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

# Um estudo eletrofisiológico e ultraestrutural do transporte iônico transepitelial em camarões e caranguejos (CRUSTACEA, DECAPODA)

Antonio Hernandes Torres Júnior

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

RIBEIRÃO PRETO - SP 2006

# Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

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

# Um estudo eletrofisiológico e ultraestrutural do transporte iônico transepitelial em camarões e caranguejos (CRUSTACEA, DECAPODA)

Antonio Hernandes Torres Júnior

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

Orientado por John Campbell McNamara Co-orientado por Horst Willhelm Onken

## RIBEIRÃO PRETO - SP 2006

# FICHA CATALOGRÁFICA

Torres Jr., Antonio Hernandes

Um estudo eletrofisiológico e ultraestrutural do transporte iônico transepitelial em camarões e caranguejos (Crustacea, Decapoda). Ribeirão Preto, 2006.

p. 117:il.

Bibliografia: p. 111.

Tese de Doutorado – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo/USP.

Orientador: McNamara, John Campbell

Co-orientador: Onken, Horst Willhelm

1. Osmorregulação. 2. Crustacea. 3. Decapoda. 4.

Perfusão. 5. Eletrofisiologia. 6. Ultraestrutura.

### AGRADECIMENTOS

Dr. John Campbell McNamara, pela orientação e dedicação, por tornar disponíveis os recursos do Laboratório de Fisiologia de Crustáceos do Departamento de Biologia da FFCLRP/USP.

Dr. Horst Willhelm Onken, pela co-orientação, ao disponibilizar os recursos do convênio CAPES-DAAD utilizados nos experimentos de eletrofisiologia, e pela paciência e atenção, agradeço.

Programa de Pós-Graduação em Biologia Comparada do Departamento de Biologia da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP, na pessoa de seu coordenador, Prof. Dr. John McNamara.

Departamento de Biologia da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP, Prof. Dr. Wagner Eustáquio Paiva Avelar, Prof. Dr. Evandro Camilo e Prof. Dr. João Atílio Jorge, pela disponibilidade dos recursos do Departamento.

À Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP, na pessoa de seu antigo diretor, Prof. Dr. Oswaldo Baffa Filho e na pessoa de seu atual diretor, Prof. Dr. Francisco de Assis Leone, agradeço pela disponibilidade do espaço e dos recursos da Faculdade.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pela disponibilidade dos recursos da Bolsa de Doutorado e da Reserva Técnica de Bolsas (Processo #01/08730-0).

Departamento de Biologia Celular e Bioagentes Patogênicos da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP, microscópio eletrônico de transmissão e demais facilidade do Laboratório de Microscopia Eletrônica.

Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis – IBAMA, do Ministério do Meio Ambiente, licença de coleta dos crustáceos.

Faculdades Integradas Aparício Carvalho – FIMCA, Prof. Dr. Aparício Carvalho de Moraes e Dra. Maria Silvia Fonseca Ribeiro Carvalho de Moraes, auxílios na confecção da Tese de Doutorado e deslocamento de Porto Velho/RO a Ribeirão Preto/SP.

À Maria Tereza Picinoto Maglia, José Augusto Maulin e Maria Dolores Seabra Ferreira, do Laboratório de Microscopia Eletrônica do Departamento de Biologia Celular e Bioagentes Patogênicos da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP, pela ajuda técnica nos procedimentos de microscopia eletrônica de transmissão.

Prof. Dr. Wagner Cotroni Valente, do Laboratório de Carcinucultura da Universidade Estadual Paulista – UNESP em Jaboticabal, exemplares de *Macrobrachium rosenbergii*.

Laboratório de Microscopia Eletrônica da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP em Jaboticabal/SP, Profa. Dra. Isabel Boleli, pelo acesso ao microscópio eletrônico de transmissão.

Centro de Biologia Marinha da Universidade de São Paulo – CEBIMar/USP em São Sebastião/SP, Profa. Dra. Eleonora Trajano e Prof. Dr. Álvaro Esteves Migotto.

Laboratório de Bioquímica de Fungos do Departamento de Biologia da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP, Prof. Dr. João Atílio Jorge, acesso aos equipamentos.

Laboratório de Biologia Molecular de Plantas do Departamento de Biologia da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP, Profa. Dra. Maria Helena Goldman.

Prof. Dr. Pietro Ciancaglini do Departamento de Química da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP pelo empréstimo do "Gradient Maker" para a confecção do SDS-PAGE.

Dr. Robert Tew Boyle, Fernanda Tinti Bell e Suzie Keiko Teixeira Rocha pela convivência durante estes anos.

Aos colegas Daniel Pergher, Gustavo Tanaka e Anselmo Nogueira pela agradável convivência.

Agradeço à minha família - Antonio Hernandez Torres, Júlia Olindo de Carvalho Torres, Helke Carvalho Hernandes e Waldemeriton Carvalho Hernandez - pelo admirável auxílio nos anos de Doutoramento.

E aos caranguejos e camarões que, compulsoriamente, contribuíram com as vidas para este estudo, meus sinceros agradecimento e respeito.

Para Louise, com amor.

# ÍNDICE

FICHA CATALOGRÁFICA	. 2
AGRADECIMENTOS	. 3

ÍNDICE	6
RESUMO DA TESE	8
CAPÍTULO 1. PANORAMA GERAL DA OSMORREGULAÇÃO	11
CAPÍTULO 2. ELETROFISIOLOGIA DE BRÂNQUIAS PERFUNDIDAS DO	
CAMARÃO DIÁDROMO Macrobrachium rosenbergii	24
2.1 INTRODUÇÃO	24
2.2 MATERIAIS E MÉTODOS	28
2.3 RESULTADOS DOS PARÂMETROS ELETROFISIOLÓGICOS DE PER	FUSÃO
DE BRÂNQUIAS DE Macrobrachium rosenbergii	37
2.4 DISCUSSÃO DA ELETROFISIOLOGIA DE BRÂNQUIAS PERFUNDIDA	AS DE
Macrobrachium rosenbergii	46
2.5 FIGURAS DE ELETROFISIOLOGIA DE TRANSPORTE EM BRÂNQUIA	NS .
PERFUNDIDAS DE Macrobrachium rosenbergii	55
CAPÍTULO 3. HISTOLOGIA E ULTRAESTRUTURA DE BRÂNQUIA DO	
CARANGUEJO DE ÁGUA DOCE Dilocarcinus pagei	66
3.1 INTRODUÇÃO	66
3.2 MATERIAIS E MÉTODOS	71
3.3 RESULTADOS	79
3.4 DISCUSSÃO DA HISTOLOGIA E ULTRAESTRUTURA DAS BRÂNQUI	AS DE
Dilocarcinus pagei	87
3.5 FIGURAS DA ORGANIZAÇÃO HISTOLÓGICA DAS BRÂNQUIAS DE	
Dilocarcinus pagei	92
3.6 ELETROMICROGRAFIAS DE ULTRAESTRUTURA DAS BRÂNQUIAS	DE
Dilocarcinus pagei	95
CAPÍTULO 4. DISCUSSÃO INTEGRADA	103
ABSTRACT	108
LITERATURA CITADA	111

### **RESUMO DA TESE**

Os crustáceos de água doce, confrontados com um gradiente elevado de NaCl entre a hemolinfa e o meio externo tendem a perder sal e ganhar água através das superfícies corporais. Os seus órgãos osmorreguladores, tais como as brânquias e a glândulas antenais, são responsáveis por manterem a homeostase de sal e água contra esse elevado gradiente. Para isso capturam e reabsorvem NaCl compensando as perdas difusivas de sal. Essa habilidade foi fundamental para a invasão da água doce pelos camarões palemonídeos. O objetivo deste trabalho foi investigar a biologia comparada do transporte iônico transepitelial nas brânquias camarões e caranguejos.

No camarão diádromo de água doce *Macrobrachium rosenbergii*, as brânquias posteriores foram perfundidas com diversas salinas para experimentação eletrofisiológica. As manipulações com substituição de íons e adição de alguns inibidores do transporte iônico nas salinas perfundidas, simétricas no lado externo e interno do epitélio, demonstraram que o epitélio produz uma voltagem que pode englobar a absorção ativa (sensível ao inibidor metabólico NaCN) de Na<sup>+</sup>, que ocorre provavelmente por intermédio de um canal de Na<sup>+</sup> ou um trocador Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> apicais sensíveis à amiloride, e é dependente da atividade de uma Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase. Uma pequena voltagem decorrente da captura de Cl<sup>-</sup> foi também medida, e se mostrou sensível ao inibidor de uma V(H<sup>+</sup>)-ATPase, concanamicina, mostrando que esta bomba de prótons também desempenha um papel no transporte iônico transepitelial.

Os resultados corroboram um modelo semelhante de captura de Na<sup>+</sup> dependente de canais apicais de sódio em série com uma Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase proposto anteriormente por este laboratório. O gradiente eletroquímico produzido pela atividade desta ATPase permite a captura de Na<sup>+</sup> na água doce. O acoplamento elétrico entre

as células pilares e as células do septo branquial permite a passagem do Na<sup>+</sup> ao longo da rota de captura até a hemolinfa.

Análises das brânquias posteriores e anteriores do caranguejo de água doce *Dilocarcinus pagei* também foram feitas no intuito de se revelar a ultraestrutura do epitélio branquial e marcar a atividade *p*-NPPásica de uma Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase. Os experimentos envolvendo ultraestrutura das brânquias do caranguejo de água doce *Dilocarcinus pagei* mostraram, ao nível ultraestutural, uma diferenciação entre os dois lados da lamela branquial nas brânquias posteriores, aonde um lado distal apresenta características de um epitélio ionotransportador, menos desenvolvido do que no lado proximal, apesar dos dois lados mostrarem uma marcação ultracitoquímica para a Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase, indicando a ubiqüidade desta enzima.

Os resultados indicam que existem dois processos fundamentais de transporte, um de Cl<sup>-</sup> e outro de Na<sup>+</sup>, demonstrados de modo eletrofisiológico e estrutural e que tal separação de processos possibilitou aos dois crustáceos estudados a invasão do ambiente dulcícola. CAPÍTULO 1. PANORAMA GERAL DA OSMORREGULAÇÃO

## CAPÍTULO 1. PANORAMA GERAL DA OSMORREGULAÇÃO

### A. OSMORREGULAÇÃO DEPENDENTE DO TRANSPORTE IÔNICO

Em um organismo multicelular, os fluídos como sangue e hemolinfa atuam como tampões entre o interior das células (citosol) e o meio ambiente. A habilidade de sobreviver em uma variedade de ambientes com diferentes concentrações osmóticas é observada em vários grupos animais. Um dos requerimentos na regulação de ambientes internos é a quantidade apropriada de água retida nesses ditos tampões corporais. Outro importante requerimento para a sobrevivência de organismos multicelulares é a presença de inúmeros solutos (sais e nutrientes, por exemplo) em concentrações apropriadas no fluído extracelular (hemolinfa) e intracelular (citosol) (Randall *et al.*, 1997).

O fluído intracelular da maioria dos animais possui pequena concentração de sódio, mas apresenta elevada concentração de potássio, fosfato, proteínas e aminoácidos livres. Existem, portanto, diferenças iônicas entre os fluídos intra e extracelulares que podem ocasionar pequenas diferenças osmóticas de magnitude e duração variáveis através da membrana celular. Os epitélios externos dos animais, entretanto, podem confrontar elevadas diferenças iônicas e osmóticas entre estes animais e seus meios.

Os animais requerem nutrientes e oxigênio para manter o metabolismo, e como resultado do metabolismo, eles produzem resíduos que devem ser eliminados. As membranas celulares permeáveis ao oxigênio também são à água. Assim, a manutenção do equilíbrio iônico e osmótico deve ser feita com gasto de energia.

Vários mecanismos são empregados para controlar os problemas osmóticos e iônicos entre os fluídos intra e extracelulares e entre estes e o meio ambiente. Tais mecanismos são chamados coletivamente de *mecanismos osmorregulatórios* e a

evolução de mecanismos osmorregulatórios eficientes tiveram pronunciado efeito sobre a diversificação animal.

Os animais podem manter a concentração osmótica do fluído extracelular diferente do meio da qual vivem e por isso são chamados de osmorreguladores. Um animal que não controla esta concentração osmótica extracelular é chamado de osmoconformador. Os invertebrados aquáticos, de água doce, salobra ou marinha, são expostos a várias salinidades ambientais.

Nos invertebrados marinho tais como crustáceos, a quantidade dos dois principais osmólitos inorgânicos, Na<sup>+</sup> e Cl<sup>-</sup>, estão em equilíbrio quase passivo entre a hemolinfa (o líquido extracelular) e o meio ambiente, característica chamadade isosmoticidade em relação ao meio ambiente (Croghan, 1976). Tais animais, portanto, não precisam gastar energia para a regulação da osmolilidade de seu fluído extracelular. Em água doce, entretanto, os animais são hiposmóticos, com a concentração osmótica do fluído extracelular maior do que a do meio ambiente. Desse modo, estes animais aquáticos de água doce enfrentam dois tipos de problemas: 1) gradientes elevados estabelecem movimentos passivos de entrada corpórea de água, e 2) perda de sais corporais através das superfícies epiteliais (Mantel e Farmer, 1983).

Muitos dos estudos que tentaram entender os mecanismos osmorregulatório foram conduzidos em animais de água doce, pela constatação que estes exercem o que se chama estritamente de regulação. Para exemplificar, tomam-se os experimentos clássicos de August Krogh (1937, 1938), utilizando rãs. Estes experimentos demonstraram pela primeira vez que animais de água doce compensam a perda de sal através da captura ativa de NaCl pela pele. Esta captura de sal pelos epitélios corporais envolve inúmeros processos de transporte iônico.

O transporte iônico transepitelial existente nos mecanismos osmorregulatórios é um fenômeno global que reflete a presença de proteínas da membrana celular tais como canais iônicos, antiportadores e simportadores, bem como a existência de íons a serem transportados. Qual é a energia necessária para produzir o trabalho ionotransportador e, conseqüentemente, as correntes iônicas? Obviamente a energia vem da quebra das ligações químicas do ATP, energia essa transformada em trabalho ionomotivo pela atividade de enzimas transmembranais, ionotransportadoras tais como a Mg<sup>2+</sup>-Adenosina Trifosfatase Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-dependente (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase) (Lingrell e Kuntzweiller, 1994). Essa ATPase, sensível à ouabaína (Skou, 1965), pertence à classe das P-ATPases. O ciclo de funcionamento da enzima envolve dois estados conformacionais, um fosforilado de alta energia, e um não fosforilado de energia reduzida.

### B. ESTUDO DE UM CLADO PARTICULAR: CRUSTÁCEOS DECÁPODOS

Ubíqua a quase todas as células animais, a atividade Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPásica foi sistematicamente medida em muitos crustáceos decápodos, como por exemplo, nas brânquias de caranguejos braquiúros (Spencer *et al.*, 1979, Castilho *et al.*, 2001) e de camarões carídeos (Stern *et al.*, 1984; Provérbio *et al.* 1990, Lima *et al.*, 1997; Furriel *et al.*, 2000) e nas glândulas renais de lagostins (Kamemoto e Tullis, 1972) e lagostas (Sarver *et al.*, 1994). Tais estudos demonstraram o papel central desta ATPase nos mecanismos que permitem a regulação osmótica e iônica dos fluidos internos nestes crustáceos. Portanto, nos crustáceos, o estudo dos mecanismos osmorregulatórios também envolve o estudo do transporte iônico promovido pela Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase.

Um exemplo onde os mecanismos de transporte iônico estão razoavelmente entendidos é a brânquia de caranguejos braquiúros. O Na<sup>+</sup> é capturado primariamente nas brânquias posteriores por células epitelais, e este processo é mantido por uma Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase (Péqueux, 1995). O cátion penetra nas células através de trocadores iônicos e canais de Na<sup>+</sup> nas dobras de membranas apicais, passando da célula para a hemolinfa via uma Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase (Towle e Kays, 1986).

Em anos recentes, grande volume de informações sobre a base ultraestrutural e a dinâmica osmorregulatória surgiu com o estudo de camarões palemonídeos, conhecidos popularmente no Brasil como "Pitus". No palemonídeo de água doce *Macrobrachium olfersii*, os sítios de atividade da Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>ATPase foram marcados ultracitoquimicamente utilizando-se o substrato sintético *para*-Nitrofenilfosfato (*p*-NPP). Os sítios de acúmulo de produto de reação da Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase localizaram-se nas invaginações da membrana das células do septo intralamelar (McNamara e Torres, 1999). Nas glândulas antenais (ou glândulas renais), essa atividade localiza-

se nas invaginações da membrana basal das células epiteliais dos túbulos renais de calibre médio (McNamara e Torres, 1999).

O grupo de crustáceos decápodos representado pelos camarões palemonídeos invadiu com sucesso o ambiente aquático dulcícola (Felgenhauer e Abele, 1983) e as espécies existentes atualmente exibem variados graus de adaptação aos ambientes aquáticos pobres em sal. Muitas espécies de palemonídeos do gênero *Macrobrachium* estão distribuídas no ambiente neotropical. De modo interessante, apesar de ser um gênero cosmopolita e contar com representantes marinhos e de estuário, em nenhum outro ambiente os camarões se diversificaram mais do que nos rios brasileiros (Holthius, 1952; Moreira *et al.,* 1983).

As capacidades osmorregulatórias e ionorregulatórias têm sido examinadas em várias espécies do gênero *Macrobrachium* (Dene, 1968; Moreira *et al.*, 1983; Stern *et al.*, 1987; Souza e Moreira, 1994; Funge-Smith *et al.*, 1995; Brailovsky e Galera, 1997; Wildere *et al.*, 1998). Poucos estudos, entretanto, se concentraram no genro *Palaemon* (Born, 1968; Knowlton e Kirby, 1984; Knowlton e Schoen, 1984; Kirkpatrick e Jones, 1985; Taylor *et al.*, 1987, Campbell e Jones, 1989). Este grupo taxonômico palemonídeo apresenta espécies em um grau intermediário no processo de invasão de ambientes menos salinos (Freire *et al.*, 2003).

O estudo das tendências osmorregulatórias nestes dois gêneros de camarões palemonídeos é fundamental para entender as estratégias e mecanismos de transporte iônico transepitelial que estão atuando na adaptação fisiológica e foram objetos de pressão seletiva. As capacidades osmorregulatórias destas espécies de palemonídeos refletem ao mesmo tempo diferentes permeabilidades iônicas e diferentes processos de transporte iônico transepitelial.

Tais processos estão particularmente concentrados em dois órgãos osmorregulatórios, as brânquias filobranquiadas e as glândulas antenais. Estes são os principais transportadores de Na<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup> e Mg<sup>2+</sup> em crustáceos decápodos. Vários estudos também propuseram um importante papel para as brânquias e glândulas antenaisnos processos que transportam Ca<sup>2+</sup> (Wheatly, 1999).

O estudo das proteínas de membrana das células ionotransportadoras das brânquias e glandulas antenais dos crustáceos é fundamental para entender o processo osmorregulatório. O milleu protéico, em última análise, é quem vai definir a capacidade e plastacidade osmorregulatória destas espécies de camarões palemonídeos, por exemplo. Com base em alguns trabalhos recentes, um modelo de captura de Na<sup>+</sup> nas brânquias do camarão de água doce *M. olfersii*, foi inicialmente proposto por McNamara e Lima (1997) e complementado por McNamara e Torres (1999) (Fig. 1.1).

O gradiente eletroquímico gerado pela Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase, localizada nas invaginações da membrana do septo intralamelar, estimularia o deslocamento de Na<sup>+</sup> para a célula pilar via canais de Na<sup>+</sup> ou trocadores iônicos NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> (Armstrong *et al.*, 1981. Kirschner, 2001) localizados nas evaginações apicais. O Na<sup>+</sup> passaria para a célula do septo intralamelar através das junções elétron-lucentes entre as células pilares e as células do septo, e a partir daí translocado para a hemolinfa via a Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase.



Figura 1.1 Modelo de movimento iônico e de água pelo epitélio branguial no camarão palemonídeo M. olfersii quando em água doce. O modelo baseia-se na localização da Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase nas invaginações da membrana plasmática da célula do septo intralamelar. Neste local, essa enzima proporciona o gradiente eletroquímico responsável pelo influxo de Na<sup>+</sup> do meio externo para a hemolinfa. O epitélio abaixo da cutícula está em continuidade elétrica com as células do septo. Mostra-se neste modelo somente uma metade do epitélio, sendo que a outra metade representa uma camada de células pilares simétrica à mostrada aqui. Fonte: McNamara e Torres (1999).

Em anos recentes, o modelo de captura iônica nas células branquiais de crustáceos apresentado na Figura 1.1 se mostrou incompleto. Outros estudos contribuíram para o aumentoda complexidade do modelo. Nas brânguias posteriores do caranguejo eurialino Eriocheir sinensis, uma V(H<sup>+</sup>)-ATPase pode atuar indiretamente no processo de transporte iônico transepitelial, particularmente no que se refere ao Cl<sup>-</sup> (Onken e Putzenlechner, 1995). Furriel et al. (2000) demonstraram que mais de 20% da atividade ATPásica da brânguia do camarão de água doce Macrobrachium olfersii era sensível ao bloqueador específico da V(H<sup>+</sup>)-ATPAse, a Bafilomicina A<sub>1</sub>. McNamara e Torres (1999) estudando a atividade da Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase nas brânquias e nas glândulas antenais do camarão de água doce Macrobrachium *olfersii*, demonstraram uma marcação ultracitoquímica de atividade de uma *p*-NPPase apical que era insensível ao tratamento com ouabaína e que portanto, não representava uma Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase.

