

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

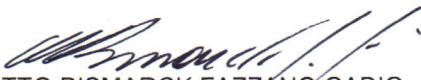
TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Influência do regime alimentar sobre o metabolismo, excreção e osmorregulação de jovens de Tubarão Bambu (*Chiloscyllium punctatum*) em diferentes salinidades.

AUTOR: RAFAEL SILVA DOS SANTOS

ORIENTADOR: OTTO BISMARCK FAZZANO GADIG

COORIENTADOR: RAFAEL MENDONÇA DUARTE

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em BIODIVERSIDADE AQUÁTICA, área: BIODIVERSIDADE pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. OTTO BISMARCK FAZZANO GADIG
Campus Litoral Paulista / UNESP - Instituto de Biociências - São Vicente/SP



Prof. Dr. DOMINGOS GARRONE NETO
Campus de Registro / UNESP



Profa. Dra. CAMILA DE MARTINEZ GASPAR MARTINS
Instituto de Ciências Biológicas / Universidade Federal do Rio Grande

São Vicente, 30 de janeiro de 2018

Influência do regime alimentar sobre o metabolismo, excreção e osmorregulação de jovens de Tubarão Bambu (*Chiloscyllium punctatum*) em diferentes salinidades.

RAFAEL SILVA DOS SANTOS

São Vicente/SP
2018

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“Júlio de Mesquita Filho”
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS CAMPUS DO LITORAL PAULISTA

Influência do regime alimentar sobre o metabolismo, excreção e osmorregulação de jovens de Tubarão Bambu (*Chiloscyllium punctatum*) em diferentes salinidades.

Rafael Silva dos Santos

Orientador: Otto Bismarck Fazzano Gadig

Co-orientador: Rafael Mendonça Duarte

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências - Campus do Litoral Paulista, UNESP, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Aquática

**São Vicente/SP
2018**

597.31 Santos, Rafael Silva dos
Si381 Influência do regime alimentar sobre o metabolismo, excreção e osmorregulação de jovens de tubarão bambu (*Chiloscyllium punctatum*) em diferentes salinidades. / Rafael Silva dos Santos. – São Vicente, 2018.
43 p.: il., gráfs.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Campus do Litoral Paulista - Instituto de Biociências.
Orientador: Otto Bismarck Fazzano Gadig
Co-orientador: Rafael Mendonça Duarte

1. Uréia. 2. Amônia. 3. Jejum 4. Consumo de oxigênio.
5. Coeficiente de nitrogênio. I. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca da UNESP
Instituto de Biociências - Campus do Litoral Paulista

Sumário

Introdução.....	10
Objetivos	15
Material e métodos.....	16
<i>Animais experimentais e aclimação</i>	<i>16</i>
<i>Procedimentos experimentais.....</i>	<i>16</i>
<i>Procedimentos analíticos e cálculos</i>	<i>18</i>
<i>Análise estatística</i>	<i>19</i>
Resultados	20
<i>Metabolismo e excreção de amônia e ureia</i>	<i>20</i>
<i>Parâmetros osmoregulatórios e bioquímicos plasmáticos.....</i>	<i>21</i>
Discussão	22
<i>Efeitos pós-prandiais sobre o metabolismo, excreção de nitrogênio e osmoregulação de C.</i> <i>punctatum em salinidade 32ppm</i>	<i>22</i>
<i>Influência da aclimação a salinidade reduzida sobre as respostas metabólicas e osmoregulatórias</i> <i>pós-prandiais de C. punctatum.....</i>	<i>27</i>
Conclusões.....	32
Referências bibliográficas.....	32

Lista de Tabelas e Figuras

Tabela 1..... 39

Figura 1 40

Figura 2 41

Figura 3 42

Figura 4..... 43

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao Laboratório de Pesquisa de Elasmobrânquios, por me receberem como parte da equipe e ao meu orientador Otto Bismarck, que por anos me estimulou a acreditar na possibilidade de realizar uma pós-graduação e por sua paciência em lidar com as cabacisses que fiz ao longo do desenvolvimento do trabalho.

Ao meu coorientador Rafael Duarte, que foi a peça chave para que eu pudesse ter a base segura e precisa do caminho que eu deveria traçar e que em nenhum momento hesitou em contribuir para todas as etapas e abraçou a idéia mesmo com todas as incertezas que tinham pelo caminho de forma técnica e muito profissional.

Aos professores Milton, Alessandra, Denis, Leandro, que gentilmente cederam seu material, seu tempo e seus laboratórios para a concretização desse trabalho.

A professora Helen Sadauskas por colaborar com as metodologias pertinentes no trabalho e por liberar o Rafa por diversos finais de semana para realizar os experimentos durante as longas e exaustivas madrugadas.

A aluna Gabriela Cabrera pelo empenho e dedicação no auxílio das análises das amostras e por sempre estar disposta a trabalhar pelo trabalho.

A toda equipe de estagiários do Acqua Mundo, que sempre com muito trabalho, esforço e dedicação proporcionaram a viabilidade e o sucesso reprodutivo dessa espécie no Aquário do Guarujá, e ao biólogo Paulo de Tarso por permitir a utilização dos animais e bem como fornecer todos os subsídios necessários para a manutenção dos animais.

Ao Médico Veterinário Doutor Gustavo Dutra do Aquário de Santos por ceder o espaço do seu laboratório para a triagem das amostras e por toda a contribuição com o seu conhecimento.

Aos amigos do Laboratório, Pri, Pitú, Tixa, Bini, Rodri, Cussi, Corega, Grazi e Centauro, por todo o apoio nas horas boas e tensas.

A toda a equipe da secretária em especial a Hana que sempre esteve disposta a resolução dos problemas.

A amiga que conheci durante o mestrado Ana Luchetta por dividir todas as burocracias e por estar sempre disposta a ajudar independente dos horários e lugares onde ela estava.

Agradeço em especial ao Níccolas, Giane e Jonatas, por sempre estarem comigo em todos os momentos bons e ruins ao longo do desenvolvimento do trabalho.

Agradeço a minha família em especial as minhas mães Lucia e Preta por sempre me estimularem a ser uma melhor pessoa e por todo o suporte dado no meu desenvolvimento pessoal e profissional.

RESUMO

Elasmobrânquios marinhos são reconhecidamente ureotélicos, ou seja, sintetizam, retêm e excretam preferencialmente ureia como produto do metabolismo do nitrogênio, mantendo os seus fluídos corpóreos iso-osmóticos, ou ligeiramente hiper-osmóticos, em relação ao meio externo. Assim, o alto requerimento por nitrogênio nesses animais, tanto para o crescimento quanto para a manutenção de sua estratégia ureosmótica, pode tornar os elasmobrânquios limitados pela disponibilidade de alimento. O presente estudo buscou avaliar o efeito do regime de alimentação e da aclimação a salinidade reduzida sobre respostas fisiológicas e bioquímicas relacionadas ao metabolismo e excreção de nitrogênio em jovens de tubarão bambu (*Chiloscyllium punctatum*). Para tanto, foram determinados as formas preferenciais de excreção de nitrogênio (amônia_N e ureia_N), consumo de oxigênio, coeficiente de nitrogênio, níveis plasmáticos de compostos nitrogenados (amônia e ureia), principais osmólitos (proteínas totais, $[Na^+]$, $[Cl^-]$; osmolaridade total) e glicose em jovens *C. punctatum* aclimatados em salinidade 32 e 20ppm, e mantidos sob regime regular de alimentação (2-3% da biomassa) e privação alimentar por 7 dias. Nossos resultados evidenciaram que a ureia é a principal excreta nitrogenada nos jovens de tubarão bambu mantidos em ambos os regimes de alimentação e em ambas as salinidades testadas. Após a alimentação os animais em 32ppm aumentam significativamente a excreção de nitrogênio na forma de amônia, efeito não observado nos animais mantidos à 20ppm. No entanto, nos animais aclimatados a salinidade reduzida houve um aumento quantitativo na excreção total de nitrogênio dos animais, particularmente nos jovens *C. punctatum* mantidos em jejum, como visto pelas taxas aumentadas de excreção de amônia e ureia. Tanto o regime de alimentação quanto a aclimação a baixa salinidade não influenciaram a taxa de consumo de oxigênio dos animais. O coeficiente de nitrogênio evidenciou que o metabolismo aeróbico dos jovens de tubarão bambu, em ambas as salinidades testadas, é altamente dependente da oxidação de proteínas e aminoácidos, tal como observado para outras espécies de elasmobrânquios. Nos animais em 32ppm foi observado um aumento do catabolismo de proteínas relacionados a estratégia de conservação de nitrogênio pelos animais, particularmente para síntese de amônia, enquanto em 20ppm foi observado um aumento do anabolismo associado a síntese proteica e de ureia pelos animais. A aclimação a salinidade reduzida promoveu a redução da osmolaridade e das concentrações de ureia e cloreto plasmático nos jovens de *C. punctatum*, sugerindo que esses animais apresentam a capacidade de regular a concentração desses osmólitos nos fluidos internos a fim de manterem seu equilíbrio osmótico com relação ao meio externo. Em conjunto nossos resultados indicam que em menores salinidades os jovens de *C. punctatum* são fortemente limitados pelo aporte de nitrogênio *via* alimentação para a manutenção de sua estratégia ureosmótica, e que longos períodos sob privação alimentar em salinidades baixas podem influenciar negativamente a capacidade osmorregulatória e a retenção de nitrogênio pelos animais.

Palavras-chave: Ureia, Amônia, Jejum, Consumo de oxigênio, Coeficiente de nitrogênio

ABSTRACT

Marine elasmobranchs are ureothelic organisms which synthesize, retain, and excrete preferentially urea as the end-product of nitrogen metabolism, maintaining their internal body fluids iso-osmotic or slightly hyperosmotic relative to the external marine environment. The high requirement for nitrogen in these animals for both growth and maintenance of their ureosmotic strategy, might make elasmobranchs limited by the availability of food. Thus, the present study aimed to evaluate the effect of feeding regime and acclimation to lowered salinity on physiological and biochemical responses associated to nitrogen metabolism and excretion in juvenile of brownbanded bamboo shark (*Chiloscyllium punctatum*). For this purpose, we determine the rates of waste excretion of the main nitrogen end-products (ammonia_N and urea_N), oxygen consumption, nitrogen quotient, and levels of nitrogen compounds (ammonia and urea), osmolality, major ions (Na^+ and Cl^-), total protein and glucose in plasma of juvenile *C. punctatum* acclimated to both 32 and 20ppm, and kept on regular feeding regime (2-3% of body weight) or fasting for 7 days. Our results showed that urea is the main nitrogen product excreted by brownbanded bamboo shark kept at both fasting and feeding regime, at both salinities tested. After feeding, sharks at 32ppm significantly increased ammonia excretion, an effect not seen in animals acclimated to 20ppm. However, at lower salinity, animals quantitatively increased the total nitrogen excretion, particularly fasted sharks, as seen by the increased ammonia and urea excretion rates in comparison with animals maintained at 32ppm. Oxygen consumption was not affected by either fasting or feeding regime at both salinities tested. The nitrogen coefficient showed that the aerobic metabolism of brownbanded bamboo shark acclimated to both 32 and 20ppm is highly dependent on the oxidation of proteins and amino acids, as already reported to other elasmobranchs species. At 32ppm, sharks displayed an increase in catabolism of proteins related to the strategy of nitrogen conservation, particularly related to ammonia synthesis, while an increase in anabolism associated with synthesis of both urea and protein was seen in animals acclimated to 20ppm. The acclimation to lowered salinity resulted in decreases in plasmatic osmolality, as well as in both urea and chloride levels of juveniles of *C. punctatum*, suggesting that these animals have the ability to regulate the concentration of these osmolytes in their internal fluids, in order to maintain their osmotic balance with the external marine environment. Overall, our results indicate that in lowered salinities the juveniles of brownbanded bamboo shark are strongly limited by the nitrogen acquired through feeding in order to maintain their ureosmotic strategy, and that fasting for prolonged periods at low salinities can negatively disturb their osmoregulatory homeostasis and affect the retention of nitrogen by the animals.

