquiúros (Taylor e Taylor, 1992). Os canais marginais aferentes e

eferentes das lamelas das filobrânquias de *Clibanarius vittatus* são equivalentes aos canais aferentes e eferentes presentes nos filamentos das tricobrânquias de *Aegla*. Enquanto as tricobrânquias apresentam um septo axial que se estende para dentro de cada filamento, nas filobrânquias o septo está expandido, ele é o septo intralamelar que divide o espaço da hemolinfa e que é sustentado pelas células pilares (Figura 52).

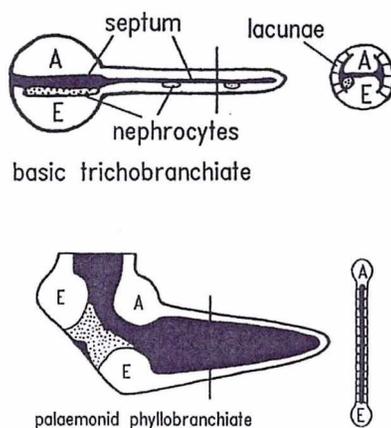


Figura 52. Esquema de plano comum de tricobrânquia, e da filobrânquia de palaemonídeo. O septo é o tecido em preto, em pontilhado é tecido conjuntivo. (Taylor e Taylor, 1992).

Numa avaliação evolutiva em relação à morfologia branquial dentro dos Anomura, ao analisar o cladograma da Figura 53, pode-se observar que mesmo grupos derivados dentro dos Anomura apresentam tricobrânquias como morfologia branquial. Especula-se dessa forma, que a tricobrânquia seria plesiomórfico e que as

filobrânquias seriam homoplásticas, e que surgiram independentemente em vários momentos dentro de Anomura.

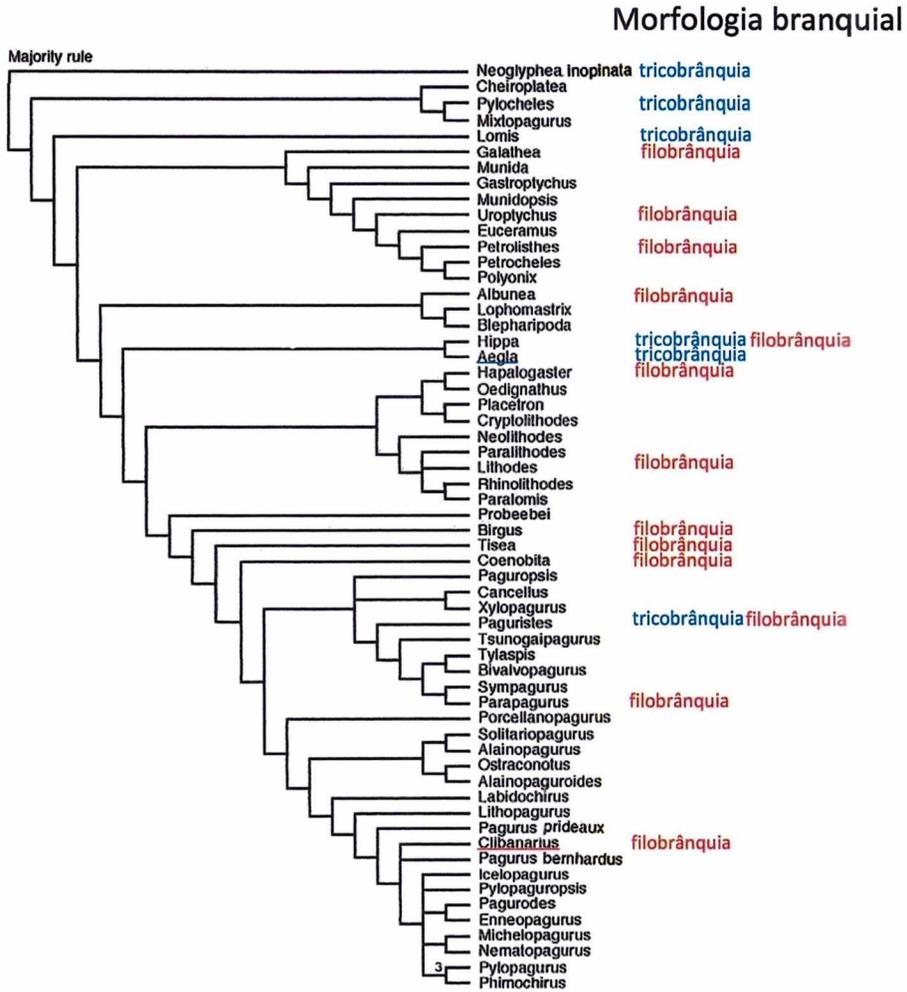


Figura 53. Cladograma de Anomuros (McLaughlin e Lemaitre, 1997).