A V(H<sup>+</sup>)-ATPase está presente em quase todas as células eucarióticas, sendo encontrada nas membranas de organelas citoplasmáticas bem como nas membranas plasmáticas (Nelson e Harvey, 1999). A enzima é um análogo da  $F_1F_0$ -ATPsintase, enzima presente nas membranas internas das mitocôndrias e membranas tilacóides dos cloroplastos. Ela é a responsável final pela síntese de ATP nestas organelas (Lodish *et al.* 2000).

Em muitos epitélios ionotransportadores existem evidências dessa enzima, tais como o ducto coletor nos rins de mamíferos (Brown *et al.*, 1988), brânquias de peixes de água doce (Fenwick *et al.*, 1999), brânquias de caranguejos (Onken e Putzenlechner, 1995; Towle *et al.* 2001), e nas brânquias de lagostins de água doce (Zare e Greenaway, 1998). Essa ATPase translocadora promove um gradiente eletroquímico de prótons que serve como força eletroquímica para transportadores passivos (Wieczorek, 1992; Nelson e Harvey, 1999).

Mudanças ultraestruturais, fisiológicas e bioquímicas ocorridas no epitélio branquial do camarão de água doce *Macrobrachium olfersii* aclimatizado a um meio de salinidade elevada (28 S) foram extensamente documentadas (Freire e McNamara, 1995; Lima *et al.*, 1997; McNamara e Lima, 1997). Após 10 dias de aclimatização, uma das alterações ultraestruturais mais visíveis, a diminuição na superfície de contato das células pilares branquiais com o meio externo, por meio de redução na altura e densidade das evaginações apicais. As células do septo intralamelar, por sua vez, exibem um notável aumento na sua já elevada relação de superfície de membrana por volume celular após a aclimatização a um meio de

elevada salinidade por 10 dias (Freire e McNamara, 1995; McNamara e Torres, 1999). Todavia, a atividade da Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase mostrou-se 40% menor após essa aclimatização (Lima et al., 1997), dados estes corroborados pela drástica diminuição da marcação ultracitoquímica da Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase (McNamara e Torres, 1999). Os eventos citados acima estão resumidos na Figura 1.2 (comparar com Figura 1.1).



Figura 1.2 Rearranjo utraestrutural e fisiológico no modelo de fluxo iônico e de água na brânquia do camarão de água doce *M. olfersii* quando aclimatizado a uma salinidade de 28 S por 10 dias. Compare com a Figura 1.1. Observa-se um aumento na área de dobras da membrana da células do septo intralamelar, uma diminuição da atividade da Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase e uma redução no tamanho e na altura das evaginações apicail das células pilares. Fonte: McNamara e Torres (1999).

Esta estratégia experimental é utilizada por muitos grupos de pesquisa que trabalham com crustáceos. A aclimatização de espécies em ambientes de salinidade diferente da usualmente encontrada representa um desafio osmótico induzido que revela a plasticidade fisiológica de algumas espécies e mais profundamente, revela a plasticidade dos mecanismos branquiais de regulação que possibilitam este tipo de aclimatização. (Luquet *et al.*, 1997; Martinez *et al.*, 1998; Flik e Haond, 2000; Luquet *et al*, 2002).

As proteínas de membrana descritas até aqui são transformadores primários da energia química estocada na molécula de ATP. Como um sistema complexo, subsistemas (partes individuais do sistema maior que atuam de forma independente) transformam a energia livre armazenada em potencial eletroquímico para integrar o sistema, ou seja, dar cabo do transporte iônico transepitelial. Os subsistemas constituem-se de transportadores inúmeros, mas o foco principal recai sobre aqueles que transportam Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, PO<sub>4</sub><sup>2-</sup> e HCO<sub>3</sub><sup>2-</sup>.

Modelos teórico-experimentais de mecanismos de osmorregulação que tentam descrever os componentes e seu funcionamento estão em voga atualmente. Alguns são extremamente complexos e outros, entretanto, pecam pela maneira simplista como abordam o assunto. Nos crustáceos, aonde o volume de informações cresce assustadoramente, existem basicamente 2 tipos de modelos: i) modelos de epitélio simples que se baseiam estritamente em experimentação, tais como os observados abaixo na Fig. 1.3, na qual um epitélio qualquer transporta Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> e Cl<sup>-</sup>.



Figura 1.3. Modelo de transporte de Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> e Cl<sup>-</sup> através de um epitélio simples. No lado serosal do epitélio encontra-se uma Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase que cria condições para um transporte de sódio e potássio e cloreto. Note que o movimento de cloreto é ao nível paracelular.

ii) modelos de epitélios não-simples (não caberia a designação de complexos) que se baseiam em dados experimentais críticos, contudo tomam certa liberdade necessária para fornecer uma visão global. Na segunda categoria estão os modelos das Figuras 1.1 e 1.2. É interessante notar que os modelos estão incompletos quanto ao caminho por onde passa o CI<sup>-</sup>; a inexistência do transporte de Ca<sup>2+</sup> no modelo também o reduz, já que o Ca<sup>2+</sup> se mostra dependente da captura osmorregulatória de Na<sup>+</sup> (Wheatly, 1999; Flik e Haond, 2000).

O que este capítulo tentou mostrar foi que o transporte iônico transepitelial é um dos pilares dos mecanismos osmorregulatórios, particularmente no que concerne o problema osmótico enfrentado pelos animais de água doce. O estudo dos mecanismos de transporte iônico transepitelial, então, dará subsídios para um maior entendimento da osmorregulação. É interessante verificar também que uma

capacidade osmorregulatória eficaz foi importante no estabelecimento da biodiversidade encontrada atualmente.

Também constou deste capítulo a apresentação dos problemas osmorregulatórios nos crustáceos. Estes animais representam um grupo diverso e, tal diversidade está intimamente ligada à evolução de mecanismos osmorregulatórios. Portanto, o estudo do transporte iônico transepitelial em curstáceos é útil não só para o entendimento dos mecanismos gerais da osmorregulação como também para a compreensão da enorme diversidade encontrada atualmente neste grupo.

Esta obra se propõe a uma busca de conhecimento sobre os processos de transporte iônico transepitelial através de experimentação biológica com diferentes espécies de crustáceos, que habitam diferentes ambientes e que enfrentam diferentes desafios osmóticos. Para isso, o transporte iônico transepitelial foi estudado sob enfoque dos processos eletrofisiológicos, celulares e moleculares que atuam de forma integrada e que possibilitam a sobrevivência dessas espécies e seus meio ambientes. Os diversos experimentos estão apresentados nos próximos capítulos desta obra.

CAPÍTULO 2. ELETROFISIOLOGIA DE BRÂNQUIAS PERFUNDIDAS DO CAMARÃO DIÁDROMO Macrobrachium rosenbergii

## CAPÍTULO 2. ELETROFISIOLOGIA DE BRÂNQUIAS PERFUNDIDAS DO CAMARÃO DIÁDROMO Macrobrachium rosenbergii

## 2.1 INTRODUÇÃO

Os mecanismos de absorção de Na<sup>+</sup> e Cl<sup>-</sup> nas brânquias de crustáceos decápos têm sido amplamente estudados (Lucu, 1990; Pequéux, 1995; Lucu e Towle, 2003). A quantidade de informações disponíveis sobre a localização específica do transportador de membrana sensível à oubaína, Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase torna incompleta a constante afirmação de uma localização celular basolateral deste fundamental transportador transmembranal. Ao se observar as localizações dessa enzima nas diversas arquiteturas celulares branquiais de crustáceos de água doce, é prudente afirmar que, muito mais do que uma localização basolateral, esta enzima se localiza em um local fundamental para que o transporte diferencial de Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup> resulte em uma captura resultante de NaCI.

O conhecimento atual sobre os fenômenos de transporte transepitelial indica que a captura de Na<sup>+</sup> e Cl<sup>-</sup> podem ser desacopladas, como proposto por Onken e Graszynski (1989) e por Onken e Putzenlechner (1995) nas brânquias posteriores do caranguejo chinês *Eriocheir sinenses*, um caranguejo hiperregulador iônico que migra sazonalmente de ambientes de água doce para água salobra para se reproduzir. A voltagem transepitelial medida em brânquias perfundidas do caranguejo mostrou também que esta voltagem em salina dita fisiológica era positiva se medida com referência ao meio interno, mostrando uma absorção de Na<sup>+</sup>. Quando o Na<sup>+</sup> era substituído na salina por outro composto como colina, esta voltagem hiperpolarizava, ou seja, aumentava consideravelmente. Quando o Cl<sup>-</sup> era substituído da salina por

gluconato, entretanto, a voltagem transepitelial medida se tornava negativa, indicando a capacidade de absorção independente de Na<sup>+</sup> e Cl<sup>-</sup> (Onken e Graszynski,1989).

Estudos em *E. sinensis* (Onken e Putzenlechener, 1995) sobre as correntes elétricas de captura de Na<sup>+</sup> e Cl<sup>+</sup> em brânquias posteriores divididas ao meio indicaram que uma V(H<sup>+</sup>)-ATPase está atuando na captura de Cl<sup>-</sup> mas não na de Na<sup>+</sup>, aumentando a quantidade de informações no sentido de melhor compreender este fenômeno desacoplado de captura de NaCla.

Observou-se através de medidas de voltagem transepitelial que em alguns casos, uma única brânquia pode estar absorvendo Na<sup>+</sup> e outra Cl<sup>-</sup> de modo independente (Martinez *et al.*, 1998). Estes experimentos utilizaram o carnguejo Uçá, *Ucides cordatus*, um caranguejo semiterrestre que pode ser hiper ou hiporregulador das concentrações iônicas da hemolinfa. Brânquias posteriores adjacentes mostravam polaridades da voltagem transepitelial invertidas quando o caranguejo estava em água salobra, indicando que estava ocorrendo a captura de Na<sup>+</sup> em uma de Cl<sup>-</sup> na outra.

Estudos que envolveram aspectos fisiológicos, muitas vezes eletrofisiológicos, mostraram que os mecanismos de captura de NaCl das brânquias posteriores de diversas espécies de caranguejos estão inserido em contextos mais amplos de transporte. Um bom modelo prediz que o transporte de Na<sup>+</sup> e Cl<sup>-</sup> está contrabalançado com antiportadores Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> e Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> ou com canais para os respectivos íons no lado apical. Entretanto, poucos destes estudos tentaram contemplar a necessidade destes crustáceos de capturar Ca<sup>2+.</sup>

Devido às suas características físico-químicas, o Ca<sup>2+</sup> não é somente um cátion utilizado em estruturas biomineralizadas, mas também um agente regulador de processos fisiológicos. As concentrações intracelulares e extracelulares apropriadas

de cálcio são finamente reguladas nos crustáceos. Grandes quantias de cálcio são de algum modo transportado através de barreiras epiteliais e do sistema circulatório. Quando crescem, os crustáceos eliminam a antiga cutícula, reabsorvendo antes parte do cálcio em um período de tempo relativamente curto. (Neufeld e Cameron 1993; Wheatly, 1999; Zanotto e Wheatly, 2003).

O deslocamento de Ca<sup>2+</sup> através de epitélios, tais como o epitélio branquial em crustáceos aquáticos, é um evento crucial para a manutenção da sua homeostase, tanto nas fases de muda, quanto nas fases entre mudas (Wheatly, 1999). A fase atual do conhecimento prediz que o deslocamento deste cátion pode estar diretamente ligado com o deslocamento de outros íons que participam no processo de osmorregulação. Assim, é plenamente justificável o estudo de processos branquiais de transporte de cálcio para uma compreensão panorâmica da osmorregulação.

Este capítulo tem por finalidade descrever os processos de captura iônica transepitelial em brânquias de um camarão de água doce, *Macrobrachium rosenbergii*. O conhecimento sobre estes processos de captura iônica cresceu basicamente através de experimentação com caranguejos. É fundamental utilizar estas ferramentas em outros crustáceos para o conhecimento de processos individuais e também para a sedimentação dos modelos de regulação iônica. Além disso, os trabalhos disponíveis não contemplam o estudo da osmorregulação em crustáceos com aspectos eletrofisiológicos originados pelo deslocamento do Ca<sup>2+</sup>. Assim, é objetivo aqui tentar responder diversas questões sobre a eletrofisiologia dos mecanismos branquiais de osmorregulação em um camarão de água doce:

1) Qual é a magnitude da voltagem transepitelial? Ela é comparável com a voltagem transepitelial medida em brânquias de caranguejos marinhos e de água doce? Quais são suas características?

- 2) Esta voltagem é dependente da bomba de sódio, Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase?
- 3) Esta voltagem é dependente da bomba de prótons, V(H<sup>+</sup>)ATPase?
- 4) Que tipos de canais iônicos de Na<sup>+</sup> e Ca<sup>2+</sup> existem nesse epitélio?

Para isso, foram feitos os experimentos descritos a seguir.

## 2.2 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 2.2.1 Obtenção dos camarões

Utilizou-se a espécie de camarão palemonídeo *Macrobrachium rosenbergii* (Figura 2.1), um camarão conhecido popularmente como Gigante da Malásia, originário do sudeste asiático que é criado no Brasil para fins comerciais. A utilização de uma espécie exótica de camarão palemonídeo justificou-se pela necessidade de se trabalhar com brânquias grandes, que permitiam a canulação dos vasos branquiais. Machos e fêmeas, medindo entre 11 e 17 cm da ponta do rostro ao fim do telson e pesando entre 100-300 g foram adquiridos junto ao Laboratório de Carcinucultura da FMVZ da Universidade Estadual Paulista-Unesp em Jaboticabal/SP e trazidos imediatamente em galões de água aerada para o Laboratório de Fisiologia de Crustáceos da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP. Permaneceram acondicionados no laboratório em tanques de pvc de 60 litros. A água foi arejada e mantida a aproximadamente 25 °C. A alimentação consistiu de carne bovina. Foram utilizados somente animais da fase entremuda. Devidos cuidados foram tomados para que essa espécie exótica de camarão não atingisse o ambiente natural.



Figura 2.1 Camarão diádromo de água doce *Macrobrachium rosenbergii* (gigante da Malásia) macho, utilizado nos experimentos eletrofisiológicos. Tamanho natural. Foto: cortesia do prof. Dr. Horst Onken.

### 2.2.2 Material biológico e preparações

Após um rápido seccionamento da corda nervosa ventral de *Macrobrachium rosenbergii* seguida pela retirada da porção mais anterior do rostro, a câmara branquial foi exposta e a sexta e a sétima brânquia, as mais posteriores, foram dissecadas. As brânquias foram então divididas em uma porção dorsal e outra ventral, na altura do local onde penetram os vasos. Foi utilizada sistematicamente a porção dorsal das brânquias (Figura 2.2) porque foi mais fácil canular esta parte da brânquia do que a ventral.



Figura 2.2. (A) Brânquia do tipo Filobrânquia isolada do camarão diádromo de água doce *Macrobrachium olfersii*, semelhante a do camarão *M. rosenbergii* utilizada nos experimentos eletrofisiológicos. Barra de escala: 1,0 mm (B) Lamela branquial, com a indicação do corte na hemilamela que permitiu a visualização de (C). Barra de escala: 0,8 mm. (C) Corte de uma hemilamela branquial isolada, na orentação indicada em (B) em uma perspectiva aonde se observa os canais marginais dos vasos sanguíneos (+). Barra de escala: 0,15 mm. Modificado de McNamara e Lima (1997).

#### 2.2.3 Perfusão

A perfusão da porção dorsal da brânquia de *M. rosenbergii* foi realizada da seguinte maneira: inseriu-se um cateter ligado a uma bomba peristáltica (Ismatec IPC, Suíça) no vaso aferente da brânquia. Desse modo, a salina perfundiu a brânquia no espaço da hemolinfa (ver Figura 1.1 e Figura 1.2), banhando as invaginações da célula do septo e a célula pilar (exceto sua região apical). Em seguida, cortou-se a ponta da brânquia. O cateter inserido no vaso aferente da brânquia foi fixado firmemente através de uma presilha que também impediu o refluxo, mantendo o trajeto em direção à ponta da brânquia. A brânquia foi então colocada em uma câmara de perfusão. Concomitantemente, lavou-se a brânquia com salina aerada

idêntica à perfundida no vaso, utilizando-se a gravidade. A velocidade de perfusão no vaso aferente foi ajustada entre 4-5 ml por minuto.

Em alguns experimentos piloto, a ponta da brânquia não foi cortada e um segundo cateter foi inserido num dos vasos eferentes. Entretanto, sob esta condição, a perfusão mostrou-se demasiadamente lenta. Devido ao fluxo muito lento, corria-se o perigo de contaminação das medidas de voltagem transepitelial com potenciais de difusão.

2.2.4 Medidas da voltagem gerada pelo epitélio branquial (V<sub>te</sub>)

Um esquema de montagem de brânquia numa câmara de perfusão semelhante ao utilizado está demonstrado na Figura 6.



Figura 2.3 Esquema experimental de montagem de uma câmara de perfusão semelhante àquela utilizada para medir a voltagem transepitelial da brânquia do camarão diádromo de água doce *Macrobrachium rosenbergii*. Neste esquema (modificado de Drews e Graszynski, 1987) mostra-se a montagem de um sistema para uma brânquia de um caranguejo do gênero *Uca*, no qual a brânquia possui 2 vasos. Notar, entretanto, que no camarão *Macrobrachium rosenbergii* utilizado aqui, a brânquia possui 3 vasos (ver figura 2.2).

Pontes de agar (agar 3% em KCI 3 M) ligam o banho (representando o meio externo) e o meio de perfusão (representando o meio interno ou a hemolinfa) com eletrodos de calomel que são conectados a um voltímetro digital, componente de um clampeador de voltagem e corrente (VCC 600, Physiologic Instruments, EUA) (Figura 2.4). A voltagem gerada através do epitélio branquial (V<sub>te</sub>) foi medida como a diferença no potencial elétrico entre o lado externo (V<sub>o</sub>) do epitélio (banho) com referência ao meio interno (perfusado) (V<sub>i</sub>) [V<sub>te</sub>=V<sub>o</sub>-V<sub>i</sub>]. V<sub>te</sub> foi registrada continuamente com um registrador gráfico (L250E-2, Linseis, Alemanha) (Figura 2.4).



Figura 2.4 Arranjo do sistema para a aquisição e registro da voltagem transepitelial gerada pelas brânquias do camarão diádromo de água doce *Macrobrachium rosenbergii*. Foto: cortesia do prof. Dr. Horst Onken.

### 2.2.5 Salinas perfusoras

A) Salina completa: para recriar o ambiente osmótico e iônico da hemolinfa, a salina se constituiu (em mM) de NaCl 190, KHCO<sub>3</sub> 2, KCl 5, MgCl<sub>2</sub> 2, gluconato de

cálcio 12, glicose 5 e HEPES 5, de acordo com a Funge-Smith *et al.* (1995). A osmolalidade dessa salina foi de  $433 \pm 7,5$  (N=3), medida através de um 7osmômetro de pressão de vapor Wescor 5500 (Utah, USA).

B) Salina sem sódio: O NaCl foi substituído por cloreto de colina 190 mM.

C) Salina sem cloreto: O NaCl foi substituído por NaNO3 190 mM. KCl foi substituído por KNO<sub>3</sub> 5 mM.

D) Salina sem cloreto e sem sódio: O NaCl foi substituído por Nmetilglucamina. KCl foi subsitituído por KNO<sub>3</sub>.

E) Salina sem cálcio: O gluconato de cálcio foi simplesmente eliminado da salina, que foi acrescentada do quelante de cálcio EGTA 1 mM. Para manter a mesma osmolalidade da salina em relação às demais utilizadas, a retirada gluconato de cálcio foi compensada com um aumento proporcional na concentração de NaCI. Devido à importância do cálcio para a estabilidade das junções celulares, a perfusão de uma salina sem cálcio ocorreu somente no lado externo (banho) do epitélio branquial. Assim, a perfusão de uma salina sem cálcio foi assimétrica.

O pH de todas as salinas foi ajustado em 7,6 com TRIS usando um medidor de pH Corning 320 (New York, USA).

### 2.2.6 Inibidores e bloqueadores

Para avaliar o provável envolvimento da Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase na geração do potencial transepitelial foi utilizado o bloqueador específico Ouabaína (Serva, Suíça). Como inibidor do transporte de sódio (canais e trocadores) foi utilizado Amiloride (Garty e Benos, 1988) (Sigma, EUA).

A dependência na geração de uma voltagem transepitelial da enzima anidrase carbônica em uma situação de ausência de sódio foi testada através de uso do bloqueador Acetazolamida (Sigma, EUA).