Key-words: Urea, Ammonia, Fasting, Oxygen consumption, Nitrogen quotient.

Introdução

Os elasmobrânquios (tubarões, raias e quimeras) são um grupo de peixes cartilaginosos essencialmente marinhos e que, de maneira geral, ocupam um elevado nível trófico nos oceanos, contribuindo para a manutenção saudável desse ecossistema. A grande maioria das espécies de elasmobrânquios são consideradas estenoalinas, estritamente marinhas ou de água doce, sendo que apenas cerca de 170 espécies (pertencentes a 34 famílias) são reconhecidamente eurialinas e habitam regiões marinhas costeiras ou estuários (Martin, 2005).

No ambiente marinho (~30-34% de salinidade), os elasmobrânquios mantêm os seus fluídos corpóreos iso-osmóticos, ou ligeiramente hiper-osmóticos, em relação ao meio externo, resultando em um ganho líquido de água pelos animais. Em outras palavras, os elasmobrânquios marinhos não necessitam ingerir ativamente água para manter o seu equilíbrio osmótico com o meio (Evans et al., 2005; Piermarini & Evans, 1998; Shuttleworth, 1988), evitando assim o custo energético associado a estratégia de ingestão ativa de água, com consequente ganho de sais por difusão, observada nos teleósteos marinhos (Evans, 2008; Evans et al., 2005; Marshall & Grosell, 2006). Nos elasmobrânquios marinhos, a entrada de água por osmose através das brânquias é rapidamente balanceada pelo aumento da excreção renal. Além disso, a tomada contínua de sais (como Na^+ e Cl^-) por difusão a partir do ambiente é compensado por mecanismos de secreção de Na^+ e Cl^- pela glândula retal, em particular, mas também pelos rins (Burger, 1965; Burger & Hess, 1960; Haywood, 1973; Piermarini & Evans, 2000).

A estratégia osmorregulatória apresentada pelos elasmobrânquios marinhos foi descrita inicialmente por Smith (1931) e, desde então, diversos autores têm evidenciado que esses animais retém no sangue grandes quantidades de produtos do metabolismo do nitrogênio como osmólitos, tais como ureia, óxido de trimetilamina (TMAO) e aminoácidos (Anderson et al., 2007; Evans et al., 2005; Hazon et al., 2003; Robertson, 1975; Wood et al., 2005). Assim, os elasmobrânquios marinhos são reconhecidamente ureotélicos, ou seja, sintetizam, retém e excretam preferencialmente ureia como produto do metabolismo do nitrogênio, enquanto a maioria das espécies de teleósteos marinhos (~30.000 espécies) são classificadas como amoniotélicas, produzindo amônia como principal excreta nitrogenada (Bucking, 2016; Wright, 1995; Wright & Wood, 2012). De maneira geral, os

elasmobrânquios marinhos sustentam altas concentrações de ureia (300-400 mM) e TMAO no sangue mantendo uma baixa permeabilidade do epitélio branquial a estes compostos (e.g. apenas 7% da permeabilidade a ureia encontrada nas brânquias de teleósteos marinhos), associada a mecanismos de reabsorção ativa de ureia nas brânquias (Marshall & Grosell, 2006; Wood, 2001). Além disso, esses animais apresentam baixas taxas de excreção desses produtos nitrogenados pelos rins, sendo que cerca de 90% da ureia e TMAO filtradas pelos néfrons são posteriormente reabsorvidas pelos túbulos renais (Janech et al., 2006; Marshall & Grosell, 2006).

Embora a estratégia ureosmótica apresentada pelos elasmobrânquios marinhos seja amplamente reconhecida como uma importante alternativa evolutiva para a adaptação ao ambiente marinho (Walsh & Mommsen, 2001), algumas limitações ao uso da uréia como osmólito têm sido levantadas por diferentes autores (Kajimura, 2004; Wood et al., 1995; Wood, 2001). De uma maneira geral, os elasmobrânquios necessitam de fontes regulares de nitrogênio, como os outros animais, para a síntese proteica e crescimento; mas também para a função crítica de osmoregulação (Anderson et al., 2007; Hazon et al., 2003; Wood et al., 1995). Dessa forma, dado o hábito alimentar essencialmente carnívoro, e a disponibilidade irregular de alimento, esses animais tendem a ser tornar “limitados” pela disponibilidade de nitrogênio na natureza (Kajimura et al., 2008, 2006; Wood & Giacomini, 2016). Além disso, a ureia exerce um efeito perturbador sobre a estrutura e função de proteínas e enzimas dos elasmobrânquios, sendo que diversos autores têm sugerido que a presença de metilaminas, como o TMAO, tendem a estabilizar o efeito deletério da ureia sobre essas moléculas (Cohen et al., 1958; Hazon et al., 2003). Ainda, a síntese hepática de ureia tem sido relacionada a um alto custo energético para os elasmobrânquios, onde para a produção de 1 mol de ureia são necessários 5 mol de ATP (Anderson, 2001). Por fim, diversos fatores intrínsecos (como a idade, tamanho, regime de alimentação e tempo de digestão) e extrínsecos (como a temperatura e a salinidade da água) aos organismos têm sido evidenciados como fortes reguladores do metabolismo e excreção de produtos nitrogenados pelos elasmobrânquios marinhos (Hazon et al., 2003; Kajimura et al., 2008; Wood et al., 1995; Wood, 2001; Wright, 1995).

Segundo Griffith (1991), o aparecimento da estratégia ureosmótica nos elasmobrânquios envolveu diferentes ajustes bioquímicos e fisiológicos ao longo da história

de vida dos animais, particularmente nos processos relacionados a síntese, tolerância e retenção de ureia pelos organismos. Nesse contexto, a síntese de ureia pelos elasmobrânquios ocorre em duas vias metabólicas principais: (i) o ciclo da ornitina-ureia (O-UC) e (ii) o catabolismo de purinas (adenina e guanina). Na espécie *Squalus acanthias* (Pacific spiny Dogfish), a maior parte da ureia sintetizada vem do ciclo O-UC (Schooler et al., 1966), sendo essa a principal via para síntese de ureia em elasmobrânquios, teleósteos ureogênicos (tais como *Opsanus beta* e *Oreochromis alcalicus grahami*) e vertebrados terrestres. No ciclo O-UC dos elasmobrânquios, o aminoácido glutamina é utilizado como substrato doador de nitrogênio, enquanto a enzima carbamoyl-fosfato sintase III (CPS III), presente nas mitocôndrias dos hepatócitos, catalisa a entrada do nitrogênio no ciclo. Além disso, a enzima glutamina sintase (GS) catalisa a síntese de glutamina, a partir da amônia e do glutamato, sendo considerada o passo regulatório central na síntese de ureia pelos elasmobrânquios (Anderson, 2001; Ballantyne, 2016; Bucking, 2016), e responsável pela manutenção dos baixos níveis de amônia plasmática usualmente observada nos elasmobrânquios marinhos (Wood et al., 2010; Wood et al., 2007). Diversos estudos têm evidenciado que a alimentação exerce um profundo efeito sobre metabolismo da ureia em elasmobrânquios marinhos (revisto por Wood et al., 2010). Por exemplo, em *S. acanthias* o aumento pós-prandial nos níveis plasmáticos de ureia, foi acompanhado de um acentuado aumento na atividade de enzimas do ciclo O-UC, como a CPS III, enquanto as taxas de excreção de ureia permaneceram inalteradas, mesmo após 48 h da ingestão de alimento (Kajimura et al., 2008, 2006; Wood et al., 2010). Além disso, em estudo realizado com *Raja erinacea*, a aclimação a baixas salinidades resultou na redução da taxa de excreção de ureia, e diminuiu drasticamente a atividade de enzimas do ciclo O-UC, como as arginases hepáticas, sugerindo que o controle na síntese e excreção de ureia são fundamentais para a espécie manter sua estratégia ureosmótica em água mais diluídas (Steele et al., 2005). Por outro lado, em mamíferos e peixes teleósteos ureotélicos, a amônia é o substrato doador de nitrogênio, e a enzima CPS I é responsável por iniciar o ciclo de síntese da ureia.

A produção endógena de amônia nos animais ocorre através do catabolismo de aminoácidos, por meio de dois mecanismos principais: (i) através da desaminação de aminoácidos, como o glutamato, pela ação de enzimas específicas, como a glutaminase e a glutamato desidrogenase (GDH), ou (ii) por meio da transaminação oxidativa de L-aminoácidos (como a alanina e o aspartato), produzindo glutamato e α -cetoácidos (Bucking,

2016; Ip & Chew, 2010). Para evitar os efeitos tóxicos do aumento dos níveis plasmáticos de amônia, particularmente após a ingestão e digestão de alimento, os teleósteos marinhos apresentam altas taxas de excreção branquial de amônia (Bucking, 2016; Ip & Chew, 2010), além de um aumento na atividade de enzimas do ciclo de detoxificação da amônia, como a GS, convertendo boa parte da amônia produzida em glutamina. Ao contrário do padrão observado para os teleósteos, os elasmobrânquios marinhos mantêm baixos níveis de amônia e glutamina no plasma mesmo após a ingestão e digestão de alimento com alto teor de proteínas (Wood, 2001). Em *S. acanthias*, o aumento dos níveis de amônia no sangue após a ingestão e digestão de alimento é regulada pelo aumento da atividade das enzimas do ciclo O-UC (principalmente a GS), e também da GDH, que consome amônia durante o ciclo. Esses dados indicam que nessa espécie o “excesso” de amônia produzida após a alimentação é rapidamente metabolizada, podendo ser direcionada para a síntese de ureia e formação de proteínas (Kajimura et al., 2008, 2006).

Diversos autores têm evidenciado que fatores ambientais, como a salinidade, exercem profundos efeitos sobre a regulação do metabolismo, excreção e osmoregulação de elasmobrânquios (Anderson et al., 2007; Ballantyne & Fraser, 2013; Wright & Wood, 2016). Assim, de acordo com os ajustes fisiológicos apresentados pelas espécies em função da salinidade ambiental, os elasmobrânquios podem ser classificados como: Estenoalinos marinhos tolerantes, que são as espécies que podem tolerar salinidades mais reduzidas, porém são osmorreguladores fracos, mantendo-se hiperosmóticos em salinidades muito reduzidas; Eurialinos migratórios, que são encontrados nos oceanos próximos a saídas de rios e permanecem saudáveis em baixas salinidades, mantendo-se isosmóticos ou levemente hiperosmóticos; Eurialinos de água doce, que são os animais que vivem e reproduzem em água doce, porém podem tolerar salinidades mais elevadas através da retenção dos osmólitos em detrimento do balanço osmótico; e Estenoalinos de água doce, que são os animais que vivem estritamente em água doce mas, em contraste aos outros grupos, apresentando baixos níveis de enzimas para síntese de uréia, e não possuem a capacidade de retenção ou reabsorção desse osmólito não se aclimatado a salinidades mais altas (Yancey, 2016).