7. Conclusão

Aegla franca apresenta transporte iônico em todos os filamentos de suas pleurobrânquias e apenas nos filamentos mais ventrais das artrobrânquias. A ausência de uma abundante maquinaria celular nas células dos epitélios branquiais faz-nos concluir que poderá haver outros mecanismos envolvidos em sua capacidade de hiperosmorregulação em água doce. Já a presença de uma ultraestrutura rica em organelas quando em meio hiperosmótico de 25 ‰ sugere subsidiar a secreção de Cl⁻, já que esta espécie hiporregula cloreto nesta salinidade.

Em *Clibanarius vittatus* aparentemente as artrobrânquias possuem maior relevância no processo da osmorregulação. A arquitetura das lamelas branquiais se assemelha à de camarões palemonídeos, fortes hiperreguladores, assim como as vias dos movimentos iônicos também se assemelham. No entanto esta espécie é um fraco hiperregulador osmótico. As mudanças na ultraestrutura do epitélio branquial devido à aclimação a meio diluído estão relacionadas com o transporte ativo de sal, principalmente nas regiões próximas aos pericários das células pilares e no septo próximo às inserções nas células pilares. Essa plasticidade estrutural permite aumento de área disponível para alojar enzimas ionotransportadoras como a Na⁺/K⁺-ATPase e canais iônicos e anti- e/ou simportadores. De mesma maneira o aumento do número de mitocôndrias supre fornecimento de ATP para atividade das proteínas ionotransportadoras como a Na⁺/K⁺-ATPase. Essas mudanças estruturais

é o que aparentemente permite a penetração e permanência de *C. vittatus* em meio de baixa salinidade.

8. Bibliografia

Antunes CD, McNamara JC, 2008(a). A base ultraestrutural da regulação osmótica e iônica no sirí-azul, *Callinectes danae* (Brachyura, Crustácea). Projeto Iniciação Científica 07/50216-6 FAPESP.

Augusto A, Greene, LJ, Laure HJ, McNamara JC, 2007. The ontogeny of isosmotic intracellular regulation in the diadromous, freshwater palaemonid shrimps, *Macrobrachium amazonicum* and *M. olfersi* (Decapoda). *J Crust Biol* 27(4), 626-634

Barradas C, Dunel-Erb S, Lignon J, Péqueux A, 1999. Surimposed morphofunctional study of ion regulation and respiration in single gill filaments of the crayfish *Astacus leptodactylus*. *J Crust Biol* 19, 14-25.

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* 152,431-439.

Bock F, 1925. Die Respirationsorgane Von *Potomobius astacus* Leach. (*Astacu fluvialis*) Beitrag zur Morphologie der Decapoden. *Z Wiss Zool* 124, 51-117

Bond-Buckup G, Buckup L. 1994. A família Aegliidae (Crustacea, Decapoda, Anomura). *Arq Zool, São Paulo*, 32 (4): 159-346.

Bond-Buckup G, 2003. Manual de identificação dos crustacea decapoda de água doce do Brasil. Família Aegliidae. Pp. 21-116. In: G. A. S. Melo (Ed.). Loyola: São Paulo.

Bueno SLS, Shimizu RM, Rocha SS, 2007. Estimating the population size of *Aegla franca* (Decapoda: Anomura: Aegliidae) by mark-recapture technique from an isolated section of Barro Preto stream, county of Claraval, State of Minas Gerais, Southeastern Brazil. *J Crust Biol* 27(4), 553-559.

Burnett LE, Towle DW, 1990. Sodium ion uptake by perfused gills of the blue crab *Callinectes sapidus*: effects of oubain and amiloride. *J Exp Biol* 149, 293-30.

