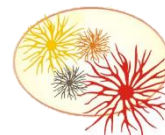




UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE – FURG
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – ICB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS



ISADORA PORTO MARTINS MEDEIROS

**HOMEOSTASE OSMOIÔNICA EM MOLUSCOS BIVALVES
HABITANTES DE DIFERENTES NICHOS OSMÓTICOS:
PADRÕES FISIOLÓGICOS E EVOLUTIVOS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Rio Grande

2019

ISADORA PORTO MARTINS MEDEIROS

**HOMEOSTASE OSMOIÔNICA EM MOLUSCOS BIVALVES
HABITANTES DE DIFERENTES NICHOS OSMÓTICOS:
PADRÕES FISIOLÓGICOS E EVOLUTIVOS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Rio Grande, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Orientador: Profa. Dra. Marta Marques de Souza

Coorientador: Dr. Samuel Coelho Faria

Rio Grande

2019

Dedico este trabalho ao meu avô Soloy (*in memoriam*) que mesmo com pouca escolaridade, sempre ressaltou a importância dos estudos nas nossas vidas. Obrigada pelo teu incentivo e vibração a cada conquista da minha trajetória acadêmica, assim como pelo teu amor e zelo nos demais momentos que pudemos compartilhar juntos!

AGRADECIMENTOS

Agradeço carinhosamente à minha mãe Ivone Regina e ao meu pai Maurício pela amizade e afeto doados, assim como pela paciência e atenção incomparáveis com que sempre me acolheram. Amo vocês!

Sou grata também às minhas avós Zilda e Loiva (*in memoriam*), bem como aos meus avôs Soloy (*in memoriam*) e Ercílio (*in memoriam*) pelas vivências, lembranças e carinho com que os guardo no coração.

À minha orientadora Marta, obrigada por me conduzir com carinho e compreensão em mais esse processo. Já se vão 8 anos de apoio, estímulo e aprendizados, além de muitas conversas e risadas também. Saiba que tuas “injeções” de ânimo foram fundamentais ao longo dessa jornada! Agradeço também ao meu coorientador Samuel pela tranquilidade, cuidado e sabedoria em me guiar. Jamais esquecerei a sensibilidade e a gentileza com que sempre conduzisses as orientações, fossem elas pessoalmente, via *e-mail* ou por áudio. Mais uma vez, obrigada pela oportunidade de aprender tanto com vocês!

Deixo meu sincero agradecimento aos professores Dr. Leonir André Colling (IO – FURG) e Dr. Ricardo Berteaux Robaldo (IB – UFPel), bem como às colegas de pós-graduação Fernanda Chaves Lopes e Joseane Marques pelas orientações e colaboração no esforço de coleta dos espécimes estuarino, dulcícola e marinho essenciais para que esse trabalho se tornasse realidade.

Agradeço também ao colega de pós-graduação Marcos Cordeiro pela indicação da metodologia de revisão sistemática, assim como por ter me apresentado – pacientemente – o caminho das pedras entre os *e-mails* trocados. Reconheço ainda o apoio concedido pelo MSc. Daniel Cavallari junto a revisão taxonômica e da nomenclatura dos bivalves, assim como pela Profa. Dra. Camila Martins nas orientações e esclarecimentos junto aos ensaios e cálculos da SL₅₀.

Sou grata à equipe de técnicos do ICB (Josencler, Glauce, Thaís, Mateus, Márcio, Lorraine e Giane), assim como ao Prof. Dr. Robert Boyle pelos inúmeros empréstimos de material. Obrigada também à colega de pós-graduação Amanda Guerreiro e pós-doutorandas Patrícia Costa, Ana Laura Escarrone, Micheli Castro e Regina Rola pelos auxílios prestados junto ao cultivo de microalgas, as análises no fotômetro de chama e de aminoácidos.

Agradeço à pós-doutoranda Mariana Hoff pela dedicação e cuidado ao discutir e pensar comigo cada detalhe de minha comunicação oral apresentada durante a FeSBE Regional de 2018, fruto deste trabalho.

À CAPES agradeço pelo fomento destinado a pós-graduação, especialmente em vista da bolsa de mestrado concedida. Obrigada ainda ao PPGCF e ao ICB pela disponibilização de recursos, bem como à FURG pela infraestrutura oferecida.

Obrigada às colegas do grupo de pesquisa pelos conhecimentos compartilhados durante nossas reuniões, assim como pelos bons momentos de confraternização.

Sou especialmente grata a minha psicóloga Regina pela paciência e serenidade com que sempre conduziu nossos encontros, ouvindo atentamente enquanto eu falava sobre esse trabalho. Gratidão ainda ao meu padrasto Jeferson e aos meus demais amigos, que mesmo de outras áreas do conhecimento, sempre estiveram comigo e se dispuseram a ouvir com entusiasmo sobre a minha pesquisa.

Por fim, sou imensamente grata ao meu companheiro Samuel pela cumplicidade, amor e força dedicados sempre. Tua doçura e bom humor ímpares também foram essenciais nessa caminhada!

“Trago dentro do meu coração,
Como num cofre que se não pode fechar de cheio,
Todos os lugares onde estive,
Todos os portos a que cheguei,
Todas as paisagens que vi (...)
E tudo isso, que é tanto, é pouco para o que eu quero”

Fernando Pessoa

PREFÁCIO

Esta dissertação constitui-se como parte dos requisitos obrigatórios para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Rio Grande - FURG.

O presente trabalho encontra-se organizado em 5 seções, além de um Apêndice. Na Introdução Geral, são apresentados ao leitor diversos elementos relacionados à pesquisa com a finalidade de contextualizar, bem como auxiliar na compreensão da temática abordada. Posteriormente, na seção de Objetivos, são elencadas as metas gerais e específicas da dissertação, seguidos da seção de Metodologia Detalhada, na qual são pormenorizados os métodos e procedimentos utilizados.

Na sequência, apresenta-se o manuscrito intitulado *Osmoionic Homeostasis in Bivalves Molluscs Inhabitants of Different Osmotic Niches* submetido ao periódico *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology*. Nele, são reportados os padrões fisiológicos expressos, além dos principais efetores osmóticos (orgânicos e inorgânicos) utilizados pelos moluscos bivalves *Corbicula largillierti* (berbigão Asiático roxo), *Erodona mactroides* (berbigão de laguna) e *Amarilladesma mactroides* (marisco branco) na Regulação Isosmótica Intracelular quando submetidos a flutuações de salinidade.

Adiante, são conduzidas - em linhas gerais - argumentações, bem como o fechamento geral do trabalho nas seções de Discussão Geral e Conclusão, respectivamente. Por fim, a seção de Apêndice compreende elementos referidos na Metodologia Detalhada disponíveis para possível consulta *a posteriori*.

SUMÁRIO

RESUMO GERAL	9
ABSTRACT	10
1. INTRODUÇÃO	11
1.1 – Variável Ambiental: Salinidade	11
1.2 – Padrões Fisiológicos: Formas de Enfrentamento às Variações Ambientais ..	11
1.3 – Vivendo com a Variação Osmótica: Mecanismos de Ação	13
1.4 – Protagonistas da Regulação: Efeitores Osmóticos	15
1.5 – Modelo Experimental: Moluscos Bivalves	17
a) <i>Corbicula largillierti</i>	17
b) <i>Erodona mactroides</i>	18
c) <i>Amarilladesma mactroides</i>	18
1.6 – Abordagem Comparativa	19
2. OBJETIVO	20
2.1 – Objetivos Gerais.....	20
2.2 – Objetivos Específicos.....	20
3. METODOLOGIA DETALHADA	21
3.1 – Componente Experimental.....	21
3.1.1 <i>Coleta e Aclimação dos Animais</i>	21
3.1.2 <i>Ensaio de Sobrevivência</i>	23
3.1.3 <i>Choques Osmóticos</i>	24
3.1.4 <i>Osmolalidade de Soluções e Hemolinfa</i>	24
3.1.5 <i>Hidratação Tecidual</i>	25
3.1.6 <i>Dosagem de Osmólitos Inorgânicos</i>	25
3.1.7 <i>Dosagem de Osmólitos Orgânicos</i>	26
3.2 – Análises Estatísticas	28
3.2.1 <i>Análises Intraespecíficas</i>	28
3.2.2 <i>Análises Interespecíficas</i>	28
a) <i>Coleta de Dados Fisiológicos</i>	29
b) <i>A Hipótese Filogenética</i>	31
c) <i>Sinal Filogenético</i>	31
d) <i>Reconstrução Ancestral</i>	32
e) <i>Regressão Filogenética</i>	32
4. MANUSCRITO	35
HIGHLIGHTS	36
ABSTRACT	37
INTRODUCTION	38
MATERIAL AND METHODS.....	40
RESULTS	43
DISCUSSION.....	55
ACKNOWLEDGEMENTS.....	60
REFERENCES	60
5. MÉTODOS COMPARATIVOS FILOGENÉTICOS	66
6. DISCUSSÃO GERAL	69
7. CONCLUSÃO	72

REFERÊNCIAS	73
APÊNDICE	81
Apêndice A	81
Apêndice B	83
Apêndice C	84
Apêndice D	86
Apêndice E.....	89
Apêndice F.....	104

RESUMO GERAL

O conhecimento desenvolvido no campo da Fisiologia, com questões voltadas para os desafios enfrentados e estratégias recrutadas pelos organismos em seus habitats, assume fundamental importância no que diz respeito à compreensão acerca da capacidade de sobrevivência quando submetidos a situações desfavoráveis. No ambiente aquático – em especial – a salinidade é reconhecida como um dos principais fatores abióticos que exerce efeito sobre a fisiologia dos organismos. Embora os padrões fisiológicos e desafios impostos por cada ambiente ocupado sejam distintos, tendem a convergir para oscilações osmóticas sobre estes. A partir de uma perspectiva comparada – objetivou-se caracterizar os padrões osmorregulatórios das espécies de moluscos bivalves *Corbicula largillierti* (berbigão asiático roxo), *Erodona mactroides* (berbigão de laguna) e *Amarilladesma mactroides* (marisco branco) - habitantes de diferentes nichos osmóticos - quando submetidos a variações hipo- e/ou hiperosmóticas de salinidade. Para isso, foi verificado previamente a capacidade de tolerância dos bivalves dulcícola, estuarino e marinho à intervalos de salinidade espécie-específicos, determinando ainda a concentração osmótica e iônica da hemolinfa, hidratação tecidual, bem como a capacidade de regulação isosmótica do fluido intracelular a partir do uso de osmólitos (orgânicos e inorgânicos). Ademais, incorporou-se a perspectiva filogenética com o intuito de inferir e ainda alargar o entendimento acerca dos padrões que compreendem a fisiologia osmo-iônica de representantes da Classe Bivalvia. Nesse sentido, os resultados apontam que a salinidade ambiental dirige a variação de traços fisiológicos, como a osmolalidade da hemolinfa e a composição dos principais íons do fluido extracelular (sódio e cloreto). Ainda, ressalta-se o importante papel desempenhado pela ancestralidade compartilhada, a qual mostrou ter influência na variabilidade interespecífica do íon K^+ hemolinfático junto a classe animal investigada. Finalmente, os padrões verificados experimentalmente juntos as espécies dulcícola *C. largillierti*, estuarina *E. mactroides* e marinha *A. mactroides* apontam uma maior utilização de osmólitos inorgânicos junto à regulação isosmótica intracelular dos tecidos avaliados (manto, músculo adutor e brânquias) após a exposição as condições experimentadas, os quais variam de acordo com o nicho osmótico ocupado por cada espécie.

PALAVRAS-CHAVE: Invertebrados, Osmoconformação, RII, Osmólitos, Evolução

ABSTRACT

The knowledge developed in the field of Physiology with questions focused on the challenges faced and strategies recruited by the organisms in their habitats assumes fundamental importance about the understanding about the ability to survive when subjected to unfavorable situations. In the aquatic environment, in particular, salinity is recognized as one of the main abiotic factors that have an effect on the physiology of organisms. Although the physiological patterns and challenges imposed by each occupied environment are distinct, they tend to converge to osmotic oscillations on them. From a comparative perspective – the objective was characterized the osmoregulatory patterns of bivalve molluscs *Corbicula largillierti* (purple Asian cockle), *Erodona mactroides* (lagoon cockle) and *Amarilladesma mactroides* (white clam) - inhabitants of different osmotic niches - when submitted to hypo- and/or hyperosmotic variations of salinity. In order to do so, the tolerance capacity of the freshwater, estuarine and marine bivalves were evaluated at species-specific salinity intervals, also determining the hemolymph osmotic and ionic concentration, tissue hydration, as well as the intracellular isosmotic regulation capacity from the use of osmolytes (organic and inorganic). In addition, the phylogenetic perspective was incorporated to infer and even broaden the understanding of the patterns that comprise the osmo-ionic physiology of representatives of the Bivalvia Class. The results indicate that the environmental salinity directs the variation of physiological traits, such as hemolymph osmolality and the composition of the main extracellular fluid ions (sodium and chloride), in the tested group. Also, the important role played by the shared ancestry is highlighted, which has been shown to influence the interspecific variability of the hemolytic K^+ ion in the investigated animal class. Finally, the patterns verified experimentally together the freshwater *C. largillierti*, estuarine *E. mactroides* and marine *A. mactroides* species show a greater use of inorganic osmolytes together with intracellular isosmotic regulation of the tissues evaluated (mantle, adductor muscle and gills) after exposure the conditions experienced, which vary according to the osmotic niche occupied by each species.

KEYWORDS: Invertebrate, Osmoconformation, IIR, Osmolytes, Evolution

SEÇÃO 1 • INTRODUÇÃO GERAL

1.1 – Variável Ambiental: Salinidade

Os seres vivos encontram-se sujeitos a receber diversas influências, sejam elas derivadas de interações com fatores bióticos ou em razão das alterações nos parâmetros abióticos (aspectos físicos e químicos) que caracterizam o ambiente ocupado. A exemplo disso, podemos apontar o ecossistema aquático, que dentre as inúmeras relações produzidas pelos organismos que nele habitam, apresenta também um dos fatores ambientais mais importantes ao qual os animais encontram-se sujeitos: a salinidade da água (Berger e Kharazova, 1997).

Relativamente constante em mar aberto, a salinidade varia consideravelmente em zonas intermareais, estuários e outros biótopos (Berger e Kharazova, 1997). Flutuações na concentração osmótica do ambiente ocorrem via estação do ano, maré ou clima (Kinne, 1966; Lynch e Wood, 1966), sendo tais regimes de variação regulares (Helmuth, 1999; Zhang et al., 2010) ou até mesmo repentinos. Ademais, a intensificação antropogênica (*e.g.* descargas urbanas e/ou industriais de água residual ou pluvial), bem como eventos associados às mudanças climáticas (*e.g.* elevação da temperatura e degelo, as quais desencadeiam – respectivamente – uma maior taxa de evaporação e aumento no nível do mar), colaboram aumentando a frequência e a extensão dessas alterações na concentração osmótica do meio aquático (Campos, 2014; Rivera-Ingraham e Lignot, 2017).

Para além desses aspectos – sob o ponto de vista biológico – a salinidade é compreendida como um dos parâmetros abióticos que afeta a distribuição de espécies (Begon et al., 2006). Em vista disso, estudos reportam alterações na osmolalidade da hemolinfa, na hidratação tecidual, bem como na sobrevivência de organismos como alguns dos efeitos causados pela variação osmótica ambiental (*e.g.* De Lisle e Roberts, 1988; Larsen et al., 2014; McFarland et al., 2013).

1.2 – Padrões Fisiológicos: Formas de Enfrentamento às Variações Ambientais

Face a exposição às condições osmóticas flutuantes no ambiente, padrões fisiológicos distintos podem ser observados nos organismos que habitam esses locais. De acordo com a estratégia utilizada para o equilíbrio ou manutenção dos fluidos internos

em relação à água e sais, os animais podem ser classificados - de modo geral - como osmoconformadores ou osmorreguladores (Fig. 1).

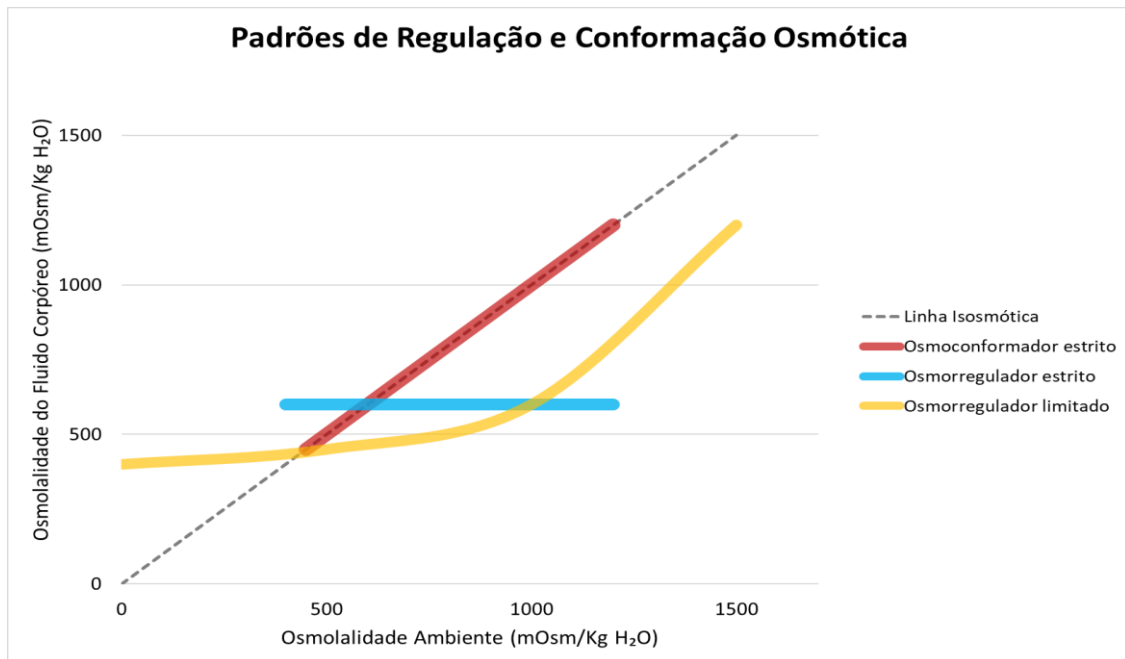


Figura 1 – Padrões básicos de resposta fisiológica. Osmoconformação estrita (linha vermelha) é caracterizada pela variação da osmolalidade da hemolinfa em relação a variação da concentração osmótica do meio ambiente; Em contrapartida, a osmorregulação pode ser estrita (linha azul), a qual mantém a concentração osmótica dos fluidos extracelulares mesmo diante da variação de salinidade ambiental; ou limitada (linha amarela), na qual a osmolalidade da hemolinfa é regulada em salinidades mais baixas, enquanto que acaba por ser conformar quando em altas pressões osmóticas do ambiente. Figura adaptada de Hill *et al.* (2012).

Conformadores osmóticos, são fisiologicamente descritos como isosmóticos em relação ao meio externo, no qual a osmolalidade do fluido extracelular assemelha-se muito ao meio circundante (Jorge et al., 2016; Larsen et al., 2014; Rivera-Ingraham e Lignot, 2017). Nesse sentido, mudanças na salinidade ambiental geram um gradiente osmótico entre o meio externo e o organismo (Kurihara, 2017). Por sua vez, o fluxo resultante dessa diferença provoca alterações no equilíbrio entre o meio extracelular e intracelular do indivíduo (Larsen et al., 2014; Neufeld e Wright, 1996), alcançando um novo equilíbrio. Em vista dessas variações, sérias perturbações passam a atuar sobre inúmeros parâmetros deste último compartimento.

Em contrapartida, a capacidade de osmorregulação possibilita a manutenção da osmo-estabilidade interna em relação à salinidade ambiental (Kinne, 1966). Nesse sentido, os reguladores osmóticos são descritos como anisosmóticos em relação ao meio externo, uma vez que uma série de mecanismos energeticamente caros – presentes através de estruturas e órgãos especializados – possibilitam a regulação dos fluidos extracelulares mesmo diante de situações flutuantes.

No entanto, em algumas espécies a capacidade de regulação é estrita, estando assim limitada a determinadas faixas de osmolalidade do ambiente, como é o caso de organismos que manifestam o padrão de hiperosmorregulação. Assim, em situações de baixa salinidade ambiental, espécies hiperosmorreguladoras respondem mantendo seus fluidos extracelulares mais concentrados que a água ambiente. No entanto, quando confrontadas com salinidades mais elevadas, permitem que sua concentração osmótica se equilibre com o meio externo (Hill et al., 2012; Piller et al., 1995). Diante dessas considerações, que mecanismos estão por detrás desses padrões e que auxiliam a melhor compreender os efeitos da salinidade sobre os organismos?

1.3 – Vivendo com a Variação Osmótica: Mecanismos de Ação

A salinidade é um importante fator ambiental que impõe grande pressão de seleção sobre a evolução da vida (Kultz, 2000). A partir disso, uma diversidade de mecanismos fisiológicos envolvidos no equilíbrio hídrico e de sais evoluiu nos metazoários (Deaton, 2009; Larsen et al., 2014), principalmente nos grupos que ocupam ambientes variáveis. A partir disso, os padrões fisiológicos verificados - sob o ponto de vista osmótico - encontram-se apoiados em estratégias de ajuste fino ao nível extra- e/ou intracelular, as quais buscam a homeostase no fluxo de íons e água através das membranas biológicas.

Conforme visto na seção anterior, a ausência de mecanismos voltados para a regulação osmótica extracelular em animais osmoconformadores inviabiliza a manutenção da osmolalidade nesse compartimento (Rivera-Ingraham e Lignot, 2017). Conseqüentemente, a resposta fisiológica de conformação da hemolinfa, encaminha para a alteração de parâmetros imprescindíveis, como o volume celular. Lane e Penky (2004) apontam que os eventos de inchaço e encolhimento das células frente aos desafios impostos pelo estresse hipo- e hiperosmótico, respectivamente, constituem-se como um perigo sempre presente para as células. Em vista de reestabelecer o volume celular, bem como prevenir de possíveis efeitos nocivos dessas mudanças (*e.g.* desnaturação de proteínas e apoptose), mecanismos de Regulação Isosmótica Intracelular (RII) são utilizados (Fig. 2).

Baseada em processos fundamentais, a RII inicia mecanismos de regulação de acordo com o efeito provocado pelo gradiente osmótico experimentado pelo organismo. Desse modo, com a exposição a um estresse osmótico que provoque o encolhimento celular, verifica-se a atuação de processos para o Aumento Regulatório do Volume (ARV

e do volume (exposição das células a menor variação no líquido extracelular), reduzindo assim a dependência de RII (Augusto et al., 2007a, 2007b).

1.4 – Protagonistas da Regulação: Efeitos Osmóticos

Na seção anterior, verificamos os princípios básicos envolvidos na manutenção dos fluidos corpóreos e na restauração do volume celular. Comum a ambos estes processos está a mobilização de solutos osmoticamente ativos nos diferentes compartimentos (extra- e intracelulares) (Fig. 2). Em vista disso, compreender alguns pormenores a respeito da função, ação e mobilização desses efeitos osmóticos, em diferentes espécies e condições ambientais se constitui como crucial para o entendimento da fisiologia osmorregulatória.

Primeiramente, os solutos osmoticamente ativos - os quais contribuem para o processo de regulação osmótica - podem ser divididos em duas classes principais: osmólitos inorgânicos e osmólitos orgânicos, ambos desempenhando papel vital na manutenção do balanço osmótico durante condições ambientais desfavoráveis (Chhabra et al., 2017). Nomeadamente, os solutos inorgânicos compreendem íons como sódio (Na^+), potássio (K^+), cloreto (Cl^-), magnésio (Mg^{2+}) e cálcio (Ca^{2+}), no entanto, o aumento desses eletrólitos acima dos níveis tipicamente encontrados podem vir a perturbar a força iônica dos sistemas fisiológicos, impactando a atividade de macromoléculas como enzimas e proteínas fundamentais (Chhabra et al., 2017; Hill et al., 2012; Yancey et al., 1982). Por esse efeito são conhecidos como solutos não compatíveis ao meio intracelular.

Em contrapartida, outra classe de osmólitos tende a servir de forma apropriada durante o estresse osmótico: os osmólitos orgânicos. Por sua vez, essas moléculas (*e.g.* aminoácidos, açúcares, metilaminas e polióis) - quando suficientemente concentradas – contribuem muito para a concentração osmótica, exercendo pouca ou nenhuma interação sobre outros processos fisiológicos. Diferentemente, essas moléculas não possuem efeitos perturbadores sobre a estrutura e função de proteínas celulares (Burg e Ferraris, 2008; Chhabra et al., 2017; Yancey, 2005) com as quais os líquidos estão em contato. Dessa maneira, o caráter de compatibilidade é conferido a essa classe de solutos que participam do processo regulatório.

A partir dessas especificidades, a ação e mobilização desses efeitos –no que diz respeito à regulação do volume celular - ocorrem de maneiras distintas de acordo com o cenário osmótico experimentando e, conseqüentemente, o mecanismo ativado (Item 1.3) (Fig. 3). No contexto da RVI, observa-se que o conteúdo de osmólitos inorgânicos

intracelulares é aumentado rapidamente (Wehner et al., 2003), sendo a ativação dos sistemas de transporte desses solutos a primeira linha de resposta celular. Já a mobilização de osmólitos orgânicos nesse mesmo processo pode ser observada quando a exposição das células à hiperosmotividade for prolongada (horas – dias), ou quando há uma grande variação osmótica (Wehner et al., 2003). Nesse sentido, os eletrólitos inorgânicos aumentados passam a ser substituídos por moléculas orgânicas, possibilitando a geração de fluxo osmótico para recuperação do volume celular (Koivusalo et al., 2009; Wehner et al., 2003). Em situação oposta, após o inchaço das células, os sistemas de transporte são imediatamente ativados pelo processo de *RVD*, o qual busca mediar a liberação dos principais osmólitos inorgânicos intracelulares, além de moléculas orgânicas (Koivusalo et al., 2009; Wehner et al., 2003) presentes no citoplasma, o que levará a um efluxo de água e, conseqüente normalização do volume celular.

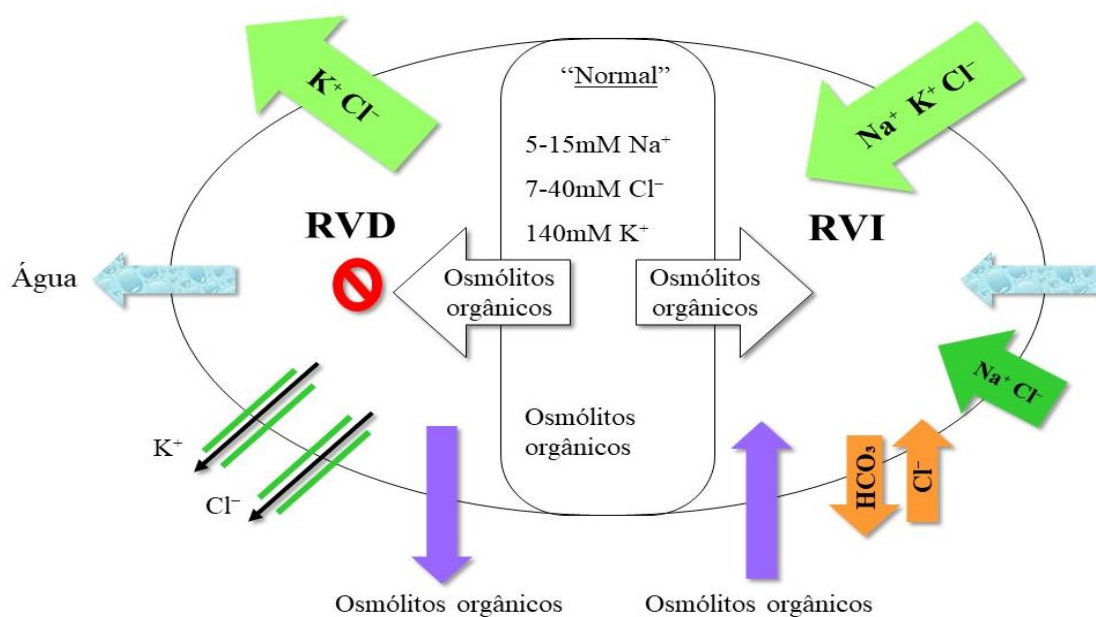


Figura 3 – Osmólitos envolvidos na regulação do volume celular (modelo generalizado). Aumentar ou diminuir a osmolalidade da célula ativa os mecanismos de *RVD* e *RVI*, respectivamente, os quais encaminham para a ativação de processos de transporte de membrana, bem como a síntese de solutos osmoticamente ativos. Em *RVD*, a célula inchada pode ser restaurada ao volume normal pelo efluxo de água, lançamento de íons (K^+ e Cl^-) via canais e co-transportadores, além da liberação e regulação da síntese de osmólitos. Por outro lado, em *RVI*, a célula encolhida pode ser restaurada pelo influxo de água seguido do acúmulo de íons (Na^+ e Cl^-), bem como a síntese e absorção de osmólitos orgânicos por meio de co-transportadores. Figura adaptada de Wijayasinghe et al. (2017).

Ademais, sobre os diferentes padrões fisiológicos discutidos para o enfrentamento ao estresse osmótico, uma preferência na mobilização de efetores também torna-se evidente. De maneira geral, a literatura indica que a partir do ambiente marinho, os osmoconformadores fazem uso de osmólitos orgânicos - em função da sua quantidade em organismos desse nicho

- para manter a concentração osmótica celular igual ao meio externo (Kinne, 1993; Yancey, 2005), porém essas conclusões estão distantes do contexto comparativo para que sejam consideradas regras.

1.5 – Modelo Experimental: Moluscos Bivalves

Diante do exposto, torna-se evidente que investigações acerca dos efeitos e estratégias utilizadas pelos organismos frente a exposição à condições osmóticas flutuantes ou desfavoráveis são fundamentais para o entendimento da fisiologia osmorregulatória. Tendo em vista os diferentes grupos animais que habitam nichos aquáticos variados, em especial, ressalta-se aqui o Filo Molusca, mais especificamente a Classe Bivalvia.

Compondo um dos maiores e mais diversos filos de animais invertebrados (Guo et al., 2015; Parker et al., 2013), os moluscos bivalves são encontrados em um amplo gradiente latitudinal, além de colonizarem uma variedade de nichos osmóticos (dulcícola, estuarino e marinho) (Gazeau et al., 2013; Larsen et al., 2014; Parker et al., 2013). Ademais, para além da importância econômica expressa por esse táxon, bivalves acabam por desempenhar serviços ecossistêmicos fundamentais, como a purificação da água por meio da filtração, o controle da concentração de Ca^{2+} e do pH aquático, a estruturação de habitats para organismos bentônicos, bem como importante fonte de alimento no contexto da cadeia trófica (Gazeau et al., 2013).

Mediante o cenário apresentado ao longo desta seção introdutória, a caracterização de traços da fisiologia osmorregulatória teve como modelos experimentais três espécies de bivalves. A seguir, são brevemente descritos aspectos acerca de cada uma delas:

a) *Corbicula largillierti* Philippi, 1844

Conhecida vulgarmente como berbigão asiático roxo devido a coloração interna de sua concha, a espécie ocupa o ambiente de água doce. Originalmente descrita do Rio Yangtse-Kiang da China, *C. largillierti* apresenta comportamento invasor, sendo introduzida na América do Sul provavelmente via água de lastro (Santos et al., 2012) (Fig. 4).



Figura 4 - Vista das valvas de *Corbicula largillierti* (≈ 33 mm de comprimento). (Fonte: Planeta dos Invertebrados - www.planetainvertebrados.com.br)

b) *Erodona mactroides* Bosc, 1802

Conhecida também como berbigão de laguna, caracteriza-se como uma espécie endêmica do Atlântico Sudocidental (Bemvenuti e Rosa-Filho, 2000) e das demais abundantes águas de rios, lagos, lagoas e estuários de algumas regiões da Argentina, Brasil e Uruguai (Camejo, 2015). Ademais, é encontrada ao longo da costa do Rio Grande do Sul, apresentando grande densidade na Lagoa dos Patos (Rosa-Filho e Bemvenuti, 1998) (Fig. 5).



Figura 5 - Vista das valvas esquerda (acima) e direita (abaixo) de *Erodona mactroides* (≈ 30 mm de comprimento). (Fonte: *World Register of Marine Species* - WoRMS www.marinespecies.org)

c) *Amarilladesma mactroides* Deshayes, 1854

Conhecido popularmente no litoral do Rio Grande do Sul como “marisco branco” e como “almeja amarilla” pelos uruguaios e argentinos, a espécie *A. mactroides* ocorre de maneira endêmica no litoral Atlântico do sul do Brasil, no Uruguai e na Argentina (Carvalho, 2015). Bancos de *A. mactroides* são facilmente encontrados durante a maré-baixa, pois é possível observar os orifícios no sedimento característicos de sua presença. Ademais, o centro de distribuição geográfica desta espécie está localizado entre a praia do Cassino (extremo sul do Brasil) e a Barra do Chuí (fronteira entre Brasil e Uruguai),

onde o crescimento e abundância do marisco são superiores, segundo Fiori e Defeo (2006) (Fig. 6).



Figura 6 - Exemplar de *Amarilladesma mactroides* (≈ 70 mm de comprimento). (Fonte: NaturaLista - www.naturalista.mx)

1.6 – Abordagem Comparativa

Diante dos aspectos expostos e considerando um contexto comparativo, correlacionar padrões e processos fisiológicos exclusivamente ao efeito ambiental, torna-se uma prática equivocada e determinista, uma vez que a fisiologia não está desenhada com um propósito ou objetivo (relação causa-efeito).