Como inibidor da fosforilação oxidativa e da geração de ATP pelas mitocôndrias foi utilizado o veneno cianeto de sódio (NaCN) 1 mM em dissolvido em uma salina completa e em uma salina sem Na<sup>+</sup>.

Para avaliar o envolvimento da V(H<sup>+</sup>)-ATPase na geração do potencial transepitelial foi utilizada uma salina completa adicionada com o bloqueador específico Concanamicina em uma concentração final de 15  $\mu$ M (Sigma, EUA) (Dröse *et al.*, 1993). A solução estoque de concanamicina foi dissolvida em um pequeno volume (20 ml) de salina sem Na<sup>+</sup> com dimetil sulfóxido 0,18% (DMSO 0,18%) antes de ser adicionada a salina sem Na<sup>+</sup> para chegar à concentração final de 15  $\mu$ M. Uma salina sem Na<sup>+</sup> com DMSO 0,18% sem concanamicina foi utilizada previamente como controle do efeito do DMSO 0,18% sobre a voltagem transepitelial.

Como bloqueador dos canais epiteliais do tipo L foi utilizado na perfusão do lado externo da brânquia (banho) uma salina completa adicionada de Verapamil 1 mM (Sigma, EUA) (Abernethy e Schwartz, 1999).

#### 2.2.7 Experimentação eletrofisiológica

Para avaliar o envolvimento da Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase e da V(H<sup>+</sup>)-ATPase na absorção ativa de NaCl, foram perfundidas brânquias de *Macrobrachium rosenbergii*. Estão incluídas no total as medidas: (i) da voltagem (V<sub>te</sub>) gerada pela sexta e sétima brânquia (ii) a alteração dessa voltagem após a adição de inibidores do transporte e/ou após a substituição de íons no perfusado.
#### 2.2.8 Procedimento experimental

Depois de se preparar uma porção dorsal da brânquia, e montar a preparação para a perfusão, iniciou-se a perfusão e se aguardou até, a voltagem transepitelial alcançar um valor constante. Somente após estabilizar a voltagem, uma manipulação (uso de bloqueador, substituição de um íon) foi realizada. Aguardou-se novamente a estabilização da voltagem transepitelial antes de se prosseguir para uma próxima mudança (uso de bloqueador, substituição de um íon) ou continuar com novo período controle. Foram utilizadas salinas idênticas nos dois lados do epitélio (no banho e no meio de perfusão) para certificar que a V<sub>te</sub> medida refletia sempre um transporte ativo, e não um processo de difusão. Excepcionalmente, a perfusão com uma salina sem cálcio e com uma salina com verapamil ocorreu somente no lado externo (banho) da brânquia.

Para verificar se o procedimento de cortar a brânquia afetou a voltagem transepitelial medida (curtos-circuitos parciais), no fim de alguns experimentos a brânquia foi cortada da ponta para a base em passos de 0,5 mm. Somente após cortar a brânquia a 0,1 mm de distância do cateter, a V<sub>te</sub> caiu, mostrando que a ponta aberta não estava afetando as medidas de voltagem transepitelial.

#### 2.2.9 Apresentação e análise estatística dos resultados

Os valores da V<sub>te</sub> para cada condição experimental foram agrupados e representados como média  $\pm$  erro padrão da média, em forma gráfica. Diferenças entre as brânquias # 6 e 7 foram testadas através de um Teste-t de Student paramétrico. O efeito das manipulações das salinas sobre a voltagem transepitelial foi verificado utilizando-se uma Análise de Variância de um único fator com medidas repetidas e posteriormente quantificado através de um teste Student-Newman-Keuls

(SNK) para localizar grupos diferentes (P=0,05). Os decursos temporais de experimentos representativos estão apresentados. O resultado dos experimentos de dose resposta está apresentado graficamente como a redução da V<sub>te</sub> produzida por cada concentração ( $\Delta V_{te}$ ) sobre a concentração do inibidor ouabaína usando-se o aplicativo Slidewrite Plus 4.0.

A constante de inibição que causa uma redução de 50% na V<sub>te</sub> pela ouabaína (K<sub>o</sub>) foi obtida através de uma linearização de Hanes-Woolf. O gráfico de Hanes-Woolf mostra o quociente entre a concentração de ouabaína e o efeito (E=redução da V<sub>te</sub>) causado por esta concentração (ordenada) sobre a concentração de ouabaína (abcissa). A reta encontrada foi determinada pela equação:

[Ouabaína]/E=1/E<sub>max</sub> x [Ouabaína] + K<sub>o</sub>/E<sub>max</sub>, aonde E<sub>max</sub> é o efeito (redução da  $V_{te}$ ) máximo.

O gráfico mostrando a linearização de Hanes-Woolf foi obtido no aplicativo Microsoft Excel 2003.

## 2.3 RESULTADOS DOS PARÂMETROS ELETROFISIOLÓGICOS DE PERFUSÃO DE BRÂNQUIAS DE Macrobrachium rosenbergii

As brânquias mais posteriores (# 6 e # 7) do camarão diádromo de água doce *Macrobrachium rosenbergii* produziram de modo espontâneo uma voltagem transepitelial negativa que se mostrou estável por pelo menos 4 horas após o início dos experimentos.

#### 2.3.1 Caracterização fundamental

As voltagens geradas pelas brânquias # 6 e # 7 de *Macrobrachium rosenbergii* quando em situação controle (salina completa em ambos os lados [433  $\pm$  7,5 mOsm/kg H<sub>2</sub>O, N=4]) estão demonstradas na Tabela 2.1 Não houve diferença na V<sub>te</sub> (P>0,05) entre as brânquias # 6 e # 7.

Tabela 2.1 Voltagem transepitelial ( $V_{te}$ ) gerada pelas brânquias # 6 e # 7 de *Macrobrachium rosenbergii* quando perfundidas com salina completa em ambos os lados do epitélio.

	Brânquia #6	Brânquia #7
V <sub>te</sub> (mV)	$-15,2 \pm 2,0$	-13,4 ± 2,8
	[5]	[10]

A voltagem transepitelial foi medida com referência ao banho ( $V_{te}=V_o-V_i$ ) e não foi significativamente diferente entre as brânquias # 6 e # 7 (P=0,953). Os valores representam média ± erro padrão. [N=número de amostras].

3.3.2 Experimentação com substituições iônicas e uso de bloqueadores

A) Perfusão com salina acrescida com inibidor dos processos dependentes de ATP,
NaCN 1 mM

Uma V<sub>te</sub> medida em condições de perfusão com soluções simétricas indica um transporte ativo. Para comprovar esta hipótese, foi utilizado cianeto. A Figura 2.5 mostra o efeito da perfusão de uma salina acrescida com NaCN (cianeto de sódio) 1 mM na voltagem transepitelial nas brânquias. A voltagem transepitelial espontânea negativa foi de -16,3 ± 3,4 mV. A perfusão com uma salina acrescida do inibidor cianeto de sódio (NaCN 1 mM) aboliu quase completamente essa voltagem (-0,67 ± 0,06 mV), demonstrando que a geração da voltagem é um evento ativo, dependente do constante fornecimento de ATP. A ação desse inibidor metabólico não foi reversível, pois a lavagem com salina completa não alterou os valores da voltagem transepitelial (-0,8 ± 0,07 mV).

### B) Perfusão com salina sem Na<sup>+</sup>

Em hiperosmorreguladores, tais como *M. rosenbergii*, a polaridade da V<sub>te</sub> sugere que ela reflete uma absorção transcelular de cátions, provavelmente Na<sup>+</sup>. Por isso o primeiro passo da análise de V<sub>te</sub> foi a substituição de sódio por colina. A Figura 2.6 mostra a redução da voltagem transepitelial (V<sub>te</sub>) após a perfusão de uma salina sem Na<sup>+</sup> nos dois lados do epitélio. A perfusão com uma salina completa gerou uma voltagem transepitelial de -9,5 ± 1,4 mV. A subseqüente perfusão com uma salina sem Na<sup>+</sup> despolarizou a V<sub>te</sub>, e gerou uma voltagem positiva de 0,8 ± 1,1 mV, demonstrando que a V<sub>te</sub> negativa espontaneamente gerada pelo epitélio era dependente da presença de Na<sup>+</sup>. O efeito dessa alteração na voltagem transepitelial foi reversível à perfusão com salina completa, voltando para um valor de -11 ± 1,4 mV.

C) Perfusão com salina completa + Amiloride 0,2 mM, um bloqueador do transporte de Na<sup>+</sup>

Em muitos epitélios que absorvem Na<sup>+</sup> o caminho de entrada através da membrana apical é sensível à amiloride. Para uma primeira caracterização da absorção este diurético foi utilizado. O resultado do experimento está mostrado na Figura 2.7. A perfusão com salina completa gerou uma voltagem espontânea negativa de -10,3  $\pm$  0,3 mV. A perfusão com amiloride 0,2 mM nos dois lados do epitélio alterou a V<sub>te</sub> para -5 mV (com um erro padrão da média igual a zero). O efeito desse bloqueador mostrou-se reversível à perfusão com salina completa. Após a perfusão com essa salina, a V<sub>te</sub> foi para -8,7  $\pm$  0,6 mV.

A Figura 2.8 é um decurso temporal de um único experimento representativo, mostrando os efeitos de salina sem Na<sup>+</sup>, com amiloride e com cianeto de Na<sup>+</sup> sobre a voltagem transepitelial gerada pelas brânquias.

D) Perfusão com salina de NaCl com o inibidor da Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase, ouabaína 5 mM

Em muitos epitélios que absorvem Na<sup>+</sup>, a saída de Na<sup>+</sup> através da membrana basolateral é realizada pela Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase, que é bloqueada por ouabaína (Skou, 1965). Para verificar se esse também é o caso no epitélio branquial de *M. rosenbergii* esta droga foi aplicada. A Figura 2.9 mostra o efeito da perfusão de uma salina acrescida com ouabaína 5 mM. A perfusão com salina completa gerou uma voltagem transepitelial negativa (-18 ± 2,3 mV). A perfusão com uma salina acrescida de ouabaína alterou os valores da V<sub>te</sub> para -4 ± 0,8 mV. Esse efeito não se mostrou reversível nos presentes experimentos, sendo que a perfusão em seguida com salina completa não aboliu por completo o efeito da ouabaína (V<sub>te</sub> de -7 ± 1,8 mV).

E) Curva concentração-resposta à ouabaína, inibidor da Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase

Para uma análise mais detalhada foram realizados experimentos com concentrações diferentes da droga com a intenção de construir uma curva concentração-resposta. A Figura 2.10 mostra o efeito de redução da voltagem transepitelial ( $\Delta V_{te}$ , em mV) gerada pelas brânquias quando aplicada 7 concentrações de ouabaína (0,025; 0,05; 0,25; 0,5; 2,5 e 5 mM). A primeira concentração de ouabaína (0,025 mM) produziu uma redução da voltagem transepitelial ( $\Delta V_{te}$ ) de -4,3  $\pm$  0,5 mV. A perfusão das brânquias com uma concentração de ouabaína de 0,05 mM produziu uma  $\Delta V_{te}$  de -5,7  $\pm$  0,7 mV. Uma concentração de 0,25 mM de ouabaína produziu uma  $\Delta V_{te}$  de -8  $\pm$  0,3 mV. Ouabaína 0,5 mM produziu uma  $\Delta V_{te}$  de -10,3  $\pm$  1 mV. Uma concentração de ouabaína de 2,5 mM produziu uma  $\Delta V_{te}$  de -11,7  $\pm$  0,6 mV. A redução da voltagem transepitelial produzia produziu uma concentração de 5 mM ( $\Delta V_{te}$  de -11,7  $\pm$  0,7 mV).

A partir dos dados da Figura 2.10 acima foi possível obter a Figura 2.11, que mostra um gráfico linear obtido através de uma transformação de Hanes-Woolf. A linearização de Hanes-Woolf permitiu visualizar a constante de inibição da ouabaína (K<sub>o</sub>), aonde foi possível obter algo correspondente a 50% de redução da voltagem transepitelial ( $\Delta V_{te}$ ) gerada pelas brânquias do camarão diádromo de água doce *Macrobrachium rosenbergii* em função da concentração de ouabaína. O K<sub>o</sub> é o módulo do ponto aonde a reta toca o eixo da abscissa. Para os presentes experimentos o K<sub>o</sub> foi de 93,4 µM.

A Figura 2.11 também permitiu calcular o efeito máximo provocado pela perfusão com ouabaína (que foi a redução da  $V_{te}$  de valores negativos para valores

próximos de zero). O  $E_{max}$  foi de -11 mV (comparar com o V<sub>te</sub> controle na brânquia # 7 que foi de -13,4 ± 2,8).

#### F) Perfusão com salina sem Cl<sup>-</sup>

Em muitos epitélios que absorvem NaCI, a absorção de Na<sup>+</sup> depende da presença de CI<sup>-</sup> (e vice-versa). A absorção é acoplada e ocorre através de cotransportadores (Shild *et al.*, 1988). Para verificar se esse também é o caso no epitélio branquial de *M. rosenbergii*, o Cl<sup>-</sup> foi substituído por nitrato. A Figura 2.12 mostra o resultado do experimento. As brânquias geraram uma voltagem transepitelial espontânea de -17,7  $\pm$  6,3 mV. A perfusão com uma salina sem cloreto em ambos os lados alterou a voltagem para -6,7  $\pm$  2. A reperfusão com salina completa alterou a voltagem para - 18,3  $\pm$  5,4. A voltagem medida na perfusão das brânquias com salina sem cloreto se mostrou diferente dos controles e indicou que a voltagem devido à absorção de Na<sup>+</sup> medida nesse experimento era dependente da presença do Cl<sup>-</sup>.

G) Perfusão com salina sem Na<sup>+</sup> com inibidor da enzima anidrase carbônica,
Acetazolamida 0,5 mM

Em caranguejos adaptados a água doce a absorção de cloreto independente de sódio foi demonstrada como sendo sensível à bloqueadores da anidrase carbônica, como a Acetazolamida (Maren, 1967). Para verificar se o mesmo ocorre no epitélio branquial de *M. rosenbergii*, foram feitos experimentos perfundindo uma salina sem sódio com acetazolamida 0,5 mM (Figura 2.13). Quando perfundido com uma salina sem sódio, o epitélio branquial de *M. rosenbergii* produziu uma reduzida voltagem transepitelial positiva de 1,9  $\pm$  0,7 mV. Adicionando-se acetazolamida à salina a voltagem transepitelial se alterou para -3,8  $\pm$  0,9 mV), demonstrando que o

fornecimento de prótons pela anidrase carbônica é um evento fundamental na visualização dessa pequena voltagem decorrente da absorção de cloreto. O efeito do inibidor sobre a voltagem mostrou-se reversível e a perfusão posterior com salina sem sódio levou os valores da  $V_{te}$  para 1,67 ± 0,7 mV.

## H) Perfusão com salina sem Ca<sup>2+</sup> com EGTA 1 mM

Os crustáceos servem como modelo ideal de estudo da homeostase de cálcio devido ao seu ciclo de muda. Crustáceos aquáticos geralmente absorvem o cálcio através do epitélio branquial. Para testar esta hipótese as brânquias de *M. rosenbergii* foram perfundidas simetricamente com salina completa e em seguida, perfundidas no lado externo (banho) com uma salina sem Ca<sup>2+</sup> adicionada com o quelante de cálcio EGTA 1 mM. O resultado do experimento está mostrado na Figura 2.14. Após aproximadamente 15 minutos de perfusão com uma salina completa, a brânquia gerou uma voltagem espontânea de -26 ± 1,3 mV. Perfundindo o lado externo da brânquia durante 30 minutos com uma salina sem Ca<sup>2+</sup> acrescentada com o quelante EGTA 1 mM a V<sub>te</sub> se reduziu para -3,8 ± 0,7 mV. Em seguida, a brânquia foi novamente perfundida com uma salina completa durante 30 minutos e o efeito da retirada do Ca<sup>2+</sup> se mostrou reversível. A V<sub>te</sub>, após a reperfusão com salina completa, foi de -23 ± 1,2 mV.

 I) Perfusão com salina adicionada com bloqueador dos canais de cálcio do tipo L, verapamil 1 mM

O movimento apical de cálcio nos crustáceos pode ocorrer por três maneiras independentes: um antiportador Ca<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup> (ou Na<sup>+</sup>, excepcionalmente) eletrogênico e sensível à amiloride (somente encontrado em crustáceos); um antiportador Ca<sup>2+</sup>/2Na<sup>+</sup>

(ou H<sup>+</sup>, excepcionalmente) eletroneutro e insensível à amiloride; ou simples difusão, via canal de Ca<sup>2+</sup> (do tipo L) sensível ao verapamil e dependente do potencial de membrana (Wheatly, 1999). Para testar se o Ca<sup>2+</sup> participa da geração da V<sub>te</sub> de modo independente da absorção de Na<sup>+</sup>, perfundiu-se o lado externo (banho) da brânquia com salina completa mais verapamil 1 mM. A Figura 2.15 mostra o efeito dessa perfusão. O epitélio, perfundido durante os 15 minutos iniciais com salina completa, desenvolve uma Vte espontânea de -22 ± 1,6 mV. O acréscimo de verapamil 1 mM no lado externo da brânquia reduziu a voltagem para -5,5 ± 0,4 mV após 30 minutos de perfusão. O efeito do bloqueador foi reversível. A posterior perfusão com salina completa reverteu a V<sub>te</sub> após 15 minutos para -23,6 ± 1,7 mV.

A Figura 2.16 é um decurso temporal de um único experimento representativo, mostrando os efeitos da perfusão externa das brânquias com uma salina sem Ca<sup>2+</sup> tamponada com EGTA 1mM, e uma salina com verapamil 1 mM.

J) Perfusão com salina com o inibidor da V(H<sup>+</sup>)-ATPase, concanamicina 15  $\mu$ M dissolvido em DMSO 0,18% em condições sem Na<sup>+</sup>

A perfusão simétrica da brânquia com uma salina sem Na<sup>+</sup> inverteu a polaridade da V<sub>te</sub>, tornando-a positiva, indicando uma absorção de cloreto. Esta voltagem positiva mostrou-se sensível à perfusão simétrica com o inibidor da enzima anidrase carbônica, a acetazolamida e demonstrou que o fornecimento de prótons pela anidrase carbônica é um evento fundamental para a visualização dessa voltagem decorrente da absorção de cloreto. Para testar se esse fornecimento de prótons possui uma ligação com uma V(H<sup>+</sup>)-ATPase, as brânquias foram simetricamente perfundidas (Fig. 2.17) com salina completa durante aproximadamente 15 minutos (V<sub>te</sub> inicial de -22  $\pm$  2 mV), seguida pela perfusão por 15

minutos com salina sem Na<sup>+</sup> e com DMSO 0,18%, e em seguida perfundida por 15 minutos com a mesma salina adicionada com o inibidor dessa ATPase, concanamicina 15  $\mu$ M dissolvida em DMSO 0,18%. A V<sub>te</sub> reduziu de 18,3 ± 2,0 para 3,6 ± 1,8 mV após a perfusão com o inibidor. O efeito não foi totalmente reversível. A perfusão com salina sem o inibidor mudou a voltagem para 11 ± 0,8 mV.

K) Perfusão com salina sem Na<sup>+</sup> com DMSO 0,18% acrescida com o inibidor dos processos dependentes de ATP, NaCN 1mM

A perfusão das brânquias com uma salina sem Na<sup>+</sup> acrescida com concanamicina dissolvida em DMSO ocasionou um efeito na voltagem transepitelial positiva, sugerindo que um bloqueio da atividade de uma V(H<sup>+</sup>)-ATPase reduz a absorção ativa de Cl<sup>-</sup> (Fig. 2.18). Para confirmar a natureza ativa dessa absorção dependente de uma V(H<sup>+</sup>)-ATPase, as brânquias posteriores foram perfundidas simetricamente com uma salina sem Na<sup>+</sup>, acrescida com DMSO 0,18% mais o inibidor metabólico NaCN 1mM. A Figura 2.19 mostra o efeito dessa perfusão simétrica. A V<sub>te</sub> gerada pelo epitélio na condição sem o Na<sup>+</sup> e sem o NaCN foi de 17 ± 1,7 mV após 15 minutos de perfusão. A adição simétrica de 1 mM de NaCN à salina reduziu a voltagem para 0,5 ± 0,02 mV após 30 minutos de perfusão, aproximadamente. Tal efeito do NaCN não foi reversível, pois a lavagem com uma salina sem NaCN durante 15 minutos não modificou a voltagem transepitelial.

A Figura 2.20 mostra um decurso temporal de um único experimento representativo, mostrando a perfusão simétrica de uma brânquia posterior com salina sem Na<sup>+</sup>, e a adição de várias substâncias inibidoras do transporte. Notar que nesse único experimento, ouabaína 5 mM foi adicionada à salina para mostrar que uma

Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase não participa diretamente da geração da voltagem transepitelial na condição sem Na<sup>+</sup>.

