

Pós Graduação em
AQUICULTURA
Universidade Federal do Rio Grande - FURG

Universidade Federal do Rio Grande - FURG
Programa de Pós Graduação em Aquicultura

Gabriel Bernardes Martins

Mecanismos osmorregulatórios em juvenis do linguado *Paralichthys orbignyanus* submetidos a choque hiposmótico

Rio Grande, RS.

2012

Universidade Federal do Rio Grande - FURG

Mecanismos osmorregulatórios em juvenis do linguado *Paralichthys orbignyanus*
submetidos a choque hiposmótico

Discente: Gabriel Bernardes Martins

Orientador: Ricardo Berteaux Robaldo

Co-orientador: Luis André Nassr de Sampaio

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do grau de mestre em Aquicultura no Programa de Pós Graduação em Aquicultura da Universidade Federal do Rio Grande.

Rio Grande, RS.

Fevereiro, 2012.

Índice

| | |
|--|-----|
| Resumo..... | vi |
| Abstract..... | vii |
| 1. Introdução | 1 |
| 2. Material e Métodos | 5 |
| 2.1. Desenho experimental e aclimação dos peixes | 5 |
| 2.2. Amostra de tecido | 6 |
| 2.3. Histologia..... | 7 |
| 2.4. Análise bioquímica..... | 7 |
| 2.4.1. Cortisol..... | 7 |
| 2.4.2. Íons..... | 8 |
| 2.4.3. Atividade das enzimas NKA e AC..... | 8 |
| 2.5. Análise estatística..... | 8 |
| 3. Resultados | 8 |
| 3.1. Glicose, hematócrito e osmolalidade | 8 |
| 3.2. Células de Cloreto e Área glomerular | 9 |
| 3.3. Concentração iônica plasmática | 9 |
| 3.4. Cortisol, NKA e AC..... | 9 |
| 4. Discussão | 16 |
| 5. Conclusão..... | 21 |
| 6. Referências Bibliográficas | 21 |
| 7. Anexos | 29 |
| Anexo 1 - Secção branquial de juvenil de <i>Paralichthys orbignyanus</i> | 29 |
| Anexo 2 - Secção renal de juvenil de <i>Paralichthys orbignyanus</i> | 30 |

Agradecimentos

Ao Ricardo Robaldo por ser um amigo em momentos fundamentais, um crítico quando necessário e um orientador nas horas vagas.

José Walter Bartmann Martins, meu pai, que mesmo longe me incentiva a dá forças para continuar. A minha avó Loni, com seu amor incansável e interminável.

Aos colegas de laboratório que contribuíram para que este trabalho acontecesse: Cíntia, Marcelo Okamoto, Ricardo, Angélica, Janaína e Eduardo.

Aos laboratórios de Histologia (responsável Dr. Luis Alberto Romano) e Fisiologia (responsável Dr. Adalto Bianchini) que abriram as portas para realização das análises. Especialmente a Indianara Barcarolli, pela grande paciência e atenção durante as análises.

Finalmente, agradeço ao PPG pela oportunidade oferecida de realizar o mestrado.

Mecanismos osmorregulatórios em juvenis do linguado *Paralichthys orbignyanus* submetidos a choque hiposmótico

Resumo

Mudanças ao longo de 72 h em diferentes parâmetros osmorregulatórios de linguado *Paralichthys orbignyanus* submetidos a choque hiposmótico foram avaliados. Um total de 132 juvenis de linguado foram distribuídos em 22 tanques, ajustados de acordo com a salinidade apropriada ao tratamento experimental (30‰ para o controle e 0‰ para o choque osmótico). Para as análises bioquímicas e histológicas, foram coletadas amostras de sangue, brânquias, rim e cérebro, nos tempos 0, 2, 6, 12, 24 e 72 h. Uma rápida redução na osmolalidade e nos íons Na^+ , Cl^- , Ca^{2+} e Mg^{2+} pode ser observada imediatamente após o choque hiposmótico, sem que houvesse restauração dos seus níveis iniciais até o final do experimento. A densidade de células de cloreto não foi alterada pelo tratamento. Entretanto, a área glomerular apresentou significativo aumento após duas horas de choque osmótico, evidenciando o papel do rim no aumento da taxa de filtração glomerular para compensar influxo osmótico de água. Não pode ser verificada uma relação entre cortisol e osmo e ionoregulação. A anidrase carbônica (AC) demonstrou aumento de até duas vezes em sua atividade, para o grupo choque osmótico, demonstrando sua relação com os trocadores Na^+/H^+ e $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$. Ainda, as $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{ATPases}$ (NKA) branquial e cerebral demonstraram aumento em suas atividades após o choque osmótico, demonstrando a sua resposta positiva em meios hiposmóticos. Durante as 72 h iniciais, o linguado tem como principais mecanismos osmorregulatórios o aumento da área glomerular renal e aumento atividade das enzimas AC e NKA branquial e cerebral.

Palavras chave: linguado, osmorregulação, água doce, células de cloreto, anidrase carbônica.

Osmoregulatory mechanism in juveniles of brazilian flounder *Paralichthys orbignyanus*
subject to hyposmotic shock

Abstract

Changes along 72 h in different osmoregulatory parameters of brazilian flounder *Paralichthys orbignyanus* submitted to hyposmotic shock were evaluated. One hundred thirty two juvenile were distributed in 22 tanks, with water salinity adjusted according to the experimental treatment (30‰ for control and 0‰ for hyposmotic shock). For biochemical and morphological analyses, samples of blood, gill, kidney, and brain were collected at 0, 2, 6, 12, 24, and 72 h after transfer to the tanks. A fast decrease in osmolality and in Na^+ , Cl^- , Ca^{2+} e Mg^{2+} ions could be observed immediately after hyposmotic shock, without reestablishment of the initial levels at the end of the experiment. Density of chloride cells was not different along time in both treatments. However, glomerular area presented significant increase after two hours of osmotic shock, evidentiating water influx with consequent increase in glomerular filtration rate. A relationship between cortisol and osmo and ionoregulation could not be verified, since cortisol levels at the beginning of the experiment were already elevated. Carbonic anhydrase activity showed up to two fold increase in the hyposmotic shock group, demonstrating its relationship with Na^+/H^+ and $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ transporters. Furthermore, gill and cerebral Na^+/K^+ ATPases showed increased activity 2 h after osmotic shock, demonstrating its positive response in hyposmotic environment. The brazilian flounder can be demonstrate hyposmoregulate along 72 h. The main osmoregulatory mechanisms demonstrate are the increased of the glomerular area and increased of enzymes activity AC and NKA gill and cerebral.

Keywords: brazilian flounder, osmoregulation, freshwater, chloride cells, anhydrase carbonic.

1. Introdução

Os teleósteos estão intimamente em contato com o meio externo, estando na maioria dos casos expostos a substancial diferença de osmolaridade entre o meio ambiente e seus fluídos corporais (Evans 2010). A osmorregulação é consequência de uma regulação precisa, que envolve um conjunto de processos moleculares e celulares, operando com uma variedade de tipos celulares através dos tecidos (Glover 2007). Desta forma, os desafios osmorregulatórios são compensados, permitindo a manutenção da homeostase através do ajuste de variáveis osmóticas e iônicas corpóreas (Evans 2010).

Dentre os principais órgãos envolvidos na osmorregulação, estão as brânquias, o rim e o intestino (Evans 2008). Alterações adaptativas já foram relatadas para esses órgãos, sob exposição crônica e aguda a diferentes salinidades. Exemplo dessas modificações são a atividade e composição dos trocadores iônicos, densidade e tamanho de glomérulos e das células ricas em mitocôndrias (Kelly *et al.* 1999, Wong & Woo 2006, Giari *et al.* 2006, Hwang & Lee 2007, Herrera *et al.* 2009, Costa *et al.* 2010).

A brânquia, o principal órgão responsável pela troca de gases e íons, excreção de nitrogenados e balanço ácido base é vulnerável as mínimas alterações químicas do meio. Basicamente, o epitélio branquial possui três tipos celulares: células ricas em mitocôndrias, pavimentosas e mucosas (Laurent *et al.* 1985). As células ricas em mitocôndrias, também chamadas ionócitos ou células de cloreto (CC), são as principais responsáveis pelas trocas iônicas (anexo 1). Essas trocas são promovidas através da $\text{Na}^+ \text{K}^+ \text{-ATPase}$ (NKA), encontrada na região basolateral e apical das CC (Hwang & Lee 2007). Desde a descoberta das CC nos filamentos branquiais da enguia *Anguilla anguilla*, essas células tem sido consideradas como o principal sitio extra renal de troca iônica em teleósteos marinhos (Keys & Wilmer 1932). Duas formas morfológicamente distintas de CC têm sido demonstradas para peixes juvenis e adultos, de acordo com ambiente em que vivem - água marinha ou doce. Utilizando microscopia eletrônica de varredura, o subtipo de água doce geralmente apresenta superfície apical plana ou levemente invaginada, com algumas porções da membrana com projeções celulares, enquanto o subtipo para água marinha exhibe superfície apical profundamente invaginada, na forma de cripta, formando o sistema tubular, com pequenos orifícios para troca com o meio (Hwang & Lee 2007).

O rim mesonéfrico dos teleósteos possui uma organização simples, não possui córtex definido, medula e alça de Henle, que são características do rim metanéfrico de mamíferos. Basicamente o rim é dividido em duas porções, a cefálica e o tronco renal (Hickman & Trump 1969, Engelund & Madsen 2011). Vasos, glomérulos e segmentos tubulares são entrelaçados e intercalados com tecido hematopoiético, especialmente na porção anterior (Resende *et al.* 2010). Geralmente, o rim cefálico consiste de tecido hematopoiético, linfóide, inter-renal e suprarenal. Quantidades variáveis de tecido hematopoiético e células pigmentares são distribuídas no tronco renal. O número e o tamanho dos glomérulos, como também a diferenciação dos segmentos funcionais, são reduzidos, comparado aos mamíferos (anexo 2). Em teleósteos eurialinos, o glomérulo, com cápsula de Bowman fechada, precede os segmentos I e II do túbulo proximal, seguido pelo distal e coletor, que drenam o filtrado do ducto mesonéfrico. Dutos mesonéfricos então se unem distalmente, formando a bexiga urinária (Hickman & Trump 1969, Engelund & Madsen 2011).

O primeiro estágio na osmorregulação renal é a filtração do plasma pelos glomérulos (Mcdonald 2007). Em água marinha, os peixes regulam hiposmoticamente seus fluídos corporais e o rim é o responsável pela reabsorção de água, produzindo urina concentrada com volume reduzido. Esse processo caracteriza a principal função do rim na osmorregulação, a excreção de íons divalentes para reabsorção de água. Em contrapartida, em água doce, o rim apresenta alta taxa de filtração glomerular, produzindo urina diluída e abundante. Nesse processo, os sais são inevitavelmente perdidos através da brânquia, pele e rim, havendo compensação através da absorção branquial e da dieta. Desta forma, peixes eurialinos são hábeis a realizar ajustes na função renal, de acordo com as flutuações de salinidade (Beyenbach 2004).