De fato, o pensamento biológico tradicional sugere que uma série graduada de mecanismos adaptativos progressivamente mais fortes podem ter impulsionado a ocupação de ambientes cada vez mais diluídos (McNamara e Faria, 2012). Contudo, alternativamente a ideia de que tais características possam ser selecionadas em um meio, estas podem estar presentes por simplesmente terem sido herdadas.

Frente a essa concepção, ao incluirmos a sistemática dos grupos investigados – por meio de ferramentas adequadas - incorporamos a noção de uma escala de tempo prolongada, permitindo o exame de transformações fisiológicas e seus processos evolutivos subjacentes. Nesse sentido, a abordagem filofisiológica pressupõe que as espécies são temporalmente ligadas, um fator que pode conferir estruturação filogenética (Garland et al., 2005; McNamara e Faria, 2012) e que deve ser considerada em estudos com viés comparativo. Ademais, ressalta-se que para além de estudos sob essa óptica serem quase inexistentes, permitem-nos inferir e ainda ampliar o entendimento acerca dos padrões que compreendem – por exemplo - a fisiologia da osmorregulação nos organismos.

SEÇÃO 2 • OBJETIVO

2.1 - Objetivo Geral

Identificar os principais efetores osmóticos recrutados pelas espécies de moluscos bivalves *Corbicula largillierti*, *Erodona mactroides* e *Amarilladesma mactroides* na Regulação Isosmótica do Intracelular (RII) quando submetidos a meios hipo- e/ou hiperosmóticos. Ainda, em condições naturalmente ocupadas, busca-se reconstruir a história evolutiva da osmorregulação por meio da detecção de padrões fisiológicos interespecíficos da Classe Bivalvia.

2.2 - Objetivos Específicos

- I. Avaliar a capacidade de tolerância a intervalos osmóticos pelos moluscos bivalves *Corbicula largillierti*, *Erodona mactroides* e *Amarilladesma mactroides* oriundos dos habitats dulcícola, estuarino e marinho, respectivamente;
- II. Caracterizar a capacidade osmorregulatória das espécies estudadas em função da salinidade ambiental;
- III. Estimar a variação do volume tecidual diante das salinidades testadas;
- IV. Determinar a concentração de osmólitos inorgânicos no fluido hemolinfático, bem como verificar o papel desses efetores, assim como de osmólitos orgânicos junto à capacidade de regulação isosmótica intracelular nos tecidos de espécies submetidas à diferentes condições experimentais;
- V. Conduzir uma análise filogenética para espécies da Classe Bivalvia;
- VI. Quantificar a autocorrelação filogenética de parâmetros fisiológicos relacionados à osmorregulação;
- VII. Verificar os efeitos da salinidade ambiental na evolução dos parâmetros citados anteriormente;

SEÇÃO 3 • METODOLOGIA DETALHADA

3.1 - Componente Experimental

3.1.1 - Coleta e Aclimação dos Animais

Espécimes adultos do bivalve dulcícola *Corbicula largillierti* (Philippi, 1844) (Fig. 7A) foram coletados manualmente em tanques presentes no Laboratório de Piscicultura da Barragem do Arroio Chasqueiro – LabChasq da Universidade Federal de Pelotas – localizado no Km 600 da Rodovia BR-116, RS, Brasil (32°16'21.07" S, 53°99'32.36" O). Em virtude do ciclo de desenvolvimento desse organismo, as larvas liberadas no plâncton podem vir a se aderir em estruturas como escamas, nadadeiras e brânquias de peixes hospedeiros, completando o desenvolvimento até a fase juvenil (Mansur et al., 2012). Posteriormente esses organismos passam a viver no sedimento, sendo dessa forma encontrados nesses reservatórios.

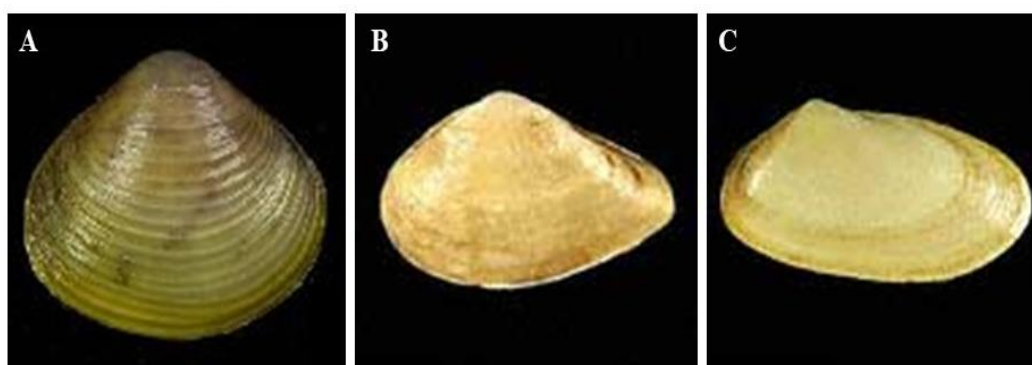


Figura 7 – Exemplares de moluscos bivalves dulcícola (A) *Corbicula largillierti* (33 mm de comprimento), estuarino (B) *Erodona mactroides* (30 mm de comprimento) e marinho (C) *Amarilladesma mactroides* (70 mm de comprimento). (Fonte: Worldwide Mollusc Species Data Base – WMSDB www.bagniliggia.it/WMSD/WMSDhome.htm)

Referente aos bivalves ocupantes dos nichos estuarino e marinho, espécimes adultos de *Erodona mactroides* (Bosc, 1802) (Fig. 7B) e *Amarilladesma mactroides* (Deshayes, 1854) (Fig. 7C) foram coletados no estuário da Lagoa dos Patos, próximo à Ilha das Pombas em Rio Grande, RS, Brasil (32°02'28.89" S, 52°12'97.98" O) e na região entre marés da Praia do Mar Grosso em São José do Norte, RS, Brasil (32°05'48.94" S, 51°99'32.36" O), respectivamente. Com o auxílio de uma draga (Fig. 8A) foi realizado o arrasto do sedimento visando a captura dos animais no estuário, enquanto que o recolhimento dos espécimes marinhos ocorreu com o auxílio de bombas de sucção (*corer*) (Fig. 8B) e pás.

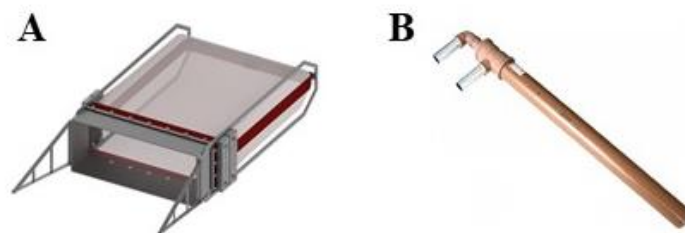


Figura 8 - Instrumentos empregados na captura dos espécimes. (A) Draga de arrasto utilizada no ambiente estuarino e (B) bomba de sucção (*corer*) aplicada na coleta dos espécimes marinhos. (Fonte: Aratu e Pesca Tropical)

Posteriormente, os animais foram encaminhados para o Biotério Aquático do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Rio Grande (Rio Grande, RS, Brasil) para aclimação em tanques plásticos com capacidade de 20 litros e aeração constante, por 7 dias, antes de serem iniciados os experimentos. Os parâmetros físico-químicos de manutenção em laboratório das diferentes espécies estudadas encontram-se listados na tabela abaixo (Tabela 1). Ademais, todas as soluções salinas utilizadas nesse estudo foram obtidas a partir da adição de sal marinho (Marineland®) ou diluição com água doce da água do mar ($\approx 30\text{ ‰}$), verificando a salinidade final com o auxílio de um refratômetro óptico manual (modelo K52-100, KASVI).

Tabela 1 – Parâmetros físico-químicos de aclimação em laboratório de espécies oriundas de diferentes nichos osmóticos.

Temperatura	21 °C	
Fotoperíodo	12-h claro : 12-h escuro	
Alimentação	Ração para peixes triturada (3 vezes por semana) - Espécie Dulcícola Microalga <i>Nannochloropsis sp.</i> (3 vezes por semana) – Espécies Estuarina e Marinha	
Salinidade de Aclimação	Nicho Osmótico	Referência
0 ‰	Dulcícola	-
11 ‰	Estuarino	Monitoramento Diário - Porto de Rio Grande (Fonte: www.portosrs.com.br)
28 ‰	Marinho	Odebrecht <i>et al.</i> , 2010

O cultivo da microalga (*Nannochloropsis sp.*) utilizada para alimentação dos organismos estuarino e marinho foi realizado a partir da doação de uma alíquota advinda do Laboratório de Fitoplâncton e Microrganismos Marinhos do Instituto de Oceanografia da Universidade Federal do Rio Grande (IO – FURG). A cultura foi mantida em incubadoras com condições de temperatura (20 °C), aeração e fotoperíodo (12-h claro: 12-h escuro) controladas. O repique do cultivo foi procedido em capela estéril, sendo

preparado na proporção aproximada de 1:9 (100 mL do inóculo de alga para 900 mL de meio). O meio de cultivo (f/2) (Guillard, 1975) é constituído de 1 mL de NaNO₃ 882,4 mM, 1 mL de NaH₂PO₄ 36,23 mM, 1 mL de Na₂SiO₃ 106 mM, 1 mL de metais traço, 1 mL de solução tampão Tris-HCl 1M, 0,5 mL de solução de vitaminas (biotina, vitamina B₁₂ e tiamina), além de 894,5 mL de água do mar autoclavada (30 ‰). Por fim, o frasco contendo o repique foi imediatamente acondicionado na incubadora.

3.1.2 - Ensaio de Sobrevivência

A tolerância osmótica de cada espécie foi testada, submetendo-as à diferentes salinidades. Nesse sentido, indivíduos da espécie dulcícola (*C. largillierii*), estuarina (*E. mactroides*) e marinha (*A. mactroides*) foram expostos às salinidades de 0 até 56 ‰, com intervalos espécie-específicos (Tabela 2), sendo as soluções salinas obtidas e verificadas de acordo com o procedimento supracitado.

Tabela 2 – Gradientes osmóticos de exposição das espécies no ensaio de sobrevivência.

Espécie e Nicho Osmótico	<i>Corbicula largillierii</i> (dulcícola)									
Salinidades (‰)	0		5		10					15
Espécie e Nicho Osmótico	<i>Erodona mactroides</i> (estuarina)									
Salinidades (‰)	0	2	10	20	25	30	35	40		50
Espécie e Nicho Osmótico	<i>Amarilladesma mactroides</i> (marinha)									
Salinidades (‰)	0	7	14	21	28	35	42	49		56

*As salinidades em negrito referem-se às salinidades de aclimação de cada espécie testada.

Na sequência, os grupos foram acondicionados em diferentes recipientes plásticos de 500 mL contendo solução salina e aeração constante. Durante a exposição salina, os animais não foram alimentados e a troca da água foi realizada após verificação de alteração da salinidade e/ou quando alguma morte era detectada. Igualmente, registrou-se o número de indivíduos mortos em cada condição ao decorrer do período de exposição (96-h), sendo considerados assim os animais que mantiveram as valvas abertas ou que não apresentavam resposta ao toque.

Os resultados obtidos a partir deste ensaio encontram-se na seção de Apêndice (Apêndice A).

3.1.3 - Choques Osmóticos

Em consonância com a capacidade de tolerância à salinidade expressos por cada uma das três espécies desse estudo, foram então cuidadosamente determinadas as condições experimentais de acordo com os intervalos suportados por cada espécie (Tabela 3). Nesse sentido, foram estabelecidos choques osmóticos 25% acima e/ou abaixo da salinidade de aclimação.

Tabela 3 - Condições experimentais selecionadas para os diferentes nichos osmóticos

Espécie	Tratamentos		
	Hiposmótico (- 25%)	Controle	Hiperosmótico (+ 25%)
<i>Corbicula largillierti</i> (D)*	Não há	0 ‰	5 ‰ 10 ‰ 15 ‰
<i>Erodona mactroides</i> (E)	8 ‰	11 ‰	14 ‰
<i>Amarilladesma mactroides</i> (M)	21 ‰	28 ‰	35 ‰

*As letras entre parênteses ao lado de cada espécie representam o nicho osmótico ocupado por cada uma delas: D – dulcícola; E – estuarino; M – marinho.

Desse modo, os organismos dulcícola, estuarino e marinho foram dispostos em recipientes plásticos de 500 mL contendo os tratamentos supracitados, além de aeração constante. Os animais estiveram submetidos a essas condições durante um período de 96 horas (exposição aguda), não sendo alimentados durante esse intervalo.

Após os experimentos, foi realizada a amostragem de material biológico dos espécimes. Primeiramente, foi efetuada a coleta da hemolinfa a partir da punção do músculo adutor com o auxílio de uma seringa. Na sequência, os animais foram colocados no gelo – crioanestesia – por aproximadamente 15 min, sendo abertos em seguida com o auxílio de uma lâmina de bisturi no local de inserção do músculo adutor. Foram retirados pares de brânquias, o manto e o músculo adutor de todas as espécies. Finalmente, as amostras foram pesadas (balança com precisão de 1 mg, modelo AG2204, Gehaka; modelo XP6, Mettler Toledo) e imediatamente armazenadas a -20 °C.

3.1.4 – Osmolalidade de Soluções e Hemolinfa

A capacidade osmorregulatória das espécies estudadas em função da salinidade ambiente foi caracterizada a partir da realização de medições da osmolalidade (mOsm/kg H₂O). A osmolalidade da hemolinfa foi mensurada utilizando osmômetro de pressão de

vapor (modelo Vapro 5600, Wescor). Ademais, foram também procedidas medidas de osmolalidade nas salinidades de tratamento.

3.1.5 - Hidratação Tecidual

A variação do volume tecidual diante das salinidades testadas foi verificada por meio de análises do teor hídrico dos tecidos do manto, músculo adutor e brânquias das três espécies estudadas. Dessa maneira, avaliaram-se mudanças na massa úmida - verificado imediatamente após a coleta - e na massa seca pós secagem do material biológico em estufa previamente aquecida a 60 °C por 72 horas. A partir dos dados obtidos, a hidratação tecidual (HT) em porcentagem (%) foi calculada utilizando a seguinte fórmula: $HT = \left[\frac{(massa\ úmida - massa\ seca)}{massa\ úmida} \right] \times 100$

3.1.6 – Dosagem de Osmólitos Inorgânicos

A concentração de osmólitos inorgânicos (Na⁺, K⁺ e Cl⁻) na água e na hemolinfa, bem como o conteúdo iônico nos diferentes tecidos foi detectada. Para a determinação do conteúdo iônico nos tecidos do manto, músculo adutor e brânquias, foi procedida a secagem das amostras a 60 °C por 72 horas e consecutiva pesagem. Em seguida, as amostras de tecidos das espécies dulcícola, estuarina e marinha foram acrescidas de ácido nítrico (HNO₃) 0,75 N. Decorrido o período de 9 dias, as amostras foram centrifugadas a 5000g durante 5 min (modelo 3K30, Sigma), armazenando o sobrenadante para as análises, conforme adaptado de Amado *et al.* (2006).

As dosagens de Na⁺ e K⁺ foram processadas por meio de fotometria de chama (modelo NK 2004, Digimed), sendo as amostras de água, hemolinfa e tecidos diluídas em água ultrapura de acordo com as proporções dispostas na seção de Apêndice (Apêndice B). O cálculo da concentração dos íons nas amostras analisadas foi procedido utilizando a equação da reta obtida pela leitura da curva-padrão estabelecida para cada íon (Na⁺: constituída por 6 pontos de 1,5 – 100 mg/L; K⁺: constituída por 5 pontos de 0,5 - 5 mg/L). Por fim, o conteúdo iônico foi expresso em mM (salinas e hemolinfa) e mM/mg massa seca (tecidos).

Medidas da concentração do íon cloreto (Cl⁻) nas salinas de tratamento, hemolinfa e tecidos foram efetuadas utilizando *kit* comercial (Cloretos Colorimétricos, Doles Reagentes) por meio da leitura em absorvância de 490 nm em leitora de microplaca (modelo EL 808, BioTek). O cálculo da concentração de Cl⁻ nas condições experimentais

e hemolinfa foram procedidas por meio da equação da reta obtida pela leitura de uma curva-padrão estabelecida para o íon (Cl^- : constituída por 3 pontos de 100 - 550 mM) ou tendo como referência o padrão de 100 mM para obtenção da concentração nos tecidos. A notação científica utilizada para expressar a concentração de Cl^- nas amostras deu-se conforme as unidades já supracitados.

3.1.7 - Dosagem de Osmólitos Orgânicos

Para definir a concentração de osmólitos orgânicos nos tecidos submetidos às diferentes condições experimentais, realizou-se a análise exclusivamente de aminoácidos a partir do método para determinação de aminoácidos livres em amostras biológicas descrito por Fisher *et al.* (2001).

Fragmentos de tecidos do manto, brânquia e músculo adutor das três espécies de moluscos bivalves investigadas pesando entre $\approx 2 - 3$ mg foram utilizados para o preparo dos extratos para análise. As amostras biológicas foram homogeneizadas mecanicamente com ácido perclórico (HClO_4 - PCA), com a finalidade de extrair e precipitar proteínas, sendo o sobrenadante neutralizado, posteriormente, pela adição de hidróxido de potássio (KOH).

As amostras que apresentavam peso superior a 2 mg foram homogeneizadas com PCA 0.1 M na proporção de 1:20, centrifugadas a 15.000g por 10 min e neutralizadas com KOH 2 M utilizando um volume de 1/19 de sobrenadante. Para as amostras que continham peso inferior a 2 mg a homogeneização foi procedida com PCA 0.04 M na proporção de 1:50, centrifugadas de igual modo e neutralizadas com KOH 0.8 M nas mesmas proporções supracitadas. Após a adição de KOH, foi realizado o resfriamento das amostras em gelo por aproximadamente 10 min, seguido de uma nova centrifugação a 15.000g por 10 min.

Baseado em um método fluorimétrico, o procedimento de determinação dos osmólitos orgânicos foi realizado por meio da reação dos aminoácidos com o-ftalaldeído (OPA), na presença do agente redutor 2-mercaptoetanol (2-ME ou MET). O reagente OPA-MET foi preparado dissolvendo 100 mg de OPA em 10 mL de metanol, adicionando posteriormente 200 μL de MET. Finalmente, a solução foi misturada com 400 mL de tampão borato 0.02 M a pH 9.5.

As misturas-padrão foram obtidas utilizando os aminoácidos taurina, alanina e glicina. Conforme apontado por Fyhn (1976), Livingstone *et al.* (1979), Henry *et al.* (1980), Otto e Pierce (1981), Deaton *et al.* (1989), Jordan e Deaton (1999), Burg e Ferraris

(2008) Hosoi *et al.* (2008) e Babarro *et al.* (2011), esses três osmólitos orgânicos são considerados mais representativos na manutenção do equilíbrio osmótico de bivalves, apresentando grandes quantidades no *pool* de aminoácidos livres. Nesse sentido, a partir de um levantamento na literatura, foram estabelecidas proporções dos aminoácidos supracitados para compor as misturas-padrão, levando em consideração o nicho osmótico ocupado pelos organismos. A planilha contendo as informações utilizadas para a preparação das misturas encontra-se na seção de Apêndice (Apêndice C).

De acordo com o habitat, as proporções de taurina, alanina e glicina utilizadas de acordo com o habitat (dulcícola, estuarino e marinho) encontram-se abaixo (Fig. 9). Na sequência, foram elaboradas misturas-padrão na concentração de 40 μM , sendo posteriormente diluídas 10, 100, 1000 e 10000 vezes (4 μM , 0,4 μM , 0,04 μM , 0,004 μM), a fim de integrarem a curva-padrão utilizada no ensaio.

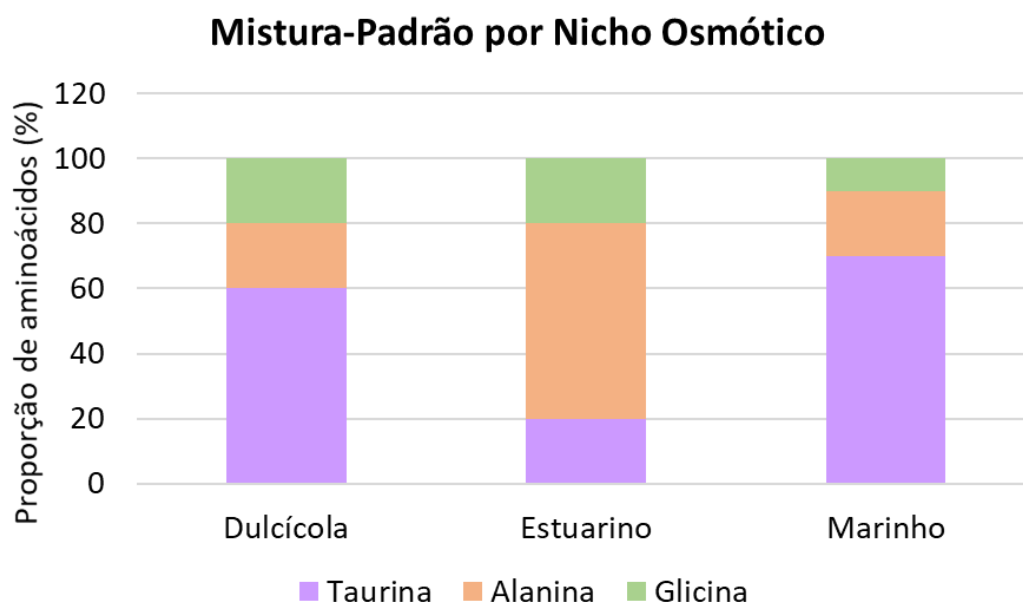


Figura 9 - Proporção de aminoácidos (taurina, alanina e glicina) utilizados nas misturas-padrão por nicho osmótico (dulcícola, estuarino e marinho).

Por fim, o complexo (Fig. 10) originado foi medido em espectrofotômetro de fluorescência (modelo FilterMax F5, Molecular Devices) com comprimentos de onda de 340 nm (excitação) e 465 nm (emissão) em microplaca preta contendo 10 μL de amostra ou padrão e 200 μL de reagente OPA-MET.

O cálculo da concentração de aminoácidos foi procedido por meio da equação da reta alcançada pela leitura de uma curva-padrão estabelecida para cada nicho osmótico. A concentração de aminoácidos foi obtida em $\mu\text{M}/\text{mg}$ massa fresca, sendo feita a

conversão para $\mu\text{M}/\text{mg}$ massa seca utilizando a seguinte fórmula, adaptada de Faria *et al.*

$$(2011): \text{Massa Seca} = \frac{\text{Massa Fresca}}{(100 - \text{Hidratação Tecidual})}$$

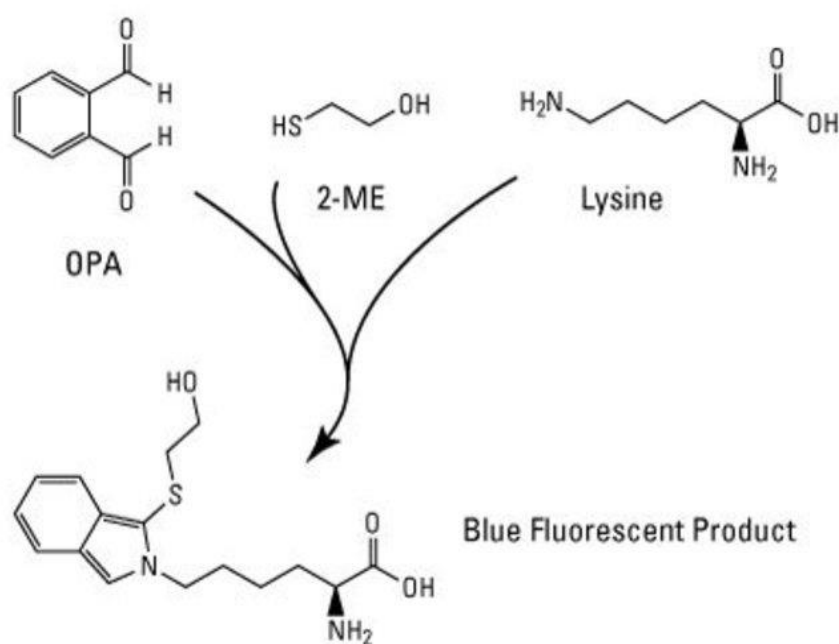


Figura 10 - Complexo formado a partir da reação de OPA na presença de 2-ME com o aminoácido disponível, *e.g.*, lisina. Como produto, há a formação de um fluorescente azul intenso. (Fonte: Thermo Fisher)

3.2- Análises Estatísticas

3.2.1 – Análises Intraespecíficas

O método *Spearman-Karber* foi utilizado para estimar a concentração salina letal que leva a morte de 50% da população de teste (SL_{50}). Outros dados foram submetidos à análise de variância não-paramétrica de Kruskal-Wallis, seguida de *post hoc* Dunns. Além disso, foi aplicado o teste U de Mann-Whitney para amostras independentes (concentrações fisiológicas vs. osmóticas e iônicas das soluções de exposição). Os dados foram expressos como a média \pm erro padrão da média. O nível de significância assumido foi de $\alpha \leq 0,05$.

3.2.2 – Análises Interespecíficas

- Métodos Comparativos Filogenéticos

Classicamente, os estudos comparativos encontram-se suportados por métodos estatísticos convencionais, os quais tendem a desconsiderar as relações de maior ou menor proximidade entre as espécies, superestimando assim a independência entre os dados. O

reflexo disso é, principalmente, a ocorrência do erro estatístico tipo 1 (falso positivo) por negligenciar os padrões de relação entre os táxons (Garland et al., 2005).

No que tange o objetivo de estudo da Biologia Comparada, analisar características de espécies distintas, procurando claramente semelhanças e diferenças entre os grupos (Amorim, 2002), deve estar fundamentada – a fim de compreender a origem dos diferentes padrões – na Evolução. Nesse sentido, os Métodos Comparativos Filogenéticos constituem-se como principais ferramentas de fisiologia evolutiva – as quais incorporam a filogenia – visando o exame de padrões e a inferência de processos de mudança evolutiva, as quais permitem-nos especular sobre condições ancestrais, bem como taxa e padrões de evolução no tempo histórico (Garland et al., 2005).

a) *Coleta dos Dados Fisiológicos*

Os dados fisiológicos relacionados à Regulação Isosmótica Intracelular dos organismos da Classe Bivalvia foram obtidos através da metodologia descrita por Leenaars *et al.* (2012). O processo de busca dos trabalhos foi desempenhado em três bases de dados (*PubMed*, *Scopus* e *Web of Science*), empregando termos de busca livres e descritores MeSH³ (*PubMed*). Considerando a sintaxe de cada base, foram elaboradas estratégias de pesquisa para 1) a intervenção/exposição; 2) o mecanismo de interesse; 3) a população estudada e 4) os parâmetros avaliados a serem considerados a partir da questão de investigação “*Quais os principais efetores osmóticos recrutados pelos organismos da Classe Bivalvia na regulação isosmótica do fluido intracelular quando submetidos a flutuações de salinidade?*”. A busca final foi dada pela intersecção dos quatro componentes pesquisados (1∩2∩3∩4). As estratégias de busca para as bases *PubMed*, *Scopus* e *Web of Science* encontram-se na seção de Apêndice (Apêndice D). Ao final, as três bibliotecas geradas foram combinadas para remoção das possíveis duplicatas utilizando o *software* livre Zotero 5.0.55.

Seguindo a metodologia de revisão sistemática (Leenaars et al., 2012), a seleção dos trabalhos foi realizada por etapas – tendo em vista classes de critérios estabelecidos para exclusão (Tabela 4). Desse modo, a triagem dos trabalhos iniciou-se a partir da leitura dos títulos. Na sequência, os textos que correspondiam à questão de pesquisa objetivada anteriormente foram encaminhados para leitura do resumo. Finalmente, a exclusão ou o aceite das produções foi feito a partir da leitura dos mesmos na íntegra (Fig. 11).

³ MeSH (*Medical Subject Headings*) – dicionário de sinônimos de vocabulário controlado pela *National Library of Medicine* (NLM) utilizado na indexação de artigos na base de dados *PubMed*.

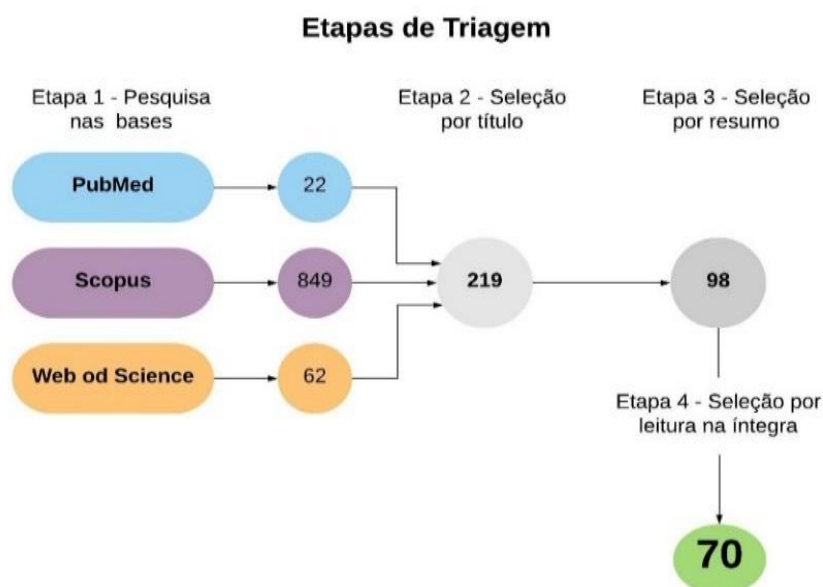


Figura 11- Fluxograma das etapas de triagem dos trabalhos obtidos aplicando a metodologia de revisão sistemática descrita por Leenaars *et al.*, 2012.

Tabela 4 - Classes de critérios criados para a seleção de trabalhos e sua contabilização em cada etapa da triagem.

Classes de Critérios de Exclusão	Nº de Exclusões nos Títulos			Nº de Exclusões nos Resumos	Nº de Exclusões na Íntegra
	WoS*	PM	S	-	-
1. Avaliação de outro táxon	12	0	485	5	1
2. Método	1	0	6	12	3
3. Alteração ambiental	1	1	13	1	0
4. Avaliação de outro processo fisiológico	0	0	26	35	1
5. Biomarcação	6	1	45	6	0
6. Relativo a outra especialidade	1	0	31	3	4
7. Avaliação de outro processo biológico	2	4	23	58	2
8. Trabalhos sem acesso disponível	0	0	4	1	4
9. Revisão não aborda os parâmetros objetivados	0	0	0	0	13

* WoS – Web of Science; PM – PubMed; S – Scopus.

e.g.: 1) Outro Reino, Filo ou Classe diferente de Bivalvia; 2) Cultura celular, cultura primária, exposição *in vitro* ou *ex vivo*; 3) Acidificação oceânica, alteração química do meio, mudanças climáticas, anoxia; 4) Resposta imune, crescimento, reprodução, respiração, atividade cardíaca; 5) Indicadores de contaminação/poluição; 6) Demais áreas da Biologia, tais como Ecologia e Paleontologia; 7) Bioquímica, Genética, Biologia Molecular.

Na sequência, foram coligidos os dados fisiológicos de cada estudo avaliado na íntegra - tendo em vista parâmetros relacionados à Regulação Isosmótica Intracelular (osmolalidade e concentração de íons da hemolinfa, conteúdo iônico, *pool* de aminoácidos livres e individuais nos tecidos), em uma abordagem meta-analítica. Os dados obtidos asseguraram a relação de homologia entre os experimentos e entre semaforontes (etapa do organismo na história ontogenética). As informações obtidas foram organizadas em planilhas contendo a espécie investigada, o habitat ocupado, o material biológico analisado, bem como a salinidade de exposição, o parâmetro avaliado, a autoria e o ano da publicação. As planilhas contendo todas as informações coletadas encontram-se na seção de Apêndice (Apêndice E). Por fim, os dados fisiológicos de 18 publicações foram compilados para compor a meta-análise (Tabela 5).

b) A Hipótese Filogenética

As hipóteses filogenéticas foram assumidas a partir da ferramenta computacional *Time Tree* (www.timetree.org) – uma base de conhecimento público pesquisável que reúne informações acerca da escala de tempo evolutiva da vida, baseada em 3.164 estudos e que reúne 97.085 espécies (Kumar et al., 2017). O recurso utiliza-se de dados de sequências moleculares para a construção das filogenias, estando disponíveis diferentes modos de busca *online* (*node time* – encontra o tempo de divergência de duas espécies ou o táxon mais alto; *timeline* – retorna no tempo e encontra ramificações evolutivas a partir da perspectiva de uma única espécie; e *timetree* – cria a filogenia de um grupo de espécies ou a partir de uma lista personalizada).

No presente trabalho, as listagens das espécies obtidas - a partir da metodologia apresentada no item 3.2.2a – para cada parâmetro (osmolalidade da hemolinfa, concentração individual de íons, *pool* de aminoácidos e aminoácidos individuais nos materiais biológicos avaliados) foram transformadas em matrizes para realização das buscas na ferramenta *Time Tree*. Problemas de sinonímia foram resolvidos previamente com consultas à base de dados *Worldwide Mollusc Species Data Base* (WMSDB). As filogenias geradas a partir da aplicação do referido procedimento encontram-se na seção de Apêndice (Apêndice F).

c) Sinal Filogenético

Com o objetivo de quantificar a tendência de maior semelhança entre espécies proximamente relacionadas, o sinal filogenético revela quão um parâmetro encontra-se

estruturado na filogenia. Desse modo, aplicou-se uma análise de autocorrelação pelo índice I de Moran, o qual varia de -1 até +1. Valores positivos significativos demonstram alta similaridade entre espécies relacionadas; valores negativos significativos sugerem que as espécies são fisiologicamente dissimilares (Rezende and Diniz-Filho 2012).