Compère P, Wanson S, Péqueux A, Gille, R, Goffinet G, 1989. Ultrastructural changes in the gill epithelium of the green crab *Carcinus maenas* in relation to the external salinity. *Tiss & Cell* 21, 299-318.

Copeland DE, Fitzjarrell AT, 1968. The salt absorbing cells in the gills of the blue crab (*Callinectes sapidus*, Rathbun) with notes on modified mitochondria. *Z Zellforsch* 92, 1-22.

Dickson JS, Dillaman RM, Roer RD, Roye DB, 1991. Distribution and Characterization of Ion Transporting and Respiratory Filaments in the Gills of *Procambarus clarkii*. *Biol Bull* 180, 154-166.

Faria SC, Augusto AS, McNamara JC, 2010. 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* DOI 10.1007/s00360-010-0522-6

- Forest J, Saint Laurent M, McLaughlin PA, Lemaitre R, 2000. The marine fauna of New Zealand: Paguridae (Decapoda: Anomura) Exclusive of Lithodidae. *Natl Inst Water Atmos Res* 114, 1-250.
- Fortheringham N.1975, Structure of seasonal migrations of the littoral hermit crab *Clibanarius vittatus* . *J Exp Mar Biol and Ecol* 21:279-287.
- Freire CA, McNamara JC, 1995. Fine structure of the gills of the fresh-water shrimp *Macrobrachium olfersii* (Decapoda): effect of acclimation to high salinity medium and evidence for involvement of the intralamellar septum in ion uptake. *J Crust Biol* 15, 103-116.
- Freire CA, Onken H, McNamara JC, 2008. A structure-function analysis of ion transport in crustacean gills and excretory organs. *Comp Biochem and Physiol* 151A, 272-304.
- Genovese G, Luquet CM, Paz DA, Rosa GA, Pelerano GN, 2000. The morphometric changes in the gills of the estuarine crab *Chasmagnathus granulatus* under hyper- and hyporegulation conditions are not caused by proliferation of specialized cells. *J Anat* 197, 239-246.
- Gilles R, Pequeux A, 1986. Physiological and ultrastructural studies of NaCl transport in crustacean gills. *Boll Zool* 53, 173-182.
- Genovese G, Luchetti CG, Luquet CM, 2004. Na⁺/K⁺-ATPase activity and gill ultrastructure in the hyperhypo-regulating crab *Chasmagnathus granulatus* acclimated to dilute, normal, and concentrated seawater. *Mar Biol* 144, 111-118.
- Goodman, SH, Cavey, MJ, 1990. Organization of a phyllobranchiate gill from the green crab *Carcinus maenas* (Crustacea, Decapoda). *Cell Tissue Res* 260, 495-505.
- Haond C, Flick G, Charmantier G, 1998. Confocal laser scanning and electron microscopical studies on osmoregulatory epithelia in the branchial cavity of the lobster *Homarus gammarus*. *J Exp Biol* 201, 1817-1833.
- Henry RP, Cameron JN, 1982. The distribution and partial characterization of carbonic anhydrase in selected aquatic and terrestrial decapod crustacean. *J Exp Zool* 221, 309-321.
- Hong SY, 1988. Development of epipods and gills in some pagurids and brachyurans. *J Nat Hist* 22, 1005-1040.
- Kirscher LB, 2002. The mechanism of sodium chloride uptake in hyperregulating aquatic animals. *J Exp Biol* 207, 1439-1452.
- Koch HJ, 1934. Essai d'interprétation de la goi-disant 'reduction vitale' de sets d'argent par certains organes d'arthropodes. *Ann Soc Sci mid not Brux B*, 54, 346.
- Laverack, MS, Saier, B, 1993. Morphology and ultrastructure of a presumptive oxygen receptor in the gills of the norway lobster *Nephrops norvegicus* (Decapoda). *J Crust Biol* 13, 504-510.
- Leone FA, Furriel RPM, McNamara JC, Mantelatto FLM, Massui DC, Alves LR, Gonçalves RR, Garçon DP, 2005. Na⁺/K⁺-ATPase from crustacean gill microsomes: a molecular maker to evaluate adaptation to biotopes of different salinity. *Trends Comp Biochem Physiol* 11, 1-15.