## 2.4 DISCUSSÃO DA ELETROFISIOLOGIA DE BRÂNQUIAS PERFUNDIDAS DE Macrobrachium rosenbergii

A técnica de perfusão de brânquia, modificada da sua metodologia original, mostrou-se apropriada para a caracterização do transporte iônico transepitelial nas brânquias do camarão *M. rosenbergii*, pois foi possível medir uma V<sub>te</sub> estável e manipulável. A proposta inicial contemplava o uso de uma metodologia na qual a perfusão das brânquias ocorria em um sistema fechado, sem que a ponta da brânquia fosse cortada. Esta foi a metodologia utilizada em ocasiões anteriores (Drews e Graszynski, 1987; Onken e Graszynski, 1989). Apesar disso, o fato de não se obter uma perfusão satisfatória utilizando esta perfusão "fechada" nas brânquias de *M. rosenbergii* justificou a utilização da metodologia da "ponta cortada". A utilização deste procedimento não influenciou as medidas de V<sub>te</sub>, a não ser quando a ponta da cânula se encontra num limite muito próximo do fim da brânquia.

Entretanto, mesmo com a ponta da brânquia cortada, a velocidade de perfusão da salina nas brânquias foi relativamente lenta (4-5 ml/minuto). Por esse motivo, foi necessário verificar se a V<sub>te</sub> medida não era resultante de potenciais de difusão entre a hemolinfa e lado externo (banho). O uso de salinas simétricas reduziu a probabilidade de ocorrência desses potencias de difusão, mas uma perfusão incompleta das lamelas nesta técnica aberta poderia originar tais potenciais. A perfusão de uma salina com o inibidor metabólico cianeto de sódio e a conseqüente inibição da V<sub>te</sub> mostrou que a voltagem transepitelial medida era originária de processos ativos de transporte iônico.

Uma V<sub>te</sub> negativa (com relação ao banho) é incomum em brânquias de crustáceos na condição controle (Drews e Graszynski, 1987, Onken e Graszynski, 1989). Em outros epitélios de hiperosmorreguladores, entretanto, uma V<sub>te</sub> negativa já

foi documentada. A pele de rã, por exemplo, apresenta uma V<sub>te</sub> negativa em relação ao banho (Ehrenfeld et al., 1987). A dimensão da voltagem transepitelial medida nas brânquias de *M. rosenbergii* (por volta de -13,4 mV) foi menor do que na pele de anfíbios (aproximadamente -130 mV) relatada por Ehrenfeld et al. (1987). Contudo, a voltagem das brânquias em *M. rosenbergii* foi semelhante à do caranguejo *Eriocheir sinensis*, que se caracteriza como um epitélio "tight" (Onken e Graszynski, 1989). A V<sub>te</sub> nas brânquias de *M. rosenbergii* foi maior do que no caranguejo *Carcinus maenas*, que possui um epitélio do tipo "leaky" (Onken e Siebers, 1992). A comparação entre estas voltagens sugere então que o epitélio branquial de *M. rosenbergii* é do tipo "tight".

Embora a substituição de Na<sup>+</sup> no lado interno do epitélio não represente as condições in vivo e então possa causar efeitos inespecíficos, a redução rápida e reversível indica que a V<sub>te</sub> reflete uma absorção de Na<sup>+</sup> eletrogênica, assim como indicado por trabalhos anteriores (Onken e Graszynski, 1989; Ehrenfeld et al., 1990). De um modo diferente, no caranguejo *Eriocheir sinensis* a V<sub>te</sub> é negativa somente na ausência de cloreto, e um aumento na concentração externa de cloreto parece inibir a corrente elétrica que representa a absorção ativa de Na<sup>+</sup> ( $I_{Na}$ ) (Onken, 1999).

Amiloride, uma droga diurética que inibe o transporte de Na<sup>+</sup>, atua nos canais apicais de Na<sup>+</sup>, no trocador eletrogênico apical 2Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> e no trocador eletrogênico basolateral 3Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> (Garty e Benos, 1988). O efeito dessa droga sobre a V<sub>te</sub> gerada nas brânquias de *M. rosenbergii* foi um efeito eletricamente detectável. A redução da V<sub>te</sub> para valores menos negativos sustenta que o diurético atuou no lado apical, nos canais ou no trocador 2Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>. A perfusão simétrica dessa droga em ambos os lados do epitélio poderia levar a uma idéia de que ela poderia também atuar no trocador basolateral 3Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>, mas neste caso, a voltagem se tornaria mais negativa, o que

não ocorreu e que sustenta a proposta de um efeito apical. O efeito do amiloride em *M. rosenbergii* não foi completo (por volta de 70%). Em *Eriocheir sinensis*, amiloride também não reduziu totalmente a voltagem transepitelial, embora seu efeito tenha sido de 90% (Künker, 1988).

O glicosídeo denominado ouabaína é um potente inibidor específico da Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase. O efeito da perfusão dessa droga nas brânquias de *M. rosenbergii* mostra que uma absorção de Na<sup>+</sup> "energizada" pela Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase é a base da maior parte da V<sub>te</sub> negativa e consequentemente, da absorção de Na<sup>+</sup>. A constante de inibição da ouabaína (K<sub>o</sub>) de 93,4 µM nas brânquias de *M. rosenbergii* foi semelhante ao achado em outros crustáceos, como por exemplo, nas brânquias do caranguejo *Uca tangeri* (Drews e Graszynski, 1987), aonde o K<sub>o</sub> foi de aproximadamente 100 µM. Enquanto o efeito da ouabaína não foi completo em *M. rosenbergii*, Künker (1988) observou uma inibição total da V<sub>te</sub> nas brânquias de *Eriocheir sinensis*. Luquet *et al.* (2002) mostrou também que ouabaína não inibiu totalmente a V<sub>te</sub> nas brânquias do caranguejo *Chasmagnathus granulatus*. O resíduo da V<sub>te</sub> que sobra da perfusão com ouabaína poderia ser a absorção de outro cátion, tal como Ca<sup>2+</sup>.

Uma voltagem transepitelial negativa é reduzida após a substituição de Cl<sup>-</sup> nos dois lados do epitélio, o que sugere uma absorção acoplada de Na<sup>+</sup> e Cl<sup>-</sup>. A maioria dos epitélios que reconhecidamente absorvem NaCl de um modo acoplado, contudo, não geram uma voltagem (por exemplo, uma absorção apical envolvendo os trocadores Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> e Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>). Uma exceção é a absorção acoplada de NaCl que gera uma voltagem transepitelial positiva (absorção apical envolvendo o cotransportador Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>/2Cl<sup>-</sup> e um canal de K<sup>+</sup>) como demonstrado nas brânquias do caranguejo *Carcinus maenas* (Onken e Siebers, 1992). No caso do caranguejo

*Eriocheir sinensis*, a absorção de Na<sup>+</sup> somente se torna "visível" (mensurável) na ausência de Cl<sup>-</sup> (Onken e Graszynski, 1989).

O efeito da substituição de Cl<sup>-</sup> (redução da V<sub>te</sub> para valores menos negativos) poderia ser um efeito da substituição no lado interno. Na ausência de Cl<sup>-</sup> no perfusado, o KCl tende a sair das células, causando um redução no volume celular. Em epitélios que absorvem NaCl, a redução do volume celular leva a uma conseqüente redução da absorção de Na<sup>+</sup> (Onken, 1996).

O efeito da substituição de NaCl na salina de perfusão mostra que a V<sub>te</sub> sem NaCl é mais negativa do que na presença de Cl<sup>-</sup>. A diferença entre os níveis da V<sub>te</sub> com e sem Cl<sup>-</sup> poderia indicar a absorção de cloreto independente de Na<sup>+</sup>. Nos caranguejos *Eriocheir sinensis* e *Dilocarcinus pagei* a absorção de Cl<sup>-</sup> é independente da absorção de Na<sup>+</sup> (Onken *et al.*, 1991; Onken e McNamara, 2002). Por que a absorção iônica em *M. rosenbergii* é diferente? Porque, visto sob a ótica da geração de uma V<sub>te</sub>, a absorção de Na<sup>+</sup> é substancialmente maior do que a absorção de Cl<sup>-</sup>, diferente do que ocorre nos caranguejos estudados até agora. Será que a diferente arquitetura do epitélio branquial e a inusitada localização da Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase nos camarões palemonídeos (Freire e McNamara, 1995; McNamara e Torres, 1999) influi em tais diferenças, ou será apenas acaso?

A perfusão das brânquias com acetazolamida, um composto inibidor da enzima anidrase carbônica, em condições de ausência de Na<sup>+</sup>, mostrou que a pequena voltagem positiva gerada pela absorção de Cl<sup>-</sup> foi dependente do fornecimento de prótons, sugerindo indiretamente a participação de uma V(H<sup>+</sup>)-ATPase neste processo. Nas brânquias de caranguejos, a absorção de Cl<sup>-</sup> envolvendo uma V(H<sup>+</sup>)-ATPase já foi demonstrada (ver modelo na Figura 18). Em anfíbios, esta absorção de Cl<sup>-</sup> ocorre nas células ricas em mitocôndrias, do tipo gama (Erhenfeld et al., 1985).

Análises no caranguejo estuarino sulamericano hipo-hiperregulador, *Chasmagnathus granulatus*, mostraram que a aplicação de acetazolamida no lado interno não afetou as medidas de I<sub>sc</sub> (corrente de curto-circuito) ou de G<sub>te</sub> (condutância transepitelial) em lamelas branquiais divididas ao meio (Onken *et al.,* 2003). Entretanto, análises detalhadas enfocando os fluxos de Na<sup>+</sup> mostraram que a aplicação de acetazolamida reduziu em aproximadamente 20 % sob uma V<sub>te</sub> constante, indicando que para este caranguejo a absorção de Na<sup>+</sup> e Cl<sup>-</sup> é acoplada (Onken *et al.,* 2003).

Quanto à captura do cálcio, esta contribui para o total de cátions transportados, juntamente com o sódio. A possibilidade de que o cálcio perfundido internamente venha a se difundir pela via paracelular e invadir o banho existe. Mas, quantitativamente, somente seria importante se viesse a alterar o deslocamento resultante do cátion, o que seria observável se ocorresse uma nova polarização da voltagem após perfusão com salina sem Ca<sup>2+</sup>. Essa polarização não foi observada. Poderia ocorrer de maneira lenta, o que por outro lado indica que o epitélio é impermeável o suficiente para que esse deslocamento afetasse as medidas.

Muito mais problemático do que o movimento paracelular é a alteração no potencial de repouso do Ca<sup>2+</sup> que uma perfusão assimétrica poderia ocasionar. No caso da perfusão assimétrica alterar o potencial de repouso do cálcio, seria difícil interpretar a diminuição da voltagem transepitelial devida à ausência do cátion na salina do banho. A diminuição da voltagem transepitelial também poderia refletir, nesse caso, a entrada de cálcio nas células a partir da salina que perfunde o meio interno (simulando a hemolinfa) e que contém cálcio elevado (12 mM). O cálculo do potencial de repouso em membranas heterogêneas, tais como das células branquiais de *M. rosenbergii*, é mais complexo quando comparado com potencial de repouso de um neurônio, por exemplo.

Analisando os vários tipos celulares do epitélio em conjunto, e assim assumindo que o epitélio possa ser simplificado como uma barreira epitelial única, cálculos preliminares, utilizando uma derivação da equação de Goldman-Hodgkin-Katz (Patuzzi, 1998) mostram que a voltagem transepitelial observada na perfusão com salina sem cálcio no banho (-26 mV, aproximadamente) é menor do que o potencial de repouso do cálcio (aproximadamente -123 mV) (Torres e McNamara, dados não publicados, ANEXO 1).

#### ANEXO 1

Para o cálculo do potencial de repouso, foram utilizadas as seguintes concentrações de Ca<sup>2+</sup>: i) salina sem cálcio quelada com EGTA (perfundia o meio externo à brânquia) = 1 nM; ii) meio intracelular = 100 nM; iii) salina completa que perfundia o interior da brânquia = 12 mM. As concentrações de cálcio intracelular e da salina sem cálcio foram obtidas do trabalho de McNamara e Ribeiro (2000). A derivação ocorreu nas seguintes equações:

 $\mu Ca^{2+}_{1} = z V[Ca^{2+}_{0}]/[Ca^{2+}_{i}] \pm 58 Log [Ca^{2+}_{0}]/[Ca^{2+}_{i}] e$ 

 $\mu Ca^{2+}_{2} = z V[Ca^{2+}_{i}]/[Ca^{2+}_{h}] \pm 58 Log [Ca^{2+}_{i}]/[Ca^{2+}_{h}], aonde:$ 

 $\mu$ Ca<sup>2+</sup> : potencial de repouso para o cálcio

z : valência do íon cálcio

V: potencial de Nernst para o cálcio

[Ca<sup>2+</sup><sub>o</sub>] : concentração de cálcio na salina externa sem cálcio quelada com EGTA 1 mM

[Ca<sup>2+</sup><sub>i</sub>] : concentração de cálcio no meio intracelular

[Ca<sup>2+</sup><sub>h</sub>] : concentração de cálcio na salina completa perfusora da hemolinfa

Este potencial de repouso elevado é mantido através de um eficiente sistema de transporte ativo de cálcio (Ca<sup>2+</sup>-ATPases) da membrana plasmática e do retículo

endoplasmático. Portanto, uma alteração de -22 mV observada na perfusão assimétrica do cálcio nas brânquias de *M. rosenbergii* não refletiria um movimento transcelular de cálcio da hemolinfa para o banho.

Os experimentos mostrados aqui, levam então ao entendimento de uma captura de  $Ca^{2+}$  pelas brânquias de *M. rosenbergii* e que seria detectável eletricamente pelo bloqueio do fornecimento do cátion. Os experimentos também demonstram a entrada de  $Ca^{2+}$  por meio de canais do tipo *L* sensíveis à verapamil. Canais semelhantes a estes estão descritos em muitos tipos celulares não nervosos, e o uso de verapamil está descrito há bastante tempo como terapêutico em casos de processos que dependam de cálcio como mensageiro químico e elétrico, como é o caso do trocador Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> presente em células musculares cardíacas (Abernethy e Schwartz, 1999; Kappl *et al.*, 2001).

O transporte dependente de Na<sup>+</sup> e Ca<sup>2+</sup> é particularmente interessante em crustáceos, visto a sua demanda por cálcio por ocasião da muda (Wheatly, 1999). O epitélio branquial é descrito como o local principal de captura ativa de cálcio e esta captura parece condicionada ao ciclo de muda e também é sensível ao estresse ácido que pode representar o ambiente. Ao que parece, o cálcio pode mediar o movimento de Na<sup>+</sup> e H<sup>+</sup> em águas ácidas ao alterar a permeabilidade ao H<sup>+</sup>, que atua na troca Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> (Wheatly e Henry, 1992).

Analisando os dados de voltagem transepitelial de Na<sup>+</sup> e os de transporte de  $Ca^{2+}$ , o mecanismo observado na captura iônica de  $Ca^{2+}$  pelo epitélio branquial de *M. rosenbergii* parece ser basicamente apical e então pode envolver a troca  $Ca^{2+}/Na^+$  (ou H<sup>+</sup>) sensível ao amiloride ou difusão simples através dos canais do tipo *L* sensíveis à verapamil. Tais mecanismos estão descritos para glândulas antenais e hepatopâncreas da lagosta do gênero *Homarus* (Ahearn e Franco, 1993; Zhuang e

Ahearn, 1996) e no lagostim de água doce *Procambarus clarkii* (Wheatly *et al.*, 2002) e de maneira interessante, podem funcionar em conjunto. Os resultados do presente trabalho demonstram pela primeira vez a mesma interação eletroquímica entre o Na<sup>+</sup> e o Ca<sup>2+</sup> nas brânquias de um camarão (*M. rosenbergii*).

A atividade translocadora de prótons por uma V(H<sup>+</sup>)-ATPase presente nas membranas plasmáticas foi descrita em diversos epitélios (Kawasaki-Nishi *et al.*, 2003). Em brânquias de crustáceos, o gradiente eletroquímico gerado pelo transporte transmembranal de prótons é uma fonte de energia utilizada para regular o pH, e para regular a captura de outros íons, como CI<sup>-</sup>, Na<sup>+</sup> e Ca<sup>2+</sup>. O transporte ativo de H<sup>+</sup> por esta ATPase do tipo V pode estar ligado com a atividade de proteínas de membrana tão distintas como um trocador eletrogênico  $2Na^+/H^+$  exclusivo de vertebrados (Ahearn *et al.*, 2001; Kirschner, 2002), quanto um trocador CI<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, agindo de modo indireto e interativo com uma enzima anidrase carbônica (Wessing *et al.*, 1997). Em brânquias de caranguejo, o transporte de CI<sup>-</sup> mostrou-se dependente de uma V(H<sup>+</sup>)-ATPase apical e independente de processos que envolvam o Na<sup>+</sup> (Onken e Putzenlechner, 1995).

Em *M.rosenbergii*, a influência de uma V(H<sup>+</sup>)-ATPase na voltagem transepitelial foi testada em função do Cl<sup>-</sup>, na perfusão sem Na<sup>+</sup>, reforçando a idéia de desacoplamento entre captura de Na<sup>+</sup> e Cl<sup>-</sup>. Entre as diversas alternativas possíveis encontradas para a captura de Cl<sup>-</sup> nas brânquias do camarão, aquela semelhante a descrita por Onken e Putzenlechner (1995) e que contempla a ação de uma anidrase carbônica, juntamente com uma V(H<sup>+</sup>)-ATPase e um trocador Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> é a que parece mais provável. Cabe também observar que a interação entre os mecanismos de transporte de Na<sup>+</sup> e H<sup>+</sup> nas brânquias de *M. rosenbergii* não foram

especificamente testados, o que torna a interpretação do papel de uma V(H<sup>+</sup>)-ATPase no transporte iônico ainda incompleta.

## 2.5 FIGURAS DE ELETROFISIOLOGIA DE TRANSPORTE EM BRÂNQUIAS PERFUNDIDAS DE Macrobrachium rosenbergii



Figura 2.5 Voltagem transepitelial ( $V_{te}$ ) medida nas brânquias do camarão de água doce M. rosenbergii durante a perfusão com salina completa, seguida de perfusão com salina completa acrescida de NaCN 1 mM (P<0,001) e novamente perfundida com salina completa (P=1). <sup>a</sup>Significativamente diferente da primeira perfusão com salina completa mas iguais entre si. Os valores são a média  $\pm$  erro padrão. [N=número de amostras].



Figura 2.6 Voltagem transepitelial ( $V_{te}$ ) medida nas brânquias de camarão M. rosenbergii perfundidas com salina completa, seguida de uma salina sem Na<sup>+</sup> (\*Significativamente diferente, P<0,001) e novamente perfundida com salina completa (P<0,001). Os valores são a média  $\pm$  erro padrão. [N=número de amostras].



Figura 2.7. Voltagem transepitelial ( $V_{te}$ ) medida nas brânquias do camarão *M. rosenbergii* durante a perfusão com salina completa, seguida pela perfusão com salina acrescida de Amiloride 0,2 mM nos dois lados do epitélio (\*Significativamente diferente, P=0,003) e novamente perfundida com salina completa (P=0,003). Os valores representam média ± erro padrão. [N=número de amostras].



Figura 2.8 Decurso temporal de um experimento típico de caracterização da voltagem transepitelial ( $V_{te}$ ) da brânquia perfundida do camarão diádromo de água doce *Macrobrachium rosenbergii*. As manipulações das salinas perfundidas simetricamente foram realizadas sempre após a estabilização da  $V_{te}$  através da perfusão com salina completa.



Figura 2.9 Voltagem transepitelial (V<sub>te</sub>) medida nas brânquias do camarão de água doce *M. rosenbergii* na perfusão com salina completa, seguida de perfusão com salina acrescida com ouabajna 5 mM (P<0,001) e novamente perfundida com salina completa (P=0,053). <sup>a</sup>Significativamente diferente da primeira perfusão com salina completa mas iguais entre si. Os valores representam média  $\pm$  erro padrão. [N=número de amostras].



Figura 2.10 Curva concentração-resposta do efeito de ouabaína na redução da voltagem transepitelial  $(\Delta V_{te})$  gerada pelas brânquias do camarão diádromo de água doce *Macrobrachium rosenbergii*. Os dados representam média ± erro padrão [Número de experimentos=3]. O coeficiente de determinação (R<sup>2</sup>) foi de 0,96. Foi aplicada uma curva sigmóide aos dados.



Figura 2.11 Transformação de Hanes-Woolf do efeito da concentração da ouabaína (ver Figura 2.10) sobre a redução da voltagem transepitelial ( $\Delta V_{te}$ ) nas brânquias perfundidas do camarão diádromo de água doce *Macrobrachium rosenbergii*. R<sup>2</sup>=0,98. Cada ponto equivale a 3 experimentos (N=3). Para efeito da linearização foram utilizadas três concentrações de inibidor ouabaína (0,05; 0,25 e 0,5 mM).



Figura 2.12 Voltagem transepitelial (V<sub>te</sub>) medida nas brânquias do camarão de água doce *M. rosenbergii* na perfusão com salina completa, seguida de perfusão com salina sem Cl<sup>-</sup> e novamente perfundida com salina completa. \*Significativamente diferente (P<0,005) das perfusões com salina completa. Os valores representam média ± erro padrão. [N=número de amostras].