O sinal filogenético foi estimado para cada um dos parâmetros – salinidade ambiental, osmolalidade da hemolinfa e concentração individual de íons (Na^+ , K^+ , Cl^- , Mg^{2+} e Ca^{2+}). Apenas dois, dos cinco parâmetros supracitados no item *a* – o qual descreve a estratégia de coleta dos dados fisiológicos – foram utilizados nesta e nas demais avaliações interespecíficas deste trabalho, uma vez que o número de táxons disponíveis na filogenia não foi o suficiente para a análise comparativa ou porque as informações de determinado traço fisiológico não possuíam variedade de nichos osmóticos representados na árvore filogenética.

d) *Reconstrução Ancestral*

Cada parâmetro supracitado no item *c* teve os estados ancestrais estimados por máxima verossimilhança. Essa análise tem como intuito buscar a árvore mais verossímil supondo um modelo de probabilístico de evolução (Movimento Browniano) (Felsenstein, 1985). Ademais, o presente critério de otimização para caracteres contínuos, objetiva estimar os valores dos nós ancestrais de uma filogenia, assim como a série de transformações mais provável para cada um dos traços avaliados.

e) *Regressão Filogenética*

O papel desempenhado pela salinidade na evolução de determinados traços osmorregulatórios foi testado a partir de regressões lineares filogenéticas (*Phylogenetic Generalized Least Squares* - PGLS). O modelo PGLS prevê que a variação residual entre espécies esteja correlacionada, conforme esperado devido à herança compartilhada (Grafen, 1989; Garland e Ives, 2000; Lavin et al., 2008). O parâmetro α do modelo evolucionário Ornstein-Uhlenbeck (O-U) (Butler e King, 2004; Revell, 2010), um indicador da força de seleção que força um valor de traço ao seu ótimo, foi calculado simultaneamente para se adequar ao melhor modelo evolucionário. $\alpha = 0$ significa que a covariância entre espécies é a consequência de mudanças evolutivas aleatórias, conforme modelado pelo modelo de movimento Browniano (Butler e King, 2004; Hansen et al., 2008). As associações evolutivas estavam atualmente aplicando um método de máxima verossimilhança (Felsenstein, 1985), que descreve os estados ancestrais de cada nodo, ilustrando também os valores das espécies existentes.

As análises foram realizadas utilizando os pacotes R (R Core Team 2015) nlme (Pinheiro et al., 2016), picante (Kembel et al., 2010), geiger (Harmon et al., 2008) e phytools (Revell, 2012), estabelecendo o nível de significância de de 0,05.

Tabela 5 - Parâmetros osmorregulatórios compilados da literatura e utilizados nas análises comparativas.

Espécie ⁴	Nicho	Osmolalidade da hemolinfa (mOsm/kg H ₂ O)	[Na ⁺] mM	[K ⁺] mM	[Cl ⁻] mM	[Mg ²⁺] mM	[Ca ²⁺] mM	Referência
<i>Aequipecten opercularis</i>	SW	970	470	-	-	53	10.2	Shumway, 1977
<i>Callista chione</i>	SW	1109	470	-	-	-	-	Zatta and Cervellin, 1987
<i>Corbicula fluminea</i>	FW	63.2	31.47	0.952	25.99	-	-	Ruiz and Souza, 2008
<i>Crassostrea gigas</i>	SW	980	473.05	12	-	54.4	10.2	Knowles et al., 2014; Shumway, 1977
<i>Crassostrea virginica</i>	SW	940	-	-	-	-	-	McFarland et al., 2013
<i>Dreissena polymorpha</i>	FW	42.66	17.33	0.5	17.13	0.9	4.06	Byrne and Dietz, 2006; Dietz et al., 1996; Dietz et al., 1997
<i>Modiolus modiolus</i>	SW	980	471	-	-	54.1	10.2	Shumway, 1977
<i>Mya arenaria</i>	SW	1015	593	12	520	50	10.6	Deaton, 1992; Shumway, 1977
<i>Mytilopsis leucophaeata</i>	BW	50	24	1.9	20	3	2.1	Deaton et al., 1989
<i>Mytilus edulis</i>	SW	1003	477	20	520.33	58	10.4	Costa and Pritchard, 1978; Hoyaux et al., 1976; Lange, 1963; Livingstone et al., 1979; Shumway, 1977
<i>Perna perna</i>	SW	990	400	56	420	-	-	Rola et al., 2017
<i>Perna viridis</i>	SW	950	-	-	-	-	-	McFarland et al., 2013
<i>Pinctada margaritifera</i>	FW	31.8	14.7	0.37	-	0.41	1.86	Shakhmatova et al., 2006
<i>Sinanodonta woodiana</i>	FW	45	15.8	0.45	13.7	-	-	Matsushima and Kado, 1982

⁴ Nome científico: algumas espécies sofreram atualização da nomenclatura. Nesse sentido, os nomes destacados em negrito foram corrigidos de acordo com a nomenclatura vigente.

SEÇÃO 4 • MANUSCRITO

INDICAÇÃO DO PERIÓDICO DE SUBMISSÃO:

Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology

Qualis B2

Osmoionic Homeostasis in Bivalves Molluscs Inhabitants of Different Osmotic Niches

Isadora Porto Martins Medeiros^a, Samuel Coelho Faria^c, Marta Marques Souza^{a,b,*}

^aPrograma de Pós Graduação em Ciências Fisiológicas, Universidade Federal do Rio Grande - FURG

^bInstituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande – FURG

^cInstituto de Biologia, Universidade de São Paulo - USP

*Author to whom correspondence should be addressed.

E-mail address:

soriedemarodasi@gmail.com (Isadora Porto Martins Medeiros)

scoelhofaria@gmail.com (Samuel Coelho Faria)

martasouza@furg.br (Marta Marques Souza)

HIGHLIGHTS:

- Hemolymph analyzes support the osmoconformer pattern of the three bivalve species;
- Tissues of the freshwater *Corbicula largilierti* use Na⁺, K⁺ and Cl⁻ as osmolytes;
- Tissues of the estuarine *Erodona mactroides* use only Na⁺ and K⁺ as osmotic effectors;
- Tissues of the marine *Amarilladesma mactroides* recruited Na⁺ into the IIR;
- Observation of physiological aspects - due to its comparative character - not previously reported for these species.

ABSTRACT: The knowledge developed in the field of Physiology with questions focused on the challenges faced and strategies recruited by the organisms in their habitats assumes fundamental importance about the understanding of the ability to survive when subjected to unfavorable situations. In the aquatic environment, in particular, salinity is recognized as one of the main abiotic factors that has an effect on the physiology of organisms. Although the physiological patterns and challenges imposed by each occupied environment are distinct, they tend to converge to osmotic oscillations on them. From a comparative perspective - we aimed to characterize the osmoregulatory patterns of bivalve molluscs *Corbicula largillierti*, *Erodona mactroides* and *Amarilladesma mactroides* - inhabitants of different osmotic niches - when submitted to hypo- and/or hyperosmotic variations of salinity. To do this determining the hemolymph osmotic and ionic concentration of freshwater, estuarine and marine bivalves, as well as the intracellular isosmotic regulation from the use of osmolytes (organic and inorganic). According to the variables analyzed in the hemolymph, the three species presented the pattern of osmoconformation. Furthermore, both ionic regulation and conformation patterns were observed in freshwater, estuarine and marine species. The patterns verified experimentally in the freshwater *C. largillierti*, estuarine *E. mactroides* and marine *A. mactroides* species show greater use of inorganic osmolytes, which vary according to the osmotic niche occupied by each species, compared to participation of organic molecules in the intracellular isosmotic regulation of the tissues evaluated (mantle, adductor muscle and gills). Finally, this finds contribute to the ampliation of classic vision about the preferential use of certain osmolytes by animals from distinct niches.

KEYWORDS: Invertebrate, Osmoconformation, IIR, Osmolytes, Saline stress

INTRODUCTION:

Bivalve molluscs are subject to several abiotic variables, which may exert significant effects on the biology of these organisms. Among them, salinity has been recognized as an important environmental factor since its fluctuations tend to occur according to the season, the tide and the climate (Kinne, 1966; Lynch and Wood, 1966) (Berger and Kharazova, 1997). In addition, anthropogenic intensification and events associated with climate change contribute to increasing the frequency and extent of the natural variabilities (Rivera-Ingraham and Lignot, 2017).

Subsisting throughout the aquatic environment, bivalve molluscs are found from fresh to sea waters (Matsushima et al., 1987), manifesting from limited capacity of osmotic regulation when in dilute environment to a narrow range of osmotic conformation when in concentrated media (Deaton, 2009; Larsen et al., 2014). Although the patterns manifested and the challenges posed by the variation of each environment are distinct - in general - they tend to converge to one point in common: osmotic variation.

The physiological effects of unfavorable or fluctuating osmotic conditions have been extensively reported and reviewed by the scientific community in Bivalvia from different osmotic niches (Beadle, 1957; Berger et al., 1978; Carvalho et al., 2015; Costa and Pritchard, 1978; Coughlan et al., 2009; Gharbi et al., 2016; Jordan and Deaton, 1999; Larsen et al., 2014; Pierce, 1970; Ruiz and Souza, 2008; Shumway, 1977). In this light, the perturbations caused on hemolymph osmolality, tissue water content and cellular volume (De Lisle and Roberts, 1988; Larsen et al., 2014; McFarland et al., 2013) might affect of the mantainance of homeostasis. Therefore, considering homeostasis as a state of fundamental stability, it can be inferred that a wide diversity of physiological mechanisms involved in water and salt balance evolved in the metazoans (Deaton, 2009; Larsen et al., 2014; Zinchenko and Golovatyuk, 2013), especially in groups that occupy variable environments.

Among these strategies, intracellular isosmotic regulation (IIR) is one of the main physiological mechanisms in the face of osmotic fluctuations in the external environment (Matsushima et al., 1987), which acts specifically on the activation of mechanisms cell volume maintenance. From the adjustment of osmotically active solutes (*i.e* ions and amino acids), regulatory events are initiated according to environmental salinity (Deaton and Pierce Jr, 1994; Koivusalo et al., 2009; Pierce, 1982; Wijayasinghe et al., 2017). Based on two fundamental processes, the IIR comprises mechanisms associated to

regulatory volume decrease (RVD) in hyposmotic scenarios, as well as strategies that encompass regulatory volume increase (RVI) in situations of cellular shrinkage.

Due to the importance of the pool of osmotically active titers during regulation of cell volume, as well as their particularities according to the saline stress experienced, the scientific literature reports several investigations in this perspective (see Allen and Garrett, 1972; Babarro et al., 2011; Baginski and Pierce Jr, 1978; Burg et al., 2007; Hosoi et al., 2003; Ivanovici et al., 1981; Kube et al., 2006; Matsushima et al., 1987; Pierce Jr, 1971; Potts, 1968). However, it is important to emphasize that such studies tend to focus only on the effects of a specific osmotic shock (hypo- or hyperosmotic), just as they are based on the one-time evaluation of a single class of effectors (inorganic or organic). In addition, the literature tends to assume the preferential use of osmolytes according to environment, as in the case of free amino acids in the marine habitat (Yancey, 2005).

In this light, we aimed to identify the main osmotic effectors recruited by species of bivalve molluscs (*Corbicula largillierti*, *Erodona mactroides* and *Amarilladesma mactroides*) - inhabitants of different osmotic niches - in the IIR when subjected to salinity fluctuations. In this way, we characterize experimentally the physiological patterns and IIR by means of organic and inorganic solutes during exposure to hyper- and hyposmotic media.

MATERIAL AND METHODS:

Collection and Acclimation of Animals

We sampled specimens of the freshwater bivalve *Corbicula largillierti* Philippi, 1844 (purple Asian cockle) (32°16'21.07"S, 53°99'32.36"W), the estuarine *Erodona mactroides* Bosc, 1802 (lagoon cockle) (32°02'28.89"S, 52°12'97.98"W) and the marine *Amarilladesma mactroides* Deshayes, 1854 (white clam) (32°02'28.89"S, 52°12'97.98"W) in the State of Rio Grande do Sul, Brazil (SISBIO License Number 54349-1). The animals were then transported to the Instituto de Ciências Biológicas of the Universidade Federal do Rio Grande – FURG (Rio Grande, RS, Brazil) and acclimated for 7-days in 20-L plastic tanks. They were held at constant aeration, ambient temperature 21 °C, 12-h light: 12-h dark photoperiod, feeding three times a week with microalgae and at their respective natural habitat salinities: 0 ‰ for *C. largillierti*, 11 ‰ for *E. mactroides* (according to the daily monitoring of the Port of Rio Grande - www.portosrs.com.br), and 28 ‰ for *A. mactroides* (Odebrecht et al., 2010). All saline solutions used were obtained from the addition of sea salt (Marineland®) to FW, or by mixing SW with FW. Salinities were verified using a manual optical refractometer (model K52 -100, KASVI).

Physiological Experiments

- Osmotic Shock Exposure

The osmotic shock experiment was determined following previously conducted survival trials. The aim was to establish safe salinity ranges for each evaluated species. Thus, the bivalve molluscs were subjected to osmotic shocks of 25% above and/or below the acclimation salinity (*C. largillierti* (N=5) - 0, 5, 10 and 15 ‰; *E. mactroides* (N=7) - 8, 11 and 14 ‰; *A. mactroides* (N=7) - 21, 28 and 35 ‰), for 96 h. Under the same laboratory conditions and constant aeration, the organisms were directly exposed to such osmotic media in 500 mL plastic containers. Subsequently, the biological material was sampled from the specimens. Hemolymph was drawn from the adductor muscle, and the animals were dead by cryoanesthesia, and the pairs of gills, as well as the mantle and the adductor muscle were removed and carefully weighed (AG2204, Gehaka; XP6, Mettler Toledo). All samples were immediately stored at -20 ° C. During the treatment exposure interval the animals were not fed.

- *Osmolality and Tissue hydration*

To characterize the osmoregulatory capacity of each species, hemolymph osmolality (mOsm/kg H₂O) was measured using a vapor pressure osmometer (Vapro 5600, Wescor). In addition, osmolality measures were also performed in the treatment salinities. The water content of the mantle, adductor muscle and gills of each species was measured by weighting fresh tissue samples on electronic balance (AG2204, Gehaka; XP6, Mettler Toledo), and reweighting after oven-dried at 60 °C for 72-h. From the obtained data, the tissue hydration (TH, %) was calculated using the following formula:

$$TH = \left[\frac{(\text{wet mass} - \text{dry mass})}{\text{wet mass}} \right] \times 100$$

- *Osmolyte concentration*

The concentration of inorganic osmolytes such as Na⁺ and K⁺ from the experimental media and hemolymph, as well from the different tissues was detected by flame photometry as adapted from Amado et al. (2006). Cl⁻ concentration was measured using a commercial kit (Colorimetric Chlorides, Doles Reagents). Each ion concentration was calculated using the standard curve equation. Data were expressed as mM or mM/mg dry mass, later relativized for percentage (%).

For organic osmolytes, free amino acids (FAA) analysis were performed using a fluorescence spectrophotometer (FilterMax F5 model, Molecular Devices), and performed following Fisher et al. (2001), with modifications. The standard mixtures required were obtained using the amino acids taurine, alanine and glycine. As pointed out previously Fyhn (1976), Livingstone et al. (1979), Henry et al. (1980), Otto and Pierce (1981), Deaton et al. (1989), Jordan and Deaton (1999), Burg and Ferraris (2008) Hosoi et al. (2008), and Babarro et al. (2011), these three organic osmolytes are considered more representative in maintaining the osmotic equilibrium of bivalves, presenting large quantities in the free amino acid pool. Taurine, alanine and glycine ratios in bivalves, respectively, were established from a literature review, respectively as follow: freshwater (60%, 20% and 20%), estuarine (20%, 60% and 20%) and marine (70%, 20% and 10%). Thus, standard mixtures were prepared at the concentration of 40, 4, 0.4, 0.04 and 0.004 μM to integrate the standard curve used in the test.

The calculation of the amino acid concentration was carried out by means of the equation of the line reached by reading a standard curve established for each osmotic

niche. The FAA concentration was obtained in μM /mg wet mass, and the conversion to μM /mg dry mass was done using the following formula, adapted from Faria et al. (2011)

$$\text{Dry mass} = \frac{\text{wet mass}}{(100 - \text{tissue hydration})}$$

Data were expressed in μM /mg dry mass, later relativized for percentage (%).

Statistical Analyses

Since some variables were not normally distributed, the data were submitted to non-parametric analysis of Kruskal-Wallis variance, followed by Dunns post-hoc to detect statistically different means ($p \leq 0.05$), and Mann-Whitney U-test for independent samples (physiological vs. osmotic and ionic concentrations of the exposure solutions). Data were expressed as the mean + SEM.

RESULTS:

Osmolality measurement

Hemolymph osmolality of *C. largillierti* in 15 ‰ was higher compared to the acclimation condition (0 ‰) ($H = 12.20$; $p < 0.05$) (Fig. 1a). When compared to the external osmolality, the osmotic concentration of hemolymph of purple Asian cockle at acclimation condition (0 ‰) was higher (50.33 ± 18.35 mOsm/kg H₂O; $U=1$ $p < 0.05$). On the other hand, hemolymph osmolality in *E. mactroides* and *A. mactroides* was different between hypo- and hyperosmotic conditions ($3.44 \leq H \leq 17.82$; $p < 0.05$), but did not when compared to the acclimation salinity (Fig. 1bc). When compared to environmental osmolality, the hemolymphatic osmotic concentration of white clam was lower in 21 ‰ ($U=0$; $p < 0.05$). In contrast, the lagoon cockle did not show difference in the osmolality of their fluids - after 96-h of exposure, as well as did not differ in the other comparisons conducted ($1 \leq U \leq 2$; $p > 0.05$).

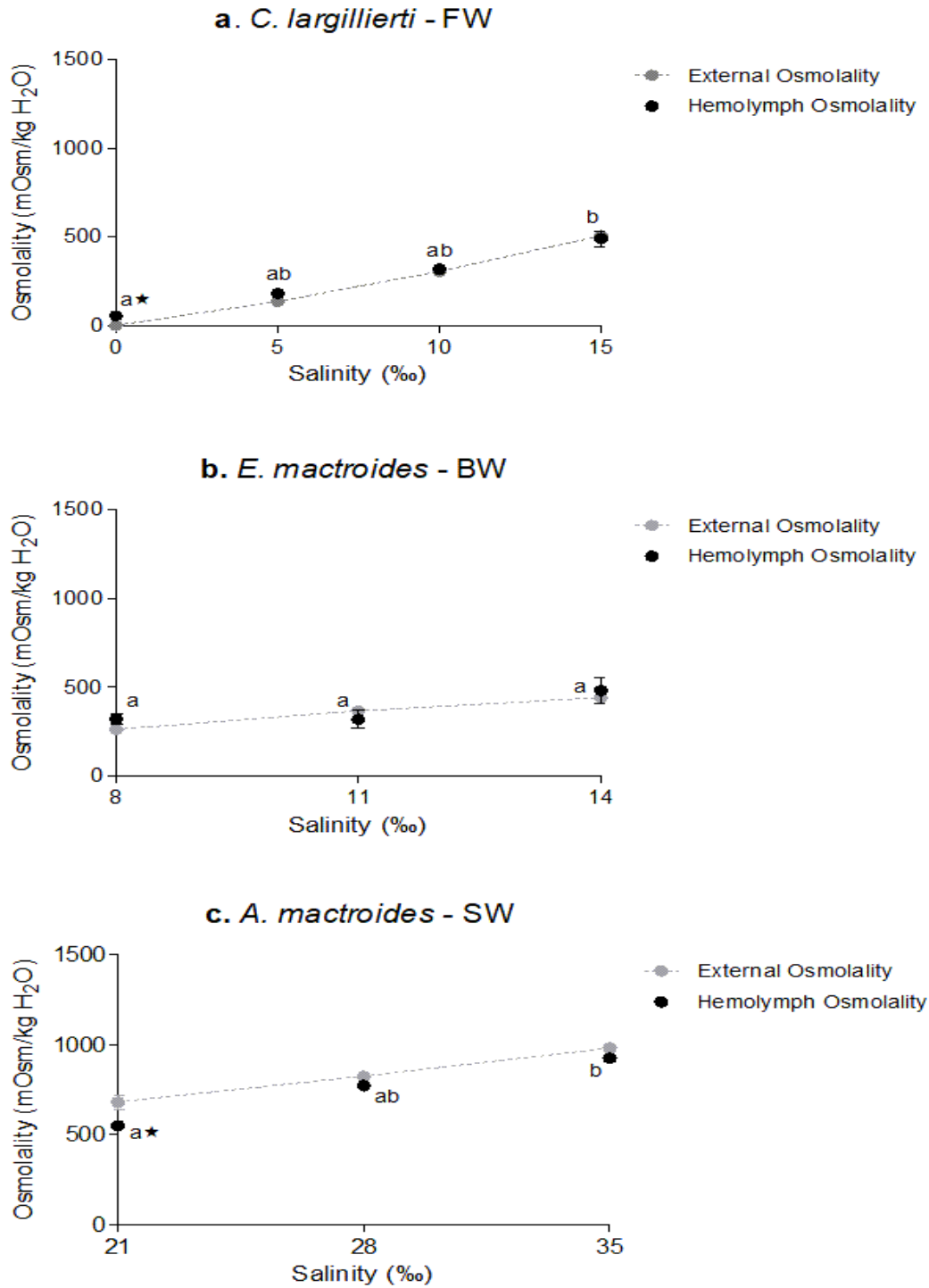


Figure 1 - Changes in the hemolymph osmolality of (a) *C. largillierti* (N=3-4), (b) *E. mactroides* (N=4-6) and (c) *A. mactroides* (N=6-7) after 96-h of exposure. Values are expressed as the mean \pm SEM. Significant difference ($p < 0.05$) is indicated by different letters. No significant differences ($H = 3.442$; $p > 0.05$) were observed for the estuarine specimens for 96-h as exposure salinities. * represents differences between hemolymph osmolality and external salinity ($p < 0.05$).

Inorganic Osmolytes in Hemolymph

The ionic concentration of hemolymph of *C. largillierti*, *E. mactroides* and *A. mactroides* varied according to the salinities of exposure (Fig. 2). In the freshwater bivalve *C. largillierti*, the concentration of Na^+ increased in salinities 10-15 ‰ after 96-h, as well as K^+ and Cl^- only in 15‰ ($16.64 \leq H \leq 17.90$; $p < 0.05$) (Fig. 2abc). Compared to the ionic environmental concentrations, only $[\text{Na}^+]$ and $[\text{Cl}^-]$ were smaller in the hemolymph when in above zero salinities ($0 \geq U \leq 10$; $p < 0.05$).

The concentration of Na^+ and Cl^- in *E. mactroides* and *A. mactroides* was different between hypo- and hyperosmotic conditions ($10.54 \leq H \leq 16.04$; $p < 0.05$), but did not when compared to the acclimation salinity (Fig. 2). Regarding the $[\text{K}^+]$, no variations were observed according to the salinity of exposure in both estuarine and marine species, after 96h of exposure ($3.35 \leq H \leq 4.99$; $p > 0.05$) (Fig. 2eh). When comparing the ionic environmental concentrations, the hemolymph Cl^- presented lower values in acclimation (11 ‰ - BW) and hyperosmotic conditions (14 ‰ - BW; 35 ‰ - SW) ($0 \geq U \leq 3$; $p < 0.05$). On the other hand, the anion increased in the fluid of the estuarine bivalves exposed for 96-h to hiposmotic condition. As for the K^+ , an increase in the cation concentration was seen in hyposmotic salinity (21 ‰ - SW) compared to environment ($U=3$; $p < 0.05$). Finally, the hemolymph Na^+ was high in the fluid of the estuarine bivalve under hyposmotic stress (8 ‰), while it was lower at 28 ‰ after 96 h ($U=1$; $p < 0.05$).

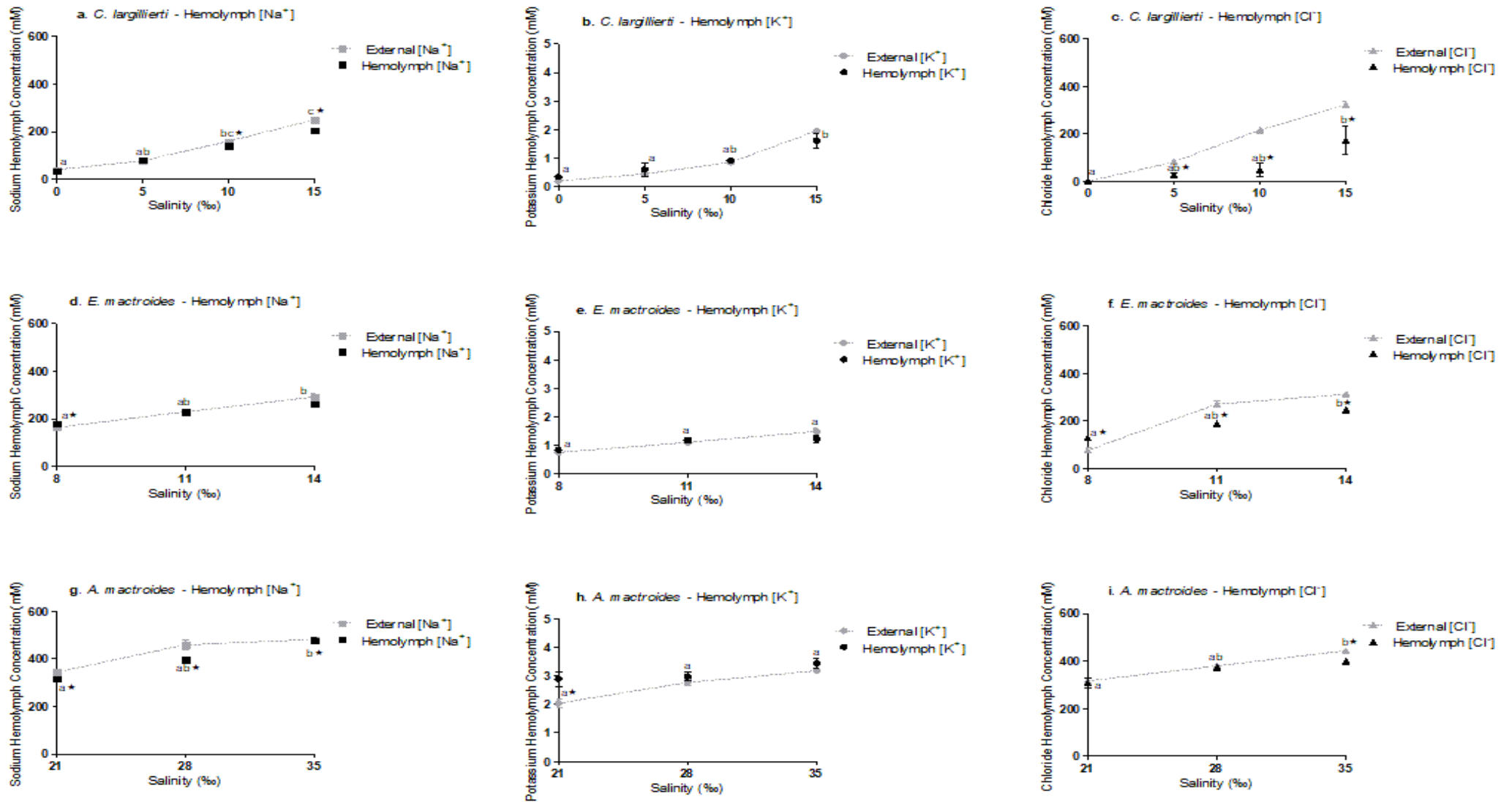


Figure 2 - Concentration of inorganic osmolytes (Na⁺, Cl⁻ and K⁺) in the hemolymph of the (a) (b) (c) freshwater species - *Corbicula largillierii* (N=5), (d) (e) (f) estuarine - *Erodona mactroides* (N=4-5) and (g) (h) (i) marine - *Amarilladesma mactroides* (N=6-7) before exposure to shocks osmotic for 96-h. Data were expressed as mean + SEM (4≤N≤11). Statistical analyzes were performed for each ion and species, separately. Significant differences (p<0.05) are indicated by different letters. No statistically significant differences (p>0.05) were observed in the potassium concentration of the estuarine bivalve hemolymph, as well as in the hemolymphatic fluid of the marine species exposed for 96-h the test salinities. In addition, stars (*) represents differences between hemolymph ion concentration and external ion concentration (p<0.05).

Tissue Hydration

The water content of the mantle, adductor muscle and gills of the freshwater bivalve (*C. largillierti*) varied after being exposed for 96 h to the hyperosmotic conditions ($7.86 \geq H \leq 11.44$; $p < 0.05$) (Fig. 3abc). A decrease in hydration - in relation to the acclimation condition - was seen in the mantle in 5 ‰, adductor muscle in 10 ‰, as well in the gills exposed to 15 ‰. In the estuarine species (*E. mactroides*), only the tissue hydration of the gills at 96-h was different between hypo- and hyperosmotic conditions, with a decrease of the parameter in salinity of 14 ‰ in relation to the condition 8 ‰ ($H = 6.14$; $p < 0.05$) (Fig. 3c). At 35 ‰, there was a decrease in the water content of the mantle of marine bivalve (*A. mactroides*) when compared to 21 ‰ condition ($H = 8.15$; $p < 0.05$) (Fig. 3a). In contrast, *E. mactroides* and *A. mactroides* presented no variation in the water content of the other tissues evaluated ($0.48 \geq H \leq 4.50$; $p > 0.05$) (Fig. 3bc).

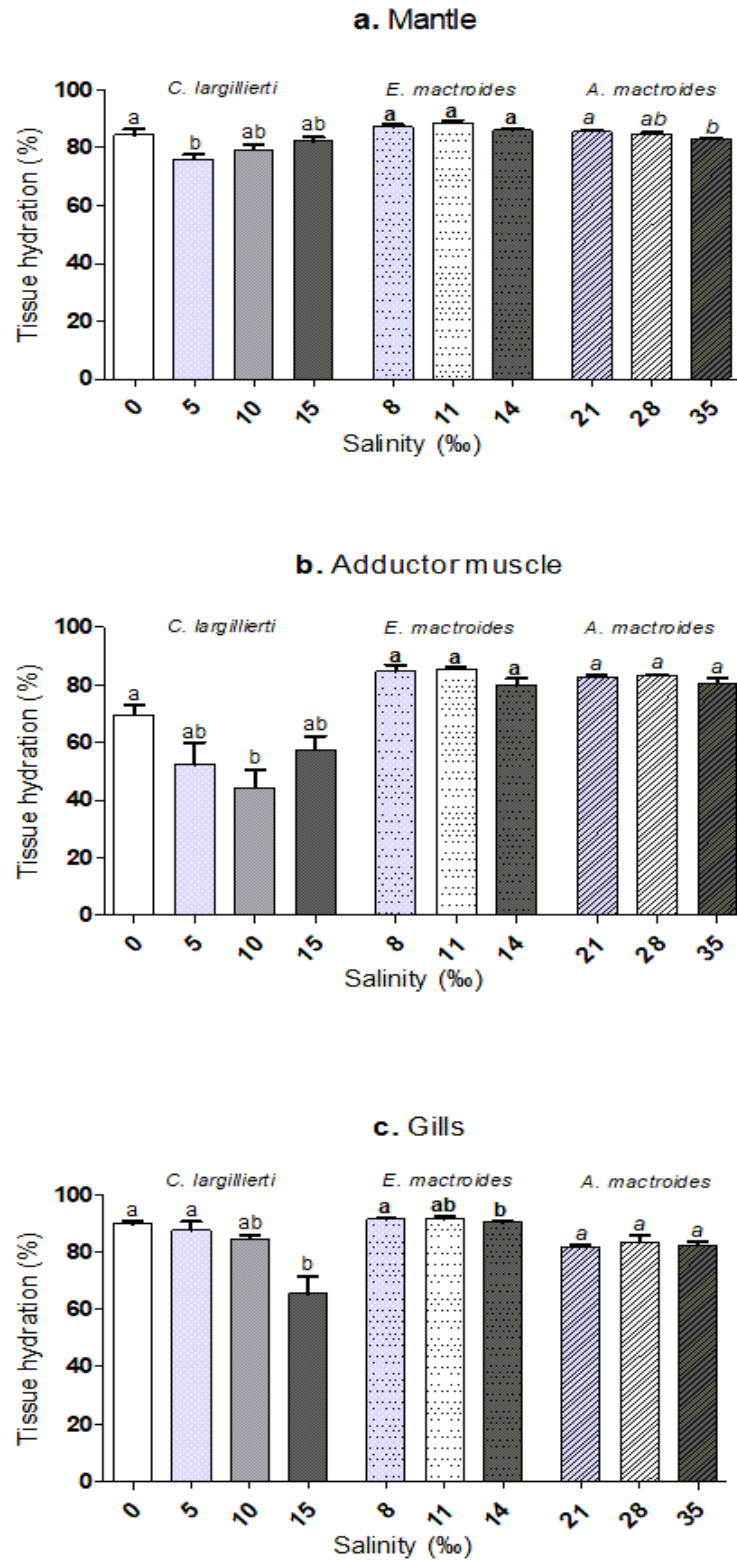


Figure 3 - Variations in the water content of (a) mantle, (b) adductor muscle and (c) gills of *Corbicula largillierti* (smooth bars; N=3-5), *Erodona mactroides* (dotted bars; N=4-5) and *Amarilladesma mactroides* (striped bars; N=5-7) after 96-h of exposure to osmotic shocks. Values are expressed as mean + SEM. Statistical analyzes were performed for each tissue and species, separately. Significant difference ($p < 0.05$) is indicated by different letters. There were no significant differences ($p > 0.05$) in the mantle of *E. mactroides*, gills of the *A. mactroides*, as well in the adductor muscle of both estuarine and marine species.