Pesquisas têm sido desenvolvidas sobre os mecanismos de regulação iônica branquial, e é evidente o papel fundamental dos canais e transportadores iônicos. Em água marinha, acredita-se que os transportadores chave de NaCl sejam a NKA, o cotransportador $\text{Na}^+\text{K}^+2\text{Cl}^-$ (NKCC) e os canais de Cl^- . O cotransportador NKCC tem sido associado à secreção de Cl^- , localizado principalmente na porção basolateral das CC (Hwang *et al.* 2007, Hiroi & McCormick, 2007). De forma semelhante, o canal denominado fator transmembrana regulador da condutância da fibrose cística (CFTR) também é responsável pela secreção do Cl^- , entretanto, é mais abundante na porção

apical das CC (Hiroi *et al.* 2005). Já em água doce, os mecanismos de absorção de NaCl estão fundamentados basicamente nas ações da H⁺-ATPase (V-ATPase) e do trocador Na⁺/H⁺, responsáveis pela absorção de Na⁺, enquanto o trocador Cl⁻/HCO₃⁻ e cotransportador Na⁺/Cl⁻ estão envolvidos na absorção de Cl⁻ (Hwang & Lee 2007). Recentemente, Tang *et al.*(2011) estudando *Tetraodon nigroviridis* e *Chanos chanos* elaboraram um modelo para troca de Cl⁻, e demonstraram utilizando técnicas imunocorantes a presença de canais de cloreto basolaterais nas CC.

A NKA, uma enzima transmembrânica, presente em todas as células animais, é uma ATPase tipo-P, consistindo de um complexo protéico ($\alpha\beta$)₂ com quatro isoformas (α 1~4) e três β (β 1~3). Estudos imunohistoquímicos e bioquímicos têm demonstrado que isolados de CC contém a maior parte da NKA presente nas brânquias, localizando-se principalmente na porção basolateral e apical das células (McCormick 1995, Sakamoto *et al.*2001, Brauer *et al.*2005). Sua principal função é bombear ativamente K⁺ para dentro e Na⁺ para fora da célula, contra o gradiente de concentração. Desta forma, a aclimatação osmótica demanda aumento da atividade da NKA e densidade das células ricas em mitocôndria (Evans *et al.* 1999, Hwang & Lee 2007).

A regulação ácido base em peixes é associada à excreção de dióxido de carbono, através da reação reversível de hidratação/desidratação entre CO₂ e os equivalentes ácido base H⁺ e HCO₃⁻. Ao mesmo tempo, está associada à regulação iônica, devido à transferência direta de H⁺ e HCO₃⁻ através da brânquia, na troca por Na⁺ e Cl⁻, respectivamente. A regulação de NaCl através da brânquia é a chave para manter o balanço iônico e osmótico nos peixes (Gilmour & Perry 2009). Fundamentalmente, a enzima que catalisa a reação reversível de hidratação/desidratação e excreção de CO₂ é a anidrase carbônica (AC). Utilizando técnicas de histoquímica, imunohistoquímica, biologia molecular e isolamento de subtipos celulares, tem sido demonstrado que na brânquia a AC encontra-se nas CC, pavimentosas, mucosas e neuroepiteliais (Gilmour & Perry 2009). Ainda, dois tipos de AC são encontrados nos organismos, a citoplasmática e transmembrânica (Gilmour & Perry 2009).

Respostas fisiológicas de peixes a estressores ambientais têm sido agrupadas como primárias, secundárias e terciárias. As primárias, envolvem respostas neuroendócrinas, incluindo a liberação de catecolaminas a partir do tecido cromafin (Randall & Perry 1992, Reid *et al.* 1998) e a estimulação do eixo hipotalâmico/pituitária/inter-renal

(HPI), culminando com a liberação de hormônios corticosteróides na circulação (Mommsen *et al.*1999). As respostas secundárias incluem mudanças nos íons plasmáticos e teciduais, a nível metabólico e hematológico. Por sua vez, alterações relacionadas à fisiologia incluem ajustes no metabolismo, respiração, balanço ácido base e hidromineral, imunidade e respostas celulares (Mommsen *et al.*1999). As respostas terciárias estão relacionadas ao desempenho do animal, como por exemplo, crescimento, condição, resistência a doenças, atividade reprodutiva, comportamento e sobrevivência (Wedemeyer *et al.* 1990, Barton 2002).

O cortisol, direta ou indiretamente, possui um papel importante na fisiologia homeostática geral, incluindo metabolismo intermediário, crescimento, osmo e ionorregulação e estados imunológico e reprodutivo (Mommsen *et al.* 1999). Acredita-se que o papel do cortisol no aumento da glicose plasmática seja devido à ativação da gluconeogênese, iniciando a atividade da enzima gluconeogênica hepática e aminotransferase. Ainda, o cortisol atua como regulador da atividade da NKA, também sendo responsável pelo aumento da permeabilidade branquial, regulando a diferenciação e função das CC, operando em sinergia com a Prolactina e fator de crescimento tipo insulina-1 (IGF-1) (McCormick 2001, McCormick *et al.* 2008). O papel direto do cortisol e do hormônio do crescimento (GH) tem sido demonstrado no desenvolvimento da habilidade hipoosmorregulatória, incluindo aumento da atividade da NKA e do cotransportador NKCC (Laiz-Carrion *et al.*2003).

Alguns estudos realizados com salmonídeos demonstraram que o eixo GH/IGF-1 também está envolvido na osmorregulação, aumentando a tolerância à salinidade, alterando a quantidade de CC e atividade da NKA branquial (McCormick 1995). Meier *et al.* (2009) demonstraram a expressão do GH, do receptor do hormônio do crescimento (GHR) e do IGF-1 na brânquia e no fígado em *P. orbignyanus* após estresse hiperosmótico, sendo que o aumento na expressão de mRNA GH ocorreu após 24h de estresse osmótico, enquanto o mRNA GHR aumentou após 7 dias. Desta forma, é evidente um aumento da sensibilidade branquial ao GH, sugerindo que o choque hiperosmótico é uma alternativa para melhorar o crescimento, embora haja necessidade de mais estudos que avaliem a expressão gênica associada ao crescimento em função da salinidade.

O linguado *P. orbignyanus*, ocorre em águas rasas, até aproximadamente 20m de profundidade, desde o sudeste brasileiro até Mar del Plata - Argentina (Figueiredo & Menezes 2000). Alguns estudos já foram realizados, comprovando a capacidade reprodutiva da espécie em cativeiro (Cerqueira *et al.* 1997, Robaldo 2003, Sampaio *et al.* 2008), tolerância a compostos nitrogenados (Bianchini *et al.* 1996) e estresse ácido (Wasielesky *et al.* 1997). Trata-se de uma espécie eurialina (Wasielesky *et al.* 1995) e alguns estudos demonstraram que não há alteração nas taxas de sobrevivência quando juvenis de linguado são mantidos em água doce, salobra ou marinha. Entretanto, em água doce houve uma menor taxa de crescimento e alteração na osmo e ionoregulação (Sampaio *et al.* 2001, Sampaio & Bianchini 2002). Considerando que pela primeira vez serão verificados detalhadamente os mecanismos osmorregulatórios acionados por essa espécie durante as primeiras horas de aclimação a uma faixa tão ampla de salinidade, o objetivo deste trabalho foi demonstrar as adaptações histológicas branquiais e renais, metabólicas e iônicas de juvenis de *P. orbignyanus* submetidos a choque hiposmótico ao longo de 72 horas.

2. Material e Métodos

2.1. Desenho experimental e aclimação dos peixes

Juvenis de *P. orbignyanus* (peso $49,7 \pm 14,6$ g e comprimento total $16,4 \pm 1,6$ cm) foram obtidos de reprodução realizada no Laboratório de Piscicultura Marinha- FURG, mantidos em tanque de 1.000 L, temperatura ambiente, salinidade 30 ± 2 ‰, fotoperíodo natural e alimentados com ração INVE NRD. Aleatoriamente, 132 indivíduos foram coletados, distribuídos em 22 tanques de 200L e mantidos por um período de aclimação de 48h em jejum, salinidade 30‰, fotoperíodo natural (14L:10E), temperatura ambiente ($23,6 \pm 0,2$ °C) e oxigênio saturado ($7,4 \pm 0,6$ mg/L). Ao final do período de aclimação, com auxílio de uma rede, todos os indivíduos foram transferidos para tanques com água previamente ajustadas à salinidade apropriada ao tratamento experimental: 30‰ para o grupo controle e 0‰ para o grupo choque osmótico. A água doce foi obtida a partir de água do sistema de abastecimento do laboratório e declorada com tiosulfado de sódio (20 mg/L). As amostragens ocorreram nos seguintes tempos: 0, 2, 6, 12, 24 e 72 horas após a transferência. Os tratamentos foram realizados em duplicata e durante o período experimental os indivíduos

permaneceram em jejum. Os parâmetros de qualidade da água ao longo do período experimental estão demonstrados na tabela 1, enquanto a concentração iônica dos meios utilizados está representada na tabela 2. A amônia total e o nitrato foram determinados de acordo com a metodologia estabelecida por UNESCO (1993) e Aminot & Chaussepied (1952), respectivamente; enquanto a alcalinidade pelo método descrito por APHA (1998).

Tabela 1- Parâmetros de qualidade de água doce e marinha (média±DP; n=10) ao longo do período experimental – oxigênio (mg/L), pH, alcalinidade (mg Ca₂CO₃/L), amônia total (mg/L) e nitrato (mg/L).

| | Oxigênio | pH | Alcal. | Amônia | Nitrato |
|--------------|-----------------|-----------|---------------|---------------|----------------|
| Água doce | 7,8±0,7 | 7,61±0,35 | 20±0 | 0,08±0,03 | 0 |
| Água marinha | 7,2±0,1 | 8,12±0,13 | 138,3±7,63 | 0,16±0,1 | 0 |

Tabela 2 - Composição iônica da água doce e marinha (média±DP; n = 3) – Na⁺, K⁺, Cl⁻, Ca²⁺ e Mg²⁺ (mM).

| | Na⁺ | K⁺ | Cl⁻ | Ca²⁺ | Mg²⁺ |
|--------------|-----------------------|----------------------|-----------------------|------------------------|------------------------|
| Água doce | 32,4±1,7 | nd | 16,6±0,8 | 4,4±0,2 | 1,7±0,01 |
| Água marinha | 453,3±60,3 | 6,0±0,8 | 508±43,3 | 7,8±1,0 | 38,8±0,9 |

Obs: nd= não detectável.

2.2. Amostra de tecido

Para amostragem dos tecidos, os peixes foram anestesiados hipotérmicamente ($\cong 0^{\circ}\text{C}$), na mesma água do tanque em que estavam. Amostra de sangue foi coletada com uma seringa heparinizada e agulha (22x0,7 mm, 22G) inserida na veia caudal. Concomitante a coleta, foram determinados a glicose (Roche Diagnostics, Accu Chek, Advantage, UK), o hematócrito (12000 RPM) e a osmolalidade (Wescor 5520, Logan, UT). O sangue acondicionado em frascos criogênicos foi mantido refrigerado ($\cong 0^{\circ}\text{C}$) até a centrifugação (10 min, 1500g). A quantidade total aparente de sangue foi coletada, e então os indivíduos foram mortos através de secção da medula espinhal. Para os estudos histológicos foram coletados o 2° arco branquial direito e o rim (porção

posterior - tronco renal). Para determinação da atividade da NKA foram amostrados o rim (porções intermediária e tronco), o cérebro e o 2º arco branquial esquerdo. O 2º arco branquial esquerdo também foi utilizado para determinação da atividade da AC.