Salina sem Na + Acetazolamida 0,5 mM

Figura 2.13. Voltagem transepitelial (V<sub>te</sub>) medida nas brânquias do camarão de água doce *M. rosenbergii* na perfusão com salina sem Na<sup>+</sup>, seguida de perfusão com salina sem Na<sup>+</sup> com Acetazolamida 0,5 mM (\*Significativamente diferente, P<0,001) e novamente perfundida com salina sem Na<sup>+</sup> (P<0,001). Os valores representam média ± erro padrão. [N=número de amostras].



Figura 2.14 Voltagem transepitelial (V<sub>te</sub>) medida nas brânquias posteriores do camarão de água doce *Macrobrachium rosenbergii* durante a perfusão com salina completa, seguida pela perfusão com salina sem Ca<sup>2+</sup> no lado externo do epitélio (\*Significativamente diferente, P=0,003) e novamente perfundida com salina completa. Os valores representam média ± erro padrão. [N=número de amostras].



Figura 2.15 Voltagem transepitelial (V<sub>te</sub>) medida nas brânquias posteriores do camarão de água doce *Macrobrachium rosenbergii* durante a perfusão com salina completa seguida da perfusão com salina completa acrescida de Verapamil 1 mM (bloqueador específico dos canais de Ca<sup>2+</sup> do tipo L) no lado externo (banho) (\*Significativamente diferente, P=0,004) e reperfundida com salina completa. Os valores representam média ± erro padrão [N=número de experimentos].



Figura 2.16 Decurso temporal de um experimento típico de caracterização da voltagem transepitelial ( $V_{te}$ ) da brânquia posterior perfundida do camarão de água doce *Macrobrachium rosenbergii*. As manipulações das salinas perfundidas foram realizadas sempre após a estabilização da voltagem através da perfusão com salina completa. As salinas sem Ca<sup>2+</sup> + EGTA 1mM, e com verapamil 1mM perfundiram somente o lado externo (banho) da brânquia.



Salina completa Na-Free + DMSO Na-Free + DMSO + concellar foree + DMSO

Figura 2.17 Voltagem transepitelial (V<sub>te</sub>) medida nas brânquias posteriores do camarão de água doce Macrobrachium rosenbergii durante a perfusão com salina completa (\*significativamente diferente dos demais, P<0,001) seguida pela perfusão com salina sem Na<sup>+</sup> e com dimetil sulfóxido (DMSO) 0,18%, seguida pela perfusão da mesma salina acrescida de concanamicina 10 µM nos dois lados do epitélio (a=significativamente diferente, P<0,001) e novamente perfundida com salina sem Na<sup>+</sup> e com DMSO 0,18% (b=significativamente diferente de a, P=0,003). Os valores são a média ± erro padrão. [N=número de amostras].



Figura 2.18 Voltagem transepitelial (V<sub>te</sub>) medida nas brânquias do camarão de água doce Macrobrachium rosenbergii durante a perfusão com salina sem Na<sup>+</sup> com dimetil sulfóxido (DMSO) 0,18% seguida da perfusão da mesma salina acrescida de NaCN 1 mM, e posterior perfusão com salina sem NaCN \*Significativamente diferente (P=0,004).



Figura 2.19 Decurso temporal de um único experimento típico de caracterização da voltagem transepitelial da brânquia posterior do camarão de água doce Macrobrachium rosenbergii em condições de ausência de Na<sup>+</sup> mais os inibidores ouabaína 5 mM, concanamicina 0,15 µM. A perfusão foi simétrica.



Figura 2.20 Modelo de transporte iônico transepitelial em Dilocarcinus pagei (Crustacea: Decapoda)

## CAPÍTULO 3. HISTOLOGIA E ULTRAESTRUTURA DE BRÂNQUIA DO CARANGUEJO DE ÁGUA DOCE *Dilocarcinus pagei*

# CAPÍTULO 3. HISTOLOGIA E ULTRAESTRUTURA DE BRÂNQUIA DO CARANGUEJO DE ÁGUA DOCE *Dilocarcinus pagei*

## 3.1 INTRODUÇÃO

Excetuando-se pouquíssimas espécies, todos os outros crustáceos decápodos possuem brânquias. Na maioria dos Eucarida, as brânquias estão acondicionadas em uma câmara chamada de branquial, entre a parede corporal no cefalotórax e a

superfície interna do exoesqueleto. A esta região do exoesqueleto que recobre as brânquias se dá o nome de branquiostegito. O escafognatito, um exópodo do apêndice maxilar localizado na porção posterior da câmara branquial, em muitos decápodos está derivado no sentido de ocasionar um fluxo que adentra a esta câmara, através da sua oscilação (McLaughlin, 1986).

O número de brânquias e a forma com que estas estão arranjadas são dependentes do grupo observado. De modo geral, quatro brânquias estão ligadas aos somitos torácicos, lateralmente no animal. A pleurobrânquia está ligada à parede lateral do somito, dorsalmente à articulação da pata. Duas outras, as artrobrânquias, estão ligadas à membrana artodial entre a coxa e a parede do corpo. A brânquia restante, podobrânquia, está ligada à coxa de um pereiópodo (Taylor e Taylor, 1992).

Nos decápodos, uma brânquia consiste de modo geral de um eixo central alongado e uma série de ramos que partem deste eixo. Baseando-se neste parâmetro, existem três tipos de brânquias. Dendobrânquias são exclusivas da ordem Dendobranchiata, dos camarões peneídeos (Sete Barbas, Rosa, Cinza e do Pacífico, por exemplo). As Tricobrânquias e Filobrânquias são encontradas na subordem Pleocyemata (Felgenhauer e Abele, 1983). Vários subtipos intermediários, entretanto, são encontrados. As mais simples em sua estrutura são as Filobrânquias, na qual os ramos laterais são lamelas achatadas como dois subconjuntos (ver Figura 2.2). Nas Tricobrânquias, os ramos são filamentosos e estão arranjados em torno do eixo central. As Dendobrânquias consistem de um eixo que carrega uma série de ramos pareados, formando um ângulo com o eixo central (McLaughlin, 1983).

Ao menos seis tipos celulares foram descritos por Taylor e Taylor (1992) no epitélio branquial dos crustáceos decápodos: células chefe, células pilares, células estriadas, glicócitos, nefrócitos e células granulares. As células chefe, pilares e

estriadas fazem contato em algum ponto com a endocutícula da lamela. Os nefrócitos, glicócitos e células granulares, entretanto, não estão associados à endocutícula. Células pilares são células de sustentação que proporcionam que a hemolinfa flua através das brânquias. As células estriadas, também denominadas de septais (Freire e McNamara, 1995; McNamara e Torrres, 1999) estão envolvidas com a regulação iônica. Nefrócitos são células fagocíticas que exibem processos pedais. Glicócitos e células granulares exibem muitos grânulos de glicogênio.

Em crustáceos decápodos, as brânquias as glândulas antenais assumem um papel de regulação osmótica e iônica (Mantel e Farmer, 1983). Na maioria dos decápodos, a hemolinfa flui pelas brânquias, separada do meio ambiente por um epitélio simples e por uma cutícula. Uma diferenciação epitelial entre as brânquias anteriores e as posteriores foi documentada em diversos caranguejos braquiúros. Enquanto as brânquias anteriores possuem um epitélio denominado de epitélio fino, com células pouco espessas e com poucas invaginações da membrana basal, as brânquias posteriores possuem um epitélio denominado de epitélio espesso, com células espessas e numerosas dobras na membrana basal e apical (Copeland, 1968; Barra *et al.*, 1983; Towle e Kays, 1986). As brânquias posteriores possuem maior área osmiofílica do que as anteriores, denunciando uma função transportadora (Towle e Kays, 1986).

Análise da anatomia e ultraestrura das brânquias de crustáceos decápodos constituem etapas fundamentais no entedimento dos processos da biologia da osmorregulação e a biologia da osmorregulação é importante definidor dos caminhos evolutivos destes crustáceos. A arquitetura das brânquias e das células epiteliais brânquias pode fornecer informações valiosas sobre os processos de transporte iônico. Taxonomicamente, caranguejos como *Carcinus maenas* e *Callinectes sapidus*,

marinhos, apresentam células epiteliais que remetem a uma condição primitiva, onde o sistema celular de membranas plasmáticas está muito pouco desenvolvido no que remete ao aumento de área disponível para transporte iônico transmembranal.

*Eriocheir sinensis*, um caranguejo de água doce que migra para regiões de estuário e marinhas, apresenta derivações na ultrestrutura das células epiteliais branquiais no que refere a área disponível para trocas iônicas, enquanto que caranguejo de água doce *Potamon niloticus*, apresenta inúmeras características ultrestruturais das células epiteliais branquiais que aumentam a área disponível para a captura iônica (Maina, 1990). Assim, como base nesse conceito geral proposto por esse laboratório, a independência ao ambiente marinho pode indicar o grau de derivação de uma linhagem decápoda e também pode indicar o grau de especialização da membrana plasmática das células branquiais.

*Dilocarcinus pagei*, um caranguejo tricodactilídeo sul americano é endêmico das bacias hidrográficas dos rios Paraguai e Amazonas. Alguns autores tomaram esta espécie como modelo de estudo sobre os mecanismos branquiais de transporte iônico que atuam na osmorregulação em crustáceos de água doce. O caranguejo, apesar de transitar no meio terrrestre, se estabelece verdadeiramente no ambiente aquático de água doce. De modo interessante, foram documentadas particularidades anatômicas e fisiológicas nas brânquias desta espécie. Observou-se uma diferenciação dentro das lamelas das brânquias posteriores, aonde o lado distal da lamela, constituído por um epitélio fino e o lado proximal, constituído por um epitélio espesso (Onken e McNamara, 2002). Experimentos eletrofisiológicos mostraram também uma assimetria funcional e indicaram que o Cl<sup>-</sup> é absorvido pelo epitélio fino, enquanto que o Na<sup>+</sup> é absorvido pelo epitélio espesso (Onken e McNamara, 2002).

Estudos posteriores também confirmaram que a diferença anatômica entre brânquias anteriores e posteriores parece estar relacionada com o nível de expressão de RNA mensageiro que codifica enzimas ionotransportadoras de membrana (Weihrauch *et al.*, 2004). O nível de RNA mensageiro que codifica a subunidade  $\alpha$  da Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase está significativamente mais alto nas brânquias posteriores do que nas anteriores, resultado também encontrado em outros caranguejos estudados (Siebers *et al.*, 1982; Onken e Putzenlechner, 1995; Towle e Weihrauch, 2001; Lucu e Towle, 2003). Entretanto, a diferença no nível de RNA mensageiro para a subunidade B da V(H<sup>+</sup>)-ATPase entre as brânquias anteriores e posteriores não foi significativa em *D. pagei*, diferente das outras espécies de caranguejos em água doce estudados até agora, notadamente *Eriocheir sinensis* (Onken e Putzenlechner, 1995).

O aprofundamento do conhecimento da anatomia fina, ou ultraestrutura das brânquias do caranguejo *D. pagei* poderia contribuir para o entendimento de alguns processos de transporte iônico que permaneceram obscuros nesta espécie de crustáceo de água doce. Assim, este capítulo objetiva descrever as bases ultraestruturais da assimetria branquial eletrofisiológica e anatômica do caranguejo de água doce *Dilocarcinus pagei*. Para tal, foram feitas preparações para microscopia eletrônica de transmissão e realizadas medidas morfométricas e quantitativas das células branquiais desta espécie de caranguejo.
# 3.2 MATERIAIS E MÉTODOS

3.2.1 Coleta e manutenção dos caranguejos

Caranguejos da espécie *Dilocarcinus pagei* (Figura 3.1) foram coletados em lagoas adjacentes ao Rio Mogi-Guaçu, no município de Barrinha, região Nordeste do Estado de São Paulo (48° 10' 300" W, 21° 12' 143" S) no verão de 2002-2003. A Licença de Coleta foi #070/2004 (IBAMA). Os caranguejos foram trazidos para o Laboratório de Fisiologia de Crustáceos da FFCLRP/USP e mantidos em tanques de pvc com aproximadamente 30 litros de água de mina constantemente arejada. Foram mantidos durante uma semana nos tanques a uma temperatura de 25 °C e alimentados diariamente com alface. O arranjo dos tanques permitiu o livre acesso dos caranguejos ao meio aéreo, comportamento observado em alguns animais.



Figura 3.1 Caranguejo de água doce *Dilocarcinus pagei* utilizado para os experimentos de ultraestrutura branquial. Tamanho natural. Foto: cortesia do Dr. Horst Onken.

## 3.2.2 Dissecção das brânquias dos caranguejos

Os caranguejos foram mortos rapidamente através da destruição do gânglio cerebral dorsal e do gânglio ventral com uma tesoura. A carapaça foi então removida, e as brânquias anteriores e posteriores foram seccionadas em suas bases com uma microtesoura, e removidas com uma pinça. As brânquias foram colocadas em um

pequeno béquer sobre gelo contendo uma solução fixadora específica para essa espécie (com aproximadamente 400 mOsm/kg H<sub>2</sub>O) a fim de representar o ambiente osmótico e iônico da hemolinfa (Onken e McNamara, 2002).

#### 3.2.3 Fixação primária

Os veículos fixadores, tamponados com cacodilato de Na<sup>+</sup> 100 mM, continham (em mM) paraformaldeído 300 (Sigma) e glutaraldeído 400 (Merck, Alemanha). Alguns íons foram acrescentados aos fixadores no intuito de recriar o ambiente osmótico e iônico da hemolinfa para a espécie de caranguejo: KCl 9, CaCl<sub>2</sub> 10, MgCl<sub>2</sub> 3, NaCl 100 (Onken e McNamara, 2002). O pH da solução foi ajustado em 7,4 e o veículo fixador mantido em 4 °C. Para uma melhor fixação, um dos vasos da brânquia foi canulado e esta perfundida com o veículo fixador durante 20 minutos, usando uma bomba peristáltica (Ismatec-IPC, Zurique, Suíça) com uma velocidade de perfusão de 4 ml/minuto.

## 3.2.4 Lavagem

As brânquias foram lavadas três vezes, durante 5 minutos cada, sob gelo, em uma solução de lavagem constituída do veículo tamponado acima, menos os aldeídos. O pH da solução foi ajustado em 7,4, e a temperatura do veículo de lavagem foi mantida em 4 °C.

#### 3.2.5 Pós-fixação

As brânquias foram reduzidas a porções de lamelas branquiais com aproximadamente 10 lamelas. Foram fixadas em recipiente sobre gelo durante 60 minutos em uma solução de tetróxido de ósmio 1% tamponada com cacodilato de Na<sup>+</sup>

100 mM. Misturou-se volumes iguais de: i) a respectiva solução de lavagem constituída dos mesmos íons nas concentrações do item 3.2.3, preparada em concentração dupla; ii) tetróxido de ósmio 2% em água destilada.

#### 3.2.6 Desidratação, infiltração e inclusão

As porções de lamelas branquiais foram desidratadas em uma série de etanol aquoso (50% 10 min, 70% 10 min, 95% 10 min, 100% duas vezes de 15 min), e óxido de propileno 100% (duas vezes de 15 min). Em seguida foram infiltradas por uma mistura de óxido de propileno e resina epóxi Araldite 502 (Pelco, EUA), para microscopia eletrônica de transmissão na proporção de 1:1, durante 1 h em temperatura ambiente. Depois, infiltradas com uma mistura de resina e óxido de propileno numa proporção de 2:1 em um misturador giratório durante 8 horas. Em seguida o material foi encubado em resina pura durante 1 hora em estufa a 45 °C e transferido para resina nova em formas de borracha de silicone, aonde as lamelas foram incluída em blocos de resina que se polimerizaram.

As lamelas branquiais foram orientadas com as hemilamelas voltadas para a extremidade anterior do bloco ou ortogonal a essa orientação. Os blocos com as brânquias foram polimerizados durante 3 a 4 dias em 60 °C.

#### 3.2.7 Microtomia e Microscopia eletrônica de transmissão

Os blocos de resina polimerizada foram aparados e seccionados em um ultramicrótomo Sorvall MT2-B (EUA) com navalhas de vidro, para a obtenção dos cortes grossos de 500 nm de espessura. Os cortes foram recolhidos em lâminas de vidro e em seguida corados com uma solução de Azul de Metileno e Azul de Toluidina (ambos em borato de sódio aquoso a 1%) sobre chapa a 60 °C. Os cortes finos, com

80 nm de espessura, foram cortados em um ultramicrótomo Leica Reichert Ultracut S (Áustria), com navalha de diamante e recolhidos sobre telas de cobre de malha de 300 nm.

Para a descrição ultraestrutural das brânquias, as telas foram contrastadas com acetato de uranila aquoso 1% e citrato de chumbo (Reynolds, 1963) durante 10 min. As telas com os cortes foram examinadas em um microscópio eletrônico de transmissão Jeol JEM 1010 (EUA) no Laboratório de Microscopia Eletrônica da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP, no campus de Jaboticabal/SP. Algumas telas foram também examinadas no microscópio de transmissão Philips EM 208 (Holanda), do Departamento de Biologia Celular e Bioagentes Patogênicos da FMRP/USP. Foi utilizada uma voltagem acelerante de 80 kV e as telas foram ampliados 2,5 vezes em papel Kodak Kodabrome RcF3. Em algumas micrografias utilizou-se diretamente a imagem digital adquirida pelo microscópio.

3.2.8 Visualização ultracitoquímica da atividade *p*-NPPásica da Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase nas brânquias anteriores e posteriores de *Dilocarcinus pagei* 

A Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase foi localizada usando a técnica do citrato de Pb<sup>2+</sup> descrita por Mayahara *et al.* (1980) e modificada para palemonídeos (McNamara e Torres, 1999). A técnica consiste na hidrólise do substrato sintético *p*-NPP pela Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase em meio alcalino; a enzima , fosforilada e após a etapa de transporte do K<sup>+</sup>, libera fosfato inorgânico (P<sub>i</sub>) a partir da hidrólise do substrato. O P<sub>i</sub> reage com o Pb<sup>2+</sup> dissolvido no meio de incubação, formando fosfato de Pb<sup>2+</sup>, que se precipita com uma eletrondensidade característica observada ao microscópio eletrônico de transmissão.

#### 3.2.9 Fixação primária

As brânquias foram dissecadas e processadas como descrito anteriormente em 4.2.2. O fixador foi aquele descrito no item 4.2.3, sendo a concentração de glutaraldeído reduzida de 250 mM para 50 mM.

#### 3.2.10 Lavagem primária

Com o intuito de recuperar a atividade *p*-NPPásica da Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase após a fixação primária (Mayahara *et al.* 1980), as brânquias foram lavadas com uma solução de lavagem com as mesmas concentrações iônicas do item 3.2.3, contendo 10% (v/v) de dimetil sulfóxido (DMSO).

### 3.2.11 Incubação para localização da Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase

As brânquias foram perfundidas com o veículo de incubação através de uma bomba peristáltica (Ismatec-IPC, Zurique, Suíça) durante 90 min a 25 °C. O veículo de reação foi constituído de: tampão glicina 250 mM e KOH 25 mM; citrato de chumbo 4,0 mM dissolvido em KOH 20 mM; dimetil sulfóxido (DMSO) 25% (v/v); o substrato sintético *p*-NPP (sal de Mg<sup>2+</sup>, Sigma) 10 mM; e Levamisole 2,5 mM, um inibidor das fosfatases alcalinas não específicas, a um pH final de 8,8.

Um controle ultracitoquímico foi feito para verificar a especificidade da reação da Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase com o substrato, através da encubação prévia dos tecidos com o inibidor específico da Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase, a ouabaína, em uma concentração de 10 mM.

#### 3.2.12 Pós-fixação

As brânquias foram reduzidas a porções com 10 lamelas. O procedimento de pós-fixação foi o mesmo do descrito no item 3.2.5.

#### 3.2.13 Demais procedimentos

Os procedimentos de desidratação, infiltração, polimerização, ultramicrotomia e microscopia eletrônica foram os mesmos utilizados para a descrição da ultraestrutura das células branquiais (ver item 3.2.7). Para a visualização dos sítios de atividade *p*-NPPásica da Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase, as telas foram contrastadas somente com acetato de uranila aquoso 1% (Mayahara *et al.*, 1980) durante 10 min.

#### 3.2.14 Análise morfométrica das brânquias de *Dilocarcinus pagei*

Um sistema teste foi sobreposto sobre micrografias eletrônicas das brânquias posteriores tiradas de áreas aleatórias, com a finalidade de quantificar alguns parâmetros ultraestruturais dessas células (Weibel *et al.*, 1966, McNamara e Torres, 1999). A análise foi feita nas brânquias posteriores porque estas possuem características de um epitélio transportador e por isso podem ser comparadas com resultados morfométricos descritos em epitélio transportadores de outras espécies de crustáceos.

O sistema teste consistiu de transparências sobrepostas às micrografias aonde foi possível quantificar a densidade de superfície de membrana (µm<sup>2</sup> de membrana/µm<sup>3</sup> de citoplasma), o volume mitocondrial relativo (em %) e a altura e densidade das evaginações apicais das células epiteliais (Freire e McNamara, 1995; McNamara e Torres, 1999).