Inorganic Osmolytes in Tissues

The tissue ionic content varied according to the salinities to which the bivalves were exposed. Compared to acclimation, the $[\text{Na}^+]$ in the mantle of *C. largillierti* was higher when submitted to salinity of 10-15 ‰, as well as in the gills in 15 ‰ (Fig. 4a). The contents of K^+ and Cl^- were increased in the mantle in front of the salinity of 10 ‰ when compared to the acclimation situation (Fig. 4bc). The same was observed for the adductor muscle and gills when exposed to higher salinity (15 ‰) ($0.22 \leq H \leq 15.79$; $p < 0.05$).

In the estuarine bivalve, the $[\text{Na}^+]$ in the mantle increased in the hyperosmotic condition in relation to hyposmotic salinity ($H=6.41$; $p < 0.05$), but did not differ when compared to acclimation (Fig. 5a). After 96-h, the mantle also presented an increase in $[\text{K}^+]$ when under hyposmotic shock compared to acclimation salinity ($H=7.53$; $p < 0.05$) (Fig. 5b).

In marine species *A. mactroides*, the content of Na^+ in the mantle were different in the hyperosmotic condition when compared to the other treatments ($H=13.62$; $p < 0.05$) (Fig. 6a). In adductor muscle and gills, after 96-h, the proportions of Na^+ ranged between the osmotic shocks (hypo- and hyperosmotic) ($8.21 \leq H \leq 9.57$; $p < 0.05$). Only in the gills, the content of K^+ increase during hyperosmotic stress ($H=8.83$; $p < 0.05$) (Fig. 6b).

In contrast, the Cl^- content of tissues of *E. mactroides* and *A. mactroides* did not varies between treatments investigated ($1.12 \leq H \leq 4.28$; $p > 0.05$) (Fig. 5c; Fig. 6c).

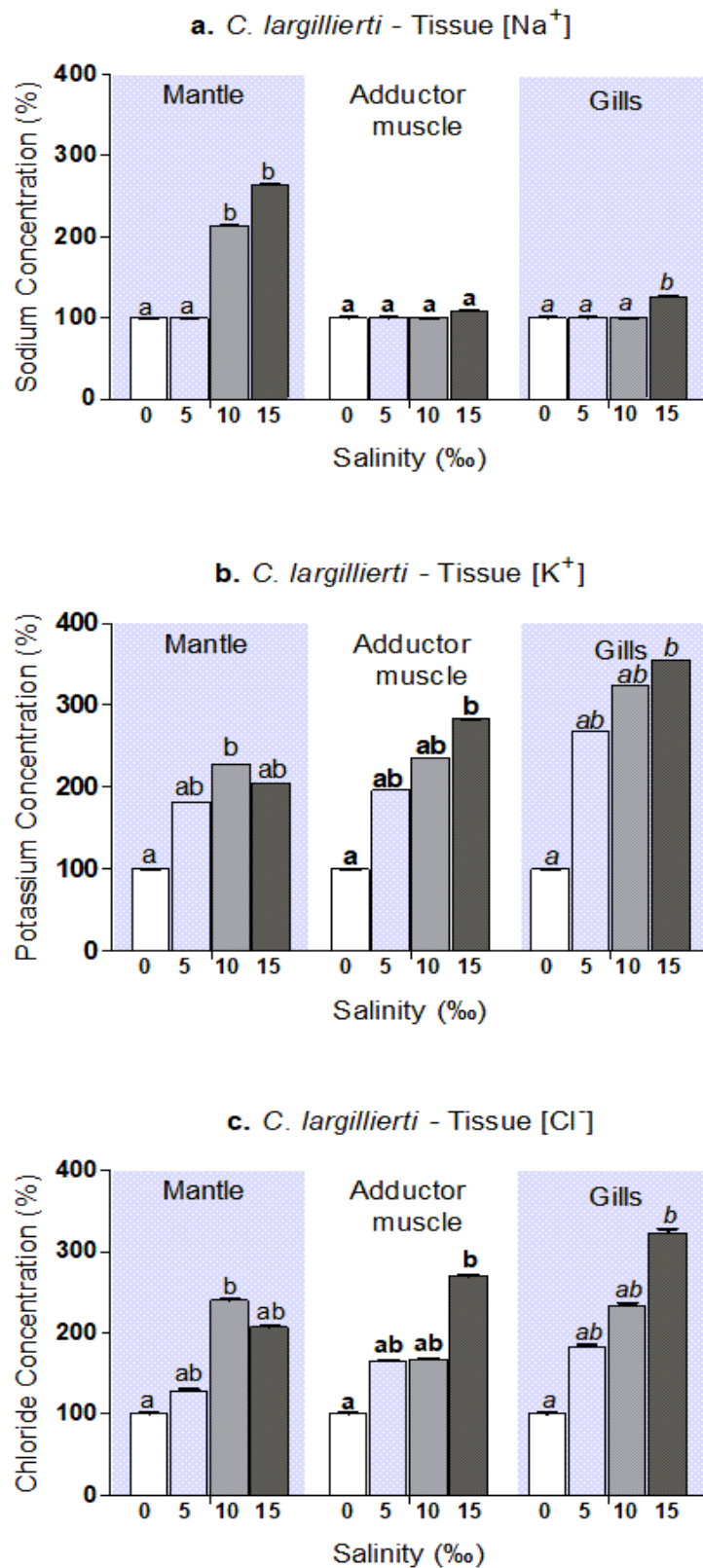


Figure 4 - Concentration of inorganic osmolytes (Na⁺, K⁺ and Cl⁻) in the mantle, adductor muscle and gills of the (a-c) freshwater species - *Corbicula largillierti* (N=3-5) before exposure to shocks osmotic for 96-h. Data were expressed as percentage + SEM. Statistical analyzes were performed for each ion and tissue, separately. Significant differences (p<0.05) are indicated by different letters. There were no statistically significant differences (p>0.05) in the sodium concentration of adductor muscle.

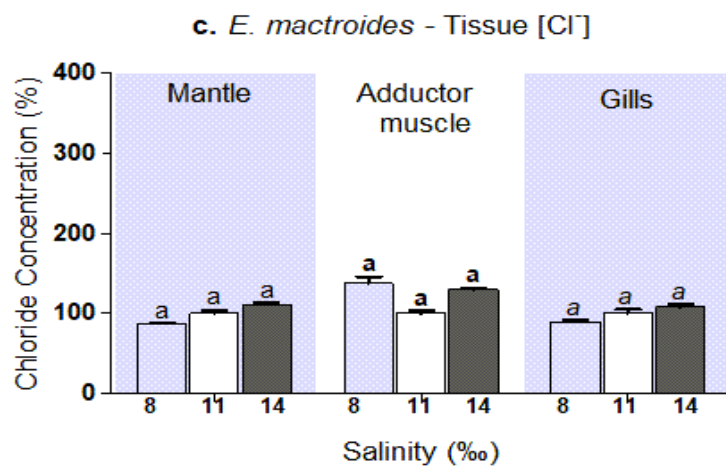
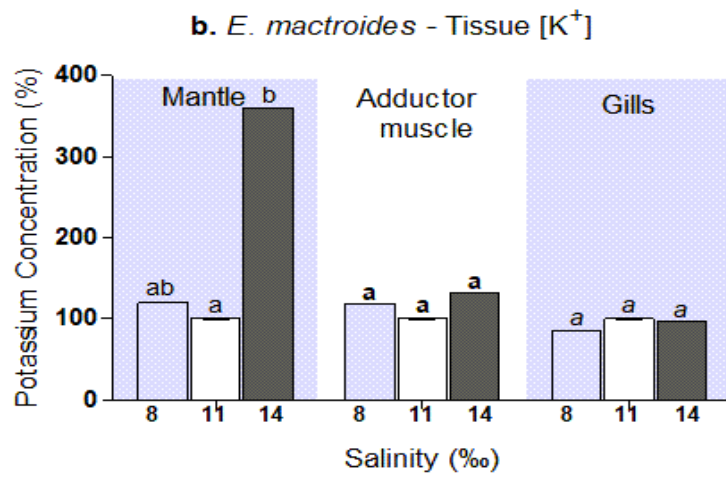
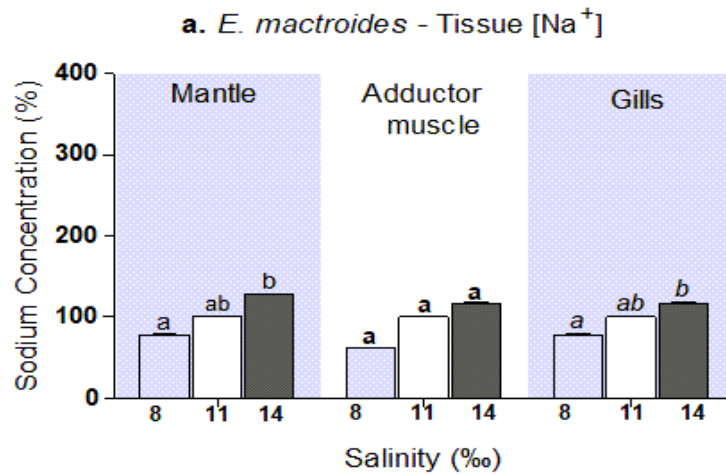


Figure 5 - Concentration of inorganic osmolytes (Na⁺, K⁺ and Cl⁻) in the mantle, adductor muscle and gills of the (a-c) estuarine - *Erodona mactroides* (N=3-5) before exposure to shocks osmotic for 96-h. Data were expressed as percentage + SEM. Statistical analyzes were performed for each ion and tissue, separately. Significant differences (p<0.05) are indicated by different letters. There were no statistically significant differences (p>0.05) in the sodium concentration of adductor, as well the concentration of intracellular potassium did not show difference in mantle, adductor muscle and gills. In addition, the Cl⁻ anion was not statistically significant in the three tissues of the estuarine species.

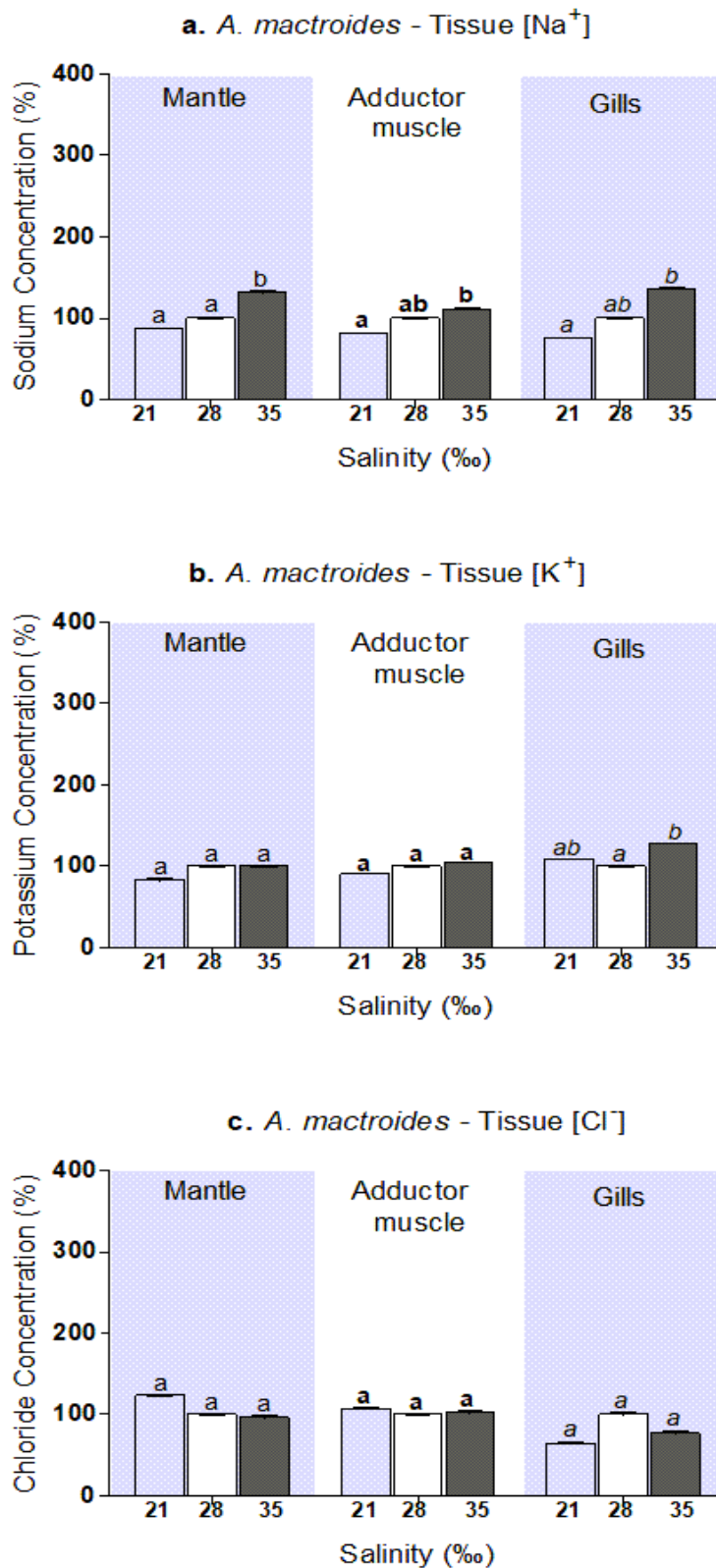


Figure 6 - Concentration of inorganic osmolytes (Na⁺, K⁺ and Cl⁻) in the mantle, adductor muscle and gills of the (a-c) marine - *Amarilladesma mactroides* (N=5-7) before exposure to shocks osmotic for 96-h. Data were expressed as percentage + SEM. Statistical analyzes were performed for each ion and tissue, separately. Significant differences (p<0.05) are indicated by different letters. There were no statistically significant differences (p>0.05) in the concentration of intracellular potassium of the mantle and adductor muscle. In addition, the Cl⁻ anion was not statistically significant in the mantle, adductor muscle and gills of the marine species at 96-h when exposed to test salinities.

Organic Osmolytes in Tissues

The concentration of organic osmolytes (free amino acids) in the tissues of *Corbicula largillierti* – varied according to the osmotic condition to which they were submitted ($10.63 \leq H \leq 11.92$; $p < 0.05$) (Fig. 7a). Mantle and adductor muscle of *C. largillierti* presented higher amounts of organic osmolytes in the presence of 15 ‰ of salinity in relation to the acclimation condition (0 ‰). In the gills, FAA content decreased in salinity 5 ‰ in relation to the expressed value in the salinity of 15 ‰. In *Erodona mactroides*, only the FAA content of the gill tissue was significantly different, since both osmotic shock conditions had lower concentration when compared to the acclimation content ($H = 5.32$; $p < 0.05$) (Fig. 7b). Differently, the marine species *Amarilladesma mactroides* presented a significant difference only in the content of organic osmolytes of the adductor muscle ($H = 11.06$; $p < 0.05$) (Fig. 7c). In this sense, after 96-h, *A. mactroides* specimens submitted to a hyperosmotic condition had higher concentrations of FAA compared to the other conditions. In relation to the mantle and adductor muscle of *E. mactroides* (Fig. 7b), as well mantle and gills of *A. mactroides*, they did not vary (Fig. 7c) ($0.15 \leq H \leq 5.45$; $p > 0.05$).

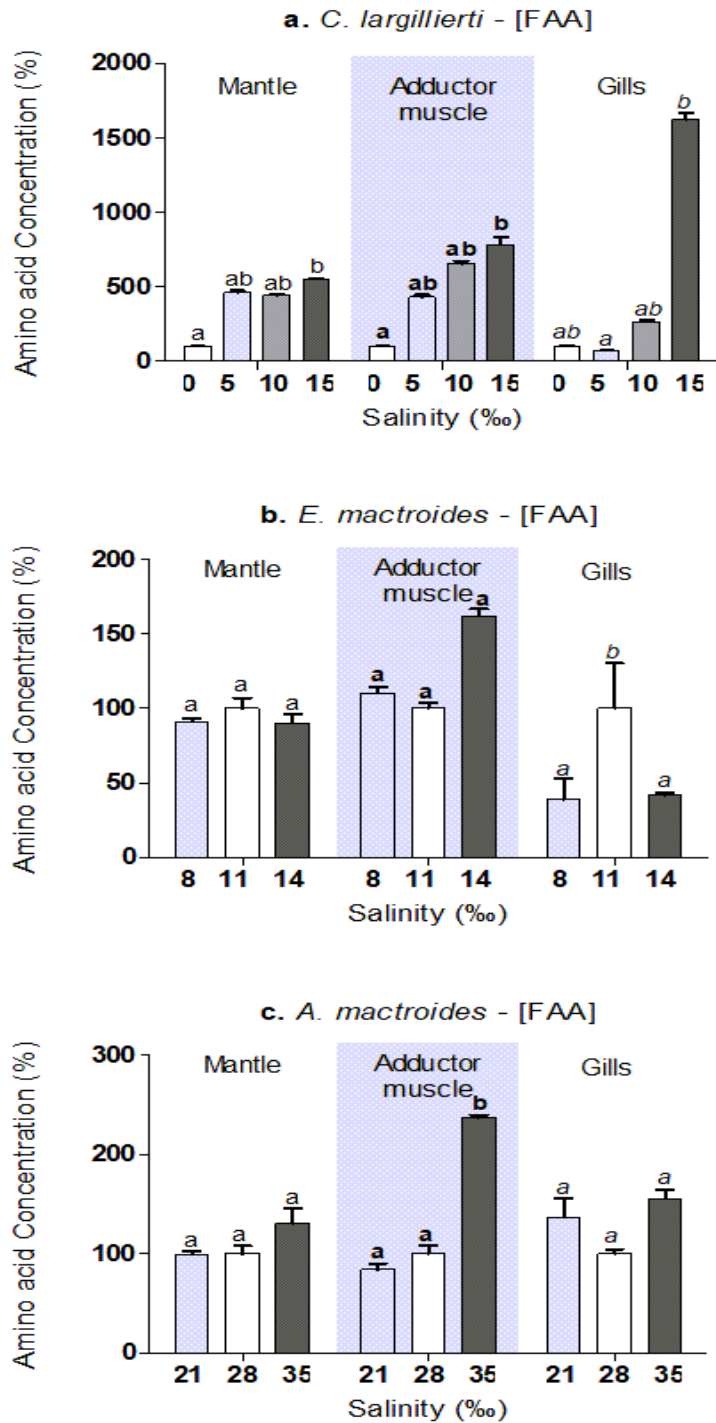


Figure 7 - Concentration of organic osmolytes (taurine, alanine and glycine) in the mantle, adductor muscle and gills of the (a) freshwater species - *Corbicula largillierti* (N=3-5), (b) estuarine - *Erodona mactroides* (N=3-4) and (c) marine - *Amarilladesma mactroides* (N=4-6) before exposure to shocks osmotic for 96-h. Data were expressed as percentage + SEM. Statistical analyzes were performed for each tissue and species, separately. Significant differences ($p < 0.05$) are indicated by different letters. No significant differences ($p > 0.05$) were observed in the amino acid concentrations in the mantle and adductor muscle of the estuarine specimens, as well as the mantle and gills of the marine samples.

DISCUSSION:

From a comparative overview of the osmotic scenarios and the physiological responses expressed by the bivalve molluscs *Corbicula largillierti* (freshwater inhabitant - FW), *Erodona mactroides* (brackish water inhabitant - BW) and *Amarilladesma mactroides* (seawater inhabitant - SW) - derived from different aquatic environments - it was possible to observe and characterize the different osmoregulatory patterns manifested by these species.

The relation between the external salinity and the survival capacity, we observed that *Corbicula largillierti* showed 100% survival against the osmotic gradient tested by 96 h (0 – 15 ‰) (data not shown). This finding departs from the reported physiological patterns for many freshwater bivalves, which are extremely sensitive to the hyperosmotic environment, and can not survive in salinities beyond 200 mOsm/kg H₂O (\approx 7 ‰) (Dietz et al., 1998; Jordan and Deaton, 1999). However, it is recognized that species of the genus *Corbicula* constitute an exception to this rule (Dietz et al., 1998), which is in agreement with the observations of Deaton (1981) for *Corbicula fluminea*, which also showed a greater tolerance to salinity (400 mOsm/kg H₂O, \approx 13.6 ‰).

Although the salinity ranges within which organisms can survive differ among species, Asian cockle (*C. fluminea*) and purple Asian cockle (*C. largillierti*) appear to have a set of similar physiological, ecological and biological characteristics which promote the adaptive success of resistance to the environmental stress experienced. In addition - from an evolutionary point of view - the observations obtained for *C. largillierti* regarding the survival of hyperosmotic conditions, as proposed by Dietz (1979) for the *C. manilensis* species on the tolerance capacity at high salinity, seem to be supported due to ancestry in brackish waters.

Estuarine and marine bivalves (especially inhabitants of coastal regions) are often exposed to changes in salinity caused by tidal cycles or rainy periods, resulting in significant osmotic gradients between the environment and the organism (Verdelhos et al., 2015). With the ultimate aim of ensuring the survival of species that occupy such variable niches, strategies such as the limit of tolerance presented by these animals become fundamental in coping with salinity changes (Nie et al., 2017). In this sense, we observed in *Erodona mactroides* and *Amarilladesma mactroides* a characteristic euryhaline profile, which presents survival greater than 50% in intervals of 0 – 25 ‰ and 7 – 56 ‰ after acute exposure, respectively (data not shown). Given the ability to withstand wide ranges of osmotic environmental concentration, euryhalinity may be due

to lower extracellular fluid variation, greater tissue tolerance to critical salinity, or to be based on a lower tissue permeability to these changes (Kinne, 1966).

Turning to the extracellular compartment, specifically about the osmotic concentration of the hemolymph, after 96 h, *C. largillierti* was characterized as an osmotic conformer in front of salinities above zero. On the other hand, hemolymph osmolality was slightly hyper-regulated in fresh water (50.33 ± 18.35 mOsm/kg H₂O; ≈ 2 ‰) (Fig. 1a). This is an emblematic pattern for freshwater bivalves, (Deaton, 2009; Larsen et al., 2014; Matsushima and Kado, 1982), which maintains the osmolality of the bodily fluid minimally higher to guarantee the compatibility with life in environments with very low salinities. Consequently, the effects of the variation in the hemolymph osmotic concentration could be visualized by the decreasing in the water content of the mantle, adductor muscle and gills of the freshwater specimens (Fig. 3abc). In the present study, it is possible to conclude that these observations are corroborating several authors about the limited capacity of regulation of the cellular volume presented by freshwater bivalve molluscs (Dietz et al., 1997; Gainey Jr. and Greenberg, 1977; Murphy and Dietz, 1976; Potts, 1968). Thus, changes in tissue/cellular volume are understood as indicative of distortion in the steady-state equilibrium of the inflow and outflow of water and salts (Kinne, 1966; Strange, 2004).

From the physiological point of view, marine and estuarine bivalves are known as osmoconformers (Larsen et al., 2014; Mantel and Farmer, 1983). Here we verify the classical physiological pattern of osmotic conformation in specimens of lagoon cockle (*E. mactroides*) when submitted to conditions of saline variation (Fig. 1b). Likewise, the osmotic concentration of the hemolymph of white clam (*A. mactroides*) was similar to the environmental, except when confronted with hyposmotic shock, where hemolymph osmolality was slightly below the ambient (hypoconformed) concentration (Fig. 1c). As changes in water content are considered as traditional indicators of volume regulation (Amado et al., 2011; Freire et al., 2013; Oglesby, 1981) we also evaluated in *E. mactroides* and *A. mactroides* the possible effects of changes in hemolymph osmotic concentration on the tissue hydration parameter. In this sense, our results show that, in view of the osmotic shock, the mantle, adductor muscle and gill tissues of both species could maintain the volume before the imposed salinity variations (Fig. 3abc). Although differences in tissue hydration of *E. mactroides* gills and mantle of *A. mactroides* were observed when compared to larger osmotic intervals (6 ‰ and 14 ‰, respectively), such differences appear to be punctual. In addition, we believe that because they are organs in

constant interface with the external environment, they tend to suffer more directly from the osmotic changes.

About ionic concentration of hemolymph, both ionoregulation patterns as ionoconformation were verified in freshwater (Fig. 2abc), estuarine (Fig. 2def) and marine species (Fig. 2ghi). In general, *C. largillierti*, *E. mactroides* and *A. mactroides* hyporegulated the hemolymphatic Cl^- concentration during hyperosmotic saline exposure, whereas purple Asian cockle (*C. largillierti*) was also able to hyporegulate - in parallel - the Na^+ ion (only 10 and 15 ‰). In addition, under the same stress experienced (hyperosmotic shock), the three bivalves ionoconformed the K^+ , just as *E. mactroides* and *A. mactroides* also conformed the Na^+ ion, conferring similarity between the environmental concentrations of the ion and the extracellular fluid. On the other hand, when confronted with hyposmotic conditions, the estuarine and marine species manifested different regulation and ion conformation patterns. Thus, lagoon cockle (*E. mactroides*) maintained slightly higher concentrations of sodium ions and chloride, whereas white clam (*A. mactroides*) only regulated potassium, after acute exposure of organisms to this shock. In view of these results, we can infer that the maintenance of the inorganic ions evaluated seems to be subject to a specific physiological control, taking into account the osmotic shock experienced - this ability being species-specific or according to the occupied aquatic niche.

As seen so far, osmolality is an important environmental factor that imposes great selection pressure on the evolution of life. As a result, all existing cells have, in a variable way, mechanisms of cell volume regulation - activated when in osmotic shock situations - which control the concentration of the cytoplasmic compartment for which cellular metabolism has been optimized (Chamberlin and Strange, 1989; Kultz, 2000; Pierce, 1982). In this sense, the capacity of intracellular isosmotic regulation (IIR) - constitutes a fundamental characteristic in osmoconformers organisms that tend to occupy so variable osmotic niches. Based on the necessary adjustments on the osmotic effectors (i.e. free ions and amino acids), the regulatory volume increase (RVI) and regulatory volume decrease (RVD) strategies seek to compensate for and control the adverse effects of salinity fluctuations on the cells. Although the scientific literature reports the preferential use of certain osmolytes by organisms from distinct niches (see Burg and Ferraris, 2008; Kinne, 1993; Yancey, 2005), such conclusions are still far from the comparative context so that they are considered rules once that this information is reported for a limited number of species in view of the diversity of each taxon.

Pierce (1982) points out that the relative contribution of each type of solute tends to vary according to species and cell type, as well as the amplitude and duration of osmotic stress. In addition, different tissues have distinct responses to variations in salinity (Carregosa et al., 2014; Deaton, 1994; Pierce Jr, 1971; Ruiz and Souza, 2008). Here we identify that the mantle tissues and gills of *C. largillierti* presented an increase in the concentrations of Na^+ , K^+ and Cl^- , as well as K^+ and Cl^- in the adductor muscle - in face of the hyperosmotic shock experienced (Fig. 4abc). Investigations have reported that freshwater bivalve molluscs depend mainly on ions as intracellular effector osmolytes (Murphy and Dietz 1976; Gainey and Greenberg 1977; Dietz et al. 1997).

Interestingly, the freshwater species investigated also showed increase in the concentration of intracellular organic osmolytes in the evaluated tissues, as the specimens were exposed to higher salinities (Fig. 7a). Although they are the class of effectors that most varies in *C. largillierti*, however the contribution as effective osmolytes is much smaller when compared with the inorganic ions (mM). However, this observation is surprising because freshwater organisms, although not naturally exposed to hyperosmotic conditions, may accumulate free amino acids in response to increased salinity (Matsushima et al., 1987). Physiologically, some studies have indicated that freshwater bivalves possess the ability to increase some amino acids under a hyperosmotic condition (Hosoi et al., 2008). Authors further suggest that the Corbiculidae family has a relatively short fossil history, so it is generally accepted that *Corbicula* species are very recent immigrants in freshwater (Keen and Casey, 1969; McMahon, 1983). Thus, such an evolutionary background seems to explain the capacity of FAA accumulation when in situations of hyperosmotic shock (Matsushima et al., 1987), mainly for *C. largillierti*.

In *E. mactroides*, we observed that the different tissues expressed different patterns about the osmolytes recruited in view of volume regulation (Fig. 5abc). In contrast to the hyposmotic profile, the estuarine bivalve specimens submitted to hyperosmotic salinity presented higher concentrations of Na^+ , as well as a slight tendency to increase the cytoplasmic Cl^- concentration in those tissues in constant interface with the external environment (gills and mantle). In addition, the cation K^+ also remained higher in the mantle after the end of the acute exposure to high salinity (14 ‰). On the other hand, the adductor muscle - which tends to be more anatomically protected in the animal - remained independent to any water change, besides showing no variations in the concentration of intracellular osmolytes. It is believed that lower permeability to the

osmotic variations in this tissue - in particular - ensure the said pattern observed even at different osmotic concentrations.

Concerning the participation of organic osmolytes in *E. mactroides* IIR - in general - they did not appear to be widely recruited for the maintenance of cytoplasmic equilibrium in both osmotic shocks to which estuarine bivalves were submitted. In view of this, we concluded that to maintain the cellular volume provoked before the hyper- or hyposmotic medium, only the inorganic osmolytes remained in distinct cytoplasmic concentrations according to the salinity experienced by the mantle tissues and gills of lagoon cockle (Fig. 7b). Although most data indicate that osmoconformers cells utilize a pool of free intracellular amino acids as the substantial source of solute for osmotic equilibrium, there is evidence that inorganic osmolytes are also used as effectors in these cells (Pierce, 1982).

From the marine environment, a classic profile expected for the species that inhabit this niche is based on the use of organic osmolytes to maintain osmotic cellular concentration (Yancey, 2005). Here, the exposure of *A. mactroides* to hyperosmotic shock caused a significant increase in the concentration of free amino acids only in the muscular tissue of the marine species, although there is also a slight tendency in the mantle and gills to present higher intracellular concentrations of these organic osmolytes after exposure to hyperosmotic salinity (Fig. 7c). In addition to these effects, the aforementioned treatment also caused an increase in the tissue Na^+ content of the mantle, adductor muscle and gills (Fig. 6abc), being more representative than the variations observed in the content of free amino acids. Such observations were inversely observed after the animals were submitted to hyposmotic condition. Regarding these findings, Carregosa and collaborators (2014) pointed out that in relation to the marine environment, organisms reach the osmotic equilibrium mainly with Na^+ . Berger and Kharazova (1997) further recognize the key role played by cation Na^+ in the osmotic regulation of organisms exposed to changes in external salinity.

Based on the physiological patterns experimentally verified in *C. largillierii*, *E. mactroides* and *A. mactroides* we concluded that species was osmotic conformators under salinities tested. Furthermore, we can conclude that the bivalves species used inorganic osmotic effectors in view of the IIR of the evaluated tissues. Although in a different way in the three evaluated species, after exposure to the experimental conditions, *C. largillierii* was prone to the use of inorganic osmolytes (Na^+ , K^+ and Cl^-), as well as - to a lesser extent - organic ones as well. On the other hand, *E. mactroides* used only the Na^+ and K^+

ions, while *A. mactroides* specifically recruited Na⁺ ions, as well as very low amounts of amino acids as effectors for its regulation.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. Ricardo Berteaux Robaldo (IB-UFPel), Dr. Leonir André Colling (IO-FURG) and MSc. Fernanda Chaves Lopes for their collaboration in the effort to collect freshwater, estuarine and marine specimens, as well as the Laboratory of Phytoplankton and Marine Microorganisms (IO - FURG) for the microalgae donation used to maintain the bivalves of this study. We are also grateful to Dr. Patrícia Costa, Dr. Ana Laura Escarrone and Dr. Micheli Castro for the contributions together with photometric and amino acid analyzes. This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Finance Code 001.

REFERENCES

- Allen, J.A., Garrett, M.R., 1972. Studies on taurine in the euryhaline bivalve *Mya arenaria*. *Comparative Biochemistry and Physiology -- Part A: Physiology* 41, 307–317. [https://doi.org/10.1016/0300-9629\(72\)90062-X](https://doi.org/10.1016/0300-9629(72)90062-X)
- Amado, E.M., Freire, C.A., Souza, M.M., 2006. Osmoregulation and tissue water regulation in the freshwater red crab *Dilocarcinus pagei* (Crustacea, Decapoda), and the effect of waterborne inorganic lead. *Aquatic Toxicology* 79, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2006.04.003>
- Amado, E.M., Vidolin, D., Freire, C.A., Souza, M.M., 2011. Distinct patterns of water and osmolyte control between intertidal (*Bunodosoma caissarum*) and subtidal (*Anemonia sargassensis*) sea anemones. *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology* 158, 542–551. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2010.12.019>
- Babarro, J.M.F., Fernández Reiriz, M.J., Labarta, U., Garrido, J.L., 2011. Variability of the total free amino acid (TFAA) pool in *Mytilus galloprovincialis* cultured on a raft system. Effect of body size. *Aquaculture Nutrition* 17, e448–e458. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2010.00781.x>
- Baginski, R., Pierce Jr, S., 1978. A comparison of amino acid accumulation during high salinity adaptation with anaerobic metabolism in the ribbed mussel, *Modiolus dernissus dernissus*. *The Journal of Experimental Zoology* 203, 419–428.
- Beadle, L.C., 1957. Comparative physiology: osmotic and ionic regulation in aquatic animals. *Annual review of physiology* 19, 329–358.
- Berger, V.J., Kharazova, A.D., 1997. Mechanisms of salinity adaptations in marine molluscs. *Hydrobiologia* 355, 115–126.