2.3. Histologia

As amostras de brânquia e rim foram fixadas em Bouin por 4h, sendo então conservadas em álcool 70%. Posteriormente, as brânquias foram descalcificadas em solução de EDTA 10% por 1,5h. As amostras foram desidratadas em série crescente de etanol e embebidas em parafina, utilizando processador automático de tecidos (Lupe, PT05, BR), cortadas em seções de 4µm, coradas com Hematoxilina-Eosina e montadas em lâminas permanentes com Bálsamo do Canadá. Para contagem das células de cloreto e morfometria dos glomérulos, foi utilizado microscópio de captura de imagem (Olympus BX 45 - Olympus America Inc. Center Valley - Pennsylvania - USA) dotado de câmera (Olympus DP 72 – Olympus America Inc. Center Valley - Pennsylvania - USA). Para cada lâmina foram capturadas três imagens, para posterior análise em um software (Image J 1.45e, National Institutes of Health, USA). Foi utilizado um total de 6 peixes para cada tempo/tratamento, e para cada peixe foram confeccionadas 3 lâminas histológicas.

2.4. Análise bioquímica

2.4.1. Cortisol

O cortisol plasmático foi medido por ELISA de acordo com instruções do fabricante (Direct ELISA Kit, Diag. Biochem Canada Inc., Canadá). Para avaliar possíveis interferentes, devido a sua aplicação em sangue não humano, foi realizada a comparação do paralelismo de curvas de diluição (1/1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16) realizadas a partir do padrão (30 ng/ml), e desse padrão acrescido de mesmo volume de uma amostra de plasma do linguado, conforme proposto por Velasco Santa-María & Cruz-Casallas (2007).

2.4.2. Íons

Para dosagem dos íons Na^+ e K^+ foi utilizado espectrofotômetro de absorção atômico (AAS, Avanta 932 Plus – GBC, Hampshire, IL, EUA). Para os íons Cl^- , Ca^{2+} e Mg^{2+} foram utilizados kit's comerciais (Labtest, Brasil).

2.4.3. Atividade das enzimas NKA e AC

A atividade da NKA das amostras homogeneizadas de brânquia e cérebro foi determinada utilizando o método de microplaca regulado pela temperatura (McCormick, 1993). Nesse ensaio, a atividade da NKA sensível a ouabaína foi medida pela conversão de ADP a NADH, utilizando desidrogenase láctica e piruvato quinase na presença ou ausência de $0,5 \text{ mmol } \mu\text{L}^{-1}$ de ouabaína. Amostras ($10 \mu\text{L}$) foram dosadas em duplicata em microplacas de 96 poços, e lidas em um comprimento de onda de 340 nm por 10 min, em um leitor de microplaca. A concentração de proteína total dos homogeneizados foi determinado através de sistema colorimétrico, utilizando Kit comercial (Proteínas Totais - Doles, Brasil). Para AC branquial, foi utilizado o método ΔpH , adaptado de Henry (1991).

2.5. Análise estatística

Os resultados foram submetidos à análise de variância de duas vias (ANOVA, Fatorial). Comparações *post-hoc* foram realizadas, utilizando Teste de Tukey, considerando a diferença estatisticamente significativa para $p < 0,05$. Todos os resultados são expressos como média \pm desvio padrão.

3. Resultados

3.1. Glicose, hematócrito e osmolalidade

O presente estudo avaliou o tempo de ajuste hipoosmorregulatório de *P. orbignyana* ao longo de 72 h. Não houve mortalidade em função da transferência abrupta à água doce. Os resultados de glicose, hematócrito e osmolalidade estão representados nas Figuras 1, 2 e 3 respectivamente. Há um rápido aumento na concentração de glicose plasmática após duas horas, em ambos os tratamentos, retornando ao valor médio inicial após 6 h. O hematócrito para o grupo controle não demonstrou diferença entre as médias, embora o grupo choque osmótico tenha

apresentado aumento pronunciado após duas horas, retornando ao valor médio inicial após seis horas, permanecendo estável. A osmolalidade apresentou declínio em ambos os tratamentos, entretanto, não apresentaram diferença significativa apenas em 12 h.

3.2. Células de Cloreto e Área glomerular

O valor médio da densidade de células de cloreto não demonstrou diferença ao longo do tempo e entre os tratamentos (tabela 3). Entretanto, a área glomerular demonstrou aumento significativo após duas horas de choque osmótico, retornando a seguir a valores semelhantes ao controle.

3.3. Concentração iônica plasmática

A concentração de Na^+ plasmático demonstrou declínio ao longo do tempo, tanto para o grupo controle como para o choque osmótico, desta forma, não havendo diferença entre os tratamentos (tabela 4). Já para o Cl^- , há uma redução imediata após o choque osmótico, após 6 horas há uma tendência de restauração dos níveis iniciais, e novamente os valores diminuem até as 72 h. Apesar da oscilação nos valores do controle, para 2 e 72 h há diferença significativa entre os tratamentos. O grupo controle manteve constante a concentração do íon K^+ , enquanto o grupo choque osmótico reduziu imediatamente após o choque osmótico. Entretanto, para os tempos seguintes há uma clara recuperação em seus níveis. Os íons divalentes Ca^{2+} e Mg^{2+} sofreram significativas reduções em suas concentrações logo após o choque osmótico, permanecendo nessa condição até o final do experimento.

3.4. Cortisol, NKA e AC

O cortisol plasmático não oscilou entre o grupo controle. Entretanto, houve redução em seus valores 24 h após o choque osmótico, retornando a valores próximos ao inicial em 72 h. Apenas para o tempo de 12 h houve diferença significativa entre os tratamentos.

A atividade da AC aumentou até 3 vezes após o choque osmótico, com seus valores permanecendo maiores que os do grupo controle durante todo tempo experimental (Figura 4). A NKA branquial demonstrou um aumento de até 3 vezes na sua atividade

após 6 h de choque osmótico, havendo restauração nos seus valores entre 12 e 24 h. De forma semelhante, a NKA cerebral demonstrou sua maior atividade 2 horas após o choque osmótico (aumento de até 3 vezes na atividade), havendo uma clara estabilização nos seus valores após 12 h.

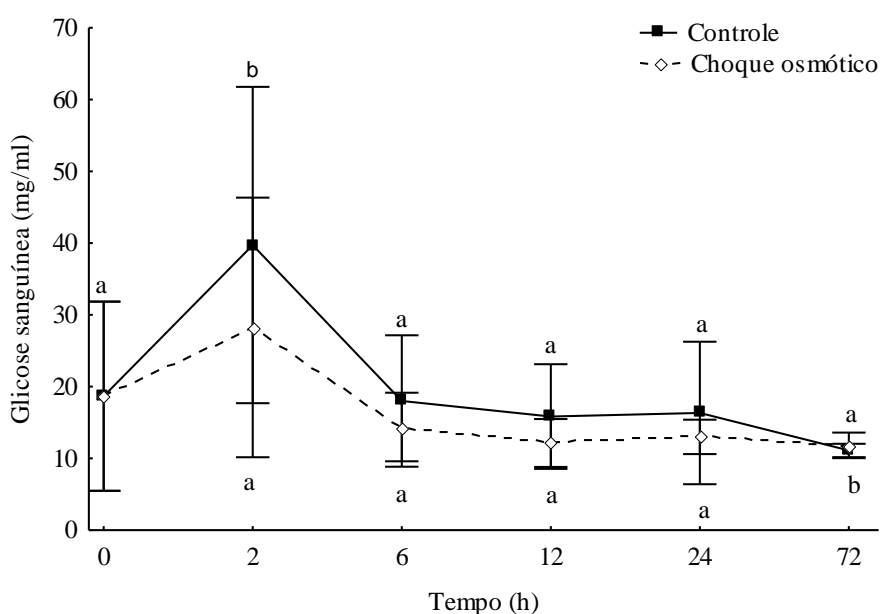


Figura 1 - Glicose sanguínea (mg/mL; média±DP; n = 12) de *Paralichthys orbignyanus* submetidos à choque hiposmótico. Letras diferentes na mesma linha representam diferença significativa ao longo do tempo para o mesmo tratamento (ANOVA Fatorial, Tukey, $p < 0,05$). As médias não diferiram entre os tratamentos em um mesmo tempo experimental.

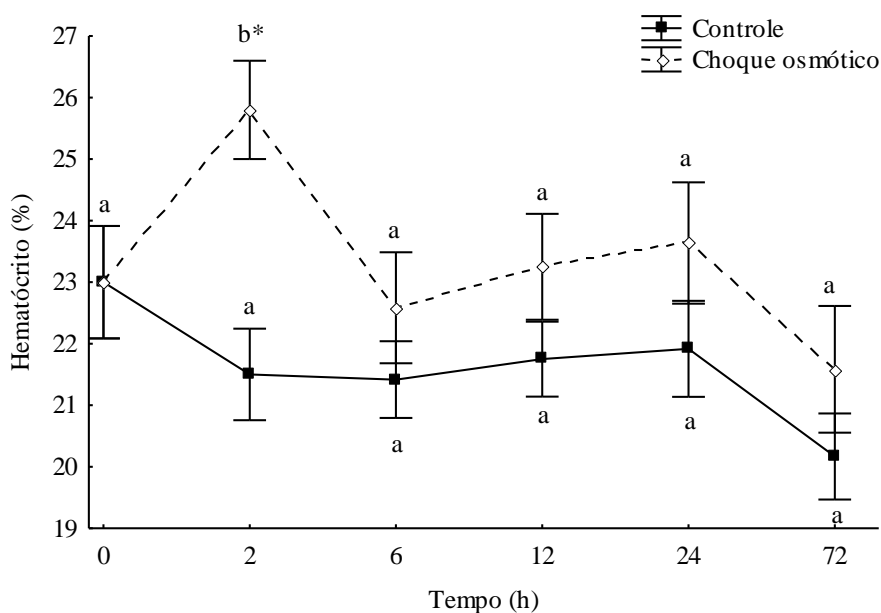


Figura 2 - Hematócrito (%; média±DP; n = 12) de *Paralichthys orbignyanus* submetidos a choque hiposmótico. Letras diferentes na mesma linha representam diferença significativa ao longo do tempo para o mesmo tratamento. * representa diferença significativa entre os tratamentos para o mesmo tempo experimental (ANOVA Fatorial, Tukey, $p < 0,05$).