Nas espécies de elasmobrânquios eurialinos, tais como no tubarão *Carcharhinus leucas* e na raia *Dasyatis sabina*, a redução da salinidade ambiental promove uma drástica diminuição das concentrações sanguíneas de ureia e TMAO, o que resulta na redução da

osmolaridade do plasma desses animais (Hazon et al., 2003; Piermarini & Evans, 1998; Pillans et al., 2005). Essa diminuição dos osmólitos nitrogenados nos elasmobrânquios eurialinos tem sido relacionada ao aumento concomitante nas taxas de filtração glomerular e no volume de urina produzida, associada a um aumento da taxa de excreção renal de ureia e, presumivelmente, TMAO (Marshall & Grosell, 2006). Além disso, esses animais apresentam uma diminuição na atividade secretora de Na^+ e Cl^- na glândula retal (Piermarini & Evans, 1998; Pillans et al., 2008), ao mesmo tempo que apresentam um aumento nas taxas de reabsorção de sais (principalmente Na^+ e Cl^-) pelos rins (Anderson et al., 2007; Marshall & Grosell, 2006; Wright & Wood, 2016). Assim, alguns autores têm sugerido que ajustes fisiológicos espécie-específicos são responsáveis por determinar o grau de eurialinidade dos elasmobrânquios, e que a perda da capacidade de retenção de ureia e TMAO no sangue, em conjunto com a capacidade de hiper-regular as concentrações plasmáticas de Na^+ e Cl^- , são fundamentais para a adaptação das espécies à ambientes mais diluídos (Ballantyne & Fraser, 2013; Hazon et al., 2003; Marshall & Grosell, 2006). A habilidade dos elasmobrânquios de viver em ambientes com diferentes gradientes de salinidade, requer alterações metabólicas associadas a regulação dos níveis corpóreos de diferentes solutos, principalmente controlando a taxa de processos metabólicos relacionados a síntese e retenção de uréia e as metilaminas.

Nesse contexto, o tubarão bambu é uma espécie considerada marinha, porém já foi descrita habitando ambientes com uma grande variação de salinidade, desde ambientes hipersalinos (36-41ppm) (Gutteridge et al., 2011; White & Potter, 2004), mas também em regiões estuarinas com salinidades baixas, de até 25ppm em eventos de maré cheia (Cramp et al., 2015). É uma espécie ovípara que habita a plataforma continental e águas costeiras do Pacífico indo-oeste exercendo um importante papel ecológico e biológico. O aquário do Guarujá mantém desde 2002 um tanque de exposição para essa espécie, e desde 2007, a partir dos primeiros eventos reprodutivos, foi criado um programa de reprodução para promover o acompanhamento da viabilidade e desenvolvimento dessa espécie em cativeiro. Com isso, aliado ao programa de educação ambiental, as atividades realizadas no aquário com essa espécie visam trabalhar com a educação não-formal e divulgação da importância biológica e ecológica de elasmobrânquios. Dessa forma, o estudo dos processos osmorregulatórios, bem como os de excreção e retenção de solutos aliados aos regimes de alimentação buscam estender e aprimorar os conhecimentos acerca do manejo e a manutenção de *C. punctatum* em cativeiro.

Assim, vemos que a regulação do metabolismo de nitrogênio tem sido estudada em apenas poucas espécies de elasmobrânquios marinhos, e virtualmente pouco se sabe sobre a influência de fatores como alimentação e salinidade, particularmente em conjunto, sobre esses processos na grande maioria das espécies desse grupo tão diverso. Desse modo, estudos avaliando respostas espécie-específicas do metabolismo e excreção de produtos nitrogenados por elasmobrânquios marinhos são fundamentais para o entendimento pleno dos ajustes fisiológicos relacionados ao aparecimento da estratégia ureosmótica nesses animais e no manejo desse grupo em ambiente cativo.

Objetivos

O objetivo geral do presente trabalho foi avaliar o efeito do regime de alimentação e da aclimação a baixa salinidade sobre respostas fisiológicas e bioquímicas relacionadas ao metabolismo e excreção de nitrogênio em jovens de tubarão bambu (*C. punctatum*). Para tanto, os objetivos específicos do trabalho foram:

- (i) Verificar a influência da alimentação sobre as formas preferenciais de excreção de nitrogênio (amônia_N e ureia_N), consumo de oxigênio e coeficiente de nitrogênio nos jovens de *C. punctatum* em salinidade 32ppm;
- (ii) Comparar os níveis plasmáticos de compostos nitrogenados (amônia e ureia), principais osmólitos (proteínas totais, $[Na^+]$, $[Cl^-]$; osmolaridade total) e glicose em jovens de *C. punctatum*, em regime regular de alimentação e em jejum, em salinidade 32ppm;
- (iii) Verificar o efeito da aclimação a salinidade reduzida (20ppm) sobre o metabolismo e excreção de nitrogênio em jovens de *C. punctatum*, mantidos sob regime regular de alimentação e em jejum;
- (iv) Avaliar a influência da aclimação a salinidade reduzida sobre parâmetros osmoregulatórios e bioquímicos plasmáticos em jovens de *C. punctatum*, mantidos sob regime regular de alimentação e em jejum.

Material e métodos

Animais experimentais e aclimação

Jovens de tubarão-bambu (*Chiloscyllium punctatum*) foram obtidos junto ao Aquário Acqua Mundo (Guarujá/SP), sendo estes oriundos de reproduções em cativeiro ocorridas no próprio aquário no período entre Janeiro e Abril de 2015 e 2016. A reprodução de exemplares de *C. punctatum* ocorre desde 2007 no Acqua Mundo, sendo que desde 2002, o mesmo conta com um tanque para a exibição dos indivíduos adultos da espécie. Após a postura, os ovos são identificados e transferidos para um sistema de suporte a vida, com 500 litros de água salgada e filtragem biológica tipo “dry wet”, “skimmer” e circulação de todo o volume de água a cada 30 minutos. A iluminação dispunha de um fotoperíodo de 10 hrs/dia, visando acompanhar melhor o seu desenvolvimento. Todos os procedimentos experimentais foram realizados nas dependências do Acqua Mundo, enquanto as análises das amostras coletadas foram realizadas no Laboratório de Biologia, Ecologia e Fisiologia de Organismos Aquáticos do Instituto de Biociências do Campus do Litoral Paulista (IB/CLP), da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP). Após cerca de 8 meses no sistema de manutenção a vida, e anteriormente aos procedimentos experimentais, os animais foram mantidos em tanques de fibra de aproximadamente 500 l, em sistema fechado com filtragem do volume total de água a cada 30 minutos, e aeração constante. Ao longo desse período os animais foram mantidos em água do mar coletada na Praia da Enseada/Guarujá com a seguinte composição: Temperatura: $22,59 \pm 0,4^{\circ}\text{C}$; Salinidade $31,5 \pm 0,28\text{ppm}$; pH $7,9 \pm 0,03$; concentração de amônia $8,9 \pm 1,2\text{ M}$; nitratos e nitritos $0,0\text{ mg/l}$. Durante esse período os animais foram alimentados com peixes e lulas em uma proporção de cerca de 2% a 3% do peso de cada animal, seguindo os procedimentos pré-estabelecidos para manutenção dos animais pelo próprio Acqua Mundo. Todos os procedimentos experimentais foram previamente submetidos a apreciação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do IB/CLP (Protocolo 03/2017).

Procedimentos experimentais

Os efeitos do regime alimentar sobre o metabolismo e excreção de compostos nitrogenados, e parâmetros bioquímicos plasmáticos de *C. punctatum* foram avaliados em animais aclimatados em duas salinidades diferentes (32ppm e 20ppm). Para tanto, os animais aclimatados em cada uma das salinidades testadas, foram divididos em dois tanques de (500 l

cada), representando os seguintes grupos experimentais: os animais que foram mantidos em regime regular de alimentação com peixes/lulas na proporção de 3% da biomassa (N=8), e os animais que foram mantidos sob privação alimentar (jejum) por 7 dias (N=7 para os animais em salinidade 32ppm; N=8 para os animais em salinidade 20 ppm). Para a aclimação dos jovens de *C. punctatum* à salinidade de 20ppm, os animais pré-aclimatados em 32ppm (N=30) foram divididos em dois tanques de 500 l, sendo a salinidade da água desses recintos reduzida através da diluição da água de troca na taxa de 2ppm a cada dois dias. Assim, ao final de 15 dias a salinidade dos tanques alcançou os níveis desejados (20ppm), sendo os animais então mantidos por mais duas semanas nessa salinidade antes do início da série experimental, seguindo os protocolos experimentais utilizados por Good e colaboradores (2008) para *S. canicula* e Cramp e colaboradores (2015) para *S. acanthias*.

Antes de se iniciar os experimentos, os animais do primeiro grupo experimental foram alimentados normalmente e, em seguida, os animais de ambos os grupos experimentais foram transferidos para câmaras respirométricas com volume de 6,2 l onde foram determinados, simultaneamente, o consumo de oxigênio e as taxas de excreção de amônia ($J_{\text{Amm_N}}$) e ureia ($J_{\text{Ureia_N}}$) de cada indivíduo. As câmaras respirométricas foram construídas utilizando caixas plásticas de polipropileno (®Sanremo), com dimensões de 425x185x144mm, cobertas com tampas de madeirite plastificado, o qual foram revestidas lateralmente com fita de borracha de vedação para manter o completo isolamento das caixas, afim de impedir a transferência de gases com o meio externo. Os animais permaneceram em repouso nas câmaras por 1h antes do início do experimento afim de evitar a influência do manuseio sobre as respostas fisiológicas dos animais, assim como evitar que os animais regurgitassem os itens alimentares consumidos no interior das câmaras. As câmaras experimentais foram mantidas ao longo desse período com fluxo de água constante, na mesma salinidade em que o animal estava aclimatado.

Após o período de 1h, o fluxo de água nas câmaras foi desligado e amostras de água (15 ml) foram retiradas, caracterizando o início do experimento (T0). As câmaras foram mantidas com aeração vigorosa e constante, e após 2, 4 e 6, 8, 10, 12, 18 e 24h amostras de água (15 ml) foram novamente retiradas. A cada 6h de experimento, o fluxo de água nas câmaras foi novamente religado, e mantido por 30min para a renovação completa da solução experimental. Tal procedimento foi realizado afim de se evitar o acúmulo de produtos nitrogenados (em especial amônia) que podem ser tóxicos aos animais. Após esse período de

renovação, o fluxo de água das câmaras foi novamente desligado e uma nova amostra de água foi retirada. Dessa forma, as taxas de excreção de amônia e ureia foram calculadas utilizando os seguintes intervalos de tempo: 0-2; 2-4; 4-6; 6-8; 8-10; 10-12; 12-18 e 18-24h. A taxa de consumo de oxigênio de cada animal foi determinada nos últimos 15 min de cada um dos intervalos de tempo. Para tanto, nos 15 min finais de cada intervalo a aeração das câmaras foi desligada, a concentração de oxigênio (mgO_2/L) na água foi medida por um oxímetro digital (Dissolved Oxygen Meter; YSI 5100) e a câmara foi imediatamente vedada. Após esse período, a câmara foi reaberta, uma nova medida da concentração de oxigênio na água foi feita, e a aeração foi reiniciada. As amostras de água foram imediatamente congeladas a -20°C para posterior determinação das concentrações de amônia_N e ureia_N.