Berger, V.Ya., Khlebovich, V.V., Kovaleva, N.M., Natochin, Yu.V., 1978. The changes of ionic composition and cell volume during adaptation of molluscs (*Littorina*) to lowered salinity. *Comparative Biochemistry and Physiology -- Part A: Physiology* 60, 447–452. [https://doi.org/10.1016/0300-9629\(78\)90015-4](https://doi.org/10.1016/0300-9629(78)90015-4)

Burg, M.B., Ferraris, J.D., 2008. Intracellular Organic Osmolytes: Function and Regulation. *Journal of Biological Chemistry* 283, 7309–7313. <https://doi.org/10.1074/jbc.R700042200>

Burg, M.B., Ferraris, J.D., Dmitrieva, N.I., 2007. Cellular Response to Hyperosmotic Stresses. *Physiological Reviews* 87, 1441–1474. <https://doi.org/10.1152/physrev.00056.2006>

Carregosa, V., Figueira, E., Gil, A.M., Pereira, S., Pinto, J., Soares, A.M.V.M., Freitas, R., 2014. Tolerance of *Venerupis philippinarum* to salinity: osmotic and metabolic aspects. *Comparative Biochemistry and Physiology A* 171, 36–43. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2014.02.009>

Carvalho, Y., Romano, L., Poersch, L., 2015. Effect of low salinity on the yellow clam *Mesodesma mactroides*. *Brazilian Journal of Biology* 75, 8–12. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.03213>

Chamberlin, M.E., Strange, K., 1989. Anisosmotic cell volume regulation: a comparative view. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 257, C159–C173. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1989.257.2.C159>

Costa, C.J., Pritchard, A.W., 1978. The response of *Mytilus edulis* to short duration hypoosmotic stress. *Comparative Biochemistry and Physiology -- Part A: Physiology* 61, 149–155. [https://doi.org/10.1016/0300-9629\(78\)90292-X](https://doi.org/10.1016/0300-9629(78)90292-X)

Coughlan, B.M., Moroney, G.A., Pelt, F.N.A.M. v., O'Brien, N.M., Davenport, J., O'Halloran, J., 2009. The effects of salinity on the Manila clam (*Ruditapes philippinarum*) using the neutral red retention assay with adapted physiological saline solutions. *Marine Pollution Bulletin* 58, 1680–1684. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2009.06.020>

De Lisle, P.F., Roberts, M.H., 1988. The effect of salinity on cadmium toxicity to the estuarine mysid *Mysidopsis bahia*: role of chemical speciation. *Aquatic Toxicology* 12, 357–370. [https://doi.org/10.1016/0166-445X\(88\)90062-8](https://doi.org/10.1016/0166-445X(88)90062-8)

Deaton, L., 2009. Osmotic and Ionic Regulation in Molluscs, in: Evans, D.H. (Ed.), *Osmotic and Ionic Regulation: Cells and Animals*. CRC Press, Boca Raton, FL - USA, pp. 107–134.

Deaton, L.E., 1994. Hypoosmotic volume regulation in bivalves: Protein kinase C and amino acid release. *Journal of Experimental Zoology* 268, 145–150. <https://doi.org/10.1002/jez.1402680212>

Deaton, L.E., 1981. Ion Regulation in Freshwater and Brackish Water Bivalve Mollusks. *Physiological Zoology* 54, 109–121. <https://doi.org/10.1086/physzool.54.1.30155809>

Deaton, L.E., Derby, J.G.S., Subhedar, N., Greenberg, M.J., 1989. Osmoregulation and salinity tolerance in two species of bivalve mollusc: *Limnoperna fortunei* and *Mytilopsis leucophaeta*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 133, 67–79. [https://doi.org/10.1016/0022-0981\(89\)90158-5](https://doi.org/10.1016/0022-0981(89)90158-5)

Deaton, L.E., Pierce Jr, S., 1994. Introduction: Cellular Volume Regulation-Mechanisms and Control. *The Journal of Experimental Zoology* 268, 77–79.

Dietz, T.H., 1979. Uptake of sodium and chloride by freshwater mussels. *Canadian Journal of Zoology*. 156–160.

Dietz, T.H., Neufeld, D.H., Silverman, H., Wright, S.H., 1998. Cellular volume regulation in freshwater bivalves. *Journal of Comparative Physiology - B Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology* 168, 87–95. <https://doi.org/10.1007/s003600050124>

Dietz, T.H., Wilcox, S.J., Silverman, H., Byrne, R.A., 1997. Effects of hyperosmotic challenge on the freshwater bivalve *Dreissena polymorpha*: importance of K⁺. *Canadian Journal of Zoology* 75, 697–705. <https://doi.org/10.1139/z97-090>

Faria, S.C., Augusto, A.S., McNamara, J.C., 2011. Intra- and extracellular osmotic regulation in the hololimnetic Caridea and Anomura: a phylogenetic perspective on the conquest of fresh water by the decapod Crustacea. *Journal of Comparative Physiology B* 181, 175–186. <https://doi.org/10.1007/s00360-010-0522-6>

Fisher, G.H., Arias, I., Quesada, I., D’Aniello, S., Errico, F., Di Fiore, M.M., D’Aniello, A., 2001. A fast and sensitive method for measuring picomole levels of total free amino acids in very small amounts of biological tissues. *Amino Acids* 163–173.

Freire, C.A., Souza-Bastos, L.R., Amado, E.M., Prodocimo, V., Souza, M.M., 2013. Regulation of Muscle Hydration Upon Hypo- or Hyper-Osmotic Shocks: Differences Related to Invasion of the Freshwater Habitat by Decapod Crustaceans: FRESHWATER INVASION AND MUSCLE HYDRATION. *J. Exp. Zool.* 319, 297–309. <https://doi.org/10.1002/jez.1793>

Fyhn, H.J., 1976. A note on the hyperosmotic regulation in the brackish-water clam *Rangia cuneata*. *Journal of Comparative Physiology - B* 107, 159–167. <https://doi.org/10.1007/BF00691222>

Gainey Jr., L.F., Greenberg, M.J., 1977. Physiological basis of the species abundance-salinity relationship in molluscs: A speculation. *Marine Biology* 40, 41–49. <https://doi.org/10.1007/BF00390626>

Gharbi, A., Farcy, E., Van Wormhoudt, A., Denis, F., 2016. Response of the carpet shell clam (*Ruditapes decussatus*) and the Manila clam (*Ruditapes philippinarum*) to salinity stress. *Biologia (Poland)* 71, 551–562. <https://doi.org/10.1515/biolog-2016-0072>

Henry, R.P., Mangum, C.P., Webb, K.L., 1980. Salt and water balance in the oligohaline clam, *Rangia cuneata* II. Accumulation of intracellular free amino acids during high salinity adaptation. *Journal of Experimental Zoology* 211, 11–24. <https://doi.org/10.1002/jez.1402110103>

Hosoi, M., Kutoba, S., Toyohara, M., Toyohara, H., Hayashi, I., 2003. Effect of salinity change on free amino acid content in Pacific oyster. *Fisheries Science* 69, 395–400.

Hosoi, M., Yoshinaga, Y., Toyohara, M., Shiota, F., Toyohara, H., 2008. Freshwater bivalve *Corbicula sandai* uses free amino acids as osmolytes under hyperosmotic condition. *Fisheries Science* 74, 1339–1341. <https://doi.org/10.1111/j.1444-2906.2008.01662.x>

Ivanovici, A.M., Rainer, S.F., Wadley, V.A., 1981. Free amino acids in three species of mollusc: Responses to factors associated with reduced salinity. *Comparative Biochemistry and Physiology -- Part A: Physiology* 70, 17–22. [https://doi.org/10.1016/0300-9629\(81\)90386-8](https://doi.org/10.1016/0300-9629(81)90386-8)

Jordan, P.J., Deaton, L.E., 1999. Osmotic regulation and salinity tolerance in the freshwater snail *Pomacea bridgesi* and the freshwater clam *Lampsilis teres*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 122, 199–205. [https://doi.org/10.1016/S1095-6433\(98\)10167-8](https://doi.org/10.1016/S1095-6433(98)10167-8)

Keen, A.M., Casey, R., 1969. Family Corbiculidae, Gray, 1847, in: *Treatise on Invertebrate Paleontology*. Geological Society of America, Boulder, CO, pp. 665–669.

Kinne, O., 1966. Physiological aspects of animal life in estuaries with special reference to salinity. *Netherlands Journal of Sea Research* 3, 222–244. [https://doi.org/10.1016/0077-7579\(66\)90013-5](https://doi.org/10.1016/0077-7579(66)90013-5)

Kinne, R.K., 1993. The role of organic osmolytes in osmoregulation: from bacteria to mammals. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology* 265, 346–355.

Koivusalo, M., Kapus, A., Grinstein, S., 2009. Sensors, transducers, and effectors that regulate cell size and shape. *The Journal of Biological Chemistry* 284, 6595–6599. <https://doi.org/10.1074/jbc.R800049200>

Kube, S., Gerber, A., Jansen, J.M., Schiedek, D., 2006. Patterns of organic osmolytes in two marine bivalves, *Macoma balthica*, and *Mytilus spp.*, along their European distribution. *Marine Biology* 149, 1387–1396. <https://doi.org/10.1007/s00227-006-0303-7>

Kultz, D., 2000. Osmotic regulation of DNA activity and the cell cycle, in: Storey, J.M., Storey, K.B. (Eds.), *Environmental Stressors and Gene Responses*. Elsevier, pp. 157–179.

Larsen, E.H., Deaton, L.E., Onken, H., O'Donnell, M., Grosell, M., Dantzler, W.H., Weihrauch, D., 2014. Osmoregulation and Excretion. *Comprehensive Physiology* 4. <https://doi.org/10.1002/cphy.c130004>

Livingstone, D.R., Widdows, J., Fieth, P., 1979. Aspects of nitrogen metabolism of the common mussel *Mytilus edulis*: Adaptation to abrupt and fluctuating changes in salinity. *Marine Biology* 53, 41–55. <https://doi.org/10.1007/BF00386528>

Lynch, M.P., Wood, L., 1966. Effects of environmental salinity on free amino acids of *Crassostrea virginica* Gmelin. *Comparative Biochemistry and Physiology* 19, 783–790.

Mantel, L.H., Farmer, L.L., 1983. Osmotic and Ionic Regulation, in: *Internal Anatomy and Physiological Regulation*. Elsevier, pp. 53–161. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-106405-1.50013-8>

Matsushima, O., Kado, Y., 1982. Hyperosmoticity of the mantle fluid in the freshwater bivalve, *Anodonta woodiana*. *Journal of Experimental Zoology* 221, 379–381. <https://doi.org/10.1002/jez.1402210314>

Matsushima, O., Katayama, H., Yamada, K., 1987. The capacity for intracellular osmoregulation mediated by free amino acids in three bivalve molluscs. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 109, 93–99. [https://doi.org/10.1016/0022-0981\(87\)90187-0](https://doi.org/10.1016/0022-0981(87)90187-0)

McFarland, K., Donaghy, L., Volety, A.K., 2013. Effect of acute salinity changes on hemolymph osmolality and clearance rate of the non-native mussel, *Perna viridis*, and the native oyster, *Crassostrea virginica*, in Southwest Florida. *Aquatic Invasions* 8, 299–310. <https://doi.org/10.3391/ai.2013.8.3.06>

McMahon, R.F., 1983. Ecology of an invasive pest bivalve, *Corbicula*, in: Russell-Hunter, W.D. (Ed.), *The Mollusca*. Academic Press, New York, pp. 505–561.

Murphy, W.A., Dietz, T.H., 1976. The Effects of Salt Depletion on Blood and Tissue Ion Concentrations in the Freshwater Mussel, *Ligumia subrostrata* (Say). *Journal of Comparative Physiology B* 108, 233–242.

Nie, H., Jiang, L., Chen, P., Huo, Z., Yang, F., Yan, X., 2017. High throughput sequencing of RNA transcriptomes in *Ruditapes philippinarum* identifies genes involved in osmotic stress response. *Scientific Reports* 7, 4953. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-05397-8>

Odebrecht, C., Bergesch, M., Rörig, L.R., Abreu, P.C., 2010. Phytoplankton Interannual Variability at Cassino Beach, Southern Brazil (1992–2007), with Emphasis on the Surf Zone Diatom *Asterionellopsis glacialis*. *Estuaries and Coasts* 33, 570–583. <https://doi.org/10.1007/s12237-009-9176-6>

Oglesby, L.C., 1981. Volume regulation in aquatic invertebrates. *Journal of Experimental Zoology* 215, 289–301. <https://doi.org/10.1002/jez.1402150307>

Otto, J., Pierce, S.K., 1981. Water balance systems of *Rangia cuneata*: ionic and amino acid regulation in changing salinities. *Marine Biology* 61, 185–192. <https://doi.org/10.1007/BF00386658>

Pierce Jr, S., 1971. Volume regulation and valve movements by marine mussels. *Comparative Biochemistry and Physiology* 39A, 103–117.

Pierce, S.K., 1982. Invertebrate cell volume control mechanisms: a coordinated use of intracellular amino acids and inorganic ions as osmotic solute. *The Biological Bulletin* 163, 405–419.

Pierce, S.K., 1970. The water balance of *Modiolus* (Mollusca: Bivalvia: Mytilidae): Osmotic concentrations in changing salinities. *Comparative Biochemistry and Physiology* 36, 521–533. [https://doi.org/10.1016/0010-406X\(70\)91028-5](https://doi.org/10.1016/0010-406X(70)91028-5)

Pinheiro, J., Bates, D., DebRoy, S., Sarkar, D., R Core Team, 2016. nlme: Linear and Nonlinear Mixed Effects Models. R package version 3 1–128.

Potts, W., 1968. Osmotic and ionic regulation. *Annual Review of Physiology* 30, 73–104.

Rivera-Ingraham, G.A., Lignot, J.-H., 2017. Osmoregulation, bioenergetics and oxidative stress in coastal marine invertebrates: Raising the questions for future research. *Journal of Experimental Biology* 220, 1749–1760. <https://doi.org/10.1242/jeb.135624>

Ruiz, J.L., Souza, M.M., 2008. Osmotic stress and muscle tissue volume response of a freshwater bivalve. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 151, 399–406. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2007.03.028>

Shumway, S., 1977. Effect of salinity fluctuation on the osmotic pressure and Na⁺, Ca²⁺ and Mg²⁺ ion concentration in the hemolymph of bivalve molluscs. *Marine Biology* 41, 153–177.

Strange, K., 2004. Cellular volume homeostasis. *AJP: Advances in Physiology Education* 28, 155–159. <https://doi.org/10.1152/advan.00034.2004>

Verdelhos, T., Marques, J.C., Anastácio, P., 2015. The impact of estuarine salinity changes on the bivalves *Scrobicularia plana* and *Cerastoderma edule*, illustrated by behavioral and mortality responses on a laboratory assay. *Ecological Indicators* 52, 96–104. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2014.11.022>

Wijayasinghe, Y.S., Tyagi, S., Poddar, N.K., 2017. Regulation of Cell Volume by Osmolytes, in: Singh, L.R., Dar, T.A. (Eds.), *Cellular Osmolytes*. Springer Nature, Singapore, pp. 195–228.

Yancey, P.H., 2005. Organic osmolytes as compatible, metabolic and counteracting cytoprotectants in high osmolarity and other stresses. *Journal of Experimental Biology* 208, 2819–2830. <https://doi.org/10.1242/jeb.01730>

Zinchenko, T.D., Golovatyuk, L.V., 2013. Salinity tolerance of macroinvertebrates in stream waters (review). *Arid Ecosystems* 3, 113–121. <https://doi.org/10.1134/S2079096113030116>

SEÇÃO 5 • MÉTODOS COMPARATIVOS FILOGENÉTICOS

Considerações acerca da análise:

A presença de sinal filogenético foi significativa apenas para o K^+ na hemolinfa ($I=0.18$; $p=0.02$), o que significa que espécies intimamente relacionadas apresentam valores semelhantes de K^+ . Por outro lado, os traços fisiológicos de osmolalidade da hemolinfa e as concentrações de Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} e Cl^- não foram significativamente relacionadas à filogenia ($-0.14 \leq I \leq 0.31$; $p > 0.05$). Em relação à salinidade do habitat, as espécies aqui avaliadas não manifestam valores semelhantes ($0.06 = I \leq 0.19$; $0.09 = p \leq 0.35$), sugerindo uma maior diversificação de nichos osmóticos.

Essa ausência de efeito filogenético significativo é reforçada pela correlação evolutiva entre todas as características fisiológicas com a salinidade do habitat (PGLS, $6.5 \leq F \leq 862.7$; $p \leq 0.03$; $1.9 \leq \alpha \leq 934$): espécies de maiores salinidades tendem a apresentar valores mais elevados de osmolalidade (Fig. 12). É importante notar, no entanto, que alguns clados apresentam estruturação filogenética, como aqueles formados por *Mytilus edulis*, *Perna perna*, *Modiolus modiolus*, *Crassostrea gigas*, *Crassostrea virginica*, *Pinctada margaritifera* e *Aequipecten opercularis*. Nessa linhagem, há uma grande consistência entre os valores de osmolalidade da hemolinfa (940-1003 mOsm/kg H₂O), com exceção de *P. margaritifera*, que apresenta menor osmolalidade da hemolinfa (31.8 mOsm/kg H₂O) e menor salinidade do habitat (0 ‰) comparada à osmolalidade da hemolinfa ancestral estimada em 745 mOsm/kg de H₂O, bem como a osmolalidade do habitat ancestral estimada em 24 ‰ (706 mOsm/kg H₂O). Da mesma forma, percebemos que espécies com quantidades menores de cátion (Na^+) tendem a também mostrar valores mais baixos do ânion (Cl^-) (Fig. 13). Isto foi observado após a realização de uma análise de correlação evolutiva entre as concentrações de Na^+ e Cl^- na hemolinfa (PGLS, $F = 314.9$, $p < 0.0001$; $\alpha = 0.83$) – os quais constituem-se como os principais osmólitos inorgânicos do fluido hemolinfático.

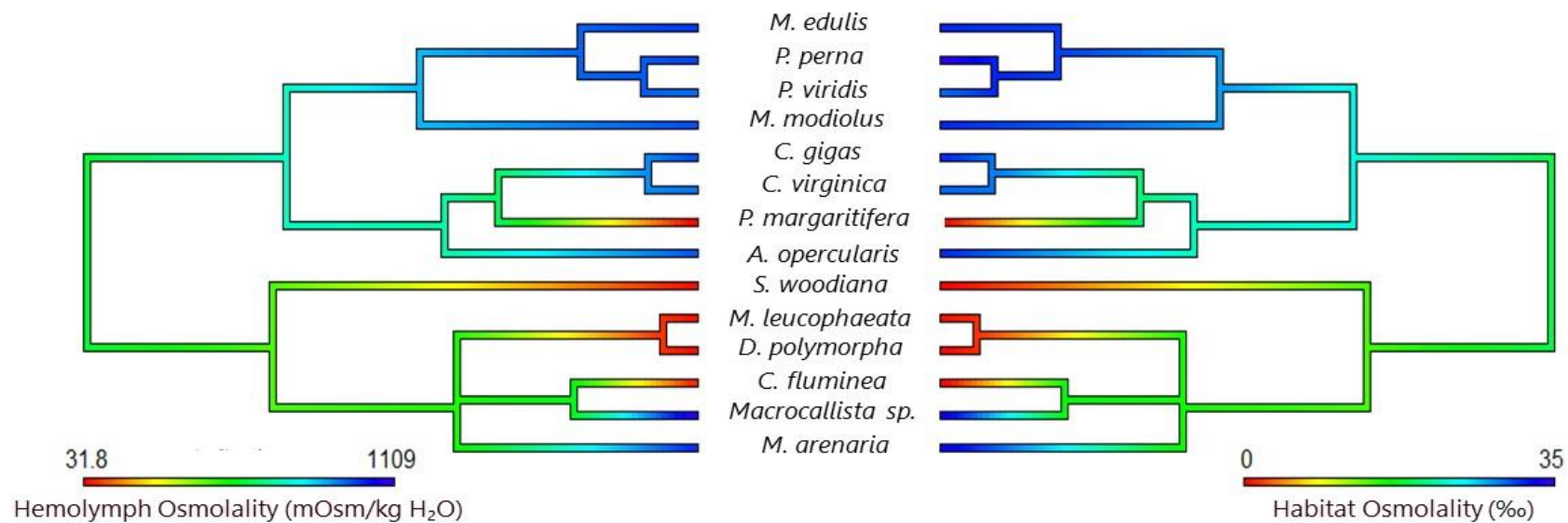


Figura 12 – Estimativa dos estados ancestrais de alguns representantes da Classe Bivalvia, por análise de máxima verossimilhança, para osmolalidade da hemolinfa (mOsm/kg H₂O; painel esquerdo) e osmolalidade do habitat (‰; painel direito). Ambos os traços são positivamente correlacionados (PGLS, $F = 5133.4$, $p < 0.0001$, $\alpha = 64.4$). *Corbicula largillierti*, *Erodona mactroides* and *Amarilladesma mactroides* não estão presentes nas filogenias assumidas aqui.

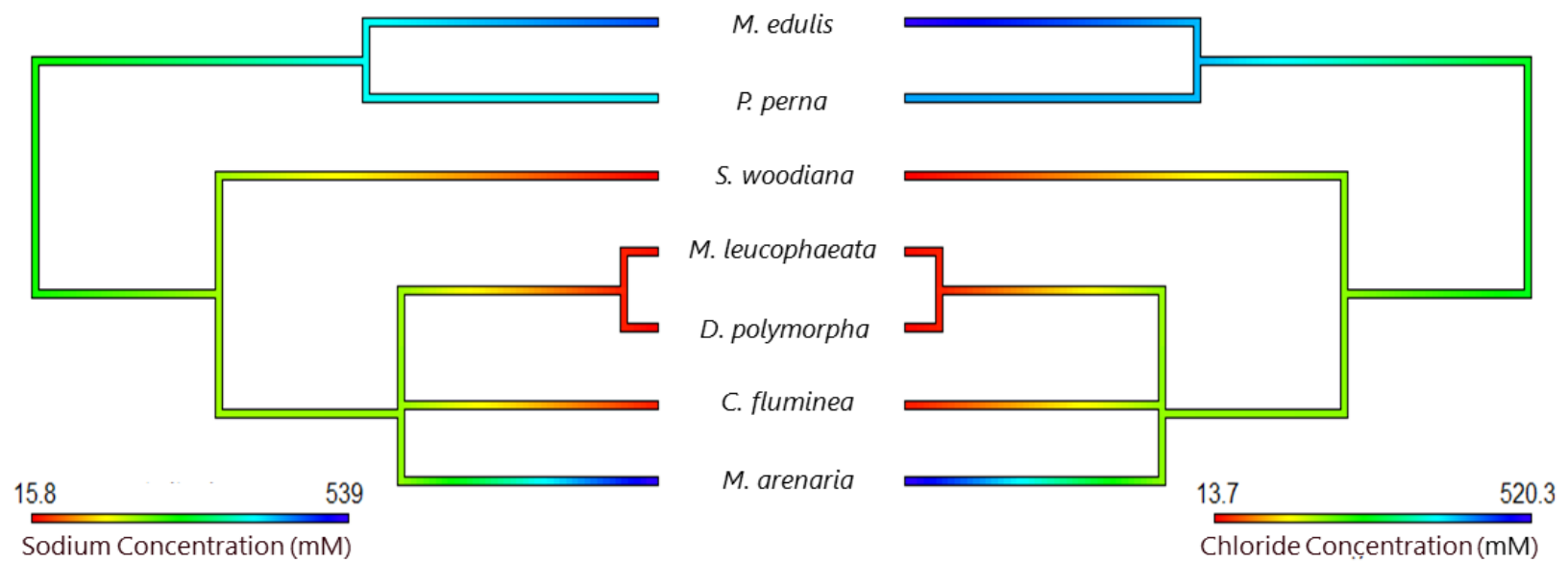


Figura 13 – Estimativa dos estados ancestrais de alguns representantes da classe Bivalvia, por análise de máxima verossimilhança, para concentração de sódio (mM; painel esquerdo) e concentração de cloretos (mM; painel direito). Ambos os traços são positivamente correlacionados (PGLS, $F = 314.9$, $p < 0.0001$; $\alpha = 0.83$). *Corbicula largillierti*, *Erodona mactroides* and *Amarilladesma mactroides* não estão presentes nas filogenias assumidas aqui.

SEÇÃO 6 • DISCUSSÃO GERAL

Muito embora os conhecimentos acerca da homeostase osmo-iônica e as consequências da variação da salinidade ambiental sobre moluscos bivalves sejam abordadas por diversos autores, (e.g. Beadle, 1957; Berger et al., 1978; Carvalho, 2015; Coughlan et al., 2009; Jordan e Deaton, 1999; Pierce, 1970), ainda assim tais investigações encontram-se unicamente pautadas em um intervalo salino em especial, em um conjunto restrito de espécies tendo em vista a diversidade da Classe Bivalvia, bem como na avaliação de parâmetros osmorregulatórios específicos e isolados. Nesse sentido, as respostas fisiológicas diante dos cenários osmóticos experimentados (hipo- e/ou hiperosmóticos) pelas espécies de bivalves dulcícola *Corbicula largillietii* (berbigão asiático roxo), estuarina *Erodona mactroides* (berbigão de laguna) e marinha *Amarilladesma mactroides* (marisco branco) permitiram a observação de aspectos fisiológicos – devido ao seu caráter comparativo – até então não reportados para esses indivíduos.

No tocante das análises junto ao fluido extracelular e ao conteúdo de osmólitos teciduais dos moluscos bivalves avaliados, destacam-se aspectos importantes acerca da contribuição desses solutos como efetores nesse último compartimento (intracelular). Nesse sentido, a colaboração dos osmólitos inorgânicos (Na^+ , K^+ e Cl^-) na RII - diante das condições osmóticas aos quais o berbigão Asiático roxo (*C. largillietii*), o berbigão de laguna (*E. mactroides*) e o marisco branco (*A. mactroides*) foram submetidos - apresentam-se significativamente mais elevados quando comparadas aos seus conteúdos de aminoácidos respectivos. Diante disso, a presente observação tem por consequência os valores brutos de cada medida, sendo eles exemplificados no tecido do manto das três espécies investigadas: manto de *C. largillietii* ($[\text{Na}^+]_{\text{teci dual } 15\text{‰}} = 6.94 \pm 0.80 \text{ mM/mg massa seca}$; $[\text{K}^+]_{\text{teci dual } 15\text{‰}} = 0.55 \pm 0.17 \text{ mM/mg massa seca}$; $[\text{Cl}^-]_{\text{teci dual } 15\text{‰}} = 20.16 \pm 1.9 \text{ mM/mg massa seca}$; $[\text{FAA}]_{\text{teci dual } 15\text{‰}} = 59.35 \text{ }\mu\text{M/mg massa seca} \pm 5.85$); manto de *E. mactroides* ($[\text{Na}^+]_{\text{teci dual } 14\text{‰}} = 5.57 \text{ mM/mg massa seca} \pm 0.20$; $[\text{K}^+]_{\text{teci dual } 14\text{‰}} = 0.54 \text{ mM/mg massa seca} \pm 0.09$; $[\text{Cl}^-]_{\text{teci dual } 14\text{‰}} = 18.87 \text{ mM/mg massa seca} \pm 1.89$; $[\text{FAA}]_{\text{teci dual } 14\text{‰}} = 40.92 \text{ }\mu\text{M/mg massa seca} \pm 5.47$) e manto de *A. mactroides* ($[\text{Na}^+]_{\text{teci dual } 35\text{‰}} = 2.83 \text{ mM/mg massa seca} \pm 0.09$; $[\text{K}^+]_{\text{teci dual } 35\text{‰}} = 0.12 \text{ mM/mg massa seca} \pm 0.006$; $[\text{Cl}^-]_{\text{teci dual } 35\text{‰}} = 3.40 \text{ mM/mg massa seca} \pm 0.65$; $[\text{FAA}]_{\text{teci dual } 35\text{‰}} = 74.65 \text{ }\mu\text{M/mg massa seca} \pm 15.15$).

Para além dos aspectos mencionados no início desta seção, acrescenta-se também que os estudos apontados encontram-se distanciados de um contexto comparativo

interespecífico. Em vista disso e com a finalidade de executar uma prática correta no estudo da fisiologia comparativa, buscou-se investigar os padrões fisiológicos observados correlacionando-os ao efeito ambiental ou à estruturação filogenética. A partir disso, foi adotada uma abordagem filofisiológica nessa pesquisa.

Com o uso de métodos comparativos filogenéticos, observou-se que a osmolalidade da hemolinfa nas salinidades naturalmente ocupadas não é filogeneticamente estruturada, o que significa que essa característica varia aleatoriamente entre as espécies avaliadas. Isto é reforçado através da correlação evolutiva com a osmolalidade do habitat (Fig. 12). Com base nisso, podemos inferir que a salinidade dirigiu a variabilidade osmótica do fluido hemolinfático, uma vez que espécies que ocupam ambientes com maiores salinidades tendem a apresentar, paralelamente, maior osmolalidade da hemolinfa. É importante notar que, apesar da ausência de um efeito significativo do sinal filogenético para este traço fisiológico, alguns clados apontam para a estruturação filogenética. Por outro lado, o perfil verificado em *P. margaritifera* (osmolalidade da hemolinfa = 31.8 mOsm/kg H₂O; salinidade do hábitat = 0 ‰, comparada à osmolalidade da hemolinfa ancestral estimada em 745 mOsm/kg de H₂O, bem como a osmolalidade do habitat ancestral estimada em 24 ‰), possivelmente indica que as espécies passaram a ocupar nichos osmóticos mais diluídos, indicando um desvio da tendência esperada para o clado em questão.

Ademais, do ponto de vista comparativo, espécies proximalmente relacionadas apresentam valores similares para o K⁺, o que indica possível conservação da concentração deste cátion na hemolinfa. Em contraste, os outros íons avaliados (Na⁺, Cl⁻, Mg²⁺ e Ca²⁺) não parecem estar estruturados na filogenia. Embora nenhum sinal filogenético significativo tenha sido observado para a concentração de Na⁺, é possível observar uma tendência em certos clados em apresentar valores mais elevados da hemolinfa. Por outro lado, considerando a fração correspondente aos íons Na⁺ e Cl⁻ na hemolinfa (cerca de 90%), as análises entre os dois caracteres fisiológicos revelam que não há estruturação filogenética entre elas. Desta forma, quando em salinidades naturais - espécies que possuem concentrações de Na⁺ mais baixas também apresentam menores concentrações de Cl⁻ (Fig. 13).

Diante do exposto, ainda que inicialmente tenham sido objetivadas algumas inferências evolutivas, limitações quanto a congruência dos dados fisiológicos gerados pela literatura incapacitaram análises mais profundas. Ao passo que inúmeras informações da RII em diferentes espécies de moluscos

bivalves foram obtidas (por meio da revisão sistemática realizada), o limitante para análise esteve no número reduzido de espécies disponíveis nas hipóteses filogenéticas, bem como a pouca variabilidade de nichos ocupados pelas mesmas, ambas fundamentais para alusão de tais objetivos, impossibilitando-nos de inferir – de modo integrado – acerca dos principais osmólitos utilizados junto a RII.

Finalmente, para além dos pontos supracitados, mas ainda no que tange as dificuldades metodológicas enfrentadas ao longo dessa investigação, evidencia-se e entende-se como importante informação o período de publicação das produções aqui referenciadas. Diante disso, uma dificuldade inerente devido a esse cenário - constatado a partir da revisão sistemática realizada – foi manter mimimamente a atualização da bibliografia utilizada.

SEÇÃO 7 • CONCLUSÃO

A partir dos ensaios e análises realizadas, podemos concluir que as espécies de bivalves dulcícola *C. largillierii* (berbigão asiático roxo), estuarino *E. mactroides* (berbigão de laguna) e marinho *A. mactroides* (marisco branco) fizeram - em maior parte - uso de efetores osmóticos inorgânicos tendo em vista a RII dos tecidos avaliados. Ainda que de forma diferente nas três espécies avaliadas, após a exposição às condições experimentais, *C. largillierii* revelou-se propenso ao uso de osmólitos inorgânicos (Na^+ , K^+ e Cl^-), assim como - em menor medida - aos orgânicos também. Por outro lado, *E. mactroides* mostrou-se optar apenas pelos íons Na^+ e K^+ , enquanto *A. mactroides* recrutou os íons Na^+ , bem como baixíssimas concentrações de aminoácidos como efetores para sua regulação.