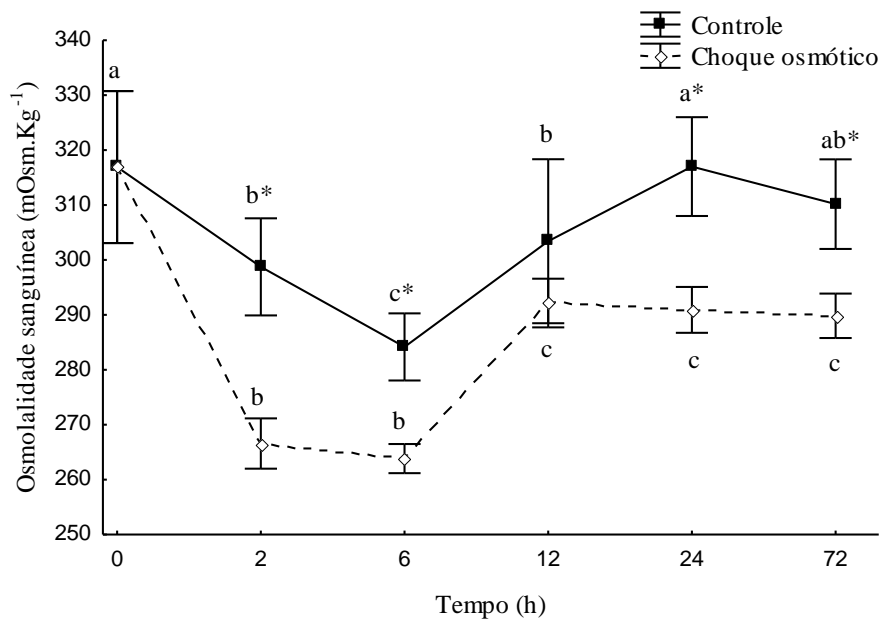


Figura 3 - Osmolalidade sanguínea (mOsm.Kg⁻¹.H₂O; média±DP; n = 12) de *Paralichthys orbignyanus* submetidos a choque hiposmótico. Letras diferentes na mesma linha representam diferença significativa ao longo do tempo para o mesmo

tratamento. *, representa diferença significativa entre os tratamentos para o mesmo tempo experimental (ANOVA Fatorial, Tukey, $p < 0,05$).

Tabela 3 - Alterações morfológicas na brânquia e rim ao longo do tempo (h) de *Paralichthys orbignyanus* submetidos a choque hiposmótico. Células de cloreto (CC; cels/mm² x 10¹) e área glomerular (AGL; μm²x10⁻³). Os valores representam média±DP (n/peixes= 4-6). Letras diferentes na mesma coluna representam diferença significativa para o mesmo tratamento. * representa diferença significativa entre os tratamentos para o mesmo tempo experimental (ANOVA Fatorial, Tukey, $p < 0,05$).

| Tempo (h) | CC | | AGL | |
|-----------|------------------------|------------------------|----------------------|-----------------------|
| | Ct | Ch | Ct | Ch |
| 0 | 50,7±11,7 ^a | | 1,3±0,2 ^a | |
| 2 | 49,7±2,2 ^a | 75,1±18,1 ^a | 1,2±0,2 ^a | 2,6±0,7 ^{b*} |
| 6 | 54,9±16,4 ^a | 54,4±11,5 ^a | 1,3±0,2 ^a | 1,3±0,2 ^a |
| 12 | 74,3±16,1 ^a | 68,7±16 ^a | 1,4±0,1 ^a | 1,6±0,4 ^a |
| 24 | 69±10,8 ^a | 79,2±16,7 ^a | 1,5±0,3 ^a | 1,6±0,2 ^a |
| 72 | 77,5±15,7 ^a | 53,4±13,5 ^a | 1,4±0,1 ^a | 1,5±0,1 ^a |

Ct - controle; Ch - choque hiposmótico.

Tabela 4 - Concentração iônica plasmática (mM) de *Paralichthys orbignyanus* ao longo do tempo (h) submetidos a choque hiposmótico. Os valores representam média±DP (n= 3-6). Letras diferentes na mesma coluna representam diferença significativa para o mesmo tratamento. *, representa diferença significativa entre os tratamentos para o mesmo tempo (ANOVA Fatorial, Tukey, $p<0,05$).

| Tempo (h) | Na ⁺ | | K ⁺ | | Cl ⁻ | | Ca ²⁺ | | Mg ²⁺ | |
|-----------|---------------------------|--------------------------|------------------------|------------------------|-------------------------|-----------------------|------------------------|----------------------|-----------------------|-----------------------|
| | Ct | Ch | Ct | Ch | Ct | Ch | Ct | Ch | Ct | Ch |
| 0 | 198,5±19,1 ^a | | 8,8±2,3 ^a | | 94±13,4 ^a | | 5,5±0,3 ^a | | 2,4±0,09 ^a | |
| 2 | 187,6±16,2 ^{ab} | 162,5±11,7 ^b | 7,9±1,1 ^{a*} | 3,7±1,7 ^b | 87,3±8,8 ^{ab*} | 57,3±8,4 ^b | 5,9±0,2 ^{ab*} | 4,9±0,2 ^b | 2,3±0,1 ^{a*} | 1,7±0,06 ^b |
| 6 | 152,9±12,6 ^{bc} | 171,3±23,9 ^{ab} | 5,3±1,3 ^a | 6,1±0,6 ^{ab} | 76±11,8 ^{ab} | 87,2±3,6 ^a | 6,0±0,2 ^{b*} | 4,9±0,3 ^b | 2,3±0,2 ^{a*} | 1,7±0,1 ^b |
| 12 | 162±12,03 ^{bc} | 140,9±13,5 ^b | 8,8±1,7 ^a | 5,9±0,7 ^{ab} | 55,5±2,8 ^c | 51,8±4,4 ^b | 5,9±0,3 ^{ab*} | 4,8±0,2 ^b | 2,3±0,1 ^{a*} | 1,7±0,2 ^b |
| 24 | 177,8±17,1 ^{abc} | 146,1±17,1 ^b | 11,3±3,9 ^{a*} | 5,6±1,3 ^{ab} | 53,7±6,9 ^c | 44,7±5,2 ^b | 5,7±0,2 ^{ab*} | 4,8±0,2 ^b | 2,4±0,1 ^{a*} | 1,7±0,06 ^b |
| 72 | 151,9±13,9 ^c | 153,9±11,5 ^b | 8,4±1,9 ^{a*} | 4,8±1,05 ^{ab} | 74,5±12 ^{b*} | 51±1,4 ^b | 5,7±0,3 ^{ab*} | 5,1±0,3 ^b | 2,4±0,1 ^{a*} | 1,6±0,03 ^b |

Ct - controle; Ch - choque hiposmótico.

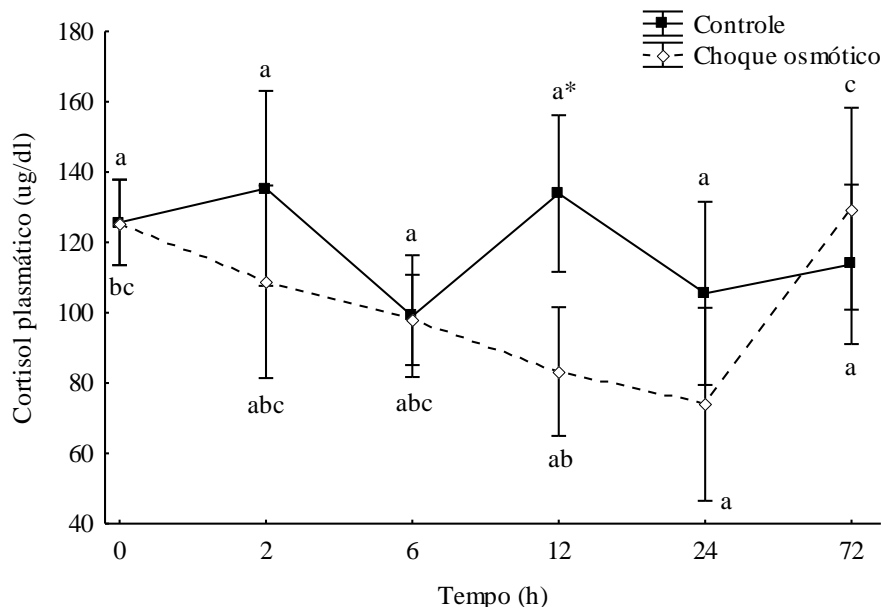


Figura 4 - Cortisol plasmático ($\mu\text{g/dL}$; média \pm DP; n= 4-6) de *Paralichthys orbignyanus* submetidos à choque hiposmótico. Letras diferentes representam diferença significativa ao longo do tempo (h) para o mesmo tratamento. * significa diferença significativa entre os tratamentos para o mesmo tempo experimental (ANOVA Fatorial, Tukey, $p < 0,05$).

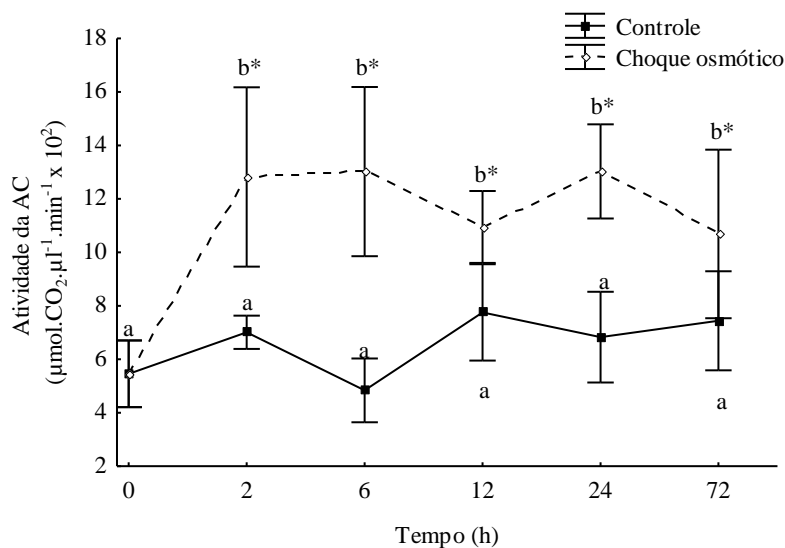


Figura 5 - Atividade da anidrase carbônica branquial ($\mu\text{mol.CO}_2.\mu\text{l}^{-1}.\text{min}^{-1} \times 10^2$; média \pm DP; n= 6) de *Paralichthys orbignyanus* submetidos a choque hiposmótico. Letras diferentes representam diferença significativa ao longo do tempo (h) para o mesmo tratamento. * representa diferença significativa entre os tratamentos para o mesmo tempo experimental (ANOVA Fatorial, Tukey, $p < 0,05$).

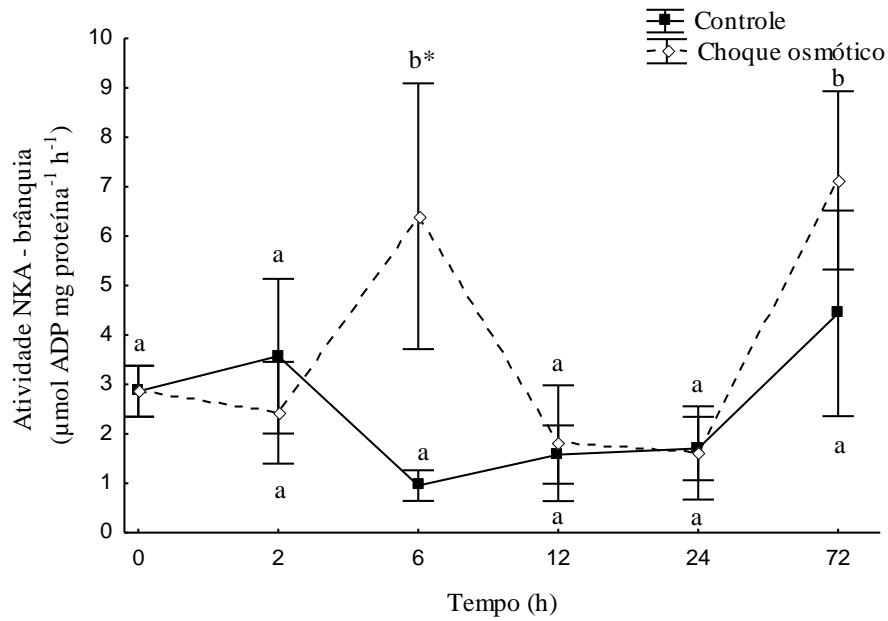


Figura 6 - Atividade da NKA branquial ($\mu\text{mol}.\text{ADP}.\text{mg}.\text{proteína}^{-1}.\text{h}^{-1}$; média \pm DP; n= 4-6) de *Paralichthys orbignyanus* submetidos a choque hiposmótico. Letras diferentes na mesma linha representam diferença significativa ao longo do tempo (h) para o mesmo tratamento. * representa diferença significativa entre os tratamentos para o mesmo tempo experimental (ANOVA Fatorial, Tukey, $p<0,05$).