- Lignot JH, Charmantier G, 1999. Immunolocalization of Na⁺,K⁺-ATPase in the organs of the branchial cavity of the European lobster *Homarus gammarus* (Crustacea, Decapoda).
- Lignot JH, Charmantier G, 2001. Immunolocalization of Na⁺,K⁺-ATPase in the branchial cavity during the early development of the European lobster *Homarus gammarus* (Crustacea, Decapoda). *J Histochem Cytochem* 49, 1013–1023.
- Lowery WA, Nelson WG. 1988. Population of the hermit crab *Clibanarius vittatus* (Decapoda: Diogenidae) at Sebastian Inlet, Florida. *J Crust Biol* 8(4): 548-556.
- Lucu C, Towle DW, 2003. Na⁺/K⁺-ATPase in gills of aquatic Crustacea. *Comp Biochem Physiol* 135A, 195- 214.
- Luquet C, Pellerano G, Rosa G, 1997. Salinity-induced changes in the fine structure of the gills of the semiterrestrial estuarine crab, *Uca uruguayensis* (Nobili, 1901) (Decapoda, Ocypodidae). *Tiss & Cell* 29, 495-501.
- Luquet CM, Genovese G, Rosa GA, Pellerano GN, 2002. Ultrastructural changes in the gill epithelium of the crab *Chasmagnathus granulatus* (Decapoda: Grapsidae) in diluted and concentrated seawater. *Mar Biol* 141, 753-760.
- Maina JN, 1998. Locations, ultrastructural morphology, and putative functions of the branchial podocytes of the fresh water crab *Potamon niloticus* – Savigny (Crustacea, Decapoda, Potamonidae). *Tiss Cell* 30(5), 562-572.
- Mantel LH, Farmer LL, 1983. Osmotic and ionic regulation. Em Bliss D E (Ed) *The Biology of Crustacea*, Volume 5 *Internal Anatomy and Physiological Regulation*, Academic Press, New York, pp. 53-159.
- Martin JW, Abele LG, 1986. Phylogenetic relationships of the genus *Aegla* (Decapoda: Anomura: Aegliidae) with comments on anomuran phylogeny. *J Crust Biol* 6(3), 576-616.
- Martin JW, Abele LG, 1988. External morphology of the genus *Aegla* (Crustacea: Anomura, Aegliidae). *Smithsonian Contributions to Zoology*, Washington, 453, 1-46.
- Martinez CBR, Alvares EP, Harris, RR, Santos, MCF, 1999. A morphological study on posterior gills of the mangrove crab *Ucides cordatus*. *Tiss & Cell* 31, 380-389.
- Masui DC, Furriel RPM, McNamara JC, Mantelatto FLM, Leone FA, 2002. Modulation by ammonium ions of gill microsomal Na⁺/K⁺-ATPase in the swimming crab *Callinectes danae*: a possible mechanism for regulation of ammonia excretion. *Comp Biochem Physiol* 132C, 471-482.
- Masui DC, Furriel RPM, Mantelatto FLM, McNamara JC, Leone FA, 2005. K⁺-Phosphatase activity of gill Na⁺/K⁺-ATPase from Blue crab, *Callinectes danae*: low-salinity acclimation and expression of the α -Subunit. *J Exp Zool* 303A, 294-307.
- Melo GAS, 1999. *Manual de identificação dos Crustacea Decapoda do litoral brasileiro*. São Paulo, Ed. Plêiade, FAPESP, 604 p.
- McLaughlin PA. 2003. Illustrated Keys to families and genera of the superfamily Paguroidea (Crustacea: Decapoda: Anomura), with diagnoses of genera of Paguridae. *Mem Mus Vict* 60(1), 111-144.