Através das análises comparativas conduzidas com representantes da Classe Bivalvia, concluímos que a salinidade ambiental desempenha um papel importante na concentração osmótica, bem como na concentração dos principais íons que compõem o fluido extracelular (Na^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} e Cl^-). Relativamente ao íon K^+ na hemolinfa, conclui-se acerca do importante papel desempenhado pela filogenia, uma vez que o sinal filogenético sobre esse traço fisiológico mostrou-se significativo. Dessa forma, é evidente a importância da ancestralidade compartilhada na variabilidade interespecífica do íon junto a classe animal investigada. Por fim, as observações aqui relatadas frente aos cenários osmóticos experimentados (hipo- e/ou hiperosmóticos) pelas espécies de bivalves, possibilitaram o relato e inferência de aspectos fisiológicos – devido ao seu caráter comparativo – até então não reportados para tal táxon.

REFERÊNCIAS

- Amado, E.M., Freire, C.A., Souza, M.M., 2006. Osmoregulation and tissue water regulation in the freshwater red crab *Dilocarcinus pagei* (Crustacea, Decapoda), and the effect of waterborne inorganic lead. *Aquatic Toxicology* 79, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2006.04.003>
- Augusto, A., Greene, L.J., Laure, H.J., McNamara, J.C., 2007a. The Ontogeny of Isosmotic Intracellular Regulation in the Diadromous, Freshwater Palaemonid Shrimps, *Macrobrachium Amazonicum* and *M. Olfersi* (Decapoda). *Journal of Crustacean Biology* 27, 626–634. <https://doi.org/10.1651/S-2796.1>
- Augusto, A., Greene, L.J., Laure, H.J., Mcnamara, J.C., 2007b. Adaptive shifts in osmoregulatory strategy and the invasion of freshwater by brachyuran crabs: evidence from *Dilocarcinus pagei* (Trichodactylidae). *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology* 307A, 688–698. <https://doi.org/10.1002/jez.a.422>
- Babarro, J.M.F., Fernández Reiriz, M.J., Labarta, U., Garrido, J.L., 2011. Variability of the total free amino acid (TFAA) pool in *Mytilus galloprovincialis* cultured on a raft system. Effect of body size. *Aquaculture Nutrition* 17, e448–e458. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2010.00781.x>
- Beadle, L., 1957. Comparative Physiology: Osmotic and ionic regulation in aquatic animals. *Annual Review of Physiology* 19, 329–358.
- Begon, S.J.M., Townsend, C.R., Harper, J.L., 2006. *Ecology from individuals to ecosystems*, 4th ed. Blackwell Publishing, Oxford.
- Bemvenuti, C.E., Rosa-Filho, J.S., 2000. Estrutura e dinâmica das associações de macroinvertebrados bentônicos dos ambientes estuarinos do Rio Grande do Sul: um estudo de caso. *Anais do Workshop: Avaliação e Ações Prioritárias para a Zona Costeira e Marinha* 49.
- Berger, V.J., Kharazova, A.D., 1997. Mechanisms of salinity adaptations in marine molluscs. *Hydrobiologia* 355, 115–126.
- Berger, V.Y., Khlebovich, V.V., Kovaleva, N., Natochin, Y.N., 1978. The changes of ionic composition and cell volume during adaptation of molluscs (*Littorina*) to lowered salinity. *Comparative Biochemistry and Physiology* 60a, 447–452.
- Burg, M.B., Ferraris, J.D., 2008. Intracellular Organic Osmolytes: Function and Regulation. *Journal of Biological Chemistry* 283, 7309–7313. <https://doi.org/10.1074/jbc.R700042200>
- Butler, M., King, A., 2004. Phylogenetic Comparative Analysis: A modeling approach for adaptive evolution. *The American Naturalist* 164, 683–695.
- Byrne, R.A., Dietz, T.H., 2006. Ionic and acid-base consequences of exposure to increased salinity in the zebra mussel, *Dreissena polymorpha*. *Biological Bulletin* 211, 66–75. <https://doi.org/10.2307/4134579>

- Camejo, M.P.M., 2015. Ensayos agudos con *Erodona mactroides* Bosc, 1801 (Bivalvia) del Río de la Plata, Uruguay: sobrevivencia frente a cambios de salinidad y evaluación de tasas de filtración (Trabalho de Conclusão de Curso - Licenciatura em Ciências Biológicas). Universidad de La República, Uruguay.
- Campos, E.J.D., 2014. O Papel do Oceano nas Mudanças Climáticas Globais. Rev. USP 55. <https://doi.org/10.11606/issn.2316-9036.v0i103p55-66>
- Carvalho, Y.B.M., 2015. Patologias que afetam o marisco branco *Mesodesma mactroides* (Bivalvia: Mesodesmatidae) (Doutorado). Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande.
- Chhabra, G., Chandra, N., Swaminathan, R., 2017. Osmolytes: Key Players in Regulating Protein Aggregation, in: Rajendrakumar Singh, L., Dar, T.A. (Eds.), Cellular Osmolytes. Springer Singapore, Singapore, pp. 97–119. https://doi.org/10.1007/978-981-10-3707-8_5
- Costa, C.J., Pritchard, A.W., 1978. The response of *Mytilus edulis* to short duration hypoosmotic stress. Comparative Biochemistry and Physiology -- Part A: Physiology 61, 149–155. [https://doi.org/10.1016/0300-9629\(78\)90292-X](https://doi.org/10.1016/0300-9629(78)90292-X)
- Coughlan, B.M., Moroney, G.A., Pelt, F.N.A.M. v., O'Brien, N.M., Davenport, J., O'Halloran, J., 2009. The effects of salinity on the Manila clam (*Ruditapes philippinarum*) using the neutral red retention assay with adapted physiological saline solutions. Marine Pollution Bulletin 58, 1680–1684. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2009.06.020>
- De Lisle, P.F., Roberts, M.H., 1988. The effect of salinity on cadmium toxicity to the estuarine mysid *Mysidopsis bahia*: role of chemical speciation. Aquatic Toxicology 12, 357–370. [https://doi.org/10.1016/0166-445X\(88\)90062-8](https://doi.org/10.1016/0166-445X(88)90062-8)
- Deaton, L.E., Derby, J.G.S., Subhedar, N., Greenberg, M.J., 1989. Osmoregulation and salinity tolerance in two species of bivalve mollusc: *Limnoperna fortunei* and *Mytilopsis leucophaeta*. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 133, 67–79. [https://doi.org/10.1016/0022-0981\(89\)90158-5](https://doi.org/10.1016/0022-0981(89)90158-5)
- Deaton, L.E., 1992. Osmoregulation and epithelial permeability in two euryhaline bivalve molluscs: *Mya arenaria* and *Geukensia demissa*. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 158, 167–177. [https://doi.org/10.1016/0022-0981\(92\)90224-x](https://doi.org/10.1016/0022-0981(92)90224-x)
- Deaton, L., 2009. Osmotic and Ionic Regulation in Molluscs, in: Evans, D.H. (Ed.), Osmotic and Ionic Regulation: Cells and Animals. CRC Press, Boca Raton, pp. 107–134.

- Dietz, T.H., Wilcox, S.J., Byrne, R.A., Lynn, J.W., Silverman, H., 1996. Osmotic and ionic regulation of North American zebra mussels (*Dreissena polymorpha*). *American Zoologist* 36, 364–372.
- Dietz, T.H., Wilcox, S.J., Silverman, H., Byrne, R.A., 1997. Effects of hyperosmotic challenge on the freshwater bivalve *Dreissena polymorpha* : importance of K⁺. *Canadian Journal of Zoology* 75, 697–705. <https://doi.org/10.1139/z97-090>
- Faria, S.C., Augusto, A.S., McNamara, J.C., 2011. Intra- and extracellular osmotic regulation in the hololimnetic Caridea and Anomura: a phylogenetic perspective on the conquest of fresh water by the decapod Crustacea. *Journal of Comparative Physiology B* 181, 175–186. <https://doi.org/10.1007/s00360-010-0522-6>
- Faria, S.C., Faleiros, R.O., Brayner, F.A., Alves, L.C., Bianchini, A., Romero, C., Buranelli, R.C., Mantelatto, F.L., McNamara, J.C., 2017. Macroevolution of thermal tolerance in intertidal crabs from Neotropical provinces: A phylogenetic comparative evaluation of critical limits. *Ecol Evol* 7, 3167–3176. <https://doi.org/10.1002/ece3.2741>
- Felsenstein, J., 1985. Phylogenies and the Comparative Method. *The American Naturalist* 125, 1–15.
- Fiori, S., Defeo, O., 2006. Biogeographic Patterns in Life-History Traits of the Yellow Clam, *Mesodesma mactroides*, in Sandy Beaches of South America. *Journal of Coastal Research* 224, 872–880. <https://doi.org/10.2112/04-0409.1>
- Fisher, G.H., Arias, I., Quesada, I., D’Aniello, S., Errico, F., Di Fiore, M.M., D’Aniello, A., 2001. A fast and sensitive method for measuring picomole levels of total free amino acids in very small amounts of biological tissues. *Amino Acids* 163–173.
- Fyhn, H.J., 1976. A note on the hyperosmotic regulation in the brackish-water clam *Rangia cuneata*. *Journal of Comparative Physiology - B* 107, 159–167. <https://doi.org/10.1007/BF00691222>
- Garland, T., Bennett, A.F., Rezende, E.L., 2005. Phylogenetic approaches in comparative physiology. *Journal of Experimental Biology* 208, 3015–3035.
- Garland, T., Ives, A.R., 2000. Using the Past to Predict the Present: Confidence Intervals for Regression Equations in Phylogenetic Comparative Methods. *The American Naturalist* 155, 346–364. <https://doi.org/10.1086/303327>
- Gazeau, F., Parker, L.M., Comeau, S., Gattuso, J.-P., O’Connor, W.A., Martin, S., Pörtner, H.-O., Ross, P.M., 2013. Impacts of ocean acidification on marine shelled molluscs. *Marine Biology* 160, 2207–2245. <https://doi.org/10.1007/s00227-013-2219-3>
- Guillard, R.R.L., 1975. Culture of Phytoplankton for Feeding Marine Invertebrates, in: Smith, W.L., Chanley, M.H. (Eds.), *Culture of Marine Invertebrate Animals*. Springer US, Boston, MA, pp. 29–60. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-8714-9_3

- Grafen, A., 1989. The phylogenetic regression. *Philosophical Transactions of the Royal Society London B* 326, 119–157. <https://doi.org/10.1098/rstb.1989.0106>
- Guo, X., He, Y., Zhang, L., Lelong, C., Jouaux, A., 2015. Immune and stress responses in oysters with insights on adaptation. *Fish and Shellfish Immunology* 46, 107–119. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.05.018>
- Hansen, T.F., Pienaar, J., Orzack, S.H., 2008. A Comparative Method For Studying Adaptation To A Randomly Evolving Environment. *Evolution* 1965-1977 <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2008.00412.x>
- Harmon, L.J., Weir, J.T., Brock, C.D., Glor, R.E., Challenger, W., 2008. GEIGER: investigating evolutionary radiations. *Bioinformatics* 24, 129–131. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm538>
- Helmuth, B., 1999. Thermal Biology of Rocky Intertidal Mussels: Quantifying Body Temperatures Using Climatological Data. *Ecology* 80, 15–34. [https://doi.org/10.1890/0012-9658\(1999\)080\[0015:TBORIM\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1890/0012-9658(1999)080[0015:TBORIM]2.0.CO;2)
- Henry, R.P., Mangum, C.P., Webb, K.L., 1980. Salt and water balance in the oligohaline clam, *Rangia cuneata* II. Accumulation of intracellular free amino acids during high salinity adaptation. *Journal of Experimental Zoology* 211, 11–24. <https://doi.org/10.1002/jez.1402110103>
- Hill, R.W., Wyse, G.A., Anderson, M., 2012. *Fisiologia Animal*, 2 ed. ed. Artmed, Porto Alegre.
- Hosoi, M., Yoshinaga, Y., Toyohara, M., Shiota, F., Toyohara, H., 2008. Freshwater bivalve *Corbicula sandai* uses free amino acids as osmolytes under hyperosmotic condition. *Fisheries Science* 74, 1339–1341. <https://doi.org/10.1111/j.1444-2906.2008.01662.x>
- Hoffmann, E.K., Dunham, P.B., 1995. Membrane mechanisms and intracellular signalling in cell volume regulation. *International Review of Cytology* 161, 173–262.
- Hoyaux, J., Gilles, R., Jeuniaux, C., 1976. Osmoregulation in molluscs of the intertidal zone. *Comparative Biochemistry and Physiology* 53A, 361–365.
- Jordan, P., Deaton, L.E., 1999. Osmotic regulation and salinity tolerance in the freshwater snail *Pomacea bridgesi* and the freshwater clam *Lampsilis teres*. *Comparative Biochemistry and Physiology* A122, 199–205.
- Jorge, M.B., Lauer, M.M., Martins, C.D.M.G., Bianchini, A., 2016. Impaired regulation of divalent cations with acute copper exposure in the marine clam *Mesodesma mactroides*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 179, 79–86. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2015.09.003>

- Kembel, S.W., Cowan, P.D., Helmus, M.R., Cornwell, W.K., Morlon, H., Ackerly, D.D., Blomberg, S.P., Webb, C.O., 2010. Picante: R tools for integrating phylogenies and ecology. *Bioinformatics* 26, 1463–1464. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq166>
- Kinne, O., 1966. Physiological aspects of animal life in estuaries with special reference to salinity. *Netherlands Journal of Sea Research* 3, 222–244. [https://doi.org/10.1016/0077-7579\(66\)90013-5](https://doi.org/10.1016/0077-7579(66)90013-5)
- Kinne, R.K., 1993. The role of organic osmolytes in osmoregulation: from bacteria to mammals. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology* 265, 346–355.
- Koivusalo, M., Kapus, A., Grinstein, S., 2009. Sensors, transducers, and effectors that regulate cell size and shape. *The Journal of Biological Chemistry* 284, 6595–6599. <https://doi.org/10.1074/jbc.R800049200>
- Knowles, G., Handlinger, J., Jones, B., Moltschaniwskyj, N., 2014. Hemolymph chemistry and histopathological changes in Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) in response to low salinity stress. *Journal of Invertebrate Pathology* 121, 78–84. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2014.06.013>
- Kultz, D., 2000. Osmotic regulation of DNA activity and the cell cycle, in: Storey, J.M., Storey, K.B. (Eds.), *Environmental Stressors and Gene Responses*. Elsevier Science, Amsterdam, pp. 157–179.
- Kumar, S., Stecher, G., Suleski, M., Heddes, S.B., 2017. TimeTree: A Resource for Timelines, Timetrees, and Divergence Times. *Molecular Biology and Evolution* 34, 1812–1819. <https://doi.org/10.1093/molbev/msx116>
- Kurihara, T., 2017. Tolerance of the bivalve *Trapezium liratum* (Reeve, 1843) to decrease in salinity. *Plankton and Benthos Research* 12, 44–52.
- Lane, E.B., Pekny, M., 2004. Stress Models for the Study of Intermediate Filament Function, in: *Methods in Cell Biology*. Elsevier, pp. 229–264. [https://doi.org/10.1016/S0091-679X\(04\)78009-7](https://doi.org/10.1016/S0091-679X(04)78009-7)
- Lang, F., Waldegger, S., 1997. Regulating Cell Volume. *American Scientist* 456–463.
- Lange, R., 1963. The osmotic function of amino acids and taurine in the mussel, *Mytilus edulis*. *Comparative Biochemistry and Physiology* 10, 173–179.
- Larsen, E.H., Deaton, L.E., Onken, H., O'Donnell, M., Grosell, M., Dantzler, W.H., Weihrauch, D., 2014. Osmoregulation and Excretion. *Comprehensive Physiology* 4. <https://doi.org/10.1002/cphy.c130004>
- Lavin, S.R., Karasov, W.H., Ives, A.R., Middleton, K.M., Garland Jr., T., 2008. Morphometrics of the Avian Small Intestine Compared with That of Nonflying Mammals: A Phylogenetic Approach. *Physiological and Biochemical Zoology* 81, 526–550. <https://doi.org/10.1086/590395>

- Leenaars, M., Hooijmans, C.R., van Veggel, N., ter Riet, G., Leeftang, M., Hooft, L., van der Wilt, G.J., Tillema, A., Ritskes-Hoitinga, M., 2012. A step-by-step guide to systematically identify all relevant animal studies. *Laboratory Animals* 46, 24–31. <https://doi.org/10.1258/la.2011.011087>
- Livingstone, D.R., Widdows, J., Fieth, P., 1979. Aspects of nitrogen metabolism of the common mussel *Mytilus edulis*: Adaptation to abrupt and fluctuating changes in salinity. *Marine Biology* 53, 41–55. <https://doi.org/10.1007/BF00386528>
- Lynch, M.P., Wood, L., 1966. Effects of environmental salinity on free amino acids of *Crassostrea virginica* Gmelin. *Comparative Biochemistry and Physiology* 19, 783–790.
- Matsushima, O., Kado, Y., 1982. Hyperosmoticity of the mantle fluid in the freshwater bivalve, *Anodonta woodiana*. *Journal of Experimental Zoology* 221, 379–381. <https://doi.org/10.1002/jez.1402210314>
- McFarland, K., Donaghy, L., Volety, A.K., 2013. Effect of acute salinity changes on hemolymph osmolality and clearance rate of the non-native mussel, *Perna viridis*, and the native oyster, *Crassostrea virginica*, in Southwest Florida. *Aquatic Invasions* 8, 299–310. <https://doi.org/10.3391/ai.2013.8.3.06>
- McNamara, J.C., Faria, S.C., 2012. Evolution of osmoregulatory patterns and gill ion transport mechanisms in the decapod Crustacea: a review. *Journal of Comparative Physiology B* 182, 997–1014. <https://doi.org/10.1007/s00360-012-0665-8>
- Neufeld, D., Wright, S., 1996. Salinity change and cell volume: the response of tissues from the estuarine mussel *Geukensia demissa*. *Journal of Experimental Biology* 199, 1619–1630.
- Odebrecht, C., Bergesch, M., Rörig, L.R., Abreu, P.C., 2010. Phytoplankton Interannual Variability at Cassino Beach, Southern Brazil (1992–2007), with Emphasis on the Surf Zone Diatom *Asterionellopsis glacialis*. *Estuaries and Coasts* 33, 570–583. <https://doi.org/10.1007/s12237-009-9176-6>
- Otto, J., Pierce, S.K., 1981. Water balance systems of *Rangia cuneata*: ionic and amino acid regulation in changing salinities. *Marine Biology* 61, 185–192. <https://doi.org/10.1007/BF00386658>
- Parker, L., Ross, P., O'Connor, W., Pörtner, H., Scanes, E., Wright, J., 2013. Predicting the Response of Molluscs to the Impact of Ocean Acidification. *Biology* 2, 651–692. <https://doi.org/10.3390/biology2020651>
- Péqueux, A., 1995. Osmotic Regulation in Crustaceans. *Journal of Crustacean Biology* 15, 1. <https://doi.org/10.2307/1549010>
- Pierce, S.K., 1970. The water balance of *Modiolus* (Mollusca: Bivalvia: Mytilidae): Osmotic concentrations in changing salinities. *Comparative Biochemistry and Physiology* 36, 521–533. [https://doi.org/10.1016/0010-406X\(70\)91028-5](https://doi.org/10.1016/0010-406X(70)91028-5)

- Piller, S., Henry, R., Doeller, J., Kraus, D., 1995. A comparison of the gill physiology of two euryhaline crab species, *Callinectes sapidus* and *Callinectes similis*: energy production, transport-related enzymes and osmoregulation as a function of acclimation salinity. *J. Exp. Biol.* 198, 349–358.
- Revell, L.J., 2010. Phylogenetic signal and linear regression on species data: Phylogenetic regression. *Methods in Ecology and Evolution* 1, 319–329. <https://doi.org/10.1111/j.2041-210X.2010.00044.x>
- Revell, L.J., 2012. phytools: an R package for phylogenetic comparative biology (and other things): phytools: R package. *Methods in Ecology and Evolution* 3, 217–223. <https://doi.org/10.1111/j.2041-210X.2011.00169.x>
- Rezende, E. L., Diniz-Filho, J. A. F., 2011. Phylogenetic analyses: comparing species to infer adaptations and physiological mechanisms. *Comprehensive Physiology*, 2(1), 639-674.
- Rivera-Ingraham, G.A., Lignot, J.-H., 2017. Osmoregulation, bioenergetics and oxidative stress in coastal marine invertebrates: Raising the questions for future research. *Journal of Experimental Biology* 220, 1749–1760. <https://doi.org/10.1242/jeb.135624>
- Rola, R.C., Souza, M.M., Sandrini, J.Z., 2017. Hypoosmotic stress in the mussel *Perna perna* (Linnaeus, 1758): Is ecological history a determinant for organismal responses? *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 189, 216–223. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2017.03.020>
- Rosa-Filho, J.S., Bemvenuti, C.E., 1998. Caracterización de las comunidades macrobentónicas de fondos blandos em regiones estuarinas de Rio Grande do Sul (Brasil). *Thalassas* 18, 43–56.
- Ruiz, J.L., Souza, M.M., 2008. Osmotic stress and muscle tissue volume response of a freshwater bivalve. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 151, 399–406. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2007.03.028>
- Santos, S.B., Thiengo, S.C., Fernandez, M.A., Miyahira, I.C., Gonçalves, I.C.B., Ximenes, R.F., Mansur, M.C., Pereira, D., 2012. Espécies de moluscos límnicos invasores no Brasil, in: Mansur, M.C.D., Santos, C.P., Pereira, D., Paz, I.C., Zurita, M.L., Rodriguez, M.T.R., Nehrke, M.V., Bergonci, P.E. (Eds.), *Moluscos Límnicos Invasores No Brasil: Biologia, Prevenção e Controle*. Redes Editora, Porto Alegre, pp. 25–50.
- Shakhmatova, E.I., Berger, V.Ya., Natochin, Yu.V., 2006. Cations in molluscan tissues at sharply different hemolymph osmolality. *Biology Bulletin* 33, 269–275. <https://doi.org/10.1134/S1062359006030095>
- Shumway, S., 1977. Effect of salinity fluctuation on the osmotic pressure and Na⁺, Ca²⁺ and Mg²⁺ ion concentration in the hemolymph of bivalve molluscs. *Marine Biology* 41, 153–177.

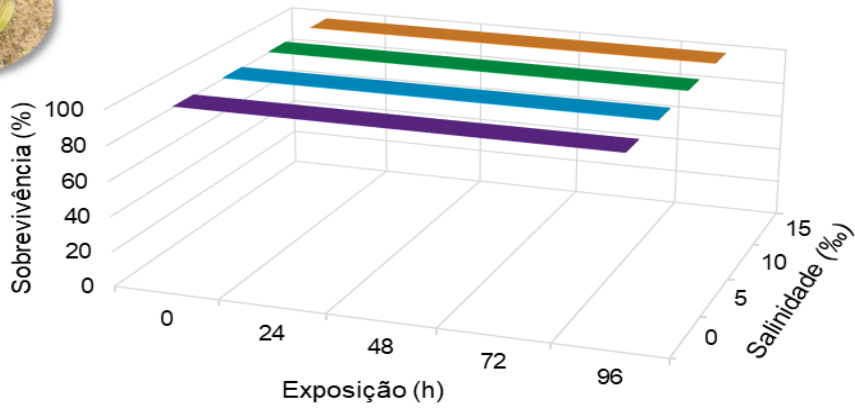
- Strange, K., 2004. Cellular volume homeostasis. *AJP: Advances in Physiology Education* 28, 155–159. <https://doi.org/10.1152/advan.00034.2004>
- Wehner, F., Olsen, H., Tinel, H., Kinne-Saffran, E., Kinne, R.K.H., 2003. Cell volume regulation: osmolytes, osmolyte transport, and signal transduction, in: *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 1–80. <https://doi.org/10.1007/s10254-003-0009-x>
- Wijayasinghe, Y.S., Tyagi, S., Poddar, N.K., 2017. Regulation of Cell Volume by Osmolytes, in: Singh, L.R., Dar, T.A. (Eds.), *Cellular Osmolytes*. Springer Nature, Singapore, pp. 195–228.
- Yancey, P.H., 2005. Organic osmolytes as compatible, metabolic and counteracting cytoprotectants in high osmolarity and other stresses. *Journal of Experimental Biology* 208, 2819–2830. <https://doi.org/10.1242/jeb.01730>
- Yancey, P.H., Clark, M.E., Hand, S.C., Bowlus, R.D., Somero, G.N., 1982. Living with water stress: evolution of osmolyte systems. *Science* 217, 1214–1222.
- Zatta, P., Cervellin, D., 1987. Hypo-osmotic stress in the bivalve mollusc *Callista chione* (LAM). *Monitore Zoologico Italiano - Italian Journal of Zoology* 21, 287–292. <https://doi.org/10.1080/00269786.1987.10736532>
- Zhang, J., Gilbert, D., Gooday, A.J., Levin, L., Naqvi, S.W.A., Middelburg, J.J., Scranton, M., Ekau, W., Peña, A., Dewitte, B., Oguz, T., Monteiro, P.M.S., Urban, E., Rabalais, N.N., Ittekkot, V., Kemp, W.M., Ulloa, O., Elmgren, R., Escobar-Briones, E., Van der Plas, A.K., 2010. Natural and human-induced hypoxia and consequences for coastal areas: synthesis and future development. *Biogeosciences* 7, 1443–1467. <https://doi.org/10.5194/bg-7-1443-2010>

APÊNDICE

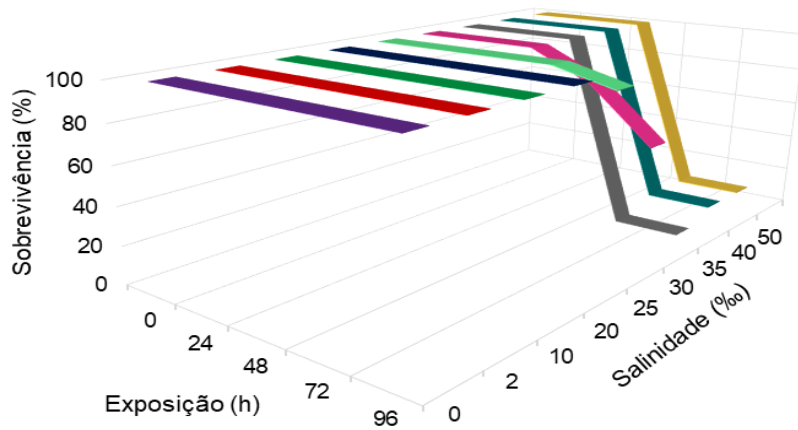
APÊNDICE A – Teste de Sobrevivência em Moluscos Bivalves



a. *Corbicula largillierti* - Espécie Dulcícola



b. *Erodona mactroides* - Espécie Estuarina



c. *Amarilladesma mactroides* - Espécie Marinha

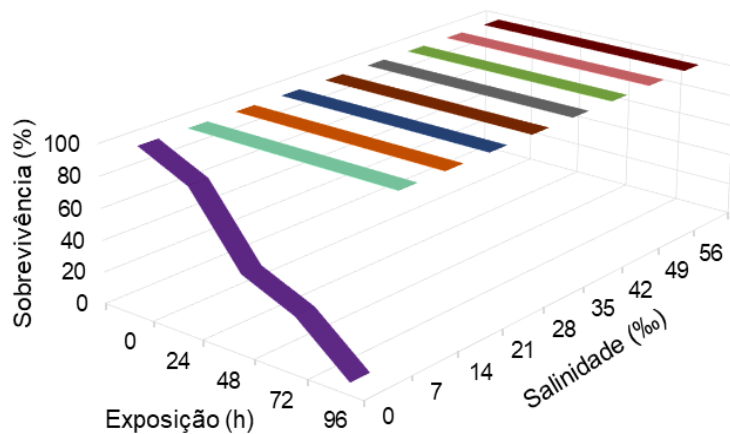


Figura 14 - Porcentagem de sobrevivência de (a) *Corbicula largillierti*, (b) *Erodona mactroides* e (c) *Amarilladesma mactroides* em diferentes concentrações osmóticas durante exposição aguda (96 h) ($5 \geq N \leq 14$).

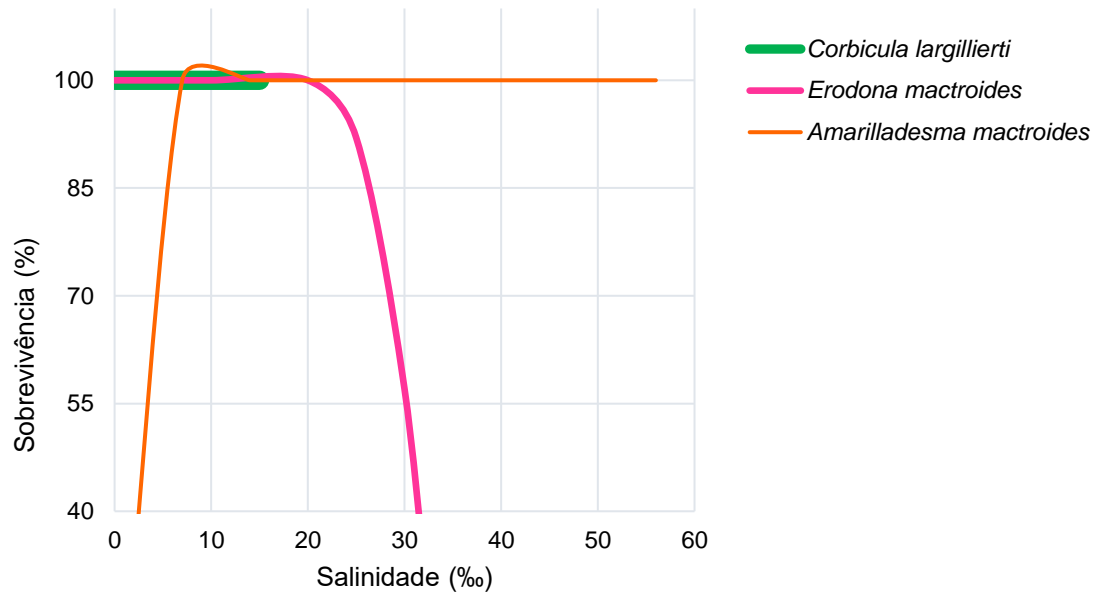


Figura 15 - Intervalos de tolerância osmótica das espécies dulcícola (linha verde), estuarina (linha rosa) e marinha (linha laranja).

APÊNCICE B - Fatores de diluição empregados para os íons sódio (Na⁺) e potássio (K⁺) nas amostras de água, hemolinfa e tecidos, de acordo com o tratamento e nicho osmótico habitado.

Nicho Osmótico	Material	Condição	Proporção - Na ⁺	Proporção - K ⁺
Dulcícola	Água Hemolinfa	Todos os tratamentos	1:150	1:50
	Manto Brânquias	Todos os tratamentos	1:15	1:15
Estuarino	Músculo	Todos os tratamentos	1:10	1:10
	Água Hemolinfa	Todos os tratamentos	1:150	1:60
	Manto Brânquias	Todos os tratamentos	1:15	1:15
	Músculo	Todos os tratamentos	1:10	1:10
Marinho	Água Hemolinfa	Todos os tratamentos	1:150	1:70
	Manto	21 ‰	1:30	1:30
	Manto	28 ‰	1:35	1:35
	Manto	35 ‰	1:45	1:45
	Músculo	Todos os tratamentos	1:10	1:10
	Brânquias	Todos os tratamentos	1:20	1:20

APÊNDICE C – Determinação da proporção de aminoácidos a partir de informações da literatura.