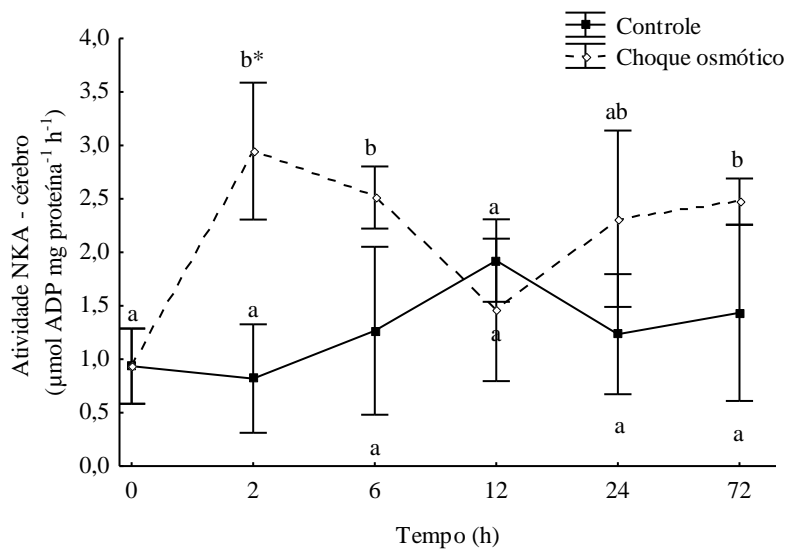


Figura 7 - Atividade da NKA cerebral ($\mu\text{mol}.\text{ADP}.\text{mg}.\text{proteína}^{-1}.\text{h}^{-1}$; média \pm DP; n= 4-6) de *Paralichthys orbignyanus* submetidos a choque hiposmótico. Letras diferentes na mesma linha representam diferença significativa ao longo do tempo (h) para o mesmo tratamento. * representa diferença significativa entre os tratamentos para o mesmo tempo experimental (ANOVA Fatorial, Tukey, $p<0,05$).

4. Discussão

Durante a osmorregulação, duas fases distintas têm sido descritas na resposta de teleósteos eurialinos após a transferência entre meios com diferentes salinidades, ocorrendo um período de aclimação aguda e outro de regulação crônica (Maetz, 1974). Sangiao-Alvarelos *et al.* (2005) demonstrou esses dois períodos para *Sparus aurata*, havendo inicialmente distúrbio na osmolalidade sanguínea, para então, após alguns dias, a osmolalidade retornar a valores similares dos peixes mantidos em água marinha. Em nosso trabalho, pode-se observar um período crítico de ajuste inicial, onde a redução da osmolalidade plasmática é uma evidência do estresse osmótico, devido ao ganho osmótico de água e efluxo de íons durante a exposição a salinidades reduzidas.

A redução dos níveis de cortisol plasmático durante as primeiras 24h nos linguados expostos ao choque contrasta com os níveis elevados de cortisol mantidos nos animais controle. Essa resposta de estresse diferenciada parece estar relacionada à preferência dos juvenis por águas de salinidade intermediária, típicas de região estuarina (Lema *et al.* 1980, Sampaio & Bianchini 2002), onde espécies congêneres como *P.lethostigma*, *P. dentatus* e *P. olivaceus*, apresentam elevado grau de adaptação nesta fase de vida (Wenner *et al.* 1990, Burke *et al.* 1998, Tomiyama *et al.* 2009) . Desta forma, pode-se inferir que animais aclimatados em água do mar ($\approx 30\%$) não devem ser considerados como controle para referenciar a zona de conforto osmótico para os juvenis desta espécie. Essas inferências são reforçadas pela redução das concentrações iônicas ao longo do desafio osmótico.

A ausência de uma elevação adicional do cortisol após um subsequente estressor pode indicar que o estressor crônico dessensibiliza o eixo hipotálamo/hipófise/tecido inter-renal a produzir e/ou liberar mais cortisol (Barton 2002). Portanto, essa produção excessiva de um mediador primário do estresse indicaria uma condição alostática, que permite a homeostase em condições de estresse, gerado tanto pelo manuseio como pelo desafio osmoregulatório (alostase: estabilidade atingida através da mudança) (McEwen & Wingfield 2003).

Além da função glucocorticóide, o cortisol também possui função mineralocorticóide, regulando a troca de íons e água em peixes (Evans 2010). Em alguns teleósteos, a administração de cortisol estimula a atividade da NKA e do transporte pelos NKCC, como estruturas envolvidas na regulação osmótica. A resposta ao estresse tipicamente resulta em aumento na captação de oxigênio pelas brânquias, para suportar o aumento da demanda respiratória (Wendelaar Bonga 1997). Dentre os mecanismos para aumentar a

captação de oxigênio estão o aumento da pressão sanguínea branquial e o aumento da área da superfície respiratória. Essas respostas necessariamente aumentam a troca difusiva de íons e de água através da brânquia; essa relação é denominada *compromisso osmorrespiratório* (González & MacDonald 1994, Breves *et al.* 2010).

O efeito do cortisol no balanço iônico tem demonstrado resultados variados, podendo as concentrações iônicas aumentar, diminuir ou permanecer inalterada de acordo com as condições experimentais (Mancera *et al.* 2002, Laíz-Carrión *et al.* 2003, Chasiotis & Kelly 2012). O aumento nos níveis plasmáticos de Na^+ e Cl^- tem sido atribuídos principalmente ao aumento da área fracional das CC e atividade da NKA (Evans 2010, Tang & Lee 2011). Desta forma, pode-se concluir que durante o período de aclimação em nosso trabalho, houve um aumento nas $[\text{Na}^+]$ e $[\text{Cl}^-]$ devido aos altos níveis de cortisol, que atuam aumentando a permeabilidade branquial, através do *compromisso osmorrespiratório*, aumento da área fracional das CC e também da atividade dos trocadores iônicos. Durante o período experimental, a redução nos níveis iônicos para o grupo controle pode ser atribuída à exaustão dos mecanismos de troca iônica reguladas pelo cortisol, principalmente as CC (Laíz-Carrión *et al.* 2003). Recentemente, Bolasina (2011) demonstrou a resposta de estresse do *P. orbignyanus* submetido a práticas comuns de laboratório, em condições de estresse agudo e crônico, ocasionando aumento de até nove vezes na concentração de cortisol plasmático, evidenciando como a espécie é sensível ao manuseio.

Os resultados não demonstram uma função clara do cortisol sobre as enzimas NKA e AC ao longo do experimento. Kiilerich *et al.* (2011) estudando *Oreochromis mossambicus* demonstrou que o cortisol aumenta a atividade da NKA e o cotransportador NKCC quando aclimatadas à água marinha, enquanto em água doce esse efeito não foi observado. Outras vias também estão relacionadas à regulação da atividade dessas enzimas, como por exemplo, os hormônios da tireóide (T4 e T3) que também modulam a taxa metabólica basal e são responsáveis pela diferenciação celular em alguns tecidos (Peter 2011). Entretanto, ainda não foi demonstrado um modo específico de ação dos hormônios da tireóide na osmorregulação, principalmente devido ao efeito sinérgico/aditivo com os hormônios do crescimento e o próprio cortisol (Klaren *et al.* 2007).

Embora a resposta de estresse primária possa ter sido atenuada pelo período de aclimação, a elevação nos valores de glicose indica uma resposta de estresse secundário. Essa resposta de aumento da glicose plasmática suporta um papel chave dessa fonte energética, suprimindo o aumento da demanda energética branquial, que inclui aumento da

atividade da NKA (Mcguire *et al.* 2010), o que foi observado tanto no cérebro como na brânquia e também na AC.

Em relação ao hematócrito, houve um aumento após duas horas de choque osmótico, enquanto o controle permaneceu constante. Dentre as hipóteses a serem consideradas, está a hidratação dos eritrócitos, uma vez que os fluidos e células corporais dos teleósteos são hiperosmóticos em relação a água doce. A redução observada após este aumento deve-se provavelmente ao início do ajuste da taxa de filtração renal observada neste estudo pelo aumento da área glomerular. Este aumento foi concomitante ao retorno do hematócrito para os níveis basais. Da mesma forma, desafios osmóticos levam a um aumento da taxa metabólica, com imediato aumento do consumo de oxigênio, levando a uma resposta dinâmica específica (Kammerer *et al.* 2010, Uliano *et al.* 2010), ocasionando liberação eritrocitária pelos órgãos de depósito, como o baço, ou redução da circulação gastrointestinal como forma de suprir o déficit de transporte de oxigênio (Woo & Fung 1981, Prodocimo *et al.* 2008).

Considerando o papel osmorregulatório das brânquias, as CC constituem uma heterogeneidade de subtipos celulares (Pisam & Rambourg 1991) e sua principal função é manter o balanço osmótico interno através da absorção ou excreção de íons (Hwang & Lee 2007). A aclimatação a água salgada ou doce está associada ao desenvolvimento de CC altamente diferenciadas em espécies eurialinas (Evans *et al.* 2005). A constância da densidade de CC pode ter sido compensada pela maior atividade das enzimas NKA e AC e também do aumento da sua área fracional, resultando em maior exposição da membrana apical.

O rim do linguado respondeu rapidamente ao desafio hiposmótico, induzindo mudanças imediatas na histologia renal. O diâmetro aumentou significativamente após poucas horas, refletindo o aumento da taxa de filtração glomerular. Os resultados sugerem que a histologia renal está relacionada a capacidade osmorregulatória do linguado em ambiente hiposmótico, embora os estímulos e controles hormonais ainda sejam pouco conhecidos. O elevado aumento no diâmetro glomerular, com conseqüente aumento da taxa de filtração glomerular e formação de urina, reflete na acentuada redução nos íons divalentes Ca^{2+} e Mg^{2+} , já que o rim, juntamente com o intestino, é o principal órgão de troca para os íons bivalentes, e o aumento da taxa de filtração resulta em menor retenção iônica (McDonald 2007, Grossell 2007). Ao mesmo tempo, o jejum na aclimatação e período experimental reduziu a fonte destes cátions.