Após as 24h de experimentação, os animais foram pesados, e amostras de sangue (aproximadamente 1,5 ml) foram retiradas por meio de punção da veia caudal. As amostras de sangue foram então centrifugadas a 5000 rpm por 5 min para a separação do plasma, sendo o plasma imediatamente congelado a -20°C até o momento das análises. As amostras de plasma foram utilizadas para a determinação dos níveis de amônia_N e ureia_N, proteínas totais, glicose, concentração de Na^+ e Cl^- e osmolalidade total. Após a coleta do sangue, os animais foram transferidos de volta aos tanques de 500 l com água do mar na mesma condição do período de aclimação. Os animais experimentais não foram sacrificados ao final do experimento e não foi observada mortalidade dos animais ao longo do experimento.

Procedimentos analíticos e cálculos

A determinação da concentração de ureia nas amostras de água e plasma foi realizada por meio de ensaio colorimétrico descrito por Rahmatullah e Boyde (1980), e lidos em 525 nm. Já a concentração de amônia na água foi determinada pelo método do indofenol, conforme descrito por Verdouw e colaboradores (1978), enquanto a concentração de amônia no plasma foi determinada por meio de kit comercial (Sigma AA0100), baseado no método da glutamato desidrogenase/NAD. A concentração de Cl^- no plasma foi determinada por meio do ensaio colorimétrico descrito por Zall et al. (1956), enquanto a concentração de Na^+ foi lida em espectrofotômetro de chama (Analyzer 910). A osmolaridade total do plasma foi determinada utilizando um osmômetro digital, enquanto a concentração de proteínas totais no plasma foi determinada colorimetricamente por meio dos ensaios descritos por Bradford (1976). Já a concentração de glicose no sangue total foi determinada por meio de kit

comercial de Glicose Enzimática (*InVitro*), pelo método enzimático colorimétrico baseado na oxidação enzimática na presença de glicose oxidase, e lida em espectrofotometro 500nm.

A taxa de consumo de oxigênio (MO_2 ; $\mu\text{mol/kg/h}$) e as taxas de excreção de amônia ($J_{\text{Amm-N}}$; $\mu\text{mol/kg/h}$) e ureia ($J_{\text{Ureia-N}}$; $\mu\text{mol/kg/h}$) dos animais foram calculadas de forma padrão, utilizando as variações na concentração dos elementos na água ($\mu\text{mol/L}$), relativizadas pelo peso dos animais (kg), o volume das câmaras respirométricas (L) e o tempo do intervalo de exposição (h). Para tanto, foi utilizada a seguinte equação:

$$MO_2 / J_{\text{Amm-N}} / J_{\text{Ureia-N}} = [(X_1 - X_2) * V] / (P * T)$$

Onde, X_1 e X_2 são os valores iniciais e finais da concentração dos elementos (i.e. concentração de oxigênio, amônia ou ureia), respectivamente, em cada intervalo experimental, V é o volume (L) da câmara respirométrica, P o peso (kg) do animal e T o tempo (h) do intervalo de exposição. A partir das taxas de consumo de oxigênio, e excreção de amônia e ureia foi calculado o coeficiente de nitrogênio (NQ), que representa a quantidade de proteína oxidada pelo metabolismo aeróbico do animal, por meio da equação:

$$NQ = [J_{\text{Amm-N}} + J_{\text{Ureia-N}}] / MO_2$$

A partir do NQ foi determinada a porcentagem de proteína oxidada pelo metabolismos aeróbico, seguindo a fórmula descrita por Lauff & Wood (1985):

$$\% \text{ uso proteínas} = NQ * 0,27$$

Onde 0,27 corresponde ao máximo teórico para NQ (isto é, quando a proteína é a única fonte de energia indicando 100% de uso de proteínas pelo metabolismo aeróbico, quando a amônia e a ureia são os produtos finais.

Análise estatística

Todos os dados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (mean $\pm$ 1 SEM). Diferenças estatísticas significativas nas taxas de consumo de oxigênio, excreção de amônia e ureia, coeficiente de nitrogênio e porcentagem no uso de proteínas dos exemplares de *C. punctatum*, em cada uma das salinidades testadas, foram avaliadas por meio de uma análise de variância de dois fatores (ANOVA two-way), sendo o regime de alimentação (alimentado x jejum) e o tempo de exposição como fatores da ANOVA. A influencia do regime alimentar e

da aclimação a diferentes salinidades sobre as respostas plasmáticas dos exemplares de *C. punctatum* também foi avaliada por meio de uma análise de variância de dois fatores (ANOVA two-way), sendo o regime de alimentação (alimentado x jejum) e a salinidade em que o animal foi aclimado como fatores da ANOVA. As diferenças entre as médias foram determinadas por meio de teste a posteriori de Tukey. Diferenças estatísticas significativas foram aceitas no nível de significância de $P < 0,05$

Resultados

Metabolismo e excreção de amônia e ureia

Nos animais na salinidade 32 ppm, não houve diferença nas taxas de excreção de amônia entre os animais mantidos em jejum (variando entre -1,73 a -49,66 mol/kg/h), e também entre os animais alimentados (variando entre -67,27 a -152,33 e mol/kg/h), ao longo das 24h de experimento. Entretanto, observamos que nos intervalos de 4-6; 6-8; 8-10; 10-12; 12-18; 18-24h as taxas de excreção de amônia dos animais alimentados foram 2,84; 4,35; 63,05; 3,25; 3,15; 2,92 vezes maior do que nos animais em jejum, respectivamente (Fig. 1A). Já as taxas de excreção de Uréia nos animais em jejum variaram entre -67,27 e -152,33 mol/kg/h, sendo observado que taxas de excreção de ureia no período de 4-6 h foi em média 93% menor em relação aos intervalos de 0-2; 8-10 e 18-24 horas (Fig. 1B). Por outro lado, os animais alimentados apresentaram maiores taxas de excreção variando entre -251,60 e -717,79 mol/kg/h, sendo observadas taxas de excreção de ureia 2,85 vezes maiores nos períodos de 12-24 horas, em relação ao intervalo de 4-8 horas, e de 2,24 vezes no intervalo de 12-18, em relação ao intervalo de 0-2. Nos animais alimentados no intervalo de 12-18, as taxas de excreção de ureia foram 1,95 vezes maiores em relação aos animais em jejum (Fig 1B).

Não foram observados efeitos significativos do regime de alimentação (alimentados e jejum), ao longo dos intervalos de tempo, sobre o consumo de oxigênio dos animais (Fig. 2A). O NQ dos animais em jejum variou entre 0,05 a 0,21 indicando que nesses animais a porcentagem no uso de proteínas ao longo do período experimental variou entre 20-90%. Nesses animais, houve um maior uso das proteínas entre 18-24 sendo 1,10 vezes maior em relação ao período de 4-6h. Nos animais alimentados o NQ variou entre 0,1 a 0,29 indicando que nesses animais a porcentagem no uso de proteínas ao longo do período experimental

variou entre 50-130%. Sendo que a partir das 12 horas, no intervalo de 12-24 horas foi observado o maior uso de proteínas em relação as primeiras 4 horas do experimento, no intervalo de 0-4h. Além disso, o NQ e a porcentagem no uso de proteínas foram significativamente mais elevados nos animais alimentados nos intervalos de 4-6 e 12-18 h, em relação aos animais jejum (Fig. 2B).

Já nos animais em jejum aclimatados em salinidade 20 ppm, não foram observadas diferenças significativas nas taxas de excreção de amônia. Por outro lado, entre os animais alimentados, a taxa de excreção de amônia variou de -49,74 a -217,47 mol/kg/h, sendo 4,38 vezes maior no intervalo de 4-6h, e 2,84 vezes maior no intervalo 0-2h, em relação ao intervalo 10-12h. A taxa de excreção de uréia nos animais em jejum aclimatados à salinidade de 20ppm variou entre -316,44 e -1260,66 mol/kg/h, sendo observado que no intervalo de 4-6 h a taxa de excreção de ureia foi 3,98 vezes maior em relação ao intervalo de 0-4 h. Nos animais alimentados, a taxa de excreção de ureia variou entre -247,96 e -1038,29 mol/kg/h, com as taxas de excreção 4,18 vezes maiores no intervalo de 8-10 em relação a intervalo de 4-6h. No intervalo de 4-6h, a taxa de excreção de ureia dos animais em jejum foi 5,08 vezes maior do que nos animais alimentados (Fig. 3B).

Como visto para os animais aclimatados em salinidade 32ppm, não foram observadas diferenças significativas nas taxas de consumo de oxigênio dos jovens de *C. punctatum* mantidos em diferentes regimes de alimentar, e aclimatados à 20ppm, ao longo dos intervalos de tempo. O NQ nos animais em jejum não apresentou diferença significativa ao longo dos intervalos de tempo, entretanto nos animais alimentados, um maior uso de proteínas (152,09%) foi observado no intervalo de 8-10h, sendo 2 vezes maior que no intervalo de 6-8h (79,6%) e 6 vezes maior que no intervalo de 4-6 (27,5%) (Fig. 4B). No entanto, a porcentagem no uso de proteínas nos animais mantidos em jejum foi cerca de 4,4 e 1,9 vezes mais elevada do que nos animais alimentados nos intervalos de 4-6 e 6-8h, respectivamente.

Parâmetros osmoregulatórios e bioquímicos plasmáticos

Dentre os parâmetros bioquímicos plasmáticos analisados, apenas os níveis de glicose e de cloreto apresentaram diferenças significativas entre os animais alimentados e mantidos sob privação alimentar, em uma mesma salinidade. Os animais em jejum apresentaram níveis de glicose plasmática 1,67 vezes maiores do que os animais alimentados em salinidade

32ppm, enquanto a concentração de cloreto foi 1,1 vezes maior no plasma dos alimentados (Tabela 1). Por outro lado, nos animais em jejum aclimatados à salinidade 20ppm, os níveis de glicose plasmática foram cerca de 43,6% reduzidos em relação aos animais em jejum aclimatados à 32ppm. Já a concentração plasmática de cloreto foi reduzida em média 35% nos animais mantidos em ambos os regimes alimentares em salinidade 20ppm, em relação aos animais em 32ppm. Os níveis de proteínas totais no plasma foram cerca de 39% e 37,6 % menores nos animais alimentados e em jejum aclimatados à 20 ppm, em relação aos animais aclimatados a salidade 32ppm e mantidos sob mesmo regime alimentar. A osmolaridade plasmática dos animais alimentados e aclimatados em 20ppm foi reduzida em 20,1% em relação aos animais alimentados e aclimatados em 32ppm. Já os níveis de ureia no plasma foram cerca de 69,42% e 61% menores nos animais alimentados e em jejum aclimatados a salinidade 20ppm, em relação aos animais mantidos sob mesmo regime alimentar em salinidade 32ppm, respectivamente. Não foram observadas alterações nos níveis plasmáticos de amônia e Na^+ entre os animais sob diferentes regime de alimentação, nas duas salinidades testadas (Tabela 1).