A quantificação da densidade de superfície de membrana (µm<sup>2</sup>/µm<sup>3</sup>) foi obtida através do posicionamento aleatório do sistema teste sobre a micrografia. O sistema

teste consistiu de linhas de comprimento *z* (1,2 cm na transparência, equivalente a 0,3 µm em uma micrografia de aumento de 40.000 vezes) separadas horizontalmente pela distância *z*. O espaçamento vertical entre as linhas foi de  $\frac{z}{2}\sqrt{3}$ . O começo de cada linha ocorre a uma distância  $\frac{z}{4}$  da extremidade da transparência e termina a uma distância de  $\frac{3z}{4}$  da outra extremidade. Na linha abaixo ou acima, a posição se inverte.

A densidade de superfície de volume  $\frac{Si}{Vi}$  ( $\mu$ m<sup>2</sup>/ $\mu$ m<sup>3</sup>) foi calculada pela fórmula:

$$\frac{Si}{Vi} = (z)\frac{Pi}{4}(Nni);$$
 aonde

 $\frac{Pi}{4}$  = número total de extremidades de linha *z* no citoplasma dividido por 4. (*Nni*) = número total de interseções da membrana celular nos segmentos de linha z.

Para quantificar o volume mitocondrial relativo (em %) utilizou-se o mesmo sistema teste empregado no item anterior. Contou-se o número de extremidades dos segmentos de linha *z* que caíram no citoplasma e dentro das mitocôndrias, excluídas aquelas que caíram dentro dos núcleos. O volume então foi dado pela fórmula:

$$Vm = \frac{Pm}{Pcit}$$
; aonde

Pm = número de extremidades de linha z que estão dentro das mitocôndrias.

Pcit = número de extremidades de linha z que estão no citoplasma.

Para medir a altura das evaginações das células epiteliais, o mesmo sistema teste foi colocado aleatoriamente sobre a micrografia e se mediu a altura dos microvilos cujo interior continha uma extremidade de linha *z*.

Para a quantificação da densidade numérica das evaginações das células epiteliais, um sistema teste formado por um segmento de reta de comprimento de 3,1 µm em uma transparência foi sobreposto perpendicularmente à região basal das evaginações celulares. Foram contados os microvilos que estiveram contidos nesse comprimento.

#### 3.2.15 Análise estatística da morfometria e quantificações

Com o intuito de localizar diferenças entre alguns parâmetros ultraestruturais das células dos epitélios espesso e fino das brânquias posteriores do caranguejo foram feitas Análise de Variância de um único fator. As diferenças, quando houveram, foram posteriormente quantificadas através de um teste Student-Newman-Keuls (SNK) com um nível de significância (P=0,05).

## 3.3 RESULTADOS

#### 3.3.1 Histologia das brânquias anteriores

O epitélio das brânquias anteriores (Figura 3.2) se assemelha a um epitélio com características de epitélio respiratório. As interfaces epiteliais são finas e apresentam células epiteliais em um formato de "T", com aproximadamente 7 µm de largura na região do corpo celular. O epitélio alonga-se apicalmente, de modo ortogonal ao eixo do corpo celular e paralelamente à cutícula, apresentando largura de 18 µm. Este alongamento forma o que pode se chamar de abas. Este arranjo apresenta, nas brânquias anteriores, razoável simetria nos dois lados da lamela e assim forma um espaço na qual a hemolinfa pode fluir livremente, com exceção de poucos locais aonde é possível visualizar um septo intralamelar de característica esponhgosa, inserido no meio do espaço da hemolinfa.

#### 3.3.2 Histologia das brânquias posteriores

A assimetria entre os dois lados do epitélio das brânquias posteriores é uma característica histológica marcante das brânquias posteriores do caranguejo *D. pagei* (Figura 3.3). Tanto as células do lado espesso quanto as do lado fino possuem um núcleo no corpo celular e essa parece ser a região de contato entre os dois lados da brânquia. A espessura da lamela é de aproximadamente 40 µm e a diferenciação de espessura entre os dois lados da lamela é evidente. O lado dito proximal, o epitélio é notadamente mais espesso, com aproximadamente 15 µm de espessura, do que o lado dito distal, com aproximadamente 5 µm de espessura.

O lado distal, mais fino, é caracterizado por uma expansão apical das células epiteliais formando finas abas apicais, adjacentes à cutícula. Os corpos celulares das

células epiteliais do lado fino se extendem através do espaço da hemolinfa em direção à camada proximal, a mais espessa.

#### 3.3.3 Ultraestrutura das células das brânquias anteriores

Ao nível da microscopia eletrônica de transmissão, as células epiteliais das brânquias anteriores (Figura 3.4) algumas mitocôndrias e dobras da membrana plasmática. No eixo caracterizado como do corpo celular, encontram-se inúmeros feixes de citoesqueleto dispostos ortogonais ao eixo da cutícula. Estas fibras se estendem por quase toda a extensão do corpo celular e formam uma via de tráfego até a base dos dobramentos da membrana plasmática no pólo apical da célula. Células intralamelares formam um septo espongoso, intensamente vesiculado e com um denso núcleo celular. A membrana plasmática deste septo não forma dobras e o número de mitocôndrias é reduzido. Este septo contacta as células epiteliais de ambos os lados da lamela de forma ortogonal ao eixo do corpo celular das células epiteliais (Figura 3.4)

No pólo apical de algumas células epiteliais, as mitocôndrias apresentam uma forma ligeiramente alongada no eixo ortogonal à cutícula (Figura 3.4). Finos tufos de membrana plasmática apical fazem o contato entre a célula epitelial na altura das mitocôndrias e a cutícula (Figura 3.4 e Figura 3.5). Este arranjo origina espaços subcuticulares. Uma lâmina basal é visível no contorno da membrana celular que está em contato com a hemolinfa (Figura 3.5).

Esta membrana plasmática possui poucas dobras evidentes. O núcleo da célula epitelial, pode se localizar no corpo celular, com grandes dimensões e constituído de uma grande área de eucromatina (Figura 3.5). O núcleo da célula epitelial pode se extender até a região da aba da célula, ocupando quase toda a área

dessa fina aba (Figura 3.6). Nesta aba, complexos juncionais estão presentes (Figura 3.6) e mostram o grau de conexão entre as células e presumivelmente atuam na constituição de uma barreira para os fluxos paracelulares de água e íons entre o meio externo e a hemolinfa.

#### 3.3.4 Ultraestrutura das células das brânquias posteriores

De modo geral, assim como visto na microscopia de luz, a assimetria entre os dois lados da lamela branquial das brânquias posteriores é uma marcante característica que diferencia estes epitélios. Ao nível ultrestrutural, as células epiteliais dos lados proximal e distal da lamela também possuem notadas diferenças, além da espessura. A eletrondensidade das células do lado distal, mais fino, é maior do que a das células do lado proximal (Figura 3.7) O formato da célula epitelial do lado distal remete ao formato em "T" das células epiteliais das brânquias anteriores, com um corpo celular evidente e diferenciado da região da aba (Figura 3.7), lembrando um estutura em forma de "pilar". No lado fino, a célula epitelial paresenta razoável polarização apical-basal na região do corpo celular, sendo que o pólo basal possui poças mitocôndrias e quase nenhuma dobra da membrana plasmática, enquanto que o pólo apical apresenta evaginações associadas a algumas mitocôndrias.

No outro lado da lamela, o lado espesso ou proximal, a célula epitelial é menos densa e robusta no sentido de lembrar um "pilar" (Figura 3.7). A membrana plasmática destas células é intensamente dobrada, diferenciada em uma região basolateral e em uma região apical (Figura 3.7) Estas dobras, nas duas regiões, estão intimamente associadas a inúmeras mitocôndrias, de maneira pecualiar para cada região.

Análises detalhadas da ultraestrutura das células epiteliais do lado distal, fino, revelam um sistema de membranas apicais na transição da região do corpo celular com a aba com alguns microvilos associados às mitocôndrias (Figura 3.8). Alguns microvilos partem diretamente das mitocôndrias e esta arranjo origina alguns espaçoes subcuticulares. A membrana plasmatica que faceia o espaço da hemolinfa, não há dobras da membrana arranjadas com mitocôndrias, somente uma lâmina basal na interface entre a membrana e a hemolinfa (Figura 3.8).

A região das abas das células pilares se caracteriza por uma porção celular que reduz a sua espessura à medida que se afasta do corpo celular. Em uma região da aba com uma espessura intermediária (Figura 3.9), a região apical que interage com a cutícula apresenta algumas dobras da membrana e mitocôndrias com formato arredondado e também espaços subcuticulares (Figura 3.9). As mitocôndrias formam com a membrana plasmática uma espécie de conjunto, aonde a organela delimita o contorno da membrana em uma superposição de membranas e o contato entre a cutícula e a célula é caracterizado por estruturas que lembram microvilos (Figuras 3.9). Estruturas da membrana como junções septadas e desmossomos (Figura 3.9) unem células adjacentes e também podem impedir fluxos paracelulares de água e ìons entre o meio exerno e a hemolinfa. A região da aba, distante do corpo celular, das células epiteliais do lado distal é muito fina (Figura 3.10). A espessura pode ser menor do que a própria cutícula adjacente. É possível notar uma estratificação da cutícula, com várias camadas paralelas de disposição de espessura regular, e uma única camada notadamente mais espessa, mais externa (Figura 3.10). Raras são as mitocôndrias, e nota-se grande quantidade de junções variadas, como desmossomos, junções septadas e junções adeerentes. Uma lâmina basal recobre toda a membrana em contato com a hemolinfa (Figura 3.10).

No lado proximal, espesso, a complexidade ultraestrutural da célula epitelial é nítida no que se refere aos parâmetros de dobras da membrana plasmática e número de mitocôndrias, e por um grande número de espaços subcuticulares (Figura 3.11). As células do lado espesso das brânquias posteriores apresentam características que se assemelham a um epitélio transportador (Figura 3.12). A região que está em contato com a hemolinfa pode ser definida como uma área de membrana basolateral, devido às dobras da membrana plasmática associadas com mitocôndrias (Figura 3.12). A região apical é bem estruturada (microvilos arranjados como tufos), formando espaços subcuticulares nos intervalos desses tufos (Figura 3.12). Os sistemas membranais apicais e basais continuam fortemente ampliados em suas áreas de superfície de membrana. No lado espesso, as invaginações da membrana basal/basolateral são profundas, penetrando até 2/3 na célula (Figura 3.12). O núcleo da célula epitelial possui grande proporção de eucromatina (Figura 3.12), menos condensada, sugerindo elevada atividade transcritora de informação genética.

No pólo apical da célula epitelial do lado proximal é possível visualizar mitocôndrias associadas com evaginações da membrana plasmática apical (Figura 3.13). Adjacente a essa região apical é possível notar que as invaginações da membrana que formam a região basolateral alcançam as evaginações apicais, sendo que nestes locais existem uma população de junções septadas de membrana e desmossomos (Figura 3.13).

#### 3.3.5 Morfometria das células branquiais de Dilocarcinus pagei

A área disponível para trocas iônicas apicais nas células pilares das brânquias posteriores de *D. pagei* pode ser indiretamente estimada pela altura e densidade das evaginações apicais dessas células. As medidas morfométricas mostraram que a

altura e a densidade média das evaginações das células pilares foram maiores no epitélio espesso do que no epitélio fino (Tabela 3.1). No epitélio espesso a altura e a densidade média foram respectivamente de 0,75  $\pm$  0,07 µm [N=8] e 6,9  $\pm$  1,1 [N=8] evaginações/µm<sup>2</sup>. No epitélio fino, estes valores foram de 0,50  $\pm$  0,08 µm [N=8] e 2,3  $\pm$  1,4 [N=8] evaginações/µm<sup>2</sup> respectivamente.

Tabela 3.1 Altura e densidade média (± EPM) dos microvilos da célula pilar das brânquias posteriores do caranguejo de água doce *Dilocarcinus pagei*. [N=número de micrografias].

	Altura média dos microvilos	Densidade média dos
	(em µm)	microvilos (microvilos/µm²)
Epitélio espesso	0,75 ± 0,071 <sup>1</sup> [8]	6,9 ± 1,12 <sup>2</sup> [8]
Epitélio fino	0,50 ± 0,08 [8]	2,3 ± 1,4 [8]

<sup>1</sup>P=0,049 comparado com o epitélio fino

<sup>2</sup>P=0,038 comparado com o epitélio fino

A atividade de enzimas transmembranais translocadoras de íons é um importante componente formador do transporte iônico transepitelial. Assim, a densidade de superfície de membrana disponível e a quantidade relativa de mitocôndrias podem refletir indiretamente a capacidade transportadora de um epitélio. A Tabela 3.2 mostra a densidade de superfície e o percentual de volume mitocondrial da região basal do epitélio espesso das brânquias posteriores de *D. pagei*. A densidade de superfície de membrana ( $\mu$ m<sup>2</sup>/ $\mu$ m<sup>3</sup>) foi significantemente maior no epitélio espesso (14,08 ± 1,9  $\mu$ m<sup>2</sup>/ $\mu$ m<sup>3</sup>) do que no epitélio fino (7,51 ± 2,0  $\mu$ m<sup>2</sup>/ $\mu$ m<sup>3</sup>). O volume mitocondrial relativo, entretanto, não foi significativamente diferente para os dois epitélios.

Tabela 3.2 Densidade média ( $\pm$  EPM) de superfície ( $\mu$ m<sup>2</sup> de membrana/ $\mu$ m<sup>3</sup> de citoplasma) e volume mitocondrial médio relativo (em %) ( $\pm$  EPM) da região basal das células epiteliais das brânquias posteriores do caranguejo de água doce *Dilocarcinus pagei*. [N=número de micrografias].

	Densidade de superfície (μm² de membrana/μm³ de	Volume mitocondrial relativo (em %)
	citoplasma)	
Epitélio espesso	$14,08 \pm 1,91^{1}$	44 ± 2,6
	[8]	[8]
Epitélio fino	7,51 ± 2,0	38 ± 3,7
	[8]	[8]

<sup>1</sup>P=0,028 comparado com o epitélio fino

3.3.6 Localização ultracitoquímica de uma atividade *p*-NPPásica nas brânquias de *Dilocacinus pagei* 

A atividade hidrolítica da Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase foi marcada ultracitoquimicamente. Sítios eletrondensos de acúmulo de produto de reação da ATPase junto ao chumbo com o substrato sintético *p*-NPP apareceram nas células epiteliais das brânquias posteriores. Não foi observada nenhuma marcação nas células das brânquias anteriores.

Sítios de acúmulo de produto de reação da ATPase foram localizados nas poucas dobras da membrana basal das células do epitélio fino da brânquia posterior (Fig. 3.14). A maioria dos depósitos se encontra no espaço extracelular, associados às dobras da membrana basal. Os sítios extracelulares possuem formato ligeiramente alongado e parecem obstruir todo o espaço extracelular. Alguns sítios de acúmulo de depósitos eletrondensos possuem até 1 µm de extensão (Figura 3.14). Alguns depósitos são visíveis no lado citosólico da célula, alguns dentro das mitocôndrias. Estes depósitos, entretanto, possuem o formato arredondado, com aproximadamente

300 nm de diâmetro. A membrana apical da célula epitelial fina não apresentou marcação eletrondensa (Figura 3.14).

As células do epitélio espesso da brânquia posterior também apresentaram alguns depósitos eletrondensos correspondentes à atividade *p*-NPPásica da Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase no espaço extracelular entre membranas adjacentes na área basal (Figura 3.15 e Figura 3.16). O formato dos depósitos é arredondado ou alongado e estes possuem até 1,5 µm de diâmetro. Os depósitos observados no epitélio espesso são maiores do que os do epitélio fino e não foram encontrados no citosol (Figura 3.16).

# 3.4 DISCUSSÃO DA HISTOLOGIA E ULTRAESTRUTURA DAS BRÂNQUIAS DE Dilocarcinus pagei

As preparações histológicas e de microscopia eletrônica de transmissão das lamelas branquiais do caranguejo de água doce *D. pagei* mostram uma arranjo branquial que ainda não havia sido documentado, com uma interessante diferenciação branquial entre brânquias anteriores e posteriores. Tal diferenciação estrutural parece apontar para uma diferenciação na função entre estes conjunos branquiais, sugerindo um caminho evolutivo selecionado nos caranguejos braquiúros na diferenciação epitelial. Tal caminho evolutivo permitiu que os braquiúros invadissem com sucesso a água doce.

A questão da assimetria epitelial das brânquias posteriores no caranguejo *D.* pagei surge como uma dúvida. Seria esta assimetria inédita para os braquiúros? A particularidade deste arranjo leva a acreditar que se tal assimetria tivesse sido observada anteriormente, seria prontamente descrita. Esta é uma idéia razoável, desde que tal disposição é verificada ao nível da microscopia de luz, ferramenta esta acessível há tempos. Na compilação de Taylor e Taylor (1992) sobre anatomia de crustáceos, nenhuma assimetria é citada nos moldes de uma assimetria como a observada em *D. pagei*. O que foi documentado foi uma diferenciação na qual as brânquias anteriores apresentam um epitélio respiratório e as posteriores apresentam um epitélio transportador. Não houve menção a uma diferenciação dentro de uma mesma brânquia, entre os dois lados.

Esta diferenciação anterior-posterior das brânquias é relatada para muitas espécies de crustáceos, principalmente carangujos braquiúros. *Ucides cordatus* (Finol e Croghan, 1983) e *Callinectes sapidus* e *Carcinus maenas*, por exemplo, apresentam uma razoável diferenciação anterior-posterior das brânquias, com o

epitélio branquial posterior notadamente transportador, com nítida marcação de atividade oriunda de uma Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase ocorrendo somente nas brânquias posteriores, que aumentam com a aclimatação destas espécies a água do mar diluída (Towle e Kays, 1986; Compére *et al.*, 1989; Goodman e Cavey, 1990). Outras espécies de caranguejos, como *Eriocheir sinensis*, que migra sazonalmente da água doce para regiões costeiras, *Uca urugayensis*, um caranguejo semi-terrestre sulamericano (Luquet *et al.*, 1997), e *Chasmagnathus granulatus*, um caranguejo estuarino sulamericano, também apresentam diversos graus de diferenciação anterior-posterior das brânquias (Genovese *et al.*, 2004). Experimentos de quantificação de parâmetros ultraesttrurais como altura (Genovese *et al.*, 2004) também mostraram que a relação entre a área de membrana plasmática e o volume celular nas células epiteliais branquias posteriores e que esta relação pode ser aumentada com a aclimatação à agua de reduzida salinidade.

Um sistema ainda mais diferenciado de arranjo anatômico branquial é aquele que se observa através da histologia e a ultrestrutura de camarões palemonídeos. Diferentemente das brânquias de *D. pagei*, os camarões de água doce do gênero *Macrobrachium* apresentam células do septo intralamelar com várias especializações que denotam função de transporte iônico (Freire e McNamara, 1995; McNamara e Torres, 1999; Torres, 2000), contrariamente ao que ocorre em *D. pagei*, aonde as células septais não apresentam uma ultrestrutura diferenciada para o transporte iônico transepitelial. Em espécies de camarões de palemonídeos a relação morfométrica de área de membrana apical das células pilares da brânquia aumenta de acordo com o grau de independência à água doce; entreanto esta disposição é observada ao longo de todas as brânquias, simultaneamente. Em *Dilocarcinus pagei*,

em um mesmo animal, na água doce, é possível observar uma gradação na área disponível de membrana apical das células epieliais branquiais, com células com pequenas áreas de membrana, nas brânquias anteriores, até células com grande amplificação da área apical. Ao analisar tais diferenças, é possível verificar que no caranguejo o sistema de transporte iônico está nas periferias da lamela, o que pode ter implicações funcionais no que se refere à exposição dos sistemas transportadores de íons.

A descrição da anatomia e da ultraestrutura das brânquias do caranguejo de água doce Dilocarcinus pagei aumenta a percepção de que o transporte de Na<sup>+</sup> e Cl<sup>-</sup> ocorra de modo desacoplado, demonstrado através das características ultraestruturais diferenciadas das células do epitélio branquial. O trabalho de Onken e McNamara (2002) introduziu a noção da assimetria epitelial das brânquias de D. pagei. O lado proximal, caracterizado como epitélio espesso, mostrou parâmetros elétricos dependentes de Na<sup>+</sup>, como a corrente  $(I_{Na}^{+})$  e a condutância  $(G_{Na}^{+})$ , enquanto que o lado proximal, denominado pelo autores de epitélio fino, apresentou uma corrente negativa dependente de  $Cl^{-}$  ( $I_{Cl^{-}}$ ) com uma condutância para o mesmo ânion ( $G_{CI}$ ). A contribuição dos dados do presente trabalho acontece por duas maneiras: a primeira é em estabelecer os parâmetros ultraestruturais, somando-se aos os resultados eletrofisiológicos. A segunda contribuição vem da marcação de uma atividade de uma Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase nesses dois tipos de epitélio.