A função do segmento proximal dos rins dos teleósteos é um tanto quanto controversa, embora seja consenso que sua função primária seja a secreção de Mg^{2+} , especialmente em espécies marinhas. A secreção de Mg^{2+} envolve exocitose apical de vesículas enriquecidas com esse íon (Renfro 1999). Em rins de peixes de água doce, isso pode constituir um papel adicional na excreção do excesso de água (Beyenbach 2004). Em algumas espécies, há evidências que o segmento proximal em peixes marinhos e de água doce é responsável pela absorção de Na^+ e Cl^- , como também glicose e outros osmólitos importantes (Dantzler 2003, Beyenbach 2004). A absorção apical de Na^+ ocorre através das células proximais, embora não seja claro, isso envolve o trocador Na^+/H^+ (Ivanis *et al.* 2008) e o cotransportador Na^+ /glicose (SGLT1).

A principal via de absorção de Cl^- é através da V-ATPase presente na porção apical das CC, responsável pela extrusão de H^+ , resultando em acúmulo citosólico de HCO_3^- , produto da hidratação do CO_2 (Marshall & Grossel 2005). No processo da regulação ácido base, tem sido demonstrado o envolvimento de dois tipos celulares. A célula secretora de base, denominada célula rica em mitocôndria lecitina *peanut* aglutinina-positiva (PNA^+), devido a sua abundância em mitocôndrias e a capacidade de se ligar a PNA; e outra célula secretora de ácido (PNA^-). A célula PNA^+ é secretora de HCO_3^- , através da troca por Cl^- , via trocador aniônico. Enquanto a célula PNA^- é secretora de H^+ na troca por Na^+ , via trocador Na^+/H^+ (Tresguerres *et al.* 2006). Ambos ionócitos catalisam a reação do CO_2 e H_2O através da AC (Perry & Gilmour 2006, Gilmour & Perry 2009). Desta forma, o aumento da atividade da AC parece responder a queda nas $[Na^+]$ e $[Cl^-]$, indicando aumento na atividade das células PNA^+ e PNA^- e provavelmente da enzima V-ATPase.

A maioria dos teleósteos eurialinos demonstra mudança na atividade da NKA quando submetidos a alterações de salinidade. Dois padrões opostos de resposta da NKA têm sido demonstrados: alta atividade da NKA em meio hiperosmótico e alta atividade da NKA em meio hiposmótico (Marshall 2002, Hwang & Lee 2007). Sangiao-Alvarelos *et al.* (2005) demonstraram redução da atividade da NKA renal quando *Sparus aurata* foi aclimatado a condição hiposmótica, enquanto os aclimatados a condição hiperosmótica apresentaram acentuada elevação na atividade da NKA. Meier (2005) demonstrou que juvenis de linguado *P. orbignyanus*, aclimatados a salinidade intermediária de 11‰ (ponto isosmótico) e transferidos para água marinha a 30‰, não apresentam alteração na atividade da NKA. Nossos resultados comprovam o aumento da atividade da NKA em meio hiposmótico, como já demonstrado por Sampaio & Bianchini (2002). Esse padrão de atividade da NKA pode ser relacionado ao ciclo de vida do linguado, uma vez que

juvenis dessa espécie tipicamente habitam regiões estuarinas, as quais apresentam flutuação de salinidade, oscilando entre água marinha até doce.

De acordo com os modelos atuais de troca iônica, a NKA presente na porção basolateral das CC é fundamental para criação de um gradiente eletroquímico, responsável pelo transporte iônico secundário durante os desafios de salinidade (Hwang & Lee 2007, Tang *et al.* 2011). O transporte de Cl^- através das CC é estabelecido pelo gradiente eletroquímico gerado pela NKA, e várias proteínas transportadoras de Cl^- estão localizadas próximas a membrana apical ou basolateral, como por ex. a NKCC e CFTR (Evans 2010).

A NKA branquial apresentou aumento significativo 6 h após o choque osmótico, retornando a valores próximos ao controle após 12 h. Claramente, pode-se perceber um ciclo inicial em resposta a diminuição da osmolalidade, onde a atividade da NKA na brânquia e no cérebro demonstra aumento acentuado, imediatamente retornando a valores próximos ao inicial.

Assim, a diminuição na concentração dos íons plasmáticos e da osmolalidade estão relacionadas ao aumento da atividade da NKA e AC. Esse aumento na atividade dessas enzimas ocorre devido à diluição dos fluidos corporais, pois há uma necessidade de aumento na capacidade de absorção desses íons.

O cérebro, o principal órgão de controle motor e fisiológico dos organismos, em desafios osmóticos possui função fundamental no eixo osmodetecção – resposta endócrina – osmorregulação. Alguns hormônios são conhecidos pela regulação dos mecanismos de transporte iônico. A prolactina (PRL), hormônio pleiotrópico produzido pela pituitária, tem sido relacionada a mecanismos de regulação iônica em água doce (Watanabe *et al.* 2009, Breves *et al.* 2010). Alguns estudos demonstram que o aumento dos níveis de PRL está associado ao aumento da absorção iônica, e provavelmente esse efeito está ligado à regulação das CC (Seale *et al.* 2006). Kelly *et al.* (1999) demonstrou que o impacto da PRL nas CC de *Sparus sarba* é dependente da salinidade ambiental. Em água salobra hiposmótica, a PRL reduz o número e o tamanho das CC, enquanto em água marinha esse hormônio não possui efeito. Sakamoto & McCormick (2006) sugeriram que o controle de renovação celular – apoptose e proliferação celular – em diferentes epitélios osmorregulatórios é uma característica crítica no controle da osmorregulação pela PRL. O aumento na secreção de PRL está relacionado ao decréscimo na concentração de Ca^{+2} plasmático, que é detectado pelo receptor cálcio-sensitivo (CaSR) (Loretz 2008). Nossos resultados demonstram uma pronunciada redução na concentração de Ca^{2+} plasmático imediatamente após o choque osmótico, o que pode ter sinalizado para o aumento da

secreção de PRL, acarretando em aumento na atividade da NKA cerebral antes dos órgãos efetores osmorregulatórios (brânquia e rim) e também da não alteração no número das CC.

5. Conclusão

O linguado demonstrou ser capaz de hipoosmorregular em um período de 72h. Os principais mecanismos osmorregulatórios demonstrados são o aumento da área glomerular renal e aumento atividade das enzimas AC e NKA branquial. A modulação destes mecanismos é acompanhada do aumento da NKA cerebral apontando para o controle neuroendócrino desta modulação. Em sequência a ação renal, a ionorregulação é garantida pelo ajuste da AC e da NKA as quais regulam a atividade dos trocadores Na^+/H^+ , $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ como fonte primária de energia.

6. Referências Bibliográficas

- AMINOT, A & M CHAUSSEPIED. 1983. Manuel des analyses chimiques en milieu marin. Brest, CNEXO, 395p.
- APHA (American Public Health Association). 1998. Standard methods for the examination of water and wastewater. 20st edition. Washington, DC. 1193p.
- BARTON, BA. 2002. Stress in Fishes: A diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. *Integ. Comp. Biol.*, 42: 517-525.
- BEYENBACH, K. 2004. Kidneys sans glomeruli. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.*, 286: 811–827.
- BIANCHINI, A, W F JR WASIELESKY & KC MIRANDA. 1996. Toxicity of nitrogenous compounds to juveniles of flatfish *Paralichthys orbignyanus*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 56(3): 453-459.
- BOLASINA, NS. 2011. Stress response of juvenile flounder (*Paralichthys orbignyanus*, Valenciennes 1839), to acute and chronic stressors. *Aquaculture*, 313(1): 4-15.
- BRAUER, PR, JN SANMANN & DH PETZEL. 2005. Effects of warm acclimation on Na^+,K^+ -ATPase alpha-subunit expression in chloride cells of Antarctic fish. *Anat. Rec.*, 285(A): 600-609.
- BREVES, JP, T HIRANO & EG GRAU. 2010. Ionoregulatory and endocrine responses to disturbed salt and water balance in Mozambique tilapia exposed to confinement and handling stress. *Comp. Biochem. Phys. A*, 155: 294-300.
- BURKE, JS, M UENO, Y TANAKA, H WALSH, T MAEDA, I KINOSHITA, T SEIKAI, DE HOSS & M TANAKA. 1998. The influence of environmental factors on early life history patterns of flounders. *J. Sea Res.*, 40: 19–32.

- CERQUEIRA, VR, R MIOSO, JAG MACCHIAVELLO & AM BRÜGGER. 1997. Ensaios de indução de desova do linguado *Paralichthys orbignyanus* Valenciennes 1839. *B. Inst. Pesca*, 4: 247-254.
- CHASIOTIS & KELLY. 2012. Effects of elevated circulating cortisol levels on hydromineral status and gill tight junction protein abundance in the stenohaline goldfish. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 175(2): 277-83.
- COSTA, PM, S CAEIRO, MS DINIS, J LOBO, M MARTINS, AM FERREIRA, M CAETANO, C VALE, A DELVALLS & MH COSTA. 2010. A description of chloride cell and kidney tubule alterations in the flatfish *Solea senegalensis* exposed to moderately contaminated sediments from the Sado estuary (Portugal). *J. Sea Res.*, 64: 465-472.
- DANTZLER, WH. 2003. Regulation of renal proximal and distal tubule transport: sodium, chloride and organic anions. *Comp. Biochem. Physiol.*, 136: 453-478.
- ENGELUND, MB & SS MADSEN. 2011. The Role of Aquaporins in the Kidney of Euryhaline Teleosts. *Front. Physiol.*, 2: 51.
- EVANS, DH, P M PIERMARINI & WTW POTTS. 1999. Ionic Transport in the Fish Gill Epithelium. *J. Exp. Zool.*, 283: 641-652.
- EVANS, DH, PM PIERMARINI, KP CHOE. 2005. The multifunctional fish gill: dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation, and excretion of nitrogenous waste. *Physiol. Rev.*, 85: 97-177.
- EVANS, DH. 2008. Teleost fish osmoregulation: what have we learned since August Krogh, Homer Smith, and Ancel Keys. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 295: 704-713.
- EVANS, DH. 2010. Co-ordination of osmotic stress responses through osmosensing and 491 signal transduction events in fishes. *J. Fish Biol.*, 76: 1903–1925.
- FIGUEIREDO, JL & NA MENEZES. 2000. Manual de peixes marinhos do sudeste do Brasil. Universidade de São Paulo, São Paulo, volume VI.
- GIARI, J, M MANERA, E SIMONY & BS DEZFULI. 2006. Changes to chloride and rodlet cells in gills, kidney and intestine of *Dicentrarchus labrax* (L.) exposed to reduced salinities. *J. Fish Biol.*, 69: 590-600.
- GILMOUR, KM & SF PERRY. 2009. Carbonic anhydrase and acid–base regulation in fish. *J. Exp. Biol.*, 212: 1647-1661.
- GLOVER, CN. 2007. Cellular and Molecular Approaches to the Investigation of Piscine Osmoregulation: Current and Future Perspectives. In: BALDISSEROTTO, B, JM MANCERA &