Discussão

Efeitos pós-prandiais sobre o metabolismo, excreção de nitrogênio e osmoregulação de C. punctatum em salinidade 32ppm

O presente estudo evidenciou que os jovens de *C. punctatum* excretam preferencialmente ureia, em comparação com a amônia, como principal resíduo nitrogenado. Nos animais mantidos em salinidade 32ppm, as taxas de $J_{\text{ureia-N}}$ ao longo do experimento foram em média 3,3 vezes maiores do que $J_{\text{Amm-N}}$ nos alimentados, e em média 8,0 vezes maiores nos animais mantidos em jejum. Similarmente, nos animais aclimatados em 20ppm, as taxas de $J_{\text{ureia-N}}$ foram 4,2 vezes maiores do que as taxas $J_{\text{Amm-N}}$ nos alimentados, enquanto nos animais em jejum essa diferença foi de 6,4 vezes (Fig 1 e Fig. 3). As taxas de $J_{\text{ureia-N}}$ e $J_{\text{Amm-N}}$ determinadas para os jovens de *C. punctatum* no presente estudo, em ambas as salinidades testadas, são próximas das taxas de excreção desses compostos nitrogenados observadas para diferentes espécies de elasmobrânquios marinhos, como *Hemiscyllium plangiosum* e *Squalus acanthias* em salinidade 33ppm ($J_{\text{ureia-N}}$ entre -351,4 e -485,451 $\text{mol kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$; $J_{\text{Amm-N}}$ entre -37,29 e -123,58 $\text{mol kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$), e também para a espécie de elasmobrânquios eurialino *Himantura uarnak* ($J_{\text{ureia-N}}$ entre -276 e -244 $\text{mol kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$; $J_{\text{Amm-N}}$

entre -60 e $-200 \text{ mol kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$) em salinidades reduzidas (revisto por Wright & Wood, 2016). Diversos autores têm demonstrado que as brânquias são o principal órgão responsável pela excreção de ureia nos elasmobrânquios, muito embora a permeabilidade relativa do epitélio branquial à ureia seja considerada muito mais baixa em comparação com espécies de teleósteos marinhos (Evans et al., 2005; Pärt et al., 1998). Essa baixa permeabilidade branquial à ureia vista nos elasmobrânquios tem sido relacionada a composição lipídica do epitélio branquial, particularmente o conteúdo de colesterol, a presença de transportadores para a excreção ativa de ureia, e também a relativamente baixa área de superfície da membrana apical (Ballantyne, 2016; Wright & Wood, 2016). Na espécie marinha *S. acanthias* a excreção de ureia via brânquias representa mais de 90% do total de nitrogênio excretado pelos animais (Wright et al., 1995), enquanto excreção de ureia pelos rins representou apenas 6,5% desse total. Já a excreção de amônia nos elasmobrânquios marinhos ocorre preferencialmente via brânquias e rins, mas corresponde a apenas cerca de 3% do total de nitrogênio excretado pelos animais (Wood et al., 1995; Wright & Wood, 2016).

A alimentação teve apenas efeitos discretos sobre a taxa de excreção de ureia dos jovens de *C. punctatum* em salinidade 32ppm, como visto pelas $J_{\text{ureia-N}}$ 1,95 vezes maiores nos alimentados, em relação aos animais em jejum, apenas no intervalo de 12-18h pós-alimentação. Por outro lado, a taxa de excreção de amônia dos animais alimentados foi significativamente mais elevada do que nos animais mantidos em jejum a partir das primeiras 4 horas pós-alimentação, se mantendo maiores até o final do experimento. Resultados similares foram obtidos para a espécie *S. acanthias*, onde a $J_{\text{Amm-N}}$ dos animais foi significativamente aumentada durante as primeiras 18h pós-alimentação, em comparação com animais mantidos em jejum por 7 dias (Kajimura et al., 2006), enquanto as taxas de $J_{\text{ureia-N}}$ não foram diferentes entre os animais mantidos em ambos os regimes alimentares. Da mesma forma, a $J_{\text{ureia-N}}$ de *S. acanthias* se manteve relativamente constante ao longo de 55 dias pós-alimentação, enquanto a $J_{\text{Amm-N}}$ foi significativamente mais elevada nas primeiras 48h pós-alimentação, mas declinou rapidamente após 5 dias e se manteve sem alterações ao longo de 55 dias de jejum (Kajimura et al., 2008). Em conjunto esses dados sugerem que os jovens de *C. punctatum*, assim como a espécie *S. acanthias*, conservam boa parte do nitrogênio adquirido via alimento na forma de ureia, excretando o excesso do “loading” de nitrogênio por meio da estimulação das taxas de excreção de amônia pós-alimentação. Essa estratégia é considerada importante para um elasmobrânquio marinho, tendo em vista o papel

fundamental da manutenção de níveis plasmáticos de ureia no controle da osmolaridade plasmática (em média 41% da osmolaridade plasmática dos animais mantidos em 32ppm), contribuindo para a homeostase osmoregulatória do animal. Além disso, isso evita que ocorra um gasto considerável de energia com a perda de ureia para o ambiente, uma vez que a síntese de 1 mol de ureia via o ciclo da ureia-ornitina requer o gasto de 5 mols de ATP (Anderson, 2001), um processo metabólico com custo energético bem mais elevado do que a síntese de amônia endógena.

Muito embora as taxas de excreção de amônia tenham sido aumentadas nos jovens de *C. punctatum* após a alimentação, efeito evidente sobre a $J_{\text{ureia-N}}$ apenas entre 12-18h, não foram observadas diferenças significativas nos níveis plasmáticos de amônia e ureia entre os animais alimentados e mantidos em jejum. Por outro lado, na espécie *S. acanthias* e em diversas espécies de teleósteos, o aumento pós-prandial na taxa de excreção de amônia têm sido associada a um aumento transiente nos níveis de amônia no plasma (Bucking, 2016; Kajimura et al., 2008; Wood et al., 2005). Durante os processos metabólicos de digestão de proteínas, o resultante aumento na produção hepática e acúmulo de amônia no plasma são, em geral, decorrentes do catabolismo oxidativo de aminoácidos ingeridos via alimentação. Assim, por meio da transaminação de L-aminoácidos em glutamato, e sua posterior deaminação via glutamato desidrogenase (GDH), amônia e α -cetoácidos são gerados como produtos finais, sendo os últimos utilizados como substrato no ciclo de Krebs (Ballantyne, 2001; Bucking, 2016). No entanto, diversos fatores são reconhecidos por alterar a taxa de oxidação de aminoácidos presentes na dieta e, conseqüentemente, a produção e os níveis plasmáticos de amônia, onde o conteúdo de proteínas da dieta e a frequência de alimentação influenciam diretamente o catabolismo de aminoácidos (Ballantyne, 2001; Bucking, 2016). Por exemplo, na espécie *S. acanthias*, a ingestão de alimento na proporção de 2-3% da massa corpórea do animal (Kajimura et al., 2006; Wood et al., 2005) resultou em pequenos aumentos nos níveis plasmáticos e na taxa de excreção de amônia, enquanto a concentração de ureia plasmática e $J_{\text{ureia-N}}$ foram inalterados. Por outro lado, a ingestão de maior quantidade de alimento (5,5% da massa corpórea) reforçou o efeito pós-prandial sobre os níveis plasmáticos e excreção de amônia, mas reduziu a $J_{\text{ureia-N}}$ o que contribui para a conservação de nitrogênio pelos animais (Wood et al., 2007). Assim, níveis plasmáticos de amônia e ureia similares entre os jovens de *C. punctatum* mantidos em jejum e em regime regular de alimentação sugerem que a quantidade de proteína ofertada na dieta não foi suficiente para aumentar os níveis de ambos

os produtos nitrogenados no sangue dos animais, ou ainda que o transiente aumento dos níveis particularmente de amônia pós-alimentação, como visto em *S. acanthias* 20h pós alimentação (Kajimura et al., 2008), podem ter ocorrido em períodos anteriores a coleta de sangue dos animais (24h pós-alimentação).

Não foi observado um efeito significativo da alimentação sobre a taxa de consumo de oxigênio nos jovens de *C. punctatum* em 32ppm, como visto pelas MO_2 similares entre os animais mantidos em regime regular de alimentação e em jejum por 7 dias (Fig. 2A). Nos animais ectotérmicos, como os elasmobrânquios e teleósteos, os processos de digestão pós-alimentação são comumente associados a um aumento na taxa metabólica dos animais (em geral medida como aumento da taxa de consumo de oxigênio), um fenômeno descrito como ação dinâmica específica (*specific dynamic action* – SDA) (revisto por Secor, 2009). Esse aumento pós-prandial na taxa metabólica de elasmobrânquios e teleósteos têm sido relacionado ao custo energético para a síntese proteica pós-alimentação, que pode corresponder até a 80% do custo energético da SDA, embora também reflita a estimulação do metabolismo oxidativo, particularmente dos mecanismos associados a deaminação e transaminação de aminoácidos ingeridos pela dieta, e a consequente síntese de ureia e amônia (Wood, 2001). Nesse contexto, os resultados do presente estudo contrastam com o efeito da alimentação sobre a taxa de consumo de oxigênio reportadas para as espécies *S. acanthias* (Wood et al., 2007) e *Scyliorhinus canicula* (Sims & Davies, 1994), onde foram observadas MO_2 1,7 vezes e 2,8 vezes maiores no animais ao longo das 72-75h pós-alimentação, respectivamente. Novamente, esse fato pode ser explicado pela diferença na proporção de alimento ofertado entre os trabalhos citados (5 a 7% do peso do animal) e o presente estudo (3% do peso do animal), o que contribuiu fortemente para que a quantidade de proteína ingerida *via* dieta pelos exemplares de *C. punctatum* fosse marcadamente reduzida em comparação com os estudos realizados com *S. acanthia* e *S. canicula*. Estimativas da quantidade de energia gasta para a síntese proteica têm evidenciado que esse processo é altamente custoso para os animais, onde ao menos 4 moléculas de ATP são hidrolizadas por ligação peptídica (Ballantyne, 2001; Wood et al., 2005). Isso sugere que os jovens de *C. punctatum* alimentados tendem a reduzir a quantidade de energia desprendida para os processos oxidativos de digestão e síntese proteica pós-alimentação, ou ainda apresentem um maior tempo para a digestão completa do alimento, em comparação com outras espécies de elasmobrânquios já estudadas.

Diversos estudos têm demonstrado que o metabolismo aeróbico dos elasmobrânquios é altamente dependente da oxidação de aminoácidos, especialmente de glutamina, representando cerca de 70% do metabolismo oxidativo desses animais. Esse fato contrasta com o predominante uso de lipídeos e carboidratos como combustíveis metabólicos preferenciais dos teleósteos (Ballantyne, 1997; Wood, 2001; Wood et al., 2007; Speers-Roesch & Treberg, 2010). Nos elasmobrânquios, a taxa de oxidação da glutamina nas células da musculatura vermelha, que ocorre por meio da deaminação da glutamina pela enzima glutaminase, formando glutamato e amônia, é significativamente mais elevada do que o observado em teleósteos, aves e mamíferos (Ballantyne, 1997; Speers-Roesch & Treberg, 2010). No presente estudo, a determinação da taxa de excreção total de nitrogênio ($J_{\text{total-N}} = J_{\text{ureia-N}} + J_{\text{Amm-N}}$), simultaneamente a determinação das taxas de consumo de oxigênio dos animais, permitiu o cálculo do coeficiente de nitrogênio (NQ) que reflete a porcentagem de nitrogênio excretado formado pelo metabolismo oxidativo de proteínas (Lauff & Wood, 1996, 1997). Dessa forma, em estado de equilíbrio, um valor de $\text{NQ} = 0,27$ representa uma condição onde 100% da taxa metabólica de um peixe é mantida pela oxidação de proteínas (van den Thillart & Kesbeke, 1978; Wood, 2001). Nos jovens de *C. punctatum*, os valores médios de NQ ao longo das 24h pós-alimentação foram de 0,20 e 0,15 para os animais mantidos sob regime regular de alimentação e em jejum, representando cerca de 75% e 58% no uso de proteínas pelo metabolismo aeróbico nesses animais, respectivamente (Figura 2B), o que confirma a alta dependência do metabolismo dos elasmobrânquios pela oxidação de proteínas (Ballantyne, 1997; Wood, 2001). No entanto, os jovens de *C. punctatum* alimentados apresentaram valores de NQ significativamente mais elevados que os animais mantidos em jejum por 7 dias nos intervalos de 4-6h e 12-18h. Esses resultados contrastam com os obtidos por Wood e colaboradores (2007), que observaram uma redução nos valores de NQ de 0,51 em exemplares de *S. acanthias* mantidos em jejum, para 0,19 nos animais pós-alimentação. Segundo esses autores, a redução no NQ pós-alimentação em *S. acanthias* evidencia a estimulação de processos anabólicos, tais como síntese de proteínas e de ureia, associados com a conservação de nitrogênio pós-prandial nessa espécie (Wood et al., 2007). Essas diferenças nas respostas pós-prandiais no NQ e na porcentagem do uso de proteínas entre exemplares de *C. punctatum* e *S. acanthias* indicam diferenças na regulação do metabolismo de aminoácidos, e consequentemente na produção de energia e síntese de ureia, entre as espécies. Importante ressaltar que nos exemplares de *C. punctatum* mantidos em jejum, os

níveis de glicose plasmática foram significativamente mais elevados do que nos animais alimentados, sugerindo que nos animais em privação alimentar os estoques hepáticos de glicogênio podem estar sendo mobilizados para utilização de carboidratos (glicose) como combustível para o metabolismo aeróbico, reduzindo sua dependência sobre a oxidação de proteínas.

Não foram observados efeitos significativos do regime alimentar sobre a osmolaridade plasmática, assim como sobre os níveis de proteínas totais e concentração de Na^+ no plasma dos jovens de *C. punctatum* em salinidade 32ppm. Por outro lado, os níveis plasmáticos de Cl^- foram significativamente mais elevados nos alimentados, em relação aos animais mantidos em jejum por 7 dias. Em vertebrados, o processo de digestão ácida que ocorre no estômago é resultante da secreção apical de H^+ pelas células parietais presentes na mucosa gástrica, processo que é acoplado à saída de íons HCO_3^- pela membrana basolateral das células. Isso faz com que haja um acúmulo de HCO_3^- no compartimento extracelular, o que promove uma significativa alcalinização do sangue dos animais (aumento do pH sanguíneo), fenômeno descrito como *alkaline tide* (Niv & Fraser, G, 2002; Wood et al., 2005; Wood et al., 2007). Em elasmobrânquios, as brânquias são o órgão responsável pela manutenção do equilíbrio ácido-base do sangue dos animais, atuando diretamente na secreção de ácidos (H^+) e bases (HCO_3^-) para o meio externo (Evans et al., 2005; Wright & Wood, 2016). Em espécies como *Dasyatis sabina*, *S. acanthias* e *Carcharinus leucas*, a secreção básica é acoplada à absorção ativa de Cl^- , por meio do trocador eletroneutro $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ (pendrin), sendo esse processo fortemente estimulado após a alimentação (revisto por Wright & Wood, 2016), ou em situações de alcalose metabólica induzida pela injeção de NaHCO_3 nos animais (Tresguerres et al., 2007a, 2007b). Assim, o aumento dos níveis de Cl^- nos jovens de *C. punctatum* alimentados sugere um aumento da excreção de produtos metabólicos básicos (HCO_3^-), com consequente absorção branquial de Cl^- , como uma resposta compensatória à alcalinização do sangue decorrente da digestão do alimento ingerido.

Influência da aclimação a salinidade reduzida sobre as respostas metabólicas e osmoregulatórias pós-prandiais de C. punctatum

O balanço osmótico, em especial para o controle do volume celular, é um desafio para a manutenção homeostase para todos os animais. Dentre as estratégias envolvidas na

osmorregulação, duas são fundamentais para o entendimento da tolerância dos elasmobrânquios a diluição do meio externo, e de como a salinidade interfere no metabolismo desses animais: osmoconformação e osmorregulação (Yancey, 2016). Uma das principais diferenças entre essas duas estratégias nos elasmobrânquios é relacionada a capacidade das diferentes espécies em sintetizar e reter altos níveis de ureia nos fluidos corpóreos, especialmente em função da variação da salinidade ambiental, associado a manutenção da osmolaridade plasmática nesses animais. Segundo Hazon e colaboradores (2003), a aclimação gradual de elasmobrânquios marinhos a diferentes salinidades, em condições de laboratório, demonstrou que esses peixes têm a capacidade de regular a pressão osmótica de seus fluidos corpóreos em função da salinidade ambiental, por meio da regulação independente dos principais osmólitos plasmáticos, particularmente dos níveis de ureia, Na^+ e Cl^- . Isso sugere que muitos dos elasmobrânquios considerados estenoalinos de fato podem ser descritos como parcialmente eurialinos, como demonstrado para diferentes espécies de elasmobrânquios marinhos como a espécie *Hemiscyllium plagiosum*, que realiza viagens frequentes e curtas para se alimentar em ambientes de águas salobras, assim como para as espécies *Pristis microdon*, *Carcharinus melanopterus*, *Carcharinus leucas* e *Negaprion brevirostris* (Chan & Wong, 1977). Em estudo recente, Wosnick e Freire (2013) demonstraram que a espécie *Zapteryx brevirostris*, uma espécie marinha considerada estritamente estenoalina, apresentou alta capacidade de manter seu balanço osmótico em função da aclimação a baixas salinidades da água. Nessa espécie, a aclimação a salinidades reduzidas resultou na redução da osmolaridade plasmática, que foi associada principalmente a redução dos níveis de ureia e concentração de K^+ no plasma, enquanto os níveis de Na^+ e Cl^- permaneceram inalterados, sugerindo que essa espécie pode ser considerada parcialmente eurialina e tolerante a baixas salinidades (Wosnick & Freire, 2013).

Os parâmetros plasmáticos dos jovens de *C. punctatum* avaliados no presente estudo não foram significativamente influenciados pelo regime de alimentação dos animais aclimatados à 20ppm. No entanto, nos jovens de *C. punctatum* aclimatados por 20 dias à salinidade 20ppm, em ambos os regimes de alimentação, os níveis plasmáticos de ureia, Cl^- e proteínas totais foram drasticamente reduzidos, sendo em média 65%, 35% e 38% menores do que os valores observados para os animais mantidos à 32ppm, respectivamente. Similarmente, a osmolaridade plasmática apresentou uma forte tendência de redução nos animais aclimatados à 20ppm, mas apenas nos animais alimentados a osmolaridade plasmática foi

significativamente reduzida (cerca de 20%), em relação aos animais mantidos à 32ppm (Tabela 2). Interessante notar que os níveis plasmáticos de Na^+ não foram significativamente afetados pela aclimação à salinidade de 20ppm, sendo observados valores muito similares entre os animais aclimatados as duas salinidades testadas, em ambos os regimes de alimentação. Esses resultados contrastam com o padrão geral de elasmobrânquios mantidos em salinidades reduzidas, onde os níveis plasmáticos de Cl^- são mais intensamente regulados do que o Na^+ , sugerindo que na espécie *C. punctatum* a concentração de Na^+ no plasma é fortemente regulada, e seu papel na manutenção da osmolaridade plasmática é maior do que o Cl^- , mesmo em salinidades reduzidas.

Em espécies consideradas tolerantes a diluição do meio externo, tais como *H. plagiosum*, *Leucoraja ocellata*, *Squalus suckleyi* e *Heterodontus portusjacksoni*, a diminuição dos níveis plasmáticos de ureia e TMAO, e em menor quantidade de Na^+ e Cl^- , é relacionada a um aumento do ganho de água por osmose, acompanhado pela diluição dos fluidos corpóreos internos, além do aumento das taxas de excreção desses compostos pelos animais, particularmente pelos rins (Chan & Wong, 1977; Cooper & Morris, 2004; Guffey & Goss, 2014; Sulikowski et al., 2003; Wright & Wood, 2016). Em condições de salinidade reduzida, os elasmobrânquios tendem a aumentar significativamente a taxa de filtração glomerular nos rins, promovendo uma grande perda de água e íons pela urina, o que, em conjunto com o aumento da secreção ativa e redução da reabsorção tubular, resulta no aumento da excreção de ureia e metilaminas para o ambiente (Ballantyne & Fraser, 2013; Wright & Wood, 2016). Além disso, algumas espécies apresentam a capacidade de reduzir a síntese metabólica de ureia via o ciclo da ureia-ornitina (O-UC) quando mantidas em baixas salinidades, como visto em *C. leucas* (Pillans et al., 2005), enquanto outras espécies, como *N. brevirostris*, aumentam a taxa de excreção de ureia mas mantém altas taxas de síntese hepática desse composto, mesmo quando expostos água do mar 50% diluída (Goldstein et al., 1968). Em conjunto, os resultados do presente estudo sugerem que os jovens de *C. punctatum* são relativamente tolerantes a salinidades moderadamente baixas, apresentando a capacidade de controlar os níveis dos principais osmólitos do plasma, especialmente ureia e Cl^- , mantendo sua osmolaridade plasmática isosmótica, ou mesmo ligeiramente hiperosmótica, em relação ao meio externo, mesmo em condições de salinidade reduzida.

Nos animais aclimatados a salinidade de 20ppm não foram observadas diferenças nas taxas de excreção de amônia entre os animais alimentados e mantidos em jejum, embora a

$J_{\text{Amm-N}}$ dos animais alimentados tenham sido significativamente mais elevadas nas primeiras 4h pós alimentação, em relação ao intervalo de 4-6h. O regime de alimentação teve um efeito discreto sobre as taxas de excreção ureia, sendo observado um aumento significativo na $J_{\text{Ureia-N}}$ dos animais em jejum, em relação aos alimentados, apenas no intervalo de 4-6h. No entanto, a $J_{\text{Amm-N}}$ e a $J_{\text{Ureia-N}}$ dos animais mantidos em jejum na salinidade 20ppm foram quantitativamente aumentadas (cerca de 3,0 e 2,1 vezes, respectivamente), quando comparadas as taxa de excreção dos animais mantidos em 32ppm, enquanto nos animais alimentados, as taxas de excreção de ambos os compostos nitrogenados foram bastante similares ($J_{\text{Amm-N}}$ entre -123,56 e -127,63 mol kg⁻¹ h⁻¹; e $J_{\text{Ureia-N}}$ entre -485,45 e -536,68 mol kg⁻¹ h⁻¹) entre os animais aclimatados às duas salinidades testadas. Interessante notar que nos jovens de *C. punctatum* aclimatados à 20ppm, em ambos os regimes alimentar, o aumento quantitativo na taxa de excreção de ureia, em relação aos animais mantidos em 32ppm, foi acompanhado pela redução significativa dos níveis plasmáticos de ureia, tal como visto para a espécie estenoalina *S. suckleyi* que apresentou um aumento de cerca de 72% na $J_{\text{Ureia-N}}$ acompanhada pela redução gradativa nos níveis de ureia no plasma ao longo de 50h de exposição a água do mar diluída (21ppm) (Guffey & Goss, 2014). Assim, as taxas de excreção de ureia aumentadas nos jovens de *C. punctatum* em salinidade 20ppm podem ser entendidas como ajustes fisiológicos relacionados à diminuição da osmolaridade plasmática dos animais em um meio mais diluído. Essas respostas refletem um aumento da excreção renal de ureia, provavelmente em função da redução do número de transportadores de ureia (UT) relacionadas a reabsorção tubular desse composto, como visto para a espécie *Triakis scyllium* aclimatada por 1 semana em salinidade 10ppm (Yamaguchi et al., 2009). Por outro lado, o aumento quantitativo da $J_{\text{Amm-N}}$ dos jovens de *C. punctatum* em salinidade 20ppm, em relação aos animais mantidos em 32ppm, não foi acompanhado de redução significativa nas concentrações plasmática de amônia dos animais. Taxas de excreção de amônia aumentadas também foram reportadas para a espécie *S. suckleyi* após 18 e 24h de exposição a água do mar diluída (70%), no entanto a concentração de amônia no plasma desses animais não foi determinada (Deck et al., 2016). Nos elasmobrânquios, a produção endógena de amônia ocorre por meio do catabolismo de aminoácidos, sendo a amônia produzida posteriormente transformada em glutamina, que é então utilizado como substrato pelo ciclo O-UC para a produção de ureia (Speers-Roesch & Treberg, 2010; Wood, 2001; Wright & Wood, 2016). Assim, as respostas nas taxas de excreção e nas concentrações plasmáticas de amônia e ureia

dos jovens de *C. punctatum* aclimatados à 20ppm sugerem tanto um aumento da produção de amônia por meio do catabolismo de proteínas, quanto a redução da síntese de ureia através da diminuição da conversão de amônia em glutamina nos animais.

Tal como visto para os animais mantidos em 32ppm, não foi observado um efeito significativo da alimentação sobre a taxa de consumo de oxigênio dos jovens de *C. punctatum* aclimatados à 20ppm, sugerindo que a taxa metabólica desses animais é pouco influenciada pelos processos de digestão dentro das condições experimentais dos regimes de alimentação testados no presente estudo. Contudo, a avaliação do coeficiente de nitrogênio (NQ) e da porcentagem no uso de proteínas pelos animais aclimatados à 20ppm demonstrou um forte efeito do regime de alimentação sobre os combustíveis preferencialmente utilizados pelo metabolismo oxidativo. Nesses animais, os valores médios de NQ ao longo das 24h pós-alimentação foram de 0,22 e 0,31 para os animais mantidos sob regime regular de alimentação e em jejum, representando cerca de 83% e 116% no uso de proteínas pelo metabolismo nesses animais, respectivamente, demonstrando novamente a alta dependência do metabolismo aeróbico desses animais pelo catabolismo de proteínas (Ballantyne, 1997; Speers-Roesch & Treberg, 2010). Tal como observado para a espécie *S. acanthias* ao longo de 72h pós-alimentação (Wood et al., 2007), os valores de NQ nos jovens de *C. punctatum* alimentados foram significativamente reduzidos no intervalo 4-8h, em comparação com os animais mantidos em jejum, indicando a ativação de processos anabólicos, tais como síntese proteica e de ureia, nesses animais após a alimentação. Por outro lado, as altas taxas de NQ observadas para os exemplares de *C. punctatum* mantidos em jejum em salinidade 20 ppm (variando entre 0,28 e 0,41 no intervalo de 4 a 24h) sugerem que estes animais não estavam em estado de equilíbrio, como visto para exemplares de *S. acanthias* mantidos por 5 dias sob privação alimentar (Wood et al., 2007). Isso evidencia que, durante o jejum prolongado, os jovens de *C. punctatum* aclimatados à 20ppm apresentaram perdas totais de nitrogênio (particularmente na forma de ureia_N) quantitativamente maiores do que a produção de nitrogênio pela quebra de proteínas e oxidação de aminoácidos, indicando que boa parte do nitrogênio disponibilizado para a produção de amônia e ureia veio do catabolismo de proteínas endógenas. Esse fato sugere fortemente que os animais em jejum em salinidades reduzidas apresentam um alto comprometimento na conservação de nitrogênio, o que pode levar a maior dificuldade desses organismos em manter sua estratégia ureosmótica em situações de privação alimentar prolongada, especialmente em ambientes de menor salinidade.

Conclusões

No presente estudo, concluímos de que a ureia é o principal produto da excreção nos jovens de tubarão bambu mantidos em ambos os regimes de alimentação, tanto em salinidade 32ppm quanto em 20ppm. Além disso, a alimentação promove o aumento da excreção de nitrogênio na forma de amônia nos animais em 32ppm, efeito não observado nos animais mantidos à 20ppm. No entanto, a aclimação a salinidade reduzida resulta em um aumento quantitativo da excreção total de nitrogênio nos animais, particularmente nos jovens *C. punctatum* mantidos em jejum, como visto pelo aumento nos valores nas taxas de $J_{\text{Amm-N}}$ e $J_{\text{Urea-N}}$ dos animais. O regime de alimentação e a aclimação a baixa salinidade não influenciaram a taxa de consumo de oxigênio dos animais. A análise dos valores de NQ evidenciaram que o metabolismo aeróbico dos jovens de tubarão bambu, em ambas as salinidades testadas, é altamente dependente da oxidação de proteínas e aminoácidos, tal como observado para outras espécies de elasmobrânquios. Contudo, a alimentação teve efeitos distintos sobre o NQ e porcentagem de uso de proteínas em função da salinidade em que o animal foi aclimatado. Nos animais em 32ppm foi notado uma forte relação entre o catabolismo de proteínas, particularmente para síntese de amônia, relacionados a estratégia de conservação de nitrogênio pelos animais, enquanto em 20ppm foi observado um aumento do anabolismo associado a síntese proteica e de ureia pelos animais. Interessante notar que nos animais mantidos em jejum em 20ppm, o catabolismo de proteínas endógenas foi bastante elevado, indicando um desequilíbrio entre as perdas de nitrogênio pela excreção de ureia e amônia e a sua disponibilização pela oxidação de aminoácidos. A redução da osmolaridade, acompanhada da diminuição da concentração de ureia e cloreto plasmático, nos jovens de *C. punctatum* aclimatados à 20ppm sugere que esses animais apresentam a capacidade de regular a concentração desses osmólitos nos fluidos internos a fim de se manterem isosmóticos, ou ligeiramente hiperosmóticos, em relação ao meio. Isso demonstra que os indivíduos dessa espécie conseguem manter seu balanço osmótico mesmo em salinidades ligeiramente reduzidas. Em conjunto nossos dados indicam que, quando em menores salinidades, os jovens de *C. punctatum* são fortemente limitados pelo aporte de nitrogênio via alimentação para a manutenção de sua estratégia ureosmótica, sugerindo que longos períodos sob privação alimentar em salinidades baixas podem influenciar negativamente a capacidade osmorregulatória e a retenção de nitrogênio pelos animais.

Referências bibliográficas

- Anderson, P.M., 2001. Urea and glutamine synthesis: Environmental influences on nitrogen excretion, in: Physiology, B.T.-F. (Ed.), Nitrogen Excretion. Academic Press, pp. 239–277. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S1546-5098\(01\)20008-9](http://dx.doi.org/10.1016/S1546-5098(01)20008-9)
- Anderson, W.G., Taylor, J.R., Good, J.P., Hazon, N., Grosell, M., 2007. Body fluid volume regulation in elasmobranch fish. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* 148, 3–13. doi:[10.1016/j.cbpa.2006.07.018](https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2006.07.018)
- Ballantyne, J.S., 2016. Metabolism of Elasmobranchs (Jaws II), in: Shadwick, R.E., Farrell, A.P., Brauner, C.J. (Eds.), *Physiology of Elasmobranch Fishes - Internal Processes*. Academic Press, San Diego, pp. 396–457.
- Ballantyne, J.S., 2016. Some of the most interesting things we know, and don't know, about the biochemistry and physiology of elasmobranch fishes (sharks, skates and rays). *Comp. Biochem. Physiol. Part - B Biochem. Mol. Biol.* 199, 21–28. doi:[10.1016/j.cbpb.2016.03.005](https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2016.03.005)
- Ballantyne, J.S., 2001. Amino acid metabolism, in: Wright, P.A., Anderson, P. (Eds.), *Nitrogen Excretion*. Academic Press, San Diego, pp. 77–108.
- Ballantyne, J.S., 1997. Jaw: The Inside story. The Metabolism of Elasmobranch Fishes. *Comp. Biochem. Physiol.* 118, 703–742.
- Ballantyne, J.S., Fraser, D.I., 2013. Euryhaline elasmobranchs, in: McCormick, S.D., Farrell, A.P., Brauner, C.J. (Eds.), *Euryhaline Fishes*. Academic Press, Oxford, pp. 126–199.
- Bradford, M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein– dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254. doi:[10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Bucking, C., 2016. A broader look at ammonia production, excretion, and transport in fish: a review of impacts of feeding and the environment. *J. Comp. Physiol. B Biochem. Syst. Environ. Physiol.* 187, 1–18. doi:[10.1007/s00360-016-1026-9](https://doi.org/10.1007/s00360-016-1026-9)
- Burger, J.W., 1965. Roles of the Rectal Gland and the Kidneys in Salt and Water Excretion in the Spiny Dogfish. *Physiol. Zool.* 38, 191–196. doi:[10.1086/physzool.38.3.30152829](https://doi.org/10.1086/physzool.38.3.30152829)
- Burger, J.W., Hess, W.N., 1960. Function of the Rectal Gland in the Spiny Dogfish. *Science* (80-.). 131, 670 LP-671.
- Chan, D.K.O., Wong, T.M., 1977. Physiological Adjustments to Dilution of the External Medium in the Lip-shark, *Hemiscyllium plangiosum*. III. Oxygen consumption and metabolic rates. *J. Exp. Zool.* 200, 97–102.
- Cohen, J.J., Krupp, M.A., Chidsey, C.A., 1958. Renal Conservation of Trimethylamine Oxide by the Spiny Dogfish, *Squalus acanthias*. *Am. J. Physiol. -- Leg. Content* 194, 229 LP-235.