Nicho Osmótico/Tecido							
DULCÍCOLA - Brânquia	Total FAA	Taurina	%Tau	Alanina	%Ala	Glicina	%Gly
Jordan e Deaton, 1999	15,9	x	-	2,6	16,35	1,8	11,32
		MÉDIA	-	MÉDIA	<i>16,35</i>	MÉDIA	<i>11,32</i>
DULCÍCOLA - Manto	Total FAA	Taurina	%Tau	Alanina	%Ala	Glicina	%Gly
Deaton et al., 1989	6,5	2,3	35,38	0,7	10,76	1,5	23,07
Hosoi et al., 2008	5,23	Traço	-	0,85	16,25	0,15	2,86
		MÉDIA	<i>35,38</i>	MÉDIA	<i>13,51</i>	MÉDIA	<i>12,97</i>
		SD	-	SD	<i>3,87</i>	SD	<i>14,28</i>
DULCÍCOLA - Músculo	Total FAA	Taurina	%Tau	Alanina	%Ala	Glicina	%Gly
Nenhum dado para esse nicho							
Proporções Finais:							
Taurina – 60%							
Alanina – 20%							
Glicina – 20%							
Nicho Osmótico/Tecido							
ESTUARINO - Brânquia	Total FAA	Taurina	%Tau	Alanina	%Ala	Glicina	%Gly
Nenhum dado para esse nicho							
ESTUARINO - Manto	Total FAA	Taurina	%Tau	Alanina	%Ala	Glicina	%Gly
Nenhum dado para esse nicho							
ESTUARINO - Músculo	Total FAA	Taurina	%Tau	Alanina	%Ala	Glicina	%Gly
Otto e Pierce, 1981	122	x	-	81	66,39	20	16,39
Fyhn, 1976	31	x	-	13,5	43,54	1,2	3,87
Henry et al., 1980b	60,7	x	-	27,2	44,81	6,3	10,37
		MÉDIA	-	MÉDIA	<i>44,81</i>	MÉDIA	<i>10,37</i>
		SD	-	SD	<i>12,84</i>	SD	<i>6,262</i>
Proporções Finais:							
Taurina – 20%							
Alanina – 60%							
Glicina – 20%							

Nicho Osmótico/Tecido							
MARINHO - Brânquia	Total FAA	Taurina	%Tau	Alanina	%Ala	Glicina	%Gly
Lin et al., 2016	50	12	24	2	4	0,5	1
Meng et al., 2013	8,81	7,86	89,21	0,13	1,47	0,16	1,81
Neufeld, 1998	752,9	227,2	30,17	18,7	2,48	40,3	5,35
Powell et al., 1982	26,63	16,37	61,47	1,3	4,88	1,29	4,84
Rice e Stephens, 1988	296,3	223,3	75,36	23,8	8,03	12,8	4,31
		MÉDIA	<i>61,47</i>	MÉDIA	<i>4</i>	MÉDIA	<i>4,31</i>
		SD	<i>28,28</i>	SD	<i>2,52</i>	SD	<i>1,935</i>
MARINHO - Manto	Total FAA	Taurina	%Tau	Alanina	%Ala	Glicina	%Gly
Deaton et al., 1985	365,1	200	54,77	16	4,38	38,7	10,59
George e Damodaran, 1999	159,3	57,7	36,22	13,5	8,47	40,2	25,23
Heavers e Hammen, 1985	145,86	94,8	64,99	12,2	8,36	7,44	5,1
Hiong et al., 2004	20	0,76	3,8	15	75	1,5	7,5
Hosoi et al., 2003	391,1	304,9	77,95	17,2	4,39	21,6	5,52
Pierce, 1971a	76,62	15,53	20,26	27,55	35,95	11,36	14,82
Pierce, 1971a	56,89	42,41	74,54	2,73	4,79	5,47	9,61
Rice e Stephens, 1988	415,9	186	44,72	66,8	16,06	44,1	10,6
		MÉDIA	<i>54,85</i>	MÉDIA	<i>12,21</i>	MÉDIA	<i>8,55</i>
		SD	<i>30,41</i>	SD	<i>27,58</i>	SD	<i>3,64</i>
MARINHO - Músculo	Total FAA	Taurina	%Tau	Alanina	%Ala	Glicina	%Gly
Hoyaux et al., 1976	256,97	20,5	7,97	28,07	10,92	132,69	51,63
Hoyaux et al., 1976	174,43	23,11	13,24	43,38	24,86	60,65	34,77
Ivanovici et al., 1981	168,1	47,2	28,07	6,9	4,1	57,8	34,38
Ivanovici et al., 1981	144,9	47,3	32,64	7,4	5,1	21	14,49
duPaul e Webb, 1970	248	16,1	6,49	90,6	36,53	86	34,67
Hiong et al., 2004	65	2,67	4,1	30	46,15	1	1,53
Hiong et al., 2004	80	2,34	2,92	39	48,75	2	2,5
Shumway et al., 1977a	572	259,6	45,38	18,9	3,3	197,5	34,52
Shumway et al., 1977a	6751	256,6	3,8	102,5	1,51	203,9	3,02
Shumway et al., 1977a	610,2	154	25,23	37,6	6,16	229,4	37,59
Shumway et al., 1977a	744,5	372,9	50,08	11	1,47	222,1	29,83
Shumway et al., 1977a	1070,1	199,4	18,63	25,2	2,35	761,2	71,13
Shumway et al., 1977a	452,8	185,7	41,01	84	18,55	97,8	21,59
Shumway et al., 1977a	737,8	83,3	11,29	61,8	8,37	242,6	32,88
Shumway et al., 1977a	934,2	73	7,81	193,9	20,75	146,1	15,63
Shumway e Youngson, 1979	435,14	133,33	30,64	88,89	20,42	92,81	21,32
Virkar e Webb, 1970	350,72	23,4	6,67	159,1	45,36	94,51	26,94
		MÉDIA	<i>13,24</i>	MÉDIA	<i>10,92</i>	MÉDIA	<i>29,83</i>
		SD	<i>15,69</i>	SD	<i>16,84</i>	SD	<i>17,86</i>
Proporções Finais:							
Taurina – 70%							
Alanina – 20%							
Glicina – 10%							

APÊNDICE D – Estratégias de pesquisa aplicadas às bases de dados

PubMed - www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/

#	Componente de Pesquisa	Elemento de pesquisa para esta investigação	Estratégia de Busca (<i>String</i>)	Nº de Ocorrências
1	Intervenção/Exposição	Salinidade	("osmotic stress"[tiab] ⁵ OR "hyposmotic stress"[tiab] OR hyperosmotic[tiab] OR hyposmotic[tiab] OR "hyperosmotic stress"[tiab] OR salinity[tiab] OR "low salinity"[tiab] OR "high salinity"[tiab] OR "saline stress"[tiab] OR "osmotic variation"[tiab])	24.752 (31/10/2017)
2	Interesse	Regulação Isosmótica Intracelular	(osmoconformation[tiab] OR osmoregulation[tiab] OR "cell volume regulation"[tiab] OR "cell volume"[tiab] OR euryhaline[tiab] OR stenohaline[tiab] OR "cell volume maintenance"[tiab] OR "Intracellular Isosmotic Regulation"[tiab])	17.774 (31/10/2017)
3	Animal	Classe Bivalvia	(bivalve[tiab] OR bivalves[tiab] OR clam[tiab] OR mussels[tiab] OR clams[tiab] OR mussel[tiab] OR "bivalvia"[MeSH Terms] OR bivalvia[tiab])	20.768 (31/10/2017)
4	Parâmetros Avaliados	Efetores osmóticos	(osmolyte[tiab] OR osmolytes[tiab] OR solute[tiab] OR solutes[tiab] OR "ninhydrin positive substances"[tiab] OR NPS[tiab] OR ion[tiab] OR ions[tiab] OR sodium[tiab] OR potassium[tiab] OR chloride[tiab] OR calcium[tiab] OR "free amino acid"[tiab] OR "free amino acids"[tiab] OR "organic solute"[tiab] OR "osmotic content"[tiab] OR osmolality[tiab])	1.151.094 (31/10/2017)
Total da intersecção dos elementos de pesquisa			(#1 AND #2 AND #3 AND #4)	22

⁵tiab - Busca do termo restrita apenas para título, resumo e palavras-chave.

#	Componente de Pesquisa	Elemento de pesquisa para esta investigação	Estratégia de Busca (<i>String</i>)	Nº de Ocorrências
1	Intervenção/Exposição	Salinidade	("osmotic stress" OR "hyposmotic stress" OR hyperosmotic OR hyposmotic OR "hyperosmotic stress" OR salinity OR "low salinity" OR "high salinity" OR "saline stress" OR "osmotic variation")	130.376 (31/10/2017)
2	Interesse	Regulação Isosmótica Intracelular	(osmoconformation OR osmoregulation OR "cell volume regulation" OR "cell volume" OR euryhaline OR stenohaline OR "cell volume maintenance" OR "Intracellular Isosmotic Regulation")	43.751 (31/10/2017)
3	Animal	Classe Bivalvia	(bivalve OR bivalves OR clam OR mussels OR clams OR mussel OR bivalvia)	57.816 (31/10/2017)
4	Parâmetros Avaliados	Efetores osmóticos	(osmolyte OR osmolytes OR solute OR solutes OR "ninhydrin positive substances" OR NPS OR ion OR ions OR sodium OR potassium OR chloride OR calcium OR "free amino acid" OR "free amino acids" OR "organic solute" OR "osmotic content" OR osmolality)	4.266.184 (31/10/2017)
Total da intersecção dos elementos de pesquisa⁶			(#1 AND #2 AND #3 AND #4)	849

⁶ TITLE – ABS – KEY – Busca restrita ao título, resumo e palavras-chave.

#	Componente de Pesquisa	Elemento de pesquisa para esta investigação	Estratégia de Busca (<i>String</i>)	Nº de Ocorrências
1	Intervenção/Exposição	Salinidade	("osmotic stress" OR "hyposmotic stress" OR hyperosmotic OR hyposmotic OR "hyperosmotic stress" OR salinity OR "low salinity" OR "high salinity" OR "saline stress" OR "osmotic variation")	104.534 (31/10/2017)
2	Interesse	Regulação Isosmótica Intracelular	(osmoconformation OR osmoregulation OR "cell volume regulation" OR "cell volume" OR euryhaline OR stenohaline OR "cell volume maintenance" OR "Intracellular Isosmotic Regulation")	29.075 (31/10/2017)
3	Animal	Classe Bivalvia	(bivalve OR bivalves OR clam OR mussels OR clams OR mussel OR bivalvia)	52.100 (31/10/2017)
4	Parâmetros Avaliados	Efetores osmóticos	(osmolyte OR osmolytes OR solute OR solutes OR "ninhydrin positive substances" OR NPS OR ion OR ions OR sodium OR potassium OR chloride OR calcium OR "free amino acid" OR "free amino acids" OR "organic solute" OR "osmotic content" OR osmolality)	4.266.184 (31/10/2017)
Total da intersecção dos elementos de pesquisa⁷			(#1 AND #2 AND #3 AND #4)	62

⁷ TÓPICO – Busca restrita ao título, resumo e palavras-chave.

APÊNDICE E – Dados fisiológicos coligidos a partir da literatura

Tabela 6 - Fórmula e fatores de correção aplicados nos dados fisiológicos para conversão de massa seca em massa úmida.

Massa fresca = massa seca x (100-HT)/100				
Habitat	Tecido	Grau de Hidratação	Fator de Correção	Referência
Dulcícola	Manto	85,13%	0,14	Presente trabalho
	Músculo/Pé	90,9%	0,09	Bedford, 1973
	Brânquias	82,5%	0,17	Jordan e Deaton, 1999
Estuarino	Manto	85,9%	0,14	Henry e Mangum, 1980a
	Músculo/Pé	74,35%	0,25	Henry e Mangum, 1980a; Leader et al., 1986
	Brânquias	86,9%	0,13	Henry e Mangum, 1980a
Marinho	Manto	86,4%	0,13	Hiong et al., 2004; Hosoi et al., 2003
	Músculo/Pé	78,42%	0,21	Costa e Pritchard, 1978; Hiong et al., 2004; Hoyaux et al., 1976
	Brânquias	81,53%	0,18	Costa e Pritchard, 1978; Deaton, 1992

PARÂMETRO: Osmolalidade da Hemolinfa (mOsm/kg H ₂ O)					
Espécie ⁸	Habitat	Tecido	Condição	Osmolalidade	Referência
<i>Eontia ponderosa</i>	Marinho	Hemolinfa	790 mOsm	838	Amende e Pierce, 1980a
<i>Mytilus edulis</i>	Marinho	Hemolinfa	870 mOsm	870	Aunaas et al., 1988
<i>Echydella lucasi</i>	Dulcícola	Hemolinfa	0 ‰ (APW)	60	Bedford, 1973
<i>Dreissena polymorpha</i>	Dulcícola	Hemolinfa	4 mOsm	41	Byrne e Dietz, 2006
<i>Mytilus edulis</i>	Marinho	Hemolinfa	980 mOsm	1002	Costa e Pritchard, 1978
<i>Solen cylindraceus</i>	Marinho	Hemolinfa	35 ‰	1085	De Villiers e Allanson, 1989
<i>Mya arenaria</i>	Marinho	Hemolinfa	1000 mOsm	1020	Deaton, 1992
<i>Geukensia demissa</i>	Marinho	Hemolinfa	1000 mOsm	1020	Deaton, 1992
<i>Mytilopsis leucophaeata</i>	Estuarino	Hemolinfa	20 mOsm	50	Deaton et al., 1989
<i>Limnoperna fortunei</i>	Dulcícola	Hemolinfa	0 mOsm	48	Deaton et al., 1989
<i>Dreissena polymorpha</i>	Dulcícola	Hemolinfa	APW	40	Dietz et al., 1997
<i>Anodonta cygnea</i>	Dulcícola	Hemolinfa	Água corrente	42	Dietz et al., 1996
<i>Margaritifera hembeli</i>	Dulcícola	Hemolinfa	APW	38	Dietz et al., 1996
<i>Toxolasma texasensis</i>	Dulcícola	Hemolinfa	APW	45	Dietz et al., 1996
<i>Corbicula manilensis</i>	Dulcícola	Hemolinfa	APW	65	Dietz et al., 1996
<i>Sphaerium transversum</i>	Dulcícola	Hemolinfa	APW	45	Dietz et al., 1996
<i>Dreissena polymorpha</i>	Dulcícola	Hemolinfa	Não publicado	47	Dietz et al., 1996
<i>Dreissena bugensis</i>	Dulcícola	Hemolinfa	Não publicado	43	Dietz et al., 1996
<i>Rangia cuneata</i>	Estuarino	Hemolinfa	15 ‰	470	Dillon e Anderson, 1979
<i>Senilia senilis</i>	Marinho	Hemolinfa	SW	1000	Djangmah et al., 1979
<i>Rangia cuneata</i>	Estuarino	Hemolinfa	100 mOsm	150	Fyhn, 1976

⁸ Nome científico: algumas espécies sofreram atualização da nomenclatura. Nesse sentido, os nomes destacados em negrito foram corrigidos de acordo com a nomenclatura vigente, seguindo Worldwide Mollusc Species Data Base - WMSDB.

Espécie	Habitat	Tecido	Condição	Osmolalidade	Referência
<i>Mytilus edulis</i>	Marinho	Hemolinfa	600 mOsm	650	Gainey, 1987
<i>Corbicula manilensis</i>	Dulcícola	Hemolinfa	FW	57	Gainey e Greenberg, 1977
<i>Elliptio lanceolata</i>	Dulcícola	Hemolinfa	FW	42	Gainey e Greenberg, 1977
<i>Polymesoda caroliniana</i>	Estuarino	Hemolinfa	10 ‰	297	Gainey e Greenberg, 1977
<i>Polymesoda floridana</i>	Marinho	Hemolinfa	27 ‰	792	Gainey e Greenberg, 1977
<i>Rangia cuneata</i>	Estuarino	Hemolinfa	1 ppt	112	Henry e Mangum, 1980a
<i>Rangia cuneata</i>	Estuarino	Hemolinfa	19-20 ppt	650	Henry e Mangum, 1980c
<i>Crassostrea gigas</i>	Marinho	Hemolinfa	800 mOsm	800	Hosoi et al., 2003
<i>Mytilus edulis</i>	Marinho	Hemolinfa	100% SW	1180	Hoyaux et al., 1976
<i>Scrobicularia plana</i>	Marinho	Hemolinfa	100% SW	1055	Hoyaux et al., 1976
<i>Modiolus fluviatilis</i>	Marinho	Hemolinfa	100% SW	1014	Leader et al., 1986
<i>Meretrix lusoria</i>	Marinho	Hemolinfa	35 ‰	980	Lin et al., 2016
<i>Mytilus edulis</i>	Marinho	Hemolinfa	30 ‰	850	Livingstone et al., 1979
<i>Sinanodonta woodiana</i>	Dulcícola	Hemolinfa	FW	45	Matsushima e Kado, 1982
<i>Perna viridis</i>	Marinho	Hemolinfa	30 ‰	950	McFarland et al., 2013
<i>Crassostrea virginica</i>	Marinho	Hemolinfa	30 ‰	940	McFarland et al., 2013
<i>Geukensia demissa</i>	Marinho	Hemolinfa	940mOsm	900	Neufeld e Wright, 1998
<i>Cerastoderma edule</i>	Marinho	Hemolinfa	31 ‰	1020	Nossier, 1986
<i>Cerastoderma glaucum</i>	Marinho	Hemolinfa	31 ‰	1050	Nossier, 1986
<i>Rangia cuneata</i>	Estuarino	Hemolinfa	130 mOsm	142	Otto et al., 1981
<i>Perna perna</i>	Marinho	Hemolinfa	35 ‰	990	Rola et al., 2017
<i>Corbicula fluminea</i>	Dulcícola	Hemolinfa	Artesian water	63,2	Ruiz e Souza, 2008
<i>Unio pictorum</i>	Dulcícola	Hemolinfa	FW	51,7	Shakhmatova et al., 2006
<i>Unio tumidus</i>	Dulcícola	Hemolinfa	FW	48,5	Shakhmatova et al., 2006

<i>Pinctada margaritifera</i>	Dulcícola	Hemolinfa	FW	31,8	Shakhmatova et al., 2006
Espécie	Habitat	Tecido	Condição	Osmolalidade	Referência
<i>Aequipecten opercularis</i>	Marinho	Hemolinfa	32 ‰ (965 mOsm)	970	Shumway, 1977b
<i>Modiolus modiolus</i>	Marinho	Hemolinfa	32 ‰ (965 mOsm)	980	Shumway, 1977b
<i>Mytilus edulis</i>	Marinho	Hemolinfa	32 ‰ (965 mOsm)	980	Shumway, 1977b
<i>Crassostrea gigas</i>	Marinho	Hemolinfa	32 ‰ (965 mOsm)	980	Shumway, 1977b
<i>Scrobicularia plana</i>	Marinho	Hemolinfa	32 ‰ (965 mOsm)	975	Shumway, 1977b
<i>Mya arenaria</i>	Marinho	Hemolinfa	100% SW	1010	Shumway, 1977b
<i>Modiolus demissus</i>	Marinho	Hemolinfa	33,5 ‰	988	Shumway e Youngson, 1979
<i>Modiolus demissus</i>	Marinho	Hemolinfa	850 mOsm	852	Strange e Crowe, 1979
<i>Callista chione</i>	Marinho	Hemolinfa	1000 mOsm	1109	Zatta e Cervellin, 1987

PARÂMETRO: Íons									
Espécie	Habitat	Tecido ⁹	Condição	Na ⁺	K ⁺	Cl ⁻	Mg ²⁺	Ca ²⁺	Referência
<i>Geukensia demissa</i>	Marinho	Brânquia	940 mOsm	-	0,017212	-	-	-	Neufeld e Wright, 1998
<i>Geukensia demissa</i>	Marinho	Brânquia	33 ‰	-	0,0364	-	-	-	Neufeld e Whright, 1996b
<i>Mytilus californianus</i>	Marinho	Brânquia	33 ‰	-	0,030	-	-	-	Neufeld e Wright, 1996a
<i>Callista chione</i>	Marinho	Hemolinfa	1000 mOsm	470	-	-	-	-	Zatta e Cervellin, 1987
<i>Echyriddella lucasi</i>	Dulcícola	Hemolinfa	0 ‰	65	3	10	0,4	0,25	Bedford, 1973
<i>Dreissena polymorpha</i>	Dulcícola	Hemolinfa	4 mOsm	17,7	0,4	16,2	0,9	4	Byrne e Dietz, 2006
<i>Mytilus edulis</i>	Marinho	Hemolinfa	980 mOsm	473	-	558	-	-	Costa e Pritchard, 1978
<i>Mya arenaria</i>	Marinho	Hemolinfa	1000 mOsm	600	12	520	47	11	Deaton, 1992
<i>Geukensia demissa</i>	Marinho	Hemolinfa	1000 mOsm	500	13	520	50	9,9	Deaton, 1992
<i>Mytilopsis leucophaeata</i>	Estuarino	Hemolinfa	20 mOsm	24	1,9	20	3	2,1	Deaton et al., 1989
<i>Limnoperna fortunei</i>	Dulcícola	Hemolinfa	0 mOsm	20	1	0,2	1,5	4,3	Deaton et al., 1989
<i>Dreissena polymorpha</i>	Dulcícola	Hemolinfa	APW	14,7	0,4	15,3	0,8	4,2	Dietz et al., 1997
<i>Anodonta cygnea</i>	Dulcícola	Hemolinfa	Água corrente	15,6	0,5	11,7	0,2	8,4	Dietz et al., 1996
<i>Margaritifera hembeli</i>	Dulcícola	Hemolinfa	APW	14	0,3	9,4	-	5,2	Dietz et al., 1996
<i>Toxolasma texasensis</i>	Dulcícola	Hemolinfa	APW	15	0,5	11,2	0,2	4,7	Dietz et al., 1996
<i>Corbicula manilensis</i>	Dulcícola	Hemolinfa	APW	27,7	1	24,2	2,7	11,2	Dietz et al., 1996
<i>Sphaerium transversum</i>	Dulcícola	Hemolinfa	APW	15,2	0,4	14,2	-	2,8	Dietz et al., 1996
<i>Dreissena polymorpha</i>	Dulcícola	Hemolinfa	Não publicado	19,6	0,7	19,9	1	4	Dietz et al., 1996
<i>Dreissena bugensis</i>	Dulcícola	Hemolinfa	Não publicado	17,9	0,6	17,1	0,8	1,9	Dietz et al., 1996
<i>Rangia cuneata</i>	Estuarino	Hemolinfa	15 ‰	181,39	6,93	229	-	-	Dillon e Anderson, 1979

⁹ Os dados de hemolinfa foram convertidos para mM. Relativamente aos valores que exprimem a concentração de íons nas demais amostras biológicas (brânquias, manto, músculo, pé e tecidos moles), estes foram transformados para mmol/kg de massa úmida utilizando as informações dispostas na Tabela 9, quando necessário.

Espécie	Habitat	Tecido	Condição	Na⁺	K⁺	Cl⁻	Mg²⁺	Ca²⁺	Referência
<i>Senilia senilis</i>	Marinho	Hemolinfa	SW	490	10,3	-	55	10,3	Djangmah et al., 1979
<i>Rangia cuneata</i>	Estuarino	Hemolinfa	100 mOsm	-	-	10	-	-	Fyhn, 1976
<i>Rangia cuneata</i>	Estuarino	Hemolinfa	1ppt	23,2	1,09	19,2	2,68	2,51	Henry e Mangum, 1980 I
<i>Mytilus edulis</i>	Marinho	Hemolinfa	100% SW	490	20	546	-	-	Hoyaux et al., 1976
<i>Scrobicularia plana</i>	Marinho	Hemolinfa	100% SW	466	19,5	512	-	-	Hoyaux et al., 1976
<i>Lampsilis teres</i>	Dulcícola	Hemolinfa	0mOsm	24	0,4	24	-	4	Jordan e Deaton, 1999
<i>Crassostrea gigas</i>	Marinho	Hemolinfa	35 ppt	468,1	12	-	-	-	Knowles et al. , 2014
<i>Mytilus edulis</i>	Marinho	Hemolinfa	SW	-	-	457	-	-	Lange, 1963
<i>Modiolus fluviatilis</i>	Marinho	Hemolinfa	100% SW	464	-	522	-	-	Leader et al., 1986
<i>Meretrix lusoria</i>	Marinho	Hemolinfa	35 ‰	610	-	600	-	-	Lin et al., 2016
<i>Sinanodonta woodiana</i>	Dulcícola	Hemolinfa	FW	15,8	0,45	13,7	-	-	Matsushima e Kado, 1982
<i>Parreysia corrugata</i>	Dulcícola	Hemolinfa	FW	-	-	18,8	-	-	Nagabhushanam e Lomte, 1971
<i>Rangia cuneata</i>	Estuarino	Hemolinfa	130 mOsm	60	2,3	40	12	4,8	Otto e Pierce, 1981
<i>Geukensia granosissima</i>	Marinho	Hemolinfa	36 ‰	550	14	740	22	9,9	Pierce, 1971b
<i>Modiolus squamosus</i>	Marinho	Hemolinfa	41 ‰	630	22	840	52	10,1	Pierce, 1971b
<i>Perna perna</i>	Marinho	Hemolinfa	35 ‰	400	56	420	-	-	Rola et al., 2017
<i>Corbicula fluminea</i>	Dulcícola	Hemolinfa	Artesian water	31,47	0,952	25,99	-	-	Ruiz e Souza, 2008
<i>Unio pictorum</i>	Dulcícola	Hemolinfa	FW	14,4	0,47	-	0,39	1,56	Shakhmatova et al., 2006
<i>Unio tumidus</i>	Dulcícola	Hemolinfa	FW	12,4	0,37	-	0,22	1,32	Shakhmatova et al., 2006
<i>Pinctada margaritifera</i>	Dulcícola	Hemolinfa	FW	14,7	0,37	-	0,41	1,86	Shakhmatova et al., 2006
<i>Aequipecten opercularis</i>	Marinho	Hemolinfa	32 ‰	470	-	-	53	10,2	Shumway et al., 1977b
<i>Modiolus modiolus</i>	Marinho	Hemolinfa	32 ‰	471	-	-	54,1	10,2	Shumway et al., 1977b
<i>Mytilus edulis</i>	Marinho	Hemolinfa	32 ‰	468	-	-	58	10,4	Shumway et al., 1977b
<i>Crassostrea gigas</i>	Marinho	Hemolinfa	32 ‰	478	-	-	55,4	10,2	Shumway et al., 1977b

Espécie	Habitat	Tecido	Condição	Na⁺	K⁺	Cl⁻	Mg²⁺	Ca²⁺	Referência
<i>Scrobicularia plana</i>	Marinho	Hemolinfa	32 ‰	470	-	-	52,5	10,2	Shumway et al., 1977b
<i>Mya arenaria</i>	Marinho	Hemolinfa	100% SW	478	-	-	53	10,2	Shumway et al., 1977b
<i>Modiolus demissus</i>	Marinho	Hemolinfa	965 mOsm	471	11,1	-	54,3	10,7	Shumway et al., 1979
<i>Modiolus demissus</i>	Marinho	Hemolinfa	850 mOsm	425	10,5	-	-	-	Strange e Crowe, 1979
<i>Mytilus edulis</i>	Marinho	Manto	25 ‰	132,4	72,3	-	14,7	2,2	Shakhmatova et al., 2006
<i>Mytilus trossulus</i>	Marinho	Manto	6,2 ‰	38,7	33,5	-	5,4	1,5	Shakhmatova et al., 2006
<i>Pinctada margaritifera</i>	Dulcícola	Manto	FW	13,8	4,9	-	9	79,8	Shakhmatova et al., 2006
<i>Mytilus edulis</i>	Marinho	Músculo	25 ‰	122,9	65,2	-	13	2,7	Shakhmatova et al., 2006
<i>Mytilus trossulus</i>	Marinho	Músculo	6,2 ‰	35,3	33,7	-	6,9	2,04	Shakhmatova et al., 2006
<i>Unio pictorum</i>	Dulcícola	Músculo	FW	13	10,3	-	4,6	3,8	Shakhmatova et al., 2006
<i>Unio tumidus</i>	Dulcícola	Músculo	FW	11	4,7	-	58	4,5	Shakhmatova et al., 2006
<i>Pinctada margaritifera</i>	Dulcícola	Músculo	FW	11,3	8,5	-	3,8	2,6	Shakhmatova et al., 2006
<i>Mytilus edulis</i>	Marinho	Pé	25 ‰	92,7	79	-	12	1,7	Shakhmatova et al., 2006
<i>Mytilus trossulus</i>	Marinho	Pé	6,2 ‰	24,5	41,4	-	5,5	1,4	Shakhmatova et al., 2006
<i>Unio pictorum</i>	Dulcícola	Pé	FW	9	10,7	-	6,1	5,2	Shakhmatova et al., 2006
<i>Unio tumidus</i>	Dulcícola	Pé	FW	7,8	7,8	-	5,3	5,7	Shakhmatova et al., 2006
<i>Pinctada margaritifera</i>	Dulcícola	Pé	FW	11,6	7,6	-	4,4	3,1	Shakhmatova et al., 2006
<i>Ruditapes decussatus</i>	Marinho	Tecidos moles	Sazonal	-	-	-	-	-	Beninger, 1985
<i>Ruditapes philippinarum</i>	Marinho	Tecidos moles	Sazonal	-	-	-	-	-	Beninger, 1985
<i>Ruditapes philippinarum</i>	Marinho	Tecidos moles	28g/L	50	5	-	6,4	1,8	Carregosa et al., 2014
<i>Rangia cuneata</i>	Estuarino	Tecidos moles	15 ‰	110	56	-	-	-	Dillon e Anderson, 1979
<i>Ruditapes philippinarum</i>	Marinho	Tecidos moles	28 ‰	0,114	0,027	-	-	-	Velez et al., 2016a

PARÂMETRO: <i>Pool de aminoácidos</i>					
Espécie	Habitat	Tecido	Condição	<i>Pool FAA</i>	Referência
<i>Chamelea gallina</i>	Marinho	Animal total	37 ‰	Não há fator de correção para esse tecido	Zurburg e Zwaan, 1981
<i>Anadara cornea</i>	Marinho	Animal total	37 ‰	Não há fator de correção para esse tecido	Zurburg e Zwaan, 1981
<i>Lampsilis teres</i>	Dulcícola	Brânquia ¹⁰	2 mOsm	0,002703	Jordan e Deaton, 1999
<i>Meretrix lusoria</i>	Marinho	Brânquia	35 ‰	0,0085	Lin et al., 2016
<i>Corbicula japonica</i>	Estuarino	Brânquia	250 mOsm	0,03473	Matsushima e Hayashi, 1992b
<i>Crassostrea gigas</i>	Marinho	Brânquia	30 ‰	1085,503006	Meng et al., 2013
<i>Geukensia demissa</i>	Marinho	Brânquia	940 mOsm	0,127993	Neufeld e Wright, 1998
<i>Crassostrea virginica</i>	Marinho	Brânquia	26 ‰	0,00002663	Powell et al., 1982
<i>Mercenaria mercenaria</i>	Marinho	Brânquia	34 ‰	0,2963	Rice e Stephens, 1988
<i>Eontia ponderosa</i>	Marinho	Células vermelhas	840 mOsm	Não há fator de correção para esse tecido	Amende e Pierce, 1980a
<i>Sinonovacula constricta</i>	Marinho	Glândula digestiva	23 psu	Não há fator de correção para esse tecido	Ran et al., 2017
<i>Mytilus edulis</i>	Marinho	Hemolinfa	30 ‰	1,3	Livingstone et al., 1979
<i>Geukensia granosissima</i>	Marinho	Hemolinfa	36 ‰	0,004314	Pierce, 1971b
<i>Modiolus squamosus</i>	Marinho	Hemolinfa	41 ‰	0,005307	Pierce, 1971b
<i>Mercenaria mercenaria</i>	Marinho	Hemolinfa	34 ‰	0,0028614	Rice e Stephens, 1988
<i>Modiolus demissus</i>	Marinho	Hemolinfa	965 mOsm	0,01265	Shumway e Youngson, 1979
<i>Geloina expansa</i>	Marinho	Hepatopâncreas	10 ‰	0,00085	Hiong et al., 2004
<i>Limnoperna fortunei</i>	Dulcícola	Manto	0 mOsm	0,00091	Deaton et al., 1989
<i>Mytilus edulis</i>	Marinho	Manto	15 ‰	0,047463	Deaton et al., 1985
<i>Sunetta scripta</i>	Marinho	Manto	35 ‰	0,1593	George e Damodaran, 1999
<i>Crassostrea virginica</i>	Marinho	Manto	1150 mOsm	0,0189618	Heavers e Hammen, 1985

¹⁰ Os dados de hemolinfa foram convertidos para mM. Relativamente aos valores que exprimem o pool de aminoácidos nas demais amostras biológicas (brânquias, manto, músculo, pé e tecidos moles), estes foram transformados para mmol/kg de massa úmida utilizando as informações dispostas na Tabela 9, quando necessário.