- BG KAPOOR (eds.). Fish Osmoregulation. Science Publishers, Enfield (NH), Jersey, Plymouth, 177-234.
- GONZALEZ, RJ & DG McDONALD. 1994. The relationship between oxygen uptake and ion loss in fish from diverse habitats. *J. Exp. Biol.*, 190, 95-108.
- GROSELL, M. 2007. Intestinal Transport Processes in Marine Fish Osmoregulation. In: BALDISSEROTTO, B, JM MANCERA & BG KAPOOR (eds.). Fish Osmoregulation. Science Publishers, Enfield (NH), Jersey, Plymouth, 333-358.
- HENRY, RP. 1991. Techniques for measuring carbonic anhydrase activity in vitro: the electrometric delta pH and pH stat assays. In: DODGSON SJ, TASHIAN RE, GROS G & CARTER ND(eds.). The Carbonic Anhydrases: Cellular Physiology and Molecular Genetics. Plenum, New York, 119-126.
- HERRERA, M, L VARGAS-CHACOFF, I HACHERO, I RUÍZ-JARABO, A RODILES, JI NAVAS & JM MANCERA. 2009. Osmoregulatory changes in wedge sole (*Dicologlossa cuneata* Moreau, 1881) after acclimation to different environmental salinities. *Aquacult. Res.*, 40: 762-771.
- HICKMAN, CP JR & BF TRUMP. 1969. The Kidney. In: HOAR, WS & DJ RANDALL (eds). Fish Physiology, Volume I Excretion, ionic regulation and Metabolism. Academic Press, New York and London, 91-227.
- HIROI J, SD McCORMICK, R OHTANI-KANEKO & T KANEKO. 2005. Functional classification of mitochondrion-rich cells in euryhaline Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*) embryos, by means of triple immunofluorescence staining for Na⁺/K⁺-ATPase, Na⁺/K⁺/2Cl⁻ cotransporter and CFTR anion channel. *J. Exp. Biol.*, 208: 2023-2036
- HIROI, J & SD McCORMICK. 2007. Variation in salinity tolerance, gill Na⁺/K⁺-ATPase, Na⁺/K⁺/2Cl⁻ cotransporter and mitochondria-rich cell distribution in three salmonids *Salvelinus namaycush*, *Salvelinus fontinalis* and *Salmo salar*. *J. Exp. Biol.*, 210: 1015-1024.
- HWANG, PP & TH LEE. 2007. New insights into fish ion regulation and mitochondrion-rich cells. *Comp. Biochem. Phys. A*, 148: 479-497.
- IVANIS, G, M BRAUN & SF PERRY. 2008. Renal expression and localization of SLC9A3 sodium/hydrogen exchanger and its possible role in acid-base regulation in freshwater rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 295 : 971-978.

- KAMMERER, BD, JCJ JOSEPH & D KÜLTZ. 2010. Rapid changes in plasma cortisol, osmolality, and respiration in response to salinity stress in tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *Comp. Biochem. Phys. A*, 257: 260-265.
- KELLY, SP, INK CHOW & YS WOO. 1999. Effects of prolactin and growth hormone on strategies of hypoosmotic adaptation in a marine teleost, *Sparus sarba*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 113: 9-22.
- KEYS, A & EN WILMER. 1932. Chloride secreting cells in the gills of fishes, with special reference to the common eel. *J. Physiol.*, 76: 368-378.
- KIILERICH, P, CK TIPSMARK, R BORSK & S MADSEN. 2011. Differential effects of cortisol and 11-deoxycorticosterone on ion transport protein mRNA levels in gills of two euryhaline teleosts, Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*) and striped bass (*Morone saxatilis*). *J. Endocrinol. A*, 209: 115-126.
- KLAREN, PHM, JM GUZMÁN, SJ REUTELIN, G SPERGER, JM MANCERA & G FLIK. 2007. Low salinity acclimation and thyroid hormone metabolizing enzymes in gilthead seabream (*Sparus auratus*). *Gen. Comp. Endocrinol.*, 152: 215-222.
- LAIZ-CARRIÓN, R, MP MARTIN DEL RIO, JM MIGUEZ, JM MANCERA & JL SOENGAS. 2003. Influence of Cortisol on Osmoregulation and Energy Metabolism in Gilthead Seabream *Sparus aurata*. *J. Exp. Zool.*, 298(A): 105-118.
- LAURENT, P, H HOBE & S DUNEL-ERB. 1985. The role of environmental sodium chloride relative to calcium in gill morphology of freshwater salmonid fish. *Cell Tissue Res.*, 240: 675-692.
- LEMA, T, MFT OLIVEIRA, CAS LUCENA. 1980. Levantamento preliminar dos Pleuronectiformes do extremo suldo Brasil ao Rio de la Plata. *Iheringia*, 56: 25-52.
- LORETZ, CA. 2008. Extracellular calcium-sensing receptors in fishes. *Comp. Biochem. Physiol. A*, 149: 225-245.
- MAETZ, J. 1974. Aspects of adaptation to hypo-osmotic and hyper-osmotic environments. In: MALINS, DC & JR SARGENT (eds.). *Biochemical and Biophysical Perspectives in Marine Biology*. Academic Press, New York, 1-167.
- MANCERA, JM, R LAIZ-CARRIÓN, & MP MARTÍN DEL RÍO. 2002. Osmoregulatory action of PRL, GH, and cortisol in the gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Gen. Comp. Endocrinol.*, 129: 95-103.
- MARSHALL, WS. 2002. Na⁺, Cl⁻, Ca²⁺ and Zn²⁺ transport by fish gills: retrospective review and prospective synthesis. *J. Exp. Zool.*, 293: 264-283.

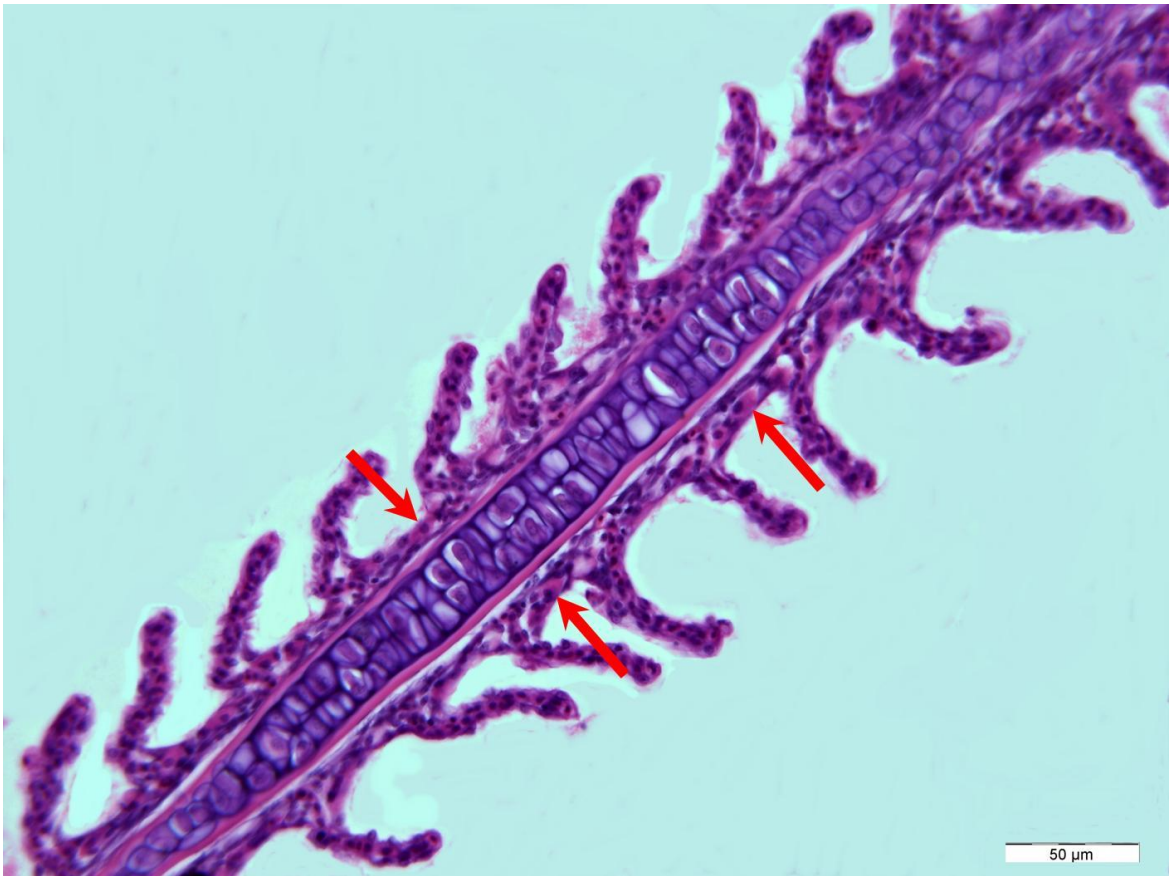
- MARSHALL, WS & M GROSELL. 2005. Ion Transport, Osmoregulation, and Acid-Base Balance. In: EVANS, DH & JB CLAIRBORNE (eds.). *The Fish Physiology of Fishes*. Taylor & Francis, Boca Raton, London, New York, 177-230.
- MCCORMICK, SD. 1993. Methods for non-lethal gill biopsy and measurement of Na⁺-K⁺-ATPase activity. *Can. J. Fish Aquat. Sci.*, 50: 656-658.
- MCCORMICK, SD. 1995. Hormonal control of gill Na⁺, K⁺-ATPase and chloride cell function. In: WOOD CM & TJ SHUTTLEWORTH (eds.). *Cellular and molecular approaches to fish ionic regulation*. Academic Press, New York, 285-315.
- MCCORMICK, SD. 2001. Endocrine control of osmoregulation in teleost fish. *Am. Zool.*, 41: 781-794.
- MCCORMICK, SD, A REGISH, MF O'DEA & JM SHRIMPTON. 2008. Are we missing a mineralocorticoid in teleost fish? Effects of cortisol, deoxycorticosterone and aldosterone on osmoregulation, gill Na⁺, K⁺-ATPase activity and isoform mRNA levels in Atlantic salmon. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 157: 35-40.
- MCDONALD, M D. 2007. The renal contribution to salt and water balance. In: BALDISSEROTTO, B, JM MANCERA & BG KAPOOR (eds.). *Fish Osmoregulation*. Science Publishers, Enfield (NH), Jersey, Plymouth, 309-332.
- MCEWEN, BS & JC WINGFIELD. 2003. The concept of allostasis in biology and biomedicine. *Horm Behav.*, 43(1): 2-15.
- MCGUIRE, A, N ALURU, A TAKEMURA, R WEIL, JM WILSON & MM VIJAYAN. 2010. Hyperosmotic shock adaptation by cortisol involves upregulation of branchial osmotic stress transcription factor 1 gene expression in Mozambique Tilapia. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 165: 321-329.
- MEIER, KM. 2005. Estudos genético-fisiológicos da osmorregulação no linguado *Paralichthys orbignyanus*. Dissertação de mestrado. Fundação Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 50 p.
- MEIER, KM, MA FIGUEIREDO, MT KAMIMURA, J LAURINO, R MAGGIONI, LS PINTO, AO DELLAGOSTIN, MB TESSER, LA SAMPAIO & LF MARINS. 2009. Increased growth hormone (GH), growth hormone receptor (GHR), and insulin-like growth factor I (IGF-I) gene transcription after hyperosmotic stress in the Brazilian flounder *Paralichthys orbignyanus*. *Fish Physiol. Biochem.*, 35: 501-509.
- MOMMSEN, TP, MM VIJAYAN & TW MOON. 1999. Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. *Rev. Fish Biol. Fish.*, 9: 211-268.
- PERRY, SF & KM GILMOUR. 2006. Acid-base balance and CO₂ excretion in fish: unanswered questions and emerging models. *Respir. Physiol. Neurobiol.*, 154: 199-215.