O epitélio proximal (espesso) parece ter características de um epitélio ionotransportador, semelhante aos observados em outras brânquias de crustáceos. Uma densidade razoavelmente elevada de membrana basal, demonstrada pela morfometria da relação µm<sup>2</sup>/µm<sup>3</sup>, em conjunto com um elevado volume relativo de mitocôndrias, caracteriza as chamadas 'bombas mitocondriais". Outra importante

característica destas células e que está relacionada com a especialização para o transporte é a elevada relação superficial do pólo apical, representada pela altura e densidade das evaginações desta região. Nota-se que, quando comparado com o mesmo local no epitélio fino, as evaginações são mais compridas (quase o dobro). Entretanto, quando o parâmetro de comparação é a densidade, esta chega a ser quase 5,5 vezes maior nas células do epitélio espesso em relação ao epitélio fino. Um indício de marcação da atividade de uma Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase nas dobras da membrana basal pode indicar a existência de um aparato de captura de Na<sup>+</sup> no lado proximal. Contudo, a marcação também ocorreu no lado do epitélio distal. Este epitélio não possui células com dobras basais e o sistema apical é menos amplificado do que no lado proximal.

A questão que surge com estes resultados é: como interpretá-los? Estarão eles em discordância com os resultados de Onken e McNamara (2002)?

Para responder estas pendências é importante ter em mente uma visão um pouco mais ampla do processo. O fato de que a aplicação de ouabaína no lado basal do epitélio distal não alterou a corrente e a condutância para o Na<sup>+</sup> (Onken e McNamara, 2002) não pode ser interpretado como ausência de uma atividade de uma Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase. O arranjo da membrana das células epiteliais é como um brinquedo do tipo "Lego". O funcionamento do sistema como um todo vai depender de quais peças moleculares estão presentes e de como estas peças interagem (Towle e Weihrauch, 2001). Uma atividade Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPásica em um epitélio que transporta Cl<sup>-</sup> mas não Na<sup>+</sup> poderia ser consequentemente utilizada no processo de captura de Ca<sup>2+</sup>, ou na eliminação de produtos nitrogenados, por exemplo. Apesar de meramente especulativas, estas afirmações possuem o mérito de não encerrar as investigações por aparentes paradoxos experimentais.

Outro fator que deve ser levado em conta é que a marcação da atividade de uma Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase em *D. pagei* ser diferente daquelas observadas por Towle e Kays (1986) e por McNamara e Torres (1999), utilizando a mesma técnica. McNamara e Torres (1999) já chamavam a atenção que o estudo das características da marcação é extremamente útil quando encaradas de modo comparativo. Pode dar a idéia da disponibilidade dos substratos da enzima e da capacidade de transporte do sistema.

Assim, comparativamente, o sistema branquial de *D. pagei* descrito neste capítulo indica que a assimetria branquial nas brânquias posteriores é uma característica derivada de uma linha evolutiva onde as funções de capura iônica estão separadas no espaço, entre dois tipos celulares, cada um com especializações ultraestruturais que conduzem a uma captura desacoplada de sódio e cloreto. Tal arranjo ainda não havia sido descrito em crustáceos decápodos e as implicações ainda não são totalmente entendidas. O que se pode concluir é que esta separação de funções permite que o caranguejo sobreviva em um ambiente pobre em íons diluídos, e que o sistema de captura iônica permitiu a invasão de nichos ecológicos dulcícolas disponíveis, com relativo sucesso.

# 3.5 FIGURAS DA ORGANIZAÇÃO HISTOLÓGICA DAS BRÂNQUIAS DE Dilocarcinus pagei

3.5 FIGURAS DA ORGANIZAÇÃO HISTOLÓGICA DAS BRÂNQUIAS DE Dilocarcinus pagei



Figura 3.2 Fotomicrografia de luz de uma brânquia anterior do caranguejo de água doce *Dilocarcinus pagei* seccionada transversalmente ao eixo dos vasos sanguíneos aferentes e eferentes, localizados nas extremidades das lamelas (não estão mostrados). Notar o formato de "T" das células epiteliais, chamadas por isso de células pilares, a diferenciação em duas regiões, a aba e o corpo celular, o amplo espaço da hemolinfa, interrompido somente por poucas células septais intralamelares. Notar também que a região da aba, distante do corpo celular, possui reduzida espessura.



Figura 3.3 Fotomicrografia de luz de uma brânquia posterior do caranguejo de água doce *Dilocarcinus pagei* seccionada transversalmente ao eixo dos vasos sanguíneos aferentes e eferentes, localizados nas extremidades das lamelas (não estão mostrados). Notar a diferença da espessura entre os epitélios dos dois lados da lamela (Comparar com Figura 3.2), a diferença de densidade entre os dois epitélios, sendo que o epitélio fino é mais corado que o espesso. Notar também o espaço intracelular e que as células epiteliais do lado fino se assemelham às células pilares do epitélio das brânquias anteriores, com uma diferenciação entre as regiões do corpo celular e da aba. As células do lado espesso, diferentemente, não apresentam tal formato.

## 3.6 ELETROMICROGRAFIAS DE ULTRAESTRUTURA DAS BRÂNQUIAS DE Dilocarcinus pagei



Figura 3.4 Fotomicrografia eletrônica de transmissão de uma brânquia anterior do caranguejo de água doce Dilocarcinus pagei cortada transversalmente ao eixo dos vasos. A: célula epitelial fina; B: célula epitelial espessa; a: região apical; c: cutícula; e: área externa; h: hemolinfa; m: mitocôndrio; n: núcleo celular; s: septo intralamelar. Barra de escala: 10 µm. Notar o formato das células epiteliais, em formato de "T", o septo espongoso no meio da lamela e a estruturação das regiões apicais das células epiteliais, como as mitocôndrias e a membrana plasmática formando uma estrutura peculiar.



Figura 3.5 Fotomicrografia eletrônica de transmissão de uma brânquia anterior do caranguejo de água doce Dilocarcinus pagei cortada transversalmente ao eixo dos vasos. Corpo celular de uma célula epitelial fina; c: cutícula; e: meio externo; ea: evaginações da região apical; h: hemolinfa; lb: lâmina basal; n: núcleo celular. Cp: corpo celular; m: miocôndria: Barra de escala: 5 µm. Notar as mitocôndrias na região apical e os espaços subcuticulares adjacentes. Notar também que a membrana plasmáica basal não tem mitocôndrias nem dobramentos de membrana associadas. É possível visualizar a grande proporção de eucromatina no núcleo celular.



Figura 3.6 Fotomicrografia de transmissão da região da aba de uma célula epitelial de uma brânquia anterior de D. pagei, processada para visualizar a sua ultraestrutura. Orientação do corte: ortogonal ao eixo central onde passam os vasos eferente/aferente. m: mitocôndria; n: núcleo; h: hemolinfa; lb: lâmina basal; c: cutícula; e: meio externo; seta cheia: junção do tipo "gap". Barra de escala: 500 nm. Notar que não existem dobras da membrana plasmática basal e que poucas miocôndrias são observadas na região apical, entretanto não há evaginações da membrana plasmática nessa região.



Figura 3.7 Fotomicrografia eletrônica de transmissão de uma brânguia posterior do caranguejo de água doce Dilocarcinus pagei. Corte transversal ao eixo dos vasos. A: corpo celular de uma célula epitelial fina; B: célula epitelial espessa; a: região apical; c: cutícula; e: região externa; m: mitocôndrio; h: hemolinfa; s: septo intralamelar. Barra de escala: 10 µm. Notar a diferença de formato e densidade entre os dois lados da lamela, e a existência de um sistema de dobras basolaterais da membrana plasmática na célula epitelial do lado espesso. Notar os espaços subcuiculares nos dois epitélios, sendo que a área destes espaços subcuticulares no epitélio espesso é elevada.



Figura 3.8 Fotomicrografia eletrônica de transmissão de uma brânquia posterior do caranguejo de água doce Dilocarcinus pagei cortada transversalmente ao eixo dos vasos. Célula epitelial fina; c: cutícula; e: meio externo; ea: evaginações apicais; h: hemolinfa; lb: lâmina basal; m: mitocôndrio. Barra de escala: 5 µm.Esta é uma região de transição entre a região do corpo celular e a aba. Notar a estruturação que ocorre nas mitocôndrias, envoltas pela membrana plasmática da região apical, formando alguns espaços subcuticulares. Notar também que a membrana plasmática do lado da hemolinfa não apresenta mitocôndria em suas adjacências nem dobras.



Figura 3.9 Fotomicrografia eletrônica de transmissão de uma brânquia posterior do água doce caranguejo de Dilocarcinus pagei cortada transversalmente. Célula epitelial fina; c: cutícula; d: desmossomo; e: meio externo; h: hemolinfa; js: junção septada; Barra m: mitocôndrio. de escala: 3 µm. Região da aba com muitas junções celulares e mitocôndrias arredondadas. Poucas evaginações apicais da membrana plasmática com alguns espaços subcuticulares.



Figura 3.10 Fotomicrografia eletrônica de transmissão de uma brânquia posterior de um caranguejo de água doce Dilocarcinus pagei cortada transversalmente ao eixo dos vasos. Célula epitelial fina; c: cutícula; d: desmossomo; e: meio externo; h: hemolinfa; js: junção septada; jt: junção "tight"; lb: lâmina basal; mj: membranas justapostas. Barra de escala: 1 µm. Notar a reduzida espessura da camada celular, a ausência de mitocôndrias e a existência de complexos juncionais. Notar a interessante disposição da cutícula em estratos paralelos.



Figura 3.11 Fotomicrografia eletrônica de transmissão de uma brânguia posterior do caranguejo de água doce Dilocarcinus pagei. Célula epitelial espessa; cutícula; e: meio externo; dm: dobras da membrana; ea: evaginações apicais; h: hemolinfa; m: mitocôndrio; n: núcleo celular. Barra de escala: 8 µm. Notar a região apical com as inúmeras evaginações apicais da membrana plasmática, com formato de tufos, e as miocôndrias adjacentes a essa região. Notar também as dobras da membrana da região em contato com a hemolinfa. Tais dobras se extendem até a região apical, alcançando região а subcuticular. Observar o núcleo celular constituído quase totalmente de eucromatina.



Figura 3.12 Fotomicrografia eletrônica de transmissão de uma brânquia posterior do caranguejo de água doce Dilocarcinus pagei cortada transversalmente aos vasos. Célula epitelial espessa; c: cutícula; dm: dobras da membrana plasmática; e: meio externo; ea: evaginações apicais; fa: actina; feixes de h: hemolinfa; m: mitocôndrio; n: núcleo celular. Barra de escala: 7 µm. Notar as peculiares características como os feixes de actina que sustentam a região apical e evaginações da suas membrana plasmática.



Figura 3.13 Fotomicrografia eletrônica de transmissão de uma brânquia posterior do caranguejo de água doce Dilocarcinus pagei cortada transversalmente aos vasos. Célula epitelial espessa; c: cutícula; d: desmossomo; dm: dobras da membrana e: meio externo; ea: evaginações apicais; js: junção septada; m: mitocôndria. Barra de escala: 4 µm. Notar as estruturas de adesão e oclusão que separam o meio externo da hemolinfa (não mostrada).



Figura 3.14 Fotomicrografia eletrônica de transmissão de uma célula do lado fino de uma brânquia posterior de D. pagei, processada para visualizar ultracitoquimicamente os sítios de de acúmulo eletrondenso uma atividade p-NPPásica de uma Na<sup>+</sup>/ $K^+$ -ATPase (setas) Orientação do corte: ortogonal ao eixo central onde passam os vasos eferente/aferente. m: mitocôndrio; h: hemolinfa; c: cutícula. Barra de escala: 3 µm. Notar que a fixação do epitélio é menos eficiente nesta micrografia, procedimento este necessário para revelar os depósitos de reação ultracioquímica.

Figura 3.15 Fotomicrografia eletrônica de transmissão de uma célula do lado espesso de uma brânquia posterior de D. pagei, processada para visualizar ultracitoquimicamente os sítios de acúmulo eletrondenso de uma atividade p-NPPásica de uma Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase (setas) Orientação do corte: ortogonal ao eixo central onde passam os vasos eferente/aferente. h: hemolinfa; lb: lâmina basal; b: dobras da membrana basal. Barra de escala: 2 µm. Notar que a fixação do epitélio é menos eficiente nesta procedimento micrografia, este necessário para revelar os depósitos de reação ultracioquímica.



Figura 3.16 Fotomicrografia eletrônica de transmissão de uma célula do lado espesso de uma brânquia posterior de D. pagei, processada para visualizar ultracitoquimicamente os sítios de acúmulo eletrondenso de uma atividade p-NPPásica de uma Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase (setas) Orientação do corte: ortogonal ao eixo central onde passam os vasos eferente/aferente. h: hemolinfa; lb: lâmina basal; b: dobras da membrana. Barra de escala: 2 µm. Notar que a fixação do epitélio é menos eficiente nesta micrografia, procedimento este necessário para revelar os depósitos de reação ultracitoquímica.

CAPÍTULO 4. DISCUSSÃO INTEGRADA

# CAPÍTULO 4. DISCUSSÃO INTEGRADA

O objetivo geral desta pesquisa científica foi descrever a biologia comparada do transporte iônico transepitelial que ocorre em um epitélio ionotransportador de crustáceos: as brânquias.

A capacidade desses crustáceos de sobreviverem em ambientes com diferentes concentrações iônicas, comprovadas por meio da observação comportamental e da experimentação fisiológica (Freire et al., 2003) indica notável capacidade osmorregulatória. As células epiteliais de brânguias nos crustáceos controlam os movimentos de cátiosn e ânions entre a hemolinfa e o meio ambiente, e atuando nesse sentido, ajudam a regular as atividades biológicas tais como a osmorregulação e a muda. Os métodos empregados recentemente de análise da eletrofisiologia e da ultraestrutura auxiliam a esclarecer o papel de vários mecanismos celulares e moleculares na fisiologia animal. Assim, um número cada vez maior de processos biológicos será compreendido e a sua influência na sobrevivência do animal passará a ser entendida através do estudo das características e funções destas camadas celulares epiteliais. Nos próximos anos, uma combinação poderosa entre a fisiologia celular e a biologia molecular irá aumentar o conhecimento da natureza regulatória existente nestes epitélios. Este conhecimento definirá os efeitos desses eventos regulatórios na biologia dos animais em estudo.

As manipulações com células epitelias das brânquias de crustáceos mostrado nesta obra tenta elucidar a associação fisiológica e molecular entre processos de transporte de Na<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Cl<sup>-</sup> e H<sup>+</sup> que definem a capacidade osmorregulatória da espécie de camarão palemonídeo estudada. Estas moléculas transportadoras, de acordo com os resultados mostrados podem ser divididas entre transportadores apicais e basais/basolaterais, que atuam de modo sinergético e cumulativo;

entretanto, para o caso do transporte de Na<sup>+</sup> e Cl<sup>-</sup>, tal sinergia não implica em acoplamento de transporte, ou seja, a natureza bioquímica de um transportador se mostra independente do outro. Porém, no caso do transporte do Ca<sup>2+</sup>, o acoplamento do transporte com o Na<sup>+</sup> foi demonstrado pela primeira vez no presente trabalho.

O meio exato através da qual o cálcio penetra na célula epitelial da brânquia do camarão ainda é dúbio. Poderia ser através de canais de cálcio de tipo L ou por trocadores Ca<sup>2+</sup>/Na<sup>+</sup> (ou H<sup>+</sup>). O que os experimentos demonstraram é que poderiam ser os dois mecanismos, fortemente influenciados pelo Na<sup>+</sup> (Kirschner, 2004).

Aparentemente, o que vale para os mecanismos de transporte iônico transepitelial estudados aqui, é que a evolução caminhou no sentido de selecionar nos crustáceos alternativas moleculares para um mesmo fim biológico. A função do epitélio, num contexto fisiológico, é de manter certa independência em relação aos mecanismos de movimento de cada íon, e ao mesmo tempo possibilitar que cada um trabalhe, quando possível, de modo sinergético em relação ao outro. É possível observar tal fundamento quando observamos a natureza dos transportadores de cátions (por exemplo, o Na<sup>+</sup> e o Ca<sup>2+</sup>) e a do ânion (Cl<sup>-</sup>). Fisicamente, estes dois grandes grupos se comportam de maneira independente, mas a junção fisiológica destes possibilita a captura de NaCl contra elevados gradientes iônicos na água doce.

Os mecanismos pelas quais os crustáceos sentem as mudanças na osmolalidade interna e externa e partir daí transmitem os sinais para o sistema neuroendócrino ainda não estão bem entendidos. O que se conhece até agora que extratos dos pedúnculos ópticos têm a capacidade de influenciar as respostas osmorregulatórias (Savage e Robinson, 1983; Eckhardt *et al.*, 1995; Santos e McNamara, 1996) ativando uma sinalização intracelular que envolve a intermediação pelo AMP cíclico (Biachini e Gilles, 1990; Riestenpatt *et al.*, 1994). Mas quais seriam

os principais alvos desta regulação? McNamara e Torres (1999) demonstraram que existe uma regulação na adaptação fisiológica de uma espécie de camarão palemonídeo de água doce que inclui uma adaptação estrutural das células do epitélio branquial que acompanha a adaptação fisiológica às salinidades elevadas. Portanto, o estudo da estrutura e ultraestrutura das células epiteliais branquiais é fundamental para compreender o palco na quais os atores (os transportadores iônicos) irão atuar.

O entendimento deste palco, não é necessariamente, anterior ao estudo da fisiologia. Os experimentos das características eletrofisiológicas branquiais do caranguejo de água doce utilizado nesta obra são anteriores à descrição ultrestrutural. As observações fisiológicas, neste caso, indicaram a direção na qual poderia se tomar para um entendimento mais completo da natureza dos mecanismos de osmorregulação que permitem a esta espécie sobreviver em um meio de reduzida concentração de sal. Novamente, o desacoplamento molecular entre os mecanismos de transporte de cátios e ânions e, concomitantemente, a possibilidade de atuarem de modo sinergético levou à necessidade de se estabelecer as bases estruturais do processo.

O paralelo entre as bases ultraestrutural e fisiológica é de extrema relevância. Contudo, não se deve encarar a ultraestrutura como uma simples confirmação dos resultados eletrofisiológicos. Além disso, é necessário entender como estas duas realidades se refletem na biologia do caranguejo. A existência de duas "baterias" de captação de íons, separadas como unidades distintas na mesma "planta industrial" é de relevância muito maior do que se pode imaginar.

Tal assimetria e sinergismo são modelos de engenharia de processos que, originado ao acaso, foi selecionado de modo a auxiliar que tal espécie de crustáceo

habite o sistema fluvial da América do Sul, alastrando-se de modo eficaz desde a Amazônia até o sul do continente. Parece que o arranjo é tão eficaz quanto ao arranjo visto nos camarões palemonídeos (Freire e McNamara, 1995; McNamara e Lima, 1997, Torres, 2000) na quais os processos de captura de cátios e íons não estão assimetricamente separados no contexto epitelial, mas parecem estar nitidamente individualizados no contexto molecular.

A existência destes dois arranjos epiteliais branquiais, de camarões palemonídeos e caranguejos tricodactilídeos, apontam para uma solução – capturar NaCl da água doce e impedir a entrada de excesso de água através da barreira epitelial branquial. A presente obra científica mostra duas abordagens complementares para o entendimento do transporte iônico transepitelial – fisiológica em camarões palemonídeos e estrutural e caranguejos tricodactilídeos, já que as abordagens estruturais e fisiológicas, respectivamente, já estão descritas na literatura. Desse modo, a elucidação destes aspectos da biologia da osmorregulação permite a montagem de um valioso panorama acerca dos mecanismos pertinentes que proporcionaram a invasão da água doce.

O que pode se estabelecer a partir de agora é que a água doce selecionou características celulares branquiais que incluem a amplificação de áreas apicais de membrana plasmática e grande amplificação de algum sistema basal, basolateral ou septal de dobras de membrana, associados com inúmeras mitocôndrias. Estas bombas mitocondriais são estruturas fundamentais para captura iônica e podem ser visualizadas, com devidas peculiaridades, em brânquias de camarões palemonídeos (Torres, 2000) e no lado espesso de brânquias posteriores de caranguejos tricodactilídeos (esta obra). Nestas bombas mitocondriais, a captura de Na<sup>+</sup> é um complexo processo que parece envolver proteínas transmembranais que permitem a
passagem seletiva de Na<sup>+</sup>. Surpreendentemente, o transporte de Na<sup>+</sup> parece responder ao transporte de específico de Ca<sup>2+</sup>, uma proposta nova que pode ter implicações de cunho biológico e biomédico. Outra proposta que esta obra corrobora é a capacidade do epitélio branquial separar em células diferentes as funções de transporte de Na<sup>+</sup> do transporte de Cl<sup>-</sup>. Tal separação celular dos íons transportados transepitelialmente é mais comum em epitélios mais derivados, como o do rim de mamíferos (Randall *et al.*, 1997).