- McNamara JC, Lima AG, 1997. The route of ion and water movements across the gill epithelium of the freshwater 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 effect of high salinity acclimation in gill and renal epithelia of the freshwater shrimp *Macrobrachium olfersii* (Crustacea, Decapoda). *J Exp Zool* 284, 617-628.
- Morse HC, Harris PJ, Dornfeld EJ, 1970. *Pacifastacus leniusculus*: Fine structure of arthrobranch with reference to active ion uptake. *Trans Am Microsc Soc* 89, 12-27.
- Narchi W, 1973. *Estudos práticos I: Crustáceos*. Editora Polígono. São Paulo.
- Onken H, Riestenpatt S, 1998. NaCl absorption across split gill lamellae of hyperregulating crabs: Transport mechanisms and their regulation. *Comp Biochem Physiol* 119A, 883-893.
- Onken H, McNamara, JC, 2002. Hyperosmoregulation in the red freshwater crab *Dilocarcinus pagei* (Brachyura, Trichodactylidae): structural and functional asymmetries of the posterior gills. *J Exp Biol* 205, 167-175.
- Onken H, Tresguerres M, Luquet CM, 2003. Active NaCl absorption across posterior gills of hyperosmoregulating *Chasmagnathus granulatus*. *J Exp Biol* 206, 1017-1023.
- Pequéux A, 1995. Osmotic regulation in crustaceans. *J Crust Biol* 15, 1-60.
- Pérez-Losada M, Jara CG, Bond-Buckup G, Crandall KA, 2002. Phylogenetic relationships among the species of aegla (Anomura: Aegliidae) freshwater crabs from Chile. *J Crust Biol* 22(2) 304-313.
- Prosser CL, 1973. *Comparative Animal Physiology*. 3rd Ed. WB Saunders Co Philadelphia.
- Ruppert EE, Barnes RD, 2005. *Zoologia dos invertebrados*. 7. ed. Ed. Roca. São Paulo.
- Sabourin, TD, Stickle WB. 1980. Respiratory and osmoregulatory responses of the hermit crab, *Clibanarius vittatus* (Bosc), to salinity changes. *J Exp Mar Ecol* 46,241-254.
- Scelzo MA, Mantelatto FLM, Tudge FLM, 2004. Spermatophore morphology of the endemic hermit crab *Loxopagurus loxochelis* (Anomura, Diogenidae) from Southwestern Atlantic, Brazil and Argentina. *Invertebr Reprod Dev* 46, 1-9.
- Sharp MS, Neff JM, 1979. Steady state hemolymph osmotic and chloride ion regulation and percent body water in *Clibanarius vittatus* (Decapoda; Anomura) from the Texas Gulf coast. *Comp Biochem Physiol* 66A, 455.
- Shumway, SE. 1978, Osmotic balance and respiration in the hermit crab *Pagurus bernhardus* exposed to fluctuating salinities. *J Mar Biol Ass UK*, 58, 869-876.
- Taylor HH, Taylor EW, 1992. Gills and lungs: the exchange of gases and ions. In: Harrison, WF, Humes, AG. (Eds), *Microscopic Anatomy of Invertebrates, Volume 10, Decapod Crustacea*. Wiley-Liss, New York, pp. 203-293.

Teodósio EAFMO, 2007. Biologia de *Aegla schimitti* Hobbs III, 1079 (Crustacea, Anomura, Aegliidae) em reservatórios dos mananciais da serra, Piraquara, Estado do Paraná. *Dissertação Mestrado*. Zoologia. UFPR.

Thurman C, 2003. Osmoregulation of six species of fiddler crabs (*Uca*) from the Mississippi delta area in the northern Gulf of Mexico. *J Crust Biol* 291, 233-253.

Towle DW, Kays WT, 1986. Basolateral localization of Na⁺,K⁺-ATPase in gill epithelium of two osmoregulating crabs, *Callinectes sapidus* and *Carcinus maenas*. *J Exp Zool* 239, 311-318.

Towle DW, 1990. Sodium transport systems in gills. In: RKH Kinne, ed, Comparative physiology, vol 7, Comparative aspects of sodium co-transport systems. Pp 241-263. Karger, Basel, Switzerland.

Towle DW, Weihrauch D, 2001. Osmoregulation by gills of euryaline crabs: molecular analysis of transporters. *Amer Zool* 41, 770-780.

Young AM, 1979. Osmoregulation in three hermit crab species, *Clibanarius vittatus*, *Pagurus longicarpus* Say and *P. pollicaris* Say (Crustacea; Decapoda; Anomura). *Comp Biochem Physiol* 63A, 377-382.

Zare S, Greenaway P, 1998. The effect of moulting and sodium depletion on sodium transport and the activities of Na⁺K⁺-ATPase, and V-ATPase in the freshwater crayfish *Cherax destructor* (Crustacea: Parastacidae). *Comp Biochem and Physiol* 119A, 739-745.