- PETER, MCS. 2011. The role of thyroid hormones in stress response of fish. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 172: 198-210.
- PISAM, M & A RAMBOURG. 1991. Mitochondria-rich cells in the gill epithelium of teleost fishes - an ultrastructural approach. *Int. Rev. Cytol.*, 130: 191-232.
- PRODOCIMO, V, CF SOUZA, C PESSINI, LC FERNANDES & CA FREIRE. 2008. Metabolic substrates are not mobilized from the osmoregulatory organs (gills and kidney) of the estuarine pufferfishes *Sphoeroides greeleyi* and *S. testudineus* upon short-term salinity reduction. *Neotrop. Ichth.*, 6(4): 613-620.
- RANDALL, DJ & SF PERRY. 1992. Catecholamines. In: HOAR, WS & DJ RANDALL (eds.). *Fish physiology*, Vol. 12B. Academic Press, New York, 255-300.
- REID, SG, NJ BERNIER & SF PERRY. 1998. The adrenergic stress response in fish: Control of catecholamine storage and release. *Comp. Biochem. Physiol.*, 120(C): 1-27.
- RENFRO, L. 1999. Recent developments in teleost renal transport. *J. Exp. Zool.*, 283: 653-661.
- RESENDE, SD, A LOBO-DA-CUNHA, F MALHÃO, F FRANQUINHO, RAF MONTEIRO & E ROCHA. 2010. Histological and stereological characterization of brown trout (*Salmo trutta* f. *fario*) trunk kidney. *Microsc. Microanal.*, 16: 677-687.
- ROBALDO, BR. 2003. Estudo comparativo da reprodução do linguado *Paralichthys orbignyanus* (Valenciennes 1839) no ambiente e em cativeiro. Tese de doutorado, Fundação Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 200 p.
- SAKAMOTO, T, K UCHIDA & S YOKOTA. 2001. Regulation of the ion-transporting mitochondrion-rich cell during adaptation of teleost fishes to different salinities. *Zool. Sci.*, 18: 1163-1174.
- SAKAMOTO, T & SD MCCORMICK. 2006. Prolactin and growth hormone in fish osmoregulation. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 147: 24-30.
- SAMPAIO, LA, A BIANCHINI & VR CERQUEIRA. 2001. Growth of juvenile brazilian flounder, *Paralichthys orbignyanus*, cultured at different salinities. *J. Appl. Aquacult.*, 11(1/2): 67-75.
- SAMPAIO, LA & A BIANCHINI. 2002. Salinity affects on osmoregulation and growth of the euryaline flounder *Paralichthys orbignyanus*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 269: 187-196.
- SAMPAIO, LA, BR ROBALDO & A BIANCHINI. 2008. Hormone-induced ovulation, natural spawning and larviculture of Brazilian flounder *Paralichthys orbignyanus* (Valenciennes 1839). *Aquacult. Res.*, 39(7): 712-717.

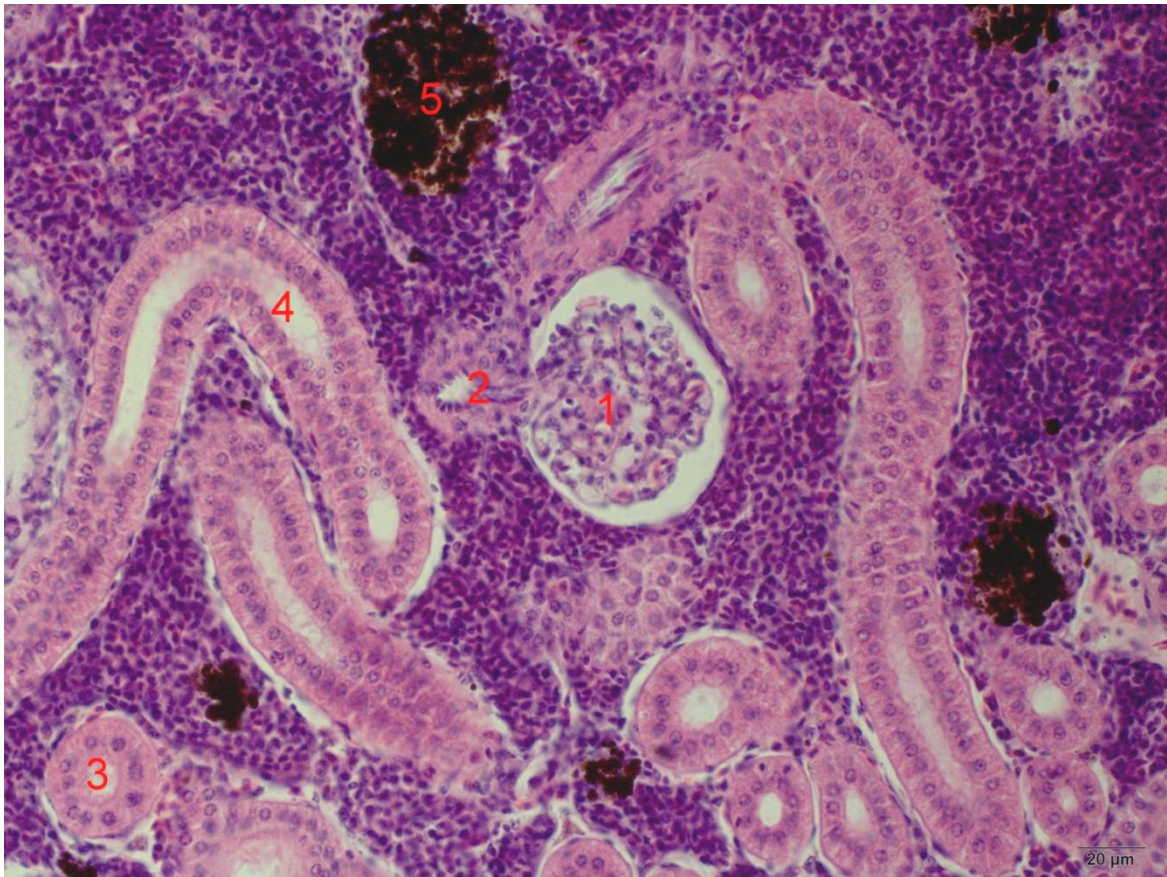
- SANGIAO-ALVARELLOS, A, FJ ARJONA, MPM DEL RÍO, JM MIGUEZ, JM MANCERA & JL SOENGAS. 2005. Time course of osmoregulatory and metabolic changes during osmotic acclimation in *Sparus auratus*. *J. Exp. Biol.*, 208: 4291-4304.
- SEALE, AP, T HIRANO & EG GRAU. 2006. Osmoreception: a fish model for a fundamental sensory modality. In: REINECKE, M, G ZACCONE & BG KAPOOR (Eds.), *Fish Endocrinology*. Science Publishers, Enfield, NH, 419-440.
- TANG, CH & TH LEE. 2011. Morphological and ion-transporting plasticity of branchial mitochondrion-rich cells in the euryhaline spotted green Pufferfish, *Tetraodon nigroviridis*. *Zool. Stud.*, 50(1): 31-42.
- TANG, CH, LY HWANG, ID SHEN, YH CHIU & TH LEE. 2011. Immunolocalization of chloride transporters to gill epithelia of euryhaline teleosts with opposite salinity-induced Na⁺/K⁺-ATPase responses. *Fish Physiol. Biochem.*, 37: 709-724.
- TOMIYAMA, T, Y YAMASHITA & M TANAKA. 2009. Occurrence of juvenile Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* in brackish estuaries. *Estuar. Coast. Shelf Sci.*, 85: 661-665.
- TRESGUERRES, M, F KATOH, E ORR, SK PARKS & GG GOSS. 2006. Chloride uptake and base secretion in freshwater fish: a transepithelial ion-transport metabolon? *Physiol. Biochem. Zool.*, 79: 981-996.
- ULIANO, E, M CATALDI, F CARELLA, O MIGLIACCIO, D IACCARINO & C AGNISOLA. 2010. Effects of acute changes in salinity and temperature on routine metabolism and nitrogen excretion in gambusia (*Gambusia affinis*) and zebrafish (*Danio rerio*). *Comp. Biochem. Physiol. A*, 157: 283-290.
- UNESCO. 1993. Chemical methods for use in marine environmental monitoring. Paris: Intergovernmental Oceanographic Commission, 53p.
- VELASCO-SANTAMARÍA, Y & P CRUZ-CASALLAS. 2007. Methodology for determination of plasma cortisol in fish using competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Rev. MZV*, 12(1): 869-877.
- WASIELESKY, WJR, K MIRANDA FILHO & A BIANCHINI. 1995. Tolerância do linguado *Paralichthys orbignyanus* à salinidade. *Arq. Biol. Tecnol.*, 38(2): 385-395.
- WASIELESKY, WJ, A BIANCHINI, MHS SANTOS & LH POERSCH. 1997. Tolerance of Juveniles of the Flatfish *Paralichthys orbignyanus* to Acid Stress. *J. World Aquacult. Soc.*, 28(2): 202-204.
- WATANABE, S, T HIRANO, EG GRAU & T KANEKO. 2009. Osmosensitivity of prolactin cells is enhanced by the water channel aquaporin-3 in a euryhaline Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *Am. J. Physiol.*, 296: 446-453.

- WEDEMEYER, GA, BA BARTON & DJ MCLEAY. 1990. Stress and acclimation. In: SCHRECK, CB & PB MOYLE (eds.), *Methods for fish biology*. American Fisheries Society, Bethesda, Maryland, 451-489
- WENDELAAR BONGA, SE. 1997. The stress response in fish. *Physiol. Rev.*, 77: 591-625.
- WENNER, CA, WA ROUMILLAT, JR MORAN, MB JR MADDOX, LB DANIEL & JB SMITH. 1990. investigations on the life history an population dynamics of marine recreational fishes in South Carolina: part 1. Marine Resources Research Institute. SC DNR. Report to United States Fish and Wildlife service, Project F-37. Charleston, South Carolina, 35p.
- WONG, MKS & NYS WOO. 2006. Rapid changes in renal morphometrics in silver sea bream *Sparus sarba* on exposure to different salinities. *J. Fish Biol.*, 69: 770-782.
- WOO, N & ACY FUNG. 1981. Studies on the biology of the red sea bream, *Chrysophrys major* – II. Salinity adaptation. *Comp. Biochem. Physiol. A*, 69: 237-242.

7. Anexos



Anexo 1 - Secção branquial de juvenil de *Paralichthys orbignyanus*. Coloração Hematoxilina Eosina, 4 μ m de espessura. As setas vermelhas indicam as células de cloreto.



Anexo 2 - Secção renal de juvenil de *Paralichthys orbignyanus*. Coloração Hematoxilina Eosina, 4μm de espessura. 1 – glomérulo, 2 – segmento do pescoço ciliado, 3 – túbulo proximal, 4 – túbulo contorcido distal, 5 – centro melanomacrofágico.