Em todos os processos, a captura iônica dependerá da existência de ATPases transmembranais que estabelecem potenciais eletroquímicos necessários para a captura iônica. Pela primeira vez em crustáceos que não são caranguejos, e que, portanto, possuem arranjo epitelial diferente, se verificou o funcionamento de uma V(H<sup>+</sup>)-ATPase que interfere no transporte de Cl<sup>-</sup> sensível à acetazolamida e que não interfere com o transporte de Na<sup>+</sup>, dependente de uma Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase, apesar de sua ubiquidade. Assim, alguns processos moleculares gerais podem se tornar únicos dependendo do arranjo estrutural. Enquanto que em caranguejos tricodactilídeos como *D. pagei* esta capura desacoplada de Na<sup>+</sup> e Cl<sup>-</sup> ocorre em lados diferentes em brânquias posteriores, com células estruturalmente distintas, em camarões palemonídeos esta divisão não é verificada nem entre brânquias e nem em seu interior. São processos que utilizam as mesmas proteínas separadas espacialmente.

Alguns fenômenos deverão ainda ser investigados para uma melhor compreensão da relevância dos achados da presente obra. Aspectos moleculares e de informação genética sobre tais transportadores deverão ser investigados com o intuito de se estabeleceer relações mais precisas entre os dois sistemas branquiais investigados. Especificamente, a completa elucidação das características bioquímicas das diversas membranas celulares branquiais em *D. pagei*, e o aprofundamento do

107

estudo eletrofisiológico de brânquias de *M. rosenbergii* auxiliará na montagem de um robusto panorama de transporte iônico transepitelial comparado.

## ABSTRACT

The freshwater crustaceans confronted with a high gradient of NaCl between the blood and the external media tend to lose salt and to gain water through the corporal surfaces. Its osmorregulatory organs, such as the gills and the antennal glands, are responsible for they maintain salt and water homeostasis against that elevated gradient. For that they capture and reabsorb NaCl compensating the difusive losses of salt. That ability was fundamental for the invasion of the freshwater by the palemoníds shrimps. The aim of this work was to investigate the compartive biology of the transepithelial ionic transport in the gills and antennal glands of shrimps and crabs.

In the diadramous freshwater shrimp *Macrobrachium rosenbergii*, the posterior gills were perfused with several salines for eletrophysiologic experimentation. The manipulations with ions replacement and addition of some ionic transport inhibitors in the perfused salines, symmetrical on the external and internal sides of the epithelium, demonstrated that the epithelium produces a voltage that can include the active absorption (sensitive to the metabolic inhibitor NaCN) of Na<sup>+</sup>, that probably occurs through a apical channel of Na<sup>+</sup> or a Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger sensitive to the amiloride, and it is dependent of the activity of a Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase. A small voltage due to the capture of Cl<sup>-</sup> was also measured, and it was shown sensitive to the acetazolamide, an inhibitor of the carbonic anhidrase. This voltage was also sensitive to the inhibitor of a V(H<sup>+</sup>)-ATPase, concanamicine, showing that this protons pump also plays a role in the transepithelial ionic transport.

The results corroborate a model similar of capture of dependent Na<sup>+</sup> of apical channels of sodium in series with a Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase proposed previously by this laboratory. The electrochemical gradient produced by the activity of that ATPase allows the capture of Na<sup>+</sup> in the freshwater. The electric coupling between the pillar cells and the gill septal cells allows the passage of Na<sup>+</sup> along the capture route to the haemolymph.

Analyses of the anterior and posterior gills of the freshwater crab *Dilocarcinus pagei* were also done in the intend to reveal the ultrastructure of the gill epithelium and to locate the *p*-NPPasic activity of a Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase. The experiments involving ultrastructure of the gills of the freshwater crab *Dilocarcinus pagei* showed, from an ultrastructural level, a differentiation among the two sides of the gill lamela in the

109

posterior gills, where a side distal presents characteristics of an ionotransporting epithelium, more developed than the proximal side, in spite of the two sides show ultracitochemical location for  $Na^+/K^+$ -ATPase.

## LITERATURA CITADA

- Abernethy, D R, Schwartz J B, 1999. Drug therapy: Calcium-antagonists drugs. *New England Journal of Medicine*, 341(19): 1447-1457.
- Armstrong D, Strange K, Crowe J, Knight A, Simmons M, 1981. High salinity acclimation by the prawn *Macrobrachium rosenbergii*: uptake of exogenous ammonia and changes in endogenous nitrogen compounds. *Biological Bulletin Marine Biological Lab Woods Hole*, 106: 349-365.
- Barra J A, Pequéux A, Humbert W, 1983. A morphological study on gills of a crab aclimated to freswater. *Tissue Cell*, 15: 583-596.
- Bianchini A, Gilles R, 1990. Cyclic AMP as a Modulator of the NaCl Transport in Gills of the Euryhaline Chinese Crab Eriocheir Sinensis. *Marine Biology*, Alemanha, v. 104, p. 191-195.
- Brown D, Gluck S, Hartwig J, 1987. Structure of the novel membrane coating material in proton-secreting epithelial cells and identification as an H<sup>+</sup>-ATPase. *The Journal of Cell Biology*, 105: 1637-1648.
- Castilho P C, Martins I A, Bianchini A, 2001. Gill Na+,K+-ATPase and osmoregulation in the estuarine crab, Chasmagnathus granulata Dana, 1851 (Decapoda-Grapsidae). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, Amsterdan, v. 256, n. 2, p. 215-227.
- Cioffi M, 1984. Comparative ultrastructure of arthropod transporting epithelia. *American Zoologist*, 24: 139-156.
- Compere P, Wanson S, Pequéux A, Gilles R, Goffinet G, 1989. Ultrastructural changes of the green crab *Carcinus maenas* in relation to the external salinity. *Tissue & Cell*. 21(2): 299-318.
- Copeland D E, 1968. Fine structure of salt and water uptake in the land crab *Geocarcinus lateralis. American Zoologist,* 8: 417-432.
- Croghan P C, 1976. Ionic and osmotic regulation of aquatic animals. Em Bligh J, Cloudsley-Thompson J, MacDonald A (eds.): *Environmental Physiology of Animals*, John-Wiley-Halstead Press, New York, pp. 59-93.
- Denne L B, 1968. Some aspects of osmotic and ionic regulation in the prawns *Macrobrachium australiensis* (Holthuis) and *M. equidens* (Dana). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 26: 17-30.

- Drews G, Graszynski K, 1987. The transepithelial potential difference in the gills of the fiddler crab, *Uca tangeri*: influence of some inhibitors. *Journal of Comparative Physiology (B)*: 345-353.
- Eckhardt E, Pierrot C, Thuet P, Van Herp F, Charmantier-Daures M, Trilles J-P, Charmantier G, 1995. Stimulation of osmoregulating processes in the perfused gill of the crab *Pachygrapsus marmoratus* (Crustaces, Decapoda) by a sinus gland peptide. *General and Comparative Endocrinology*, 99: 169-177.
- Ehrenfeld J, Garcia-Romeu F, Harvey B J, 1985. Electrogenic active proton pump in *Rana sculenta* skin and its role in sodium ion transport. *Journal of Physiology*, 359: 331-355.
- Felgenhauer B E, Abele L G. 1983. Phylogenetic relationships among shrimp-like decapods. Em Schram F R (ed.): *Crustacean Phylogeny. Crustaceans Issues*, vol.1. Rotterdam, Netherland: Balkema, pp. 291-311.
- Fenwick J C, Bonga S E, Flik G, 1999. In vivo bafilomycin-sensitive Na<sup>+</sup> uptake in young freshwater fish. *The Journal of Experimental Biology*, 202: 3659-3666.
- Finol H J, Croghan P C, 1983. Ultrastructure of the branchial epithelium of an amphibious brackish-water crab. *Tissue Cell*, 15: 63-75.
- Freire C A, McNamara J C, 1995. Fine structure of the gills of then fresh-water shrimp *Macrobrachium olfersii* (Decapoda): effect of acclimation to a high salinity medium and evidence for involvment of the lamellar septum in ion uptake. *Journal of Crustacean Biology*, 15(1): 103-116.
- Funge-Smith S J, Taylor A C, Whitley J, Brown J H, 1995. Osmotic and ionic regulation in the giant Malaysian Fresh water prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (de Man), with special reference to strontium and bromine. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 110A: 357-365.
- Furriel R P, McNamara J C, Leone F A, 2000. Characterization of (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase in gill microsomes of the freshwater shrimp *Macrobrachium olfersii*. *Comparative Biochemistry and Physiology* part B, 126: 303-315.
- Garty H, Benos D J, 1988. Characteristics and regulatory mechanisms of the amiloride-blockable Na<sup>+</sup> Channel. *Physiological Revews*, 68(2): 309-373.
- Goodman, S. H. and M. J. Cavey. 1990. Organization of a phyllobranchiate gill from the green shore crab *Carcinus maenas* (Crustacea, Decapoda). Cell Tissue Res. 260:495-505.

- Kappl M, Nagel G, Hartung K, 2001. Voltage and Ca<sup>2+</sup> dependence of pre-stady-state currents of the Na-Ca exchanger generated by Ca<sup>2+</sup> concentrations jumps. *Biophysical Journal*, 81: 2628-2638.
- Kamemoto F I, Tullis R E, 1972. Hydromineral regulation in decapod Crustacea. *General and Comparative Endocrinology,* Supplement 3: 299-307.
- Kirkpatrick K, Jones M B, 1985. Salinity tolerance and osmoregulation of a prawn, *Palaemon affinis* Milne Edwards (Caridea: Palaemonidae) *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 93: 61-70
- Kirschner L B, 2002. Sodium-proton exchange in crayfish. *Biochimica et Biophysica Acta* 1566: 67-71.
- Kirschner L B, 2004. The mechanism of sodium chloride uptake in hyperregulating aquatic animals. *Journal of Experimental Biology*, 207: 1439-1452.
- Knowlton R E, Kirby D F, 1984. Salinity tolerance and sodium balance in the prawn Palaemonetes pugio Holthuis, in relation to other Palaemonetes spp. Comparative Biochemistry and Physiology, 77(A): 425-430.
- Knowlton R F, Schoen R, 1984. Salinity tolerance and sodium balance in the prawn *Palaemonetes vulgaris* (Say) compared with *P. pugio. Comparative Biochemistry and Physiology*, 79 (A) No 4: 519-524.
- Krogh A, 1937. Osmotic regulation in the frog (*R. sculenta*) by active absorption of chloride ions. *Skand. Arch. Physiol.*, 71:60-73.
- Krogh A, 1938. The active absorption of ions in some freshwater animals. *Z. vergl. Physiol.*, 25:335-350.
- Künker W, 1988. Elektrophysiologische untersuchungen zum ionentransport über das kiemenepithel der wollhandkrabbe *Eriocheir sinensis*. Trabalho de diplomação, Freie Üniversität Berlin, Alemanha, 80 p.
- Lima A G, McNamara J C, Terra W R, 1997. Regulation of hemolymph osmolytes and gill Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase activities during acclimation to saline media in the freshwater shrimp *Macrobrachium olfersii* (Wiegmann, 1836) (Decapoda, Palaemonidae). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 215: 81-91.
- Lingrell J B, Kuntzweiller T, 1994. Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase. *Journal of Biological Chemistry,* 269 (31): 19659-19662.
- Luquet C, Pellerano G, Rosa G, 1997. Salinitry-induced changes in the fine structure of the gills of the semioterrestrial estuarian crab, *Uca uruguayensis* (Nobili, 1901) (Decapoda, Ocypodidae). *Tissue & Cell*, 29 (4): 495-501.

- Luquet C M, Postel U, Halperin J, Urcola M R, Marques R, Siebers D, 2002. Transepithelial potential difference and Na<sup>+</sup> flux in isolated perfused gills of the crab *Chasmagnathus granulatus* (Grapsidae) acclimated to hyper- and hyposalinity. *The Journal of Experimental Biology*, 205: 71-77.
- Maina J N, 1990. The morphology of the gills of the freshwater African crab *Potamon niloticus* (Crustacea: Brachiura: Potamonidae): A scanning and transmission electron microscopic study. *Journal of Zoology*, 221: 499-515.
- Mantel L H, Farmer L L, 1983. Osmotic and ionic regulation. Em Bliss D E (ed.): The Biology of Crustacea, Volume 5: Internal Anatomy and Physiological Regulation, Academic Press, New York, pp. 53-159.
- Martinez C B R, Harris R R, Santos M C F,1998. Transepithelial potential and sodium fluxes in isolated perfused gills of the mangrive crab *Ucides cordatus*. *Comparative Biochemistry and Physiology* Part A: 120: 227-236.
- Mayahara H, Fujimoto K, Ando T, Ogawa K, 1980. A new one-step method for the cytochemical localization of ouabain-sensitive potassium-dependent p-nitrophenilphosphatase activity. *Histochemistry*, 67: 125-138.
- McNamara J C, Lima A G, 1997. The route of ion and water movements across the gill epithelium of the freshwater shrimp *Macrobrachium olfersii* (Decapoda, Palaemonidae): evidence from ultrastructural changes induced by acclimation to saline media. *Biological Bulletin*, 192: 321-331.
- McNamara J C, Torres A H, 1999. Ultracytochemical location of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase activity and effect of high salinity acclimation in gill and renal epithelia of the freshwater shrimp *Macrobrachium olfersii* (Crustacea, Decapoda). *Journal of Experimental Zoology*, 284: 617-628.
- McNamara J C, Ribeiro M R, 2000. The calcium dependence of pigment translocation in freshwater shrimp red ovarian chromatophores. *Biological Bulletin*, 198(3): 357-366.
- Nelson N, Harvey W, 1999. Vacuolar and plasma membrane Proton-Adenosine Triphosphatases. *Physiological Reviews,* vol. 79 (2): 361-385.
- Onken H, Graszynski K, 1989. Active Cl<sup>-</sup> absorption by the Chinese crab (*Eriocheir sinensis*) gill epithelium measured by transepithelial potentioal difference. *Journal of Comparative Physiology*, 199(B): 21-28.
- Onken H, Graszynski K, Zeiske W, 1991. Na<sup>+</sup>-independent electrogenic Cl<sup>-</sup> uptake across the posterior gills of the Chinese crab (*Eriocheir sinensis*): voltage-clamp

and microeletrodes studies. *Journal of Comparative Physiology*, 161(B): 293-301.

- Onken H, Siebers D, 1992. Voltage-clamp measurements on single split lamellae of posterior gills of the shore crab *Carcinus maenas*. *Marine Biology*, 114: 385-390.
- Onken H, Putzenlechner M, 1995. A V-ATPase drives active, eletrogenic and Na<sup>+</sup>independent Cl<sup>-</sup> absorption across the gills of *Eriocheir sinensis*. *Journal of Experimental Biology*, 198: 767-774.
- Onken H, 1996. Active and electrogenic absorption of Na<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> across posterior gills of the Chinese crab *Eriocheir sinensis*: influence of short-term osmotic variations. *Journal of Experimental Biology*, 199: 902-910.
- Onken H, 1999. Active NaCl absorption across split lamellae of posterior gills of Chinese crabs (*Eriocheir sinensis*) adapted to different salinities. *Comparative Biochemistry and Physiology* 123(A): 377-384.
- Onken H, McNamara J C., 2001. Hyperosmoregulation in the red freshwater crab *Dilocarcinus pagei* (Brachyura, Trichodactylidae): structural and functional asymmetries of the posterior gills. *Journal of Experimental Biology*, 205:167-175.
- Onken H, Tresguerres M, Luquet C, 2003. Active NaCl absorption across posterior gills of hyperosmoregulating *Chasmagnathus granulatus*. *Journal of Experimental Biology*, 206: 1017-1023.
- Patuzzi R, 1998. The Goldman-Hodgkin-Katz equation and graphical 'load-line' analysis if ionic flow through outer hair cells. *Hearing research*, 125: 71-97.
- Péqueux A, 1995. Osmotic regulation in crustacea. *Journal of Crustacean Biology*, 15(1): 1-47.
- Prosser C L, 1973. Water: Osmotic balance, hormonal regulation, inorganic ions. Em Prosser C L (ed.) *Comparative Animal Physiology*, pp.1-110. Saunders, Philadelphia.
- Proverbio T, Zanders I, Marín R, Rodríguez J, Proverbio F, 1990. Effects of the Na<sup>+</sup> and/or K<sup>+</sup> on the Mg<sup>2+</sup>-dependent ATPase activities in shrimp (*Macrobrachium amazonicum*) gill homogenates. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 97B (2): 383-390.
- Randall D, Burggren W, French K, 1997. Ionic and Osmotic Balance. Em *Eckert animal physiology: mechanisms and adaptations, 4<sup>th</sup> edition.,* W H Freeman and Company, New York. pp. 571-626.

- Reinolds E S, 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. *Journal of Cell Biology*, 17: 208-212.
- Riestenpatt S, Zeiske W, Onken H, 1994. Cyclic AMP stimulation of eletrogenic uptake of Na<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> across the gill epithelium of the chinese crab *Eriocheir sinensis*. *Journal of Experimental Biology*, 188: 159-174.
- Sarver R G, Flynn M A, Holliday C W, 1994. Renal Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase and osmoregulation in the crayfish, *Procambarus clarkii*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 107A (2): 349-356.
- Skou J C, 1965. Enzimatic basis for active transport of Na and K across cell membranes. *Physiological Review*, 45: 596-617.
- Savage J P, Robinson G D, 1983. Inducement of increased gill Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase activity by a hemolymph factor in hyperosmoregulating *Callinectes sapidus*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 87(A):65-69.
- Spencer A M, Fielding A H, Kamemoto F I, 1979. The relationship between gill Na,K-ATPase activity and osmoregulatory capacity in various crabs. *Physiological Zoology*, 52(1): 1-10.
- Stern S, Borut A, Cohen D, 1984. Characterization of Na-K ATPase from the gills of the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* (de Man). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 79 B: 47-50.
- Taylor H H, Taylor E W, 1992. Gills and lungs: the exchange of gases and ions. Em Harrison W F, Humes A G (eds.): *Microscopic Anatomy of Invertebrates, vol. 10. Decapod Crustacea*. Wiley-Liss, Inc., pp. 203-293.
- Torres A H, 2000. A invasão da água doce pelos camarões palemonídeos (Crustacea, Decapoda): o papel das brânquias e dos rins nos mecanismos de regulação osmótica e iônica. Dissertação de Mestrado, FFCLRP/USP, 97 pg.
- Towle D W, Kays W, 1986. Localization of Na<sup>+</sup> + K<sup>+</sup> -ATPase in gill epithelium of two osmoregulating crabs, *Callinectes sapidus* and *Carcinus maenas. Journal of Experimental Zoology*, 239: 311-318.
- Towle D W, Weihrauch D, 2001. Osmoregulation by gills of euryhaline crabs: Molecular analysis of transporters. *American Zoologist*, Vol. 37, No. 6: 575-584.
- Weibel E R, Kistler G S, Scherle W F, 1966. Practical stereological methods for morphometric cytology. *The Journal of Cell Biology*, 30: 23-43.

- Wieczorek H, 1992. The insect plasmam membrane proton pum energizing secondary active transport: molecular analysis of electrogenic potassium transport in the tobacco hornworm midgut. *Journal of Experimental Biology*, 172: 335-343.
- Wheatly M G, 1999. Calcium homeostasis in crustacea: the evolving role of branchial, renal, digestive and hypodermal epithelia. *Journal of Experimental Zoology*, 283: 620-640.
- Wheatly M G, Henry R P, 1992. Extracelular and intracellular acid-base regulation in crustaceans. *Journal of Experimental Zoology*, 263: 127-142.
- Zanoto F P, Wheatly M G, 2003. Calcium balance in crustaceans: nutritional aspects of physiological regulation. *Comparative Biochemistry and Physiology* Part A: 133: 645-660.
- Zare S, Greenway P, 1998. The effect of moulting and sodium depletion on sodium transporte and the activities of Na,K-ATPAse, and V-ATPase in the freshwater crayfish *Cherax descrutor* (Crustacea:Parastacidae). *Comparative Biochemestry and Physiology*, 119A(1): 739-745.

## Livros Grátis

(<u>http://www.livrosgratis.com.br</u>)

Milhares de Livros para Download:

Baixar livros de Administração Baixar livros de Agronomia Baixar livros de Arquitetura Baixar livros de Artes Baixar livros de Astronomia Baixar livros de Biologia Geral Baixar livros de Ciência da Computação Baixar livros de Ciência da Informação Baixar livros de Ciência Política Baixar livros de Ciências da Saúde Baixar livros de Comunicação Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE Baixar livros de Defesa civil Baixar livros de Direito Baixar livros de Direitos humanos Baixar livros de Economia Baixar livros de Economia Doméstica Baixar livros de Educação Baixar livros de Educação - Trânsito Baixar livros de Educação Física Baixar livros de Engenharia Aeroespacial Baixar livros de Farmácia Baixar livros de Filosofia Baixar livros de Física Baixar livros de Geociências Baixar livros de Geografia Baixar livros de História Baixar livros de Línguas

Baixar livros de Literatura Baixar livros de Literatura de Cordel Baixar livros de Literatura Infantil Baixar livros de Matemática Baixar livros de Medicina Baixar livros de Medicina Veterinária Baixar livros de Meio Ambiente Baixar livros de Meteorologia Baixar Monografias e TCC Baixar livros Multidisciplinar Baixar livros de Música Baixar livros de Psicologia Baixar livros de Química Baixar livros de Saúde Coletiva Baixar livros de Servico Social Baixar livros de Sociologia Baixar livros de Teologia Baixar livros de Trabalho Baixar livros de Turismo