- Cooper, A.R., Morris, S., 2004. Haemoglobin function and respiratory status of the Port Jackson shark, *Heterodontus portusjacksoni*, in response to lowered salinity. J. Comp. Physiol. B Biochem. Syst. Environ. Physiol. 174, 223–236. doi:10.1007/s00360-003-0405-1
- Cramp, R.L., Hansen, M.J., Franklin, C.E., 2015. Osmoregulation by juvenile brown-banded bamboo sharks, *Chiloscyllium punctatum*, in hypo- and hyper-saline waters. Comp. Biochem. Physiol. -Part A Mol. Integr. Physiol. 185, 107–114. doi:10.1016/j.cbpa.2015.04.001
- Deck, C.A., Bockus, A.B., Seibel, B.A., Walsh, P.J., 2016. Effects of short-term hyper- and hypo-osmotic exposure on the osmoregulatory strategy of unfed North Pacific spiny dogfish (*Squalus suckleyi*). Comp. Biochem. Physiol. -Part A Mol. Integr. Physiol. 193, 29–35. doi:10.1016/j.cbpa.2015.12.004
- Evans, D.H., 2008. Teleost fish osmoregulation: what have we learned since August Krogh, Homer Smith, and Ancel Keys. Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 295, R704-13. doi:10.1152/ajpregu.90337.2008
- Evans, D.H., Piermarini, P.M., Choe, K.P., 2005. The Multifunctional Fish Gill : Dominant Site of Gas Exchange , Osmoregulation , Acid-Base Regulation , and Excretion of Nitrogenous Waste 97–177. doi:10.1152/physrev.00050.2003.
- Goldstein, L., Oppelt, W.W., Maren, T.H., 1968. Osmotic regulation and urea metabolism in the lemon shark *Negaprion brevirostris*. Am. J. Physiol. 215, 1493–7.
- Good, J.P., Wells, A., Hazon, N., 2008. Measurement of blood volume in the elasmobranch fish *Scyliorhinus canicula* following acute and long-term salinity transfers. J. Fish Biol. 73, 1301–1313. doi:10.1111/j.1095-8649.2008.02013.x
- Griffith, R.W., 1991. Guppies, toadfish, lungfish, coelacanths and frogs: a scenario for the evolution of urea retention in fishes. Environ. Biol. Fishes 32, 199–218. doi:10.1007/BF00007454
- Guffey, S.C., Goss, G.G., 2014. Time course of the acute response of the North Pacific spiny dogfish shark (*Squalus suckleyi*) to low salinity. Comp. Biochem. Physiol. - A Mol. Integr. Physiol. 171, 9–15. doi:10.1016/j.cbpa.2014.02.004
- Gutteridge, A.N., Bennett, M.B., Huveneers, C., Tibbetts, I.R., 2011. Assessing the overlap between the diet of a coastal shark and the surrounding prey communities in a sub-tropical embayment. J. Fish Biol. 78, 1405–1422. doi:10.1111/j.1095-8649.2011.02945.x
- Haywood, G.P., 1973. Hypo-osmotic regulation coupled with reduced metabolic urea in the dogfish *Poroderma africanum*: An analysis of serum osmolarity, chloride, and urea. Mar. Biol. 23, 121–127. doi:10.1007/BF00389169
- Hazon, N., Wells, A., Pillans, R.D., Good, J.P., Anderson, W.G., Franklin, C.E., 2003. Urea based osmoregulation and endocrine control in elasmobranch fish with special reference to euryhalinity. Comp. Biochem. Physiol. - B Biochem. Mol. Biol. 136, 685–700. doi:10.1016/S1096-4959(03)00280-X

- Ip, Y.K., Chew, S.F., 2010. Ammonia production, excretion, toxicity, and defense in fish: A review. *Front. Physiol.* 1 OCT, 1–20. doi:10.3389/fphys.2010.00134
- Janech, M.G., Fitzgibbon, W.R., Nowak, M.W., Miller, D.H., Paul, R. V, Plath, D.W., 2006. Cloning and functional characterization of a second urea transporter from the kidney of the Atlantic stingray, *Dasyatis sabina*. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 291, R844–53. doi:10.1152/ajpregu.00739.2005
- Kajimura, M., 2004. Dogmas and controversies in the handling of nitrogenous wastes: The effect of feeding and fasting on the excretion of ammonia, urea and other nitrogenous waste products in rainbow trout. *J. Exp. Biol.* 207, 1993–2002. doi:10.1242/jeb.00901
- Kajimura, M., Walsh, P.J., Mommsen, T.P., Wood, C.M., 2006. The Dogfish Shark (*Squalus acanthias*) Increases both Hepatic and Extrahepatic Ornithine Urea Cycle Enzyme Activities for Nitrogen Conservation after Feeding. *Physiol. Biochem. Zool.* 79, 602–613. doi:10.1086/501060
- Kajimura, M., Walsh, P.J., Wood, C.M., 2008. The spiny dogfish *Squalus acanthias* L. maintains osmolyte balance during long-term starvation. *J. Fish Biol.* 72, 656–670. doi:10.1111/j.1095-8649.2007.01756.x
- Lauff, R.F., Wood, C.H., 1996. Respiratory gas exchange , nitrogenous waste excretion , and fuel usage during aerobic swimming in juvenile rainbow trout 501–509.
- Lauff, R.F., Wood, C.M., 1997. Effects of training on respiratory gas exchange , nitrogenous waste excretion , and fuel usage during aerobic swimming in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) 571, 566–571.
- Marshall, W.S., Grosell, M., 2006. Ion Osmoregulation , and Acid – Base Balance. *Physiol. Fishes* 177–230.
- Martin, R. aAdan, 2005. Conservation of freshwater and euryhaline elasmobranchs: a review. *J. Mar. Biol. Assoc. United Kingdom* 85, 1049–1073.
- Niv, Y.M.D., Fraser, G, M.M.D., 2002. The alkaline tide phenomenon. *J. Clin. Gastroenterol.* 35, 5–8.
- Pärt, P., Wright, P.A., Wood, C.M., 1998. Urea and Water Permeability in Dogfish (*Squalus acanthias*) Gills. *Comp. Biochem. Physiol. A* 119, 117–123.
- Piermarini, P.M., Evans, D.H., 2000. Effects of environmental salinity on Na(+)/K(+)-ATPase in the gills and rectal gland of a euryhaline elasmobranch (*Dasyatis sabina*). *J. Exp. Biol.* 203, 2957–2966.
- Piermarini, P.M., Evans, D.H., 1998. Osmoregulation of the Atlantic Stingray (*Dasyatis sabina*) from the Freshwater Lake Jesup of the St. Johns River, Florida. *Physiol. Zool.* 71, 553–560. doi:10.1086/515973
- Pillans, R.D., Good, J.P., Anderson, W.G., Hazon, N., Franklin, C.E., 2008. Rectal gland morphology of freshwater and seawater acclimated bull sharks *Carcharhinus leucas*. *J.*

- Fish Biol. 72, 1559–1571. doi:10.1111/j.1095-8649.2008.01765.x
- Pillans, R.D., Good, J.P., Anderson, W.G., Hazon, N., Franklin, C.E., 2005. Freshwater to seawater acclimation of juvenile bull sharks (*Carcharhinus leucas*): plasma osmolytes and Na^+/K^+ -ATPase activity in gill, rectal gland, kidney and intestine. J. Comp. Physiol. B. 175, 37–44. doi:10.1007/s00360-004-0460-2
- Rahmatullah, M., Boyde, T.R., 1980. Improvements in the determination of urea using diacetyl monoxime; methods with and without deproteinisation. Clin. Chim. Acta. 107, 3–9. doi:10.1016/0009-8981(80)90407-6
- Robertson, J.D., 1975. OSMOTIC CONSTITUENTS OF THE BLOOD PLASMA AND PARIETAL MUSCLE OF SQUALUS ACANTHIAS L. Biol. Bull. 148, 303–319. doi:10.2307/1540549
- Schooler, J.M., Goldstein, L., Hartman, S.C., Forster, R.P., 1966. Pathways of Urea Synthesis in the elasmobranch, *Squalus acanthias*. Comp. Biochem. Physiol. 18, 271–281.
- Secor, S.M., 2009. Specific dynamic action: A review of the postprandial metabolic response. J. Comp. Physiol. B Biochem. Syst. Environ. Physiol. 179, 1–56. doi:10.1007/s00360-008-0283-7
- Shuttleworth, T.J., 1988. Salt and Water Balance - External mechanisms, in: Shuttleworth, T.J. (Ed.), Physiology of Elasmobranch Fishes. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp. 171–200.
- Sims, D.W., Davies, S.J., 1994. Does specific dynamic action (SDA) regulate return of appetite in the lesser spotted dogfish, *Scyliorhinus canicula*? J. Fish Biol. 45, 341–348.
- Smith, H.W., 1931. The absorption and excretion of water and salts by the elasmobranch fishes. 1. Fresh water elasmobranchs. Am. J. Physiol. 98, 279–295.
- Speers-Roesch, B., Treberg, J.R., 2010. The unusual energy metabolism of elasmobranch fishes. Comp. Biochem. Physiol. - A Mol. Integr. Physiol. 155, 417–434. doi:10.1016/j.cbpa.2009.09.031
- Steele, S.L., Yancey, P.H., Wright, P.A., 2005. The Little Skate *Raja erinacea* Exhibits an Extrahepatic Ornithine Urea Cycle in the Muscle and Modulates Nitrogen Metabolism during Low-Salinity Challenge. Physiol. Biochem. Zool. 78, 216–226. doi:10.1086/427052
- Sulikowski, J.A., Treberg, J.R., Howell, W.H., 2003. Fluid regulation and physiological adjustments in the winter skate, *Leucoraja ocellata*, following exposure to reduced environmental salinities. Environ. Biol. Fishes 66, 339–348. doi:10.1023/A:1023918231020
- Tresguerres, M., Parks, S.K., Goss, G.G., 2007a. Recovery from blood alkalosis in the Pacific hagfish (*Eptatretus stoutii*): involvement of gill V-H^+ -ATPase and Na^+/K^+ -ATPase. Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol. 148, 133–41. doi:10.1016/j.cbpa.2007.03.032

- Tresguerres, M., Parks, S.K., Wood, C.M., Goss, G.G., 2007b. V-H⁺ -ATPase translocation during blood alkalosis in dogfish gills: interaction with carbonic anhydrase and involvement in the postfeeding alkaline tide. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 292, R2012-9. doi:10.1152/ajpregu.00814.2006
- van den Thillart, G., Kesbeke, F., 1978. Anaerobic production of carbon dioxide and ammonia by goldfish *Carassius auratus*. *Comp. Biochem. Physiol. Part A Physiol.* 59, 393–400. doi:10.1016/0300-9629(78)90185-8
- Verdouw, H., Van Echteld, C.J. A., Dekkers, E.M.J., 1978. Ammonia determination based on indophenol formation with sodium salicylate. *Water Res.* 12, 399–402. doi:10.1016/0043-1354(78)90107-0
- Walsh, P.J., Mommsen, T.P., 2001. Evolutionary considerations of nitrogen metabolism and excretion, in: Wright, P., Anderson, P. (Eds.), *Nitrogen Excretion*. Academic Press, pp. 1–30.
- White, W.T., Potter, I.C., 2004. Habitat partitioning among four elasmobranch species in nearshore, shallow waters of a subtropical embayment in Western Australia. *Mar. Biol.* 145, 1023–1032. doi:10.1007/s00227-004-1386-7
- Wood, C., Part, P