Espécie	Habitat	Tecido	Condição	Pool FAA	Referência
<i>Geloina expansa</i>	Marinho	Manto	10 ‰	0,02	Hiong et al., 2004
<i>Crassostrea gigas</i>	Marinho	Manto	800 mOsm	0,050843	Hosoi et al., 2003
<i>Corbicula sandai</i>	Dulcícola	Manto	FW	0,00523	Hosoi et al., 2008
<i>Geukensia granosissima</i>	Marinho	Manto	36 ‰	0,076622	Pierce, 1971a
<i>Modiolus squamosus</i>	Marinho	Manto	41 ‰	0,056861	Pierce, 1971a
<i>Mercenaria mercenaria</i>	Marinho	Manto	34 ‰	0,4159	Rice e Stephens, 1988
<i>Mytilus edulis</i>	Marinho	Músculo	100% SW	256,67	Hoyaux et al., 1976
<i>Scrobicularia plana</i>	Marinho	Músculo	100% SW	174,43	Hoyaux et al., 1976
<i>Anadara trapezia</i>	Marinho	Músculo	35 ‰	0,1681	Ivanovici et al., 1981
<i>Saccostrea commercialis</i>	Marinho	Músculo	35 ‰	0,1449	Ivanovic et al., 1981
<i>Rangia cuneata</i>	Estuarino	Músculo	153 mOsm	0,0305	Otto e Pierce, 1981
<i>Mytilus edulis</i>	Marinho	Músculo	15 ‰	0,075978	Deaton et al., 1985
<i>Mya arenaria</i>	Marinho	Músculo	20 ‰	0,248	duPaul e Webb, 1970
<i>Rangia cuneata</i>	Estuarino	Músculo	104 mOsm	31	Fyhn, 1976
<i>Sunetta scripta</i>	Marinho	Músculo	35 ‰	0,1579	George e Damodaran, 1999
<i>Rangia cuneata</i>	Estuarino	Músculo	2 ppt	0,015175	Henry et al., 1980b
<i>Geloina expansa</i>	Marinho	Músculo	10 ‰	0,065	Hiong et al., 2004
<i>Mytilus edulis</i>	Marinho	Músculo	32 ‰	0,12012	Shumway et al, 1977a
<i>Mercenaria mercenaria</i>	Marinho	Músculo	32 ‰	0,141771	Shumway et al., 1977a
<i>Crassostrea gigas</i>	Marinho	Músculo	32 ‰	0,128142	Shumway et al., 1977a
<i>Modiolus modiolus</i>	Marinho	Músculo	32 ‰	0,156345	Shumway et al., 1977a
<i>Aequipecten opercularis</i>	Marinho	Músculo	32 ‰	0,224721	Shumway et al., 1977a
<i>Cerastoderma edule</i>	Marinho	Músculo	32 ‰	0,095508	Shumway et al., 1977a
<i>Mya arenaria</i>	Marinho	Músculo	60% SW	0,154938	Shumway et al., 1977a
<i>Scrobicularia plana</i>	Marinho	Músculo	32 ‰	0,196182	Shumway et al., 1977a

Espécie	Habitat	Tecido	Condição	Pool FAA	Referência
<i>Modiolus demissus</i>	Marinho	Músculo	965mOsm	0,0913794	Shumway Youngson, 1979
<i>Mya arenaria</i>	Marinho	Músculo	30 ‰	350,72	Virkar e Webb, 1970
<i>Sunetta scripta</i>	Marinho	Pé	35 ‰	0,1581	George e Damodaran, 1999
<i>Geloina expansa</i>	Marinho	Pé	10 ‰	0,08	Hiong et al., 2004
<i>Corbicula japonica</i>	Estuarino	Pé	250 mOsm	0,06155	Matsushima, 1992b
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Marinho	Tecidos moles	35,5g/L	Não há fator de correção para esse tecido	Babarro et al., 2011
<i>Ensis siliqua</i>	Marinho	Tecidos moles	35,5 psu	Não há fator de correção para esse tecido	Baptista et al., 2014
<i>Mytilopsis leucophaeata</i>	Estuarino	Tecidos moles	20 mOsm	Não há fator de correção para esse tecido	Deaton et al., 1989
<i>Mytilus edulis</i>	Marinho	Tecidos moles	30 ‰	Não há fator de correção para esse tecido	Livingstone et al., 1979
<i>Geukensia demissa</i>	Marinho	Ventrículo	940 mOsm	Não há fator de correção para esse tecido	Neufeld e Wright, 1998

PARÂMETRO: FAA Individuais							
Espécie	Habitat	Tecido	Condição	Taurina	Alanina	Glicina	Referência
<i>Lampsilis teres</i>	Dulcícola	Brânquia ¹¹	2 mOsm	-	0,000442	0,000306	Jordan e Deaton , 1999
<i>Meretrix lusoria</i>	Marinho	Brânquia	35 ‰	0,00216	0,00036	0,00009	Lin et al., 2016
<i>Corbicula japonica</i>	Estuarino	Brânquia	250 mOsm	-	0,003354	0,000442	Matsushima e Hayashi, 1992
<i>Crassostrea gigas</i>	Marinho	Brânquia	30 ‰	177,06222	2,084706	2,162016	Meng et al., 2013
<i>Geukensia demissa</i>	Marinho	Brânquia	940 mOsm	0,040896	0,003366	0,007254	Neufeld e Wright, 1998
<i>Crassostra virginica</i>	Marinho	Brânquia	26 ‰	0,0029466	0,000234	0,0002322	Powell et al., 1982
<i>Mercenaria mercenaria</i>	Marinho	Brânquia	34 ‰	0,2233	0,0238	0,0128	Rice e Stephens, 1988
<i>Callista chione</i>	Marinho	Brânquia	1000 mOsm	0,000119	0,00001	0,000012	Zatta e Cervellin, 1987
<i>Geukensia demissa</i>	Marinho	Brânquia	33 ‰	0,04221	0,005616	0,006552	Neufeld e Wright, 1996b
<i>Mytilus californianus</i>	Marinho	Brânquia	33 ‰	0,07182	-	-	Neufeld e Wright, 1996a
<i>Mytilus trossulus</i>	Marinho	Brânquia	33 ‰	0,0918	-	-	Neufeld e Wright, 1996a
<i>Anadara broughtonii</i>	Marinho	Brânquia	SW	-	0,018	-	Okuma et al., 1998
<i>Mizuhopecten yessoensis</i>	Marinho	Brânquia	SW	-	0,0013	-	Okuma et al., 1998
<i>Meretrix lusoria</i>	Marinho	Brânquia	SW	0,08	0,0343	0,09	Okuma et al., 1998
<i>Ruditapes philippinarum</i>	Marinho	Brânquia	SW	-	0,0247	-	Okuma et al., 1998
<i>Pseudocardium sachalinensis</i>	Marinho	Brânquia	SW	-	0,0331	-	Okuma et al., 1998

¹¹ Os dados de hemolinfa foram convertidos para mM. Relativamente aos valores que exprimem a concentração de aminoácidos individuais nas demais amostras biológicas (brânquias, manto, músculo, pé e tecidos moles), estes foram transformados para mmol/kg de massa úmida utilizando as informações dispostas na Tabela 9 desta seção, quando necessário.

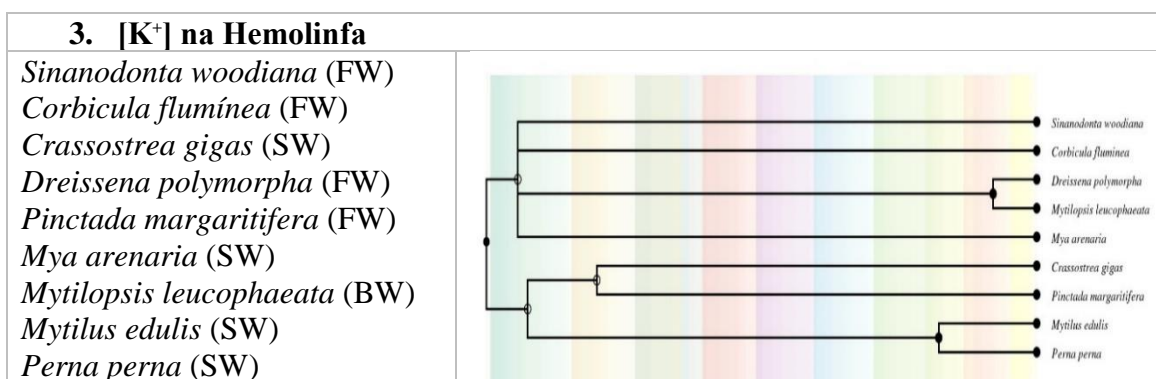
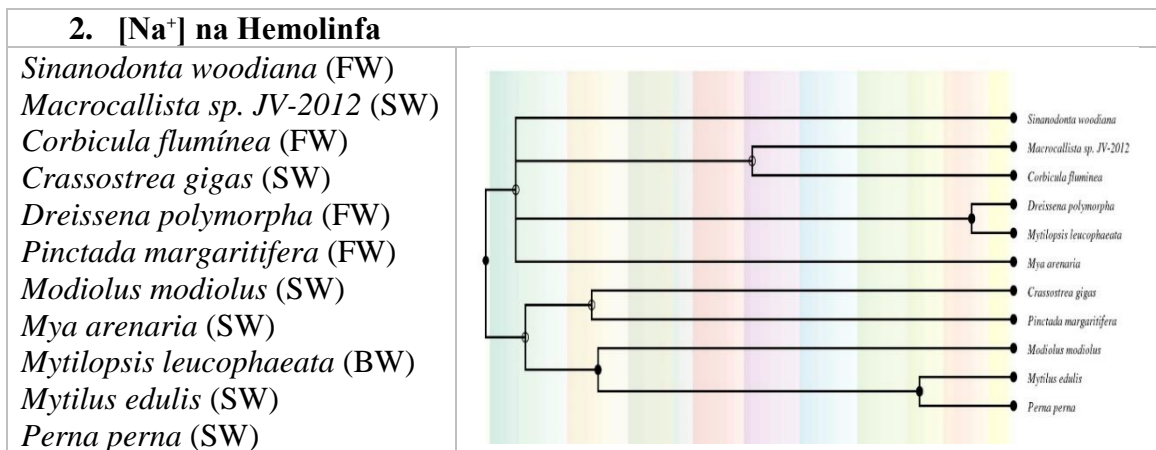
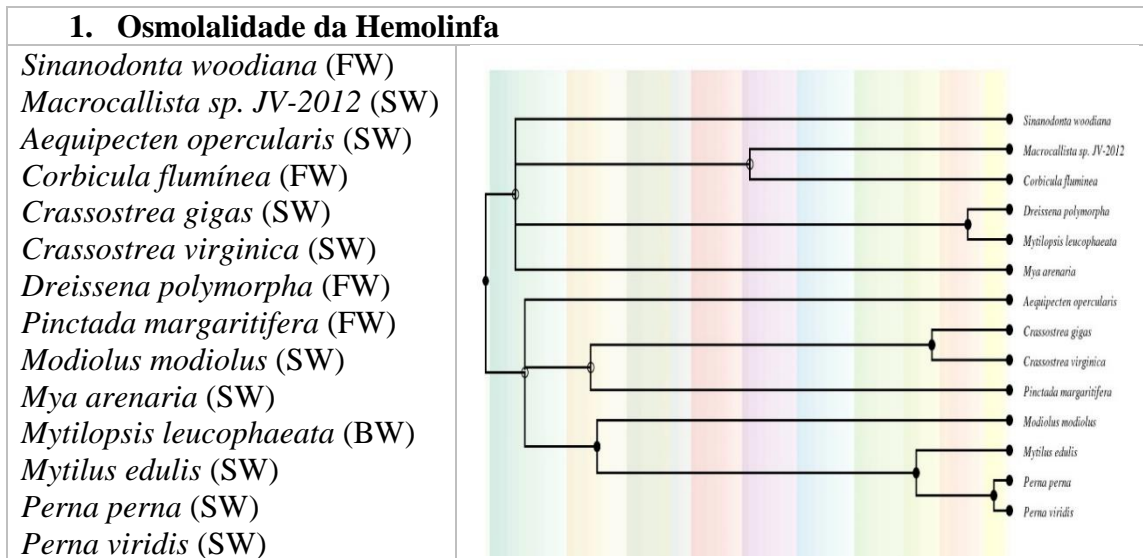
Espécie	Habitat	Tecido	Condição	Taurina	Alanina	Glicina	Referência
<i>Tresus keenae</i>	Marinho	Brânquia	SW	-	0,058	-	Okuma et al., 1998
<i>Eontia ponderosa</i>	Marinho	Células vermelhas	840 mOsm	-	-	-	Amende e Pierce, 1980a
<i>Sinonovacula constricta</i>	Marinho	Glândula digestiva	23 psu	-	Não há fator de correção para esse tecido	Não há fator de correção para esse tecido	Ran et al., 2017
<i>Mizuhopecten yessoensis</i>	Marinho	Glândula digestiva	SW	-	0,0003	-	Okuma et al., 1998
<i>Meretrix lusoria</i>	Marinho	Glândula digestiva	SW	-	0,0243	-	Okuma et al., 1998
<i>Ruditapes philippinarum</i>	Marinho	Glândula digestiva	SW	-	0,0329	-	Okuma et al., 1998
<i>Pseudocardium sachalinensis</i>	Marinho	Glândula digestiva	SW	-	0,0352	-	Okuma et al., 1998
<i>Tresus keenae</i>	Marinho	Glândula digestiva	SW	-	0,0468	-	Okuma et al., 1998
<i>Pseudocardium sachalinensis</i>	Marinho	Gônada	SW	-	0,0377	-	Okuma et al., 1998
<i>Tresus keenae</i>	Marinho	Gônada	SW	-	0,062	-	Okuma et al., 1998
<i>Geukensia granosissima</i>	Marinho	Hemolinfa	36 ‰	0,000562	0,001487	0,000843	Pierce, 1971b
<i>Modiolus squamosus</i>	Marinho	Hemolinfa	41 ‰	0,002285	0,000273	0,002106	Pierce, 1971b
<i>Mercenaria mercenaria</i>	Marinho	Hemolinfa	34 ‰	0,09554	0,06186	0,05329	Rice e Stephens, 1988
<i>Modiolus demissus</i>	Marinho	Hemolinfa	965 mOsm	0,00311	0,00102	0,00306	Shumway e Youngson, 1979
<i>Callista chione</i>	Marinho	Hemolinfa	1000 mOsm	0,000179	0,00004	0,0011	Zatta e Cervellin, 1987
<i>Geloina expansa</i>	Marinho	Hepatopâncreas	10 ‰	0,00203	0,0017	0,003	Hiong et al., 2004
<i>Limnoperna fortunei</i>	Dulcícola	Manto	0 mOsm	0,000322	0,000098	0,00021	Deaton et al., 1989
<i>Mytilus edulis</i>	Marinho	Manto	15 ‰	0,026	0,00208	0,005031	Deaton et al., 1985
<i>Sunetta scripta</i>	Marinho	Manto	35 ‰	0,0577	0,0135	0,0402	George e Damodaran, 1999
<i>Crassostrea virginica</i>	Marinho	Manto	1150 mOsm	0,0948	0,0122	0,00744	Heavers e Hammen, 1985
<i>Geloina expansa</i>	Marinho	Manto	10 ‰	0,00076	0,015	0,0015	Hiong et al., 2004
<i>Crassostrea gigas</i>	Marinho	Manto	800 mOsm	0,039637	0,002236		Hosoi et al., 2003

Espécie	Habitat	Tecido	Condição	Taurina	Alanina	Glicina	Referência
<i>Corbicula sandai</i>	Dulcícola	Manto	FW	-	0,00085	0,00015	Hosoi et al., 2008
<i>Geukensia granosissima</i>	Marinho	Manto	36 ‰	0,01553	0,027551	0,01136	Pierce, 1971b
<i>Modiolus squamosus</i>	Marinho	Manto	41 ‰	0,042412	0,002739	0,005479	Pierce, 1971b
<i>Mercenaria mercenaria</i>	Marinho	Manto	34 ‰	0,186	0,0668	0,0441	Rice e Stephens, 1988
<i>Meretrix lusoria</i>	Marinho	Manto	SW	-	0,0483	-	Okuma et al., 1998
<i>Ruditapes philippinarum</i>	Marinho	Manto	SW	-	0,0357	-	Okuma et al., 1998
<i>Pseudocardium sachalinensis</i>	Marinho	Manto	SW	-	0,0678	-	Okuma et al., 1998
<i>Tresus keenae</i>	Marinho	Manto	SW	-	0,0807	-	Okuma et al., 1998
<i>Mytilus edulis</i>	Marinho	Músculo	15 ‰	0,044604	0,009156	0,001806	Deaton et al., 1985
<i>Mytilus edulis</i>	Marinho	Músculo	100% SW	20,5	28,07	132,69	Hoyaux et al., 1976
<i>Scrobicularia plana</i>	Marinho	Músculo	100% SW	23,11	43,38	60,65	Hoyaux et al., 1976
<i>Anadara trapezia</i>	Marinho	Músculo	35 ‰	0,0472	0,0069	0,0578	Ivanovici et al., 1981
<i>Saccostrea commercialis</i>	Marinho	Músculo	35 ‰	0,0473	0,0074	0,021	Ivanovici et al., 1981
<i>Rangia cuneata</i>	Estuarino	Músculo	153 mOsm	-	0,02025	0,0005	Otto e Pierce, 1981
<i>Callista chione</i>	Marinho	Músculo	1000 mOsm	0,00017	0,000018	0,00008	Zatta e Cervellin, 1987
<i>Mya arenaria</i>	Marinho	Músculo	20 ‰	0,0161	0,0906	0,086	duPaul e Webb, 1970
<i>Rangia cuneata</i>	Estuarino	Músculo	104 mOsm	-	13,5	1,2	Fyhn, 1976
<i>Sunetta scripta</i>	Marinho	Músculo	35 ‰	0,0306	0,0182	0,0628	George e Damodaran, 1999
<i>Rangia cuneata</i>	Estuarino	Músculo	2 ppt	-	0,0068	0,001575	Henry et al., 1980b
<i>Geloina expansa</i>	Marinho	Músculo	10 ‰	0,00267	0,03	0,001	Hiong et al., 2004
<i>Mytilus edulis</i>	Marinho	Músculo	32 ‰	0,054516	0,003969	0,041475	Shumway et al., 1977a
<i>Mercenaria mercenaria</i>	Marinho	Músculo	32 ‰	0,053886	0,021525	0,04078	Shumway et al., 1977a
<i>Crassostrea gigas</i>	Marinho	Músculo	32 ‰	0,03234	0,007896	0,04588	Shumway et al., 1977a
<i>Modiolus modiolus</i>	Marinho	Músculo	32 ‰	0,078309	0,00231	0,04442	Shumway et al., 1977a
<i>Arquiptecten opercularis</i>	Marinho	Músculo	32 ‰	0,041874	0,005292	0,15224	Shumway et al., 1977a

Espécie	Habitat	Tecido	Condição	Taurina	Alanina	Glicina	Referência
<i>Mya arenaria</i>	Marinho	Músculo	60% SW	0,017493	0,012978	0,04852	Shumway et al., 1977a
<i>Scrobicularia plana</i>	Marinho	Músculo	32 ‰	0,01533	0,040719	0,02922	Shumway et al., 1977a
<i>Modiolus demissus</i>	Marinho	Músculo	965 mOsm (33,5 ‰)	0,0279993	0,0186669	0,018562	Shumway e Youngson, 1979
<i>Mya arenaria</i>	Marinho	Músculo	30 ‰	23,4	159,1	94,51	Virkar e Webb, 1970
<i>Anadara broughtonii</i>	Marinho	Músculo	SW	-	0,0001	-	Okuma et al., 1998
<i>Meretrix lusoria</i>	Marinho	Músculo	SW	0,0034	0,054	0,149	Okuma et al., 1998
<i>Ruditapes philippinarum</i>	Marinho	Músculo	SW	-	0,0478	-	Okuma et al., 1998
<i>Pseudocardium sachalinensis</i>	Marinho	Músculo	SW	-	0,0603	-	Okuma et al., 1998
<i>Tresus keenae</i>	Marinho	Músculo	SW	-	0,0628	-	Okuma et al., 1998
<i>Sunetta scripta</i>	Marinho	Pé	35 ‰	0,00177	0,3112	0,0356	George e Damodaran, 1999
<i>Geloina expansa</i>	Marinho	Pé	10 ‰	0,000066	0,039	0,002	Hiong et al., 2004
<i>Corbicula japonica</i>	Estuarino	Pé	250 mOsm	-	-	0,0132	Matsushima e Hayashi, 1992
<i>Meretrix lusoria</i>	Marinho	Pé	SW	-	0,00136	-	Okuma et al., 1998
<i>Ruditapes philippinarum</i>	Marinho	Pé	SW	-	0,0375	-	Okuma et al., 1998
<i>Pseudocardium sachalinensis</i>	Marinho	Pé	SW	-	0,0587	-	Okuma et al., 1998
<i>Tresus keenae</i>	Marinho	Pé	SW	-	0,0646	-	Okuma et al., 1998
<i>Callista chione</i>	Marinho	Pé	1000 mOsm	0,00008	0,00002	0,00006	Zatta e Cervellin, 1987
<i>Meretrix lusoria</i>	Marinho	Sifão	SW	-	0,0457	-	Okuma et al., 1998
<i>Ruditapes philippinarum</i>	Marinho	Sifão	SW	-	0,0388	-	Okuma et al., 1998
<i>Pseudocardium sachalinensis</i>	Marinho	Sifão	SW	-	0,0748	-	Okuma et al., 1998
<i>Tresus keenae</i>	Marinho	Sifão	SW	-	0,00017	-	Okuma et al., 1998
<i>Mya arenaria</i>	Marinho	Tecidos moles	-	-	Não há fator de correção para esse tecido	Não há fator de correção para esse tecido	Allen e Garrett, 1972

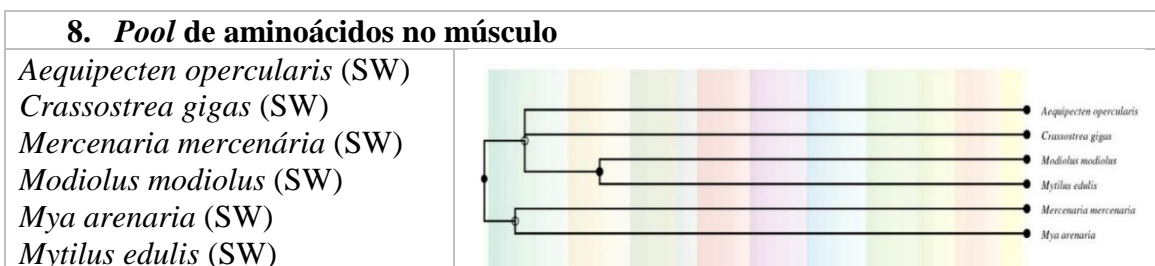
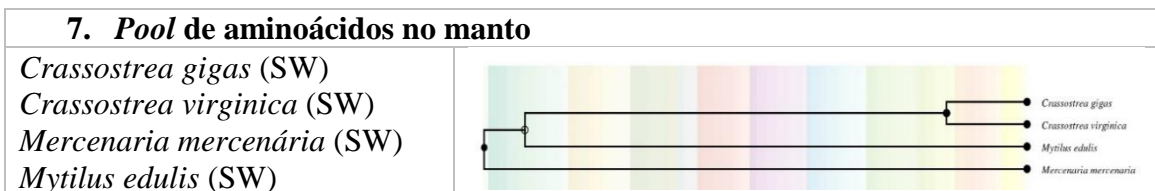
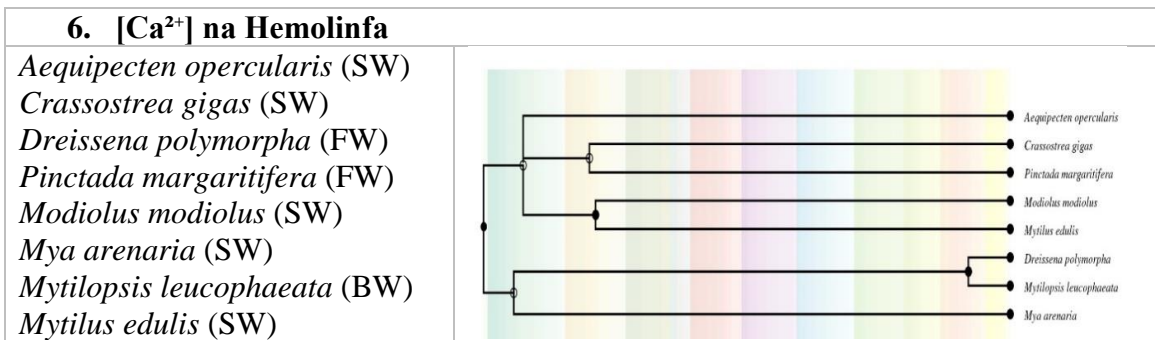
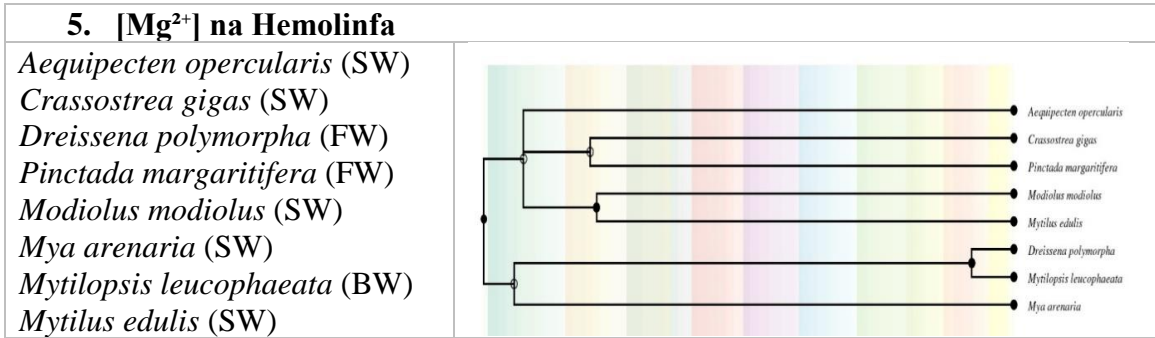
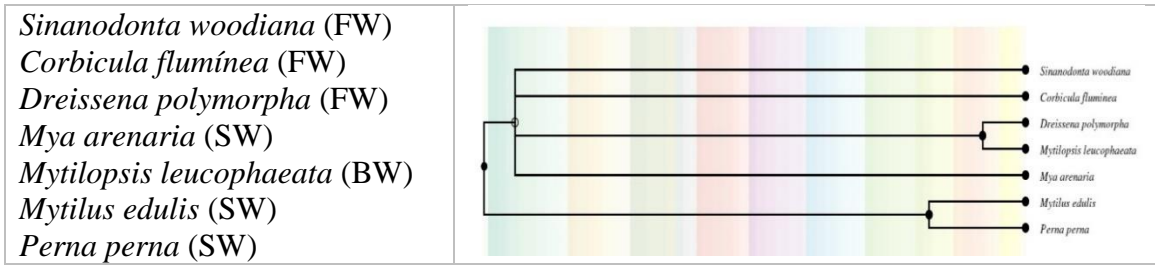
Espécie	Habitat	Tecido	Condição	Taurina	Alanina	Glicina	Referência
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Marinho	Tecidos moles	35,5g/L	Não há fator de correção para esse tecido	Não há fator de correção para esse tecido	Não há fator de correção para esse tecido	Babarro et al., 2011
<i>Ensis siliqua</i>	Marinho	Tecidos moles	35,5 psu	Não há fator de correção para esse tecido	Não há fator de correção para esse tecido	Não há fator de correção para esse tecido	Baptista et al., 2014
<i>Mytilopsis leucophaeata</i>	Estuarino	Tecidos moles	20 mOsm	Não há fator de correção para esse tecido	Não há fator de correção para esse tecido	Não há fator de correção para esse tecido	Deaton et al., 1989
<i>Mytilus edulis</i>	Marinho	Tecidos moles	30 ‰	0,082599	-	-	Lange, 1963
<i>Mytilus edulis</i>	Marinho	Tecidos moles	30 ‰	Não há fator de correção para esse tecido	Não há fator de correção para esse tecido	Não há fator de correção para esse tecido	Livingstone et al., 1979
<i>Chamelea gallina</i>	Marinho	Tecidos moles	37 ‰	0,04	0,015	0,022	Zurburg e Zwaan, 1981
<i>Anadara cornea</i>	Marinho	Tecidos moles	37 ‰	0,065	0,003	0,007	Zurburg e Zwaan, 1981
<i>Geukensia demissa</i>	Marinho	Ventrículo	940 mOsm	Não há fator de correção para esse tecido	Não há fator de correção para esse tecido	Não há fator de correção para esse tecido	Neufeld e Wright, 1998

APÊNDICE F – Listagem de espécies¹² por parâmetro fisiológico e sua respectiva filogenia

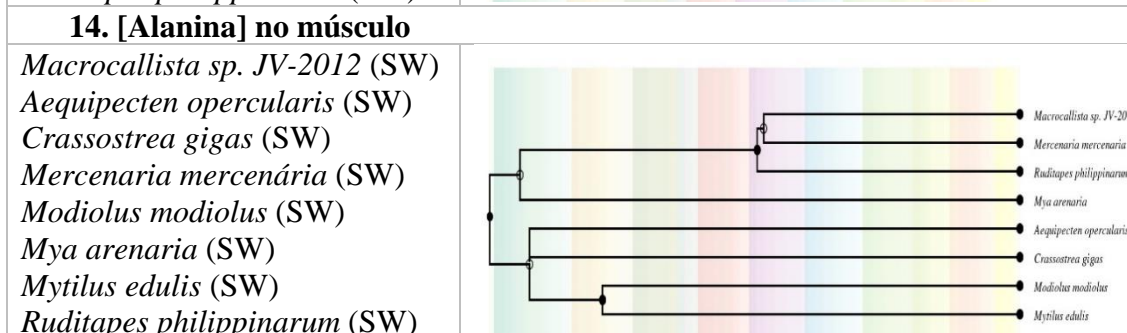
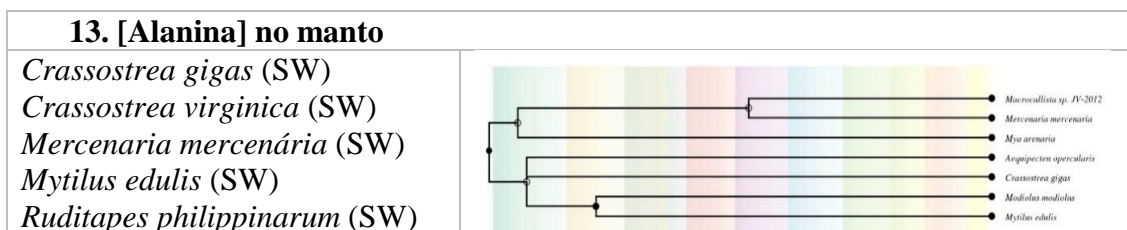
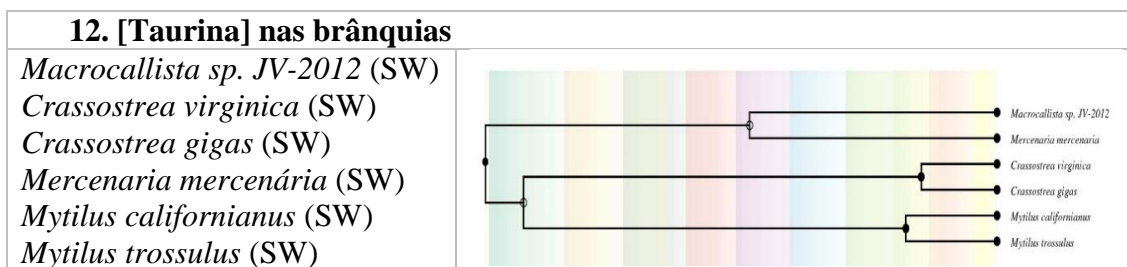
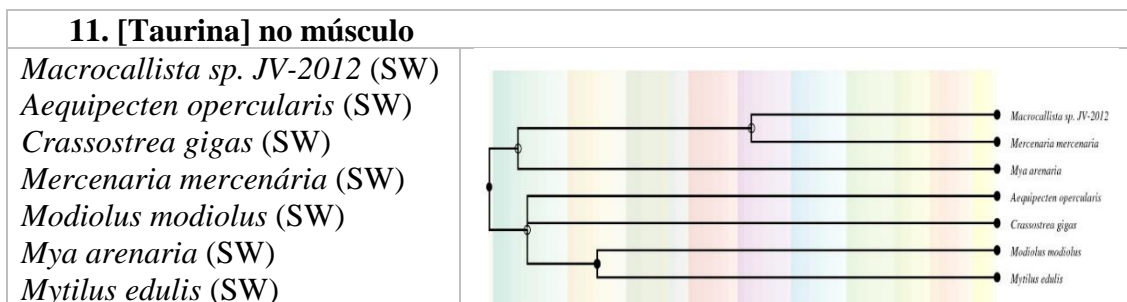
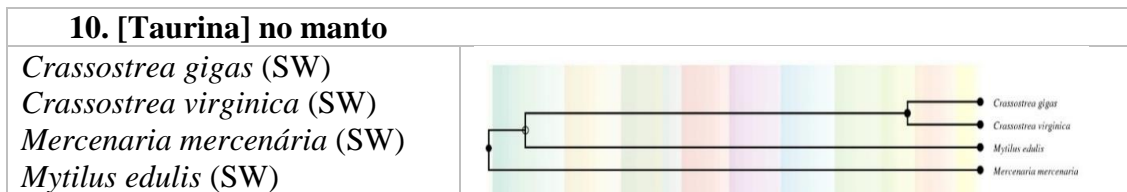


4. [Cl⁻] na Hemolinfa

¹² Nichos osmóticos de cada espécie representados pelas siglas FW – dulcícola; BW – estuarino; SW – marinho.

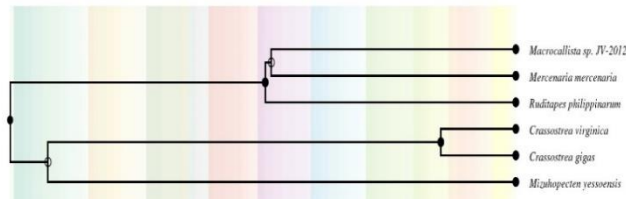


<p>9. Pool de aminoácidos nas brânquias</p>
--



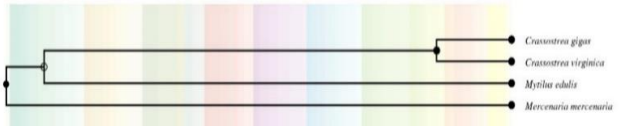
15. [Alanina] nas brânquias

Macrocallista sp. JV-2012 (SW)
Crassostrea virginica (SW)
Crassostrea gigas (SW)
Mercenaria mercenária (SW)
Mizuhopecten yessoensis (SW)
Ruditapes philippinarum (SW)



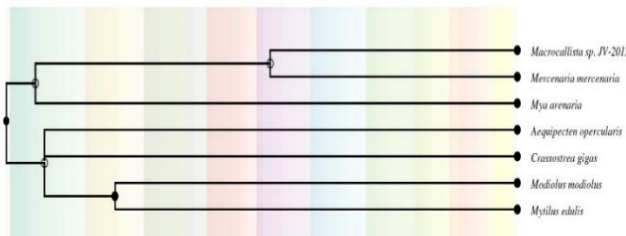
16. [Glicina] no manto

Crassostrea gigas (SW)
Crassostrea virginica (SW)
Mercenaria mercenária (SW)
Mytilus edulis (SW)



17. [Glicina] no músculo

Macrocallista sp. JV-2012 (SW)
Aequipecten opercularis (SW)
Crassostrea gigas (SW)
Mercenaria mercenária (SW)
Modiolus modiolus (SW)
Mya arenaria (SW)
Mytilus edulis (SW)



18. [Glicina] nas brânquias

Macrocallista sp. JV-2012 (SW)
Crassostrea virginica (SW)
Crassostrea gigas (SW)
Mercenaria mercenária (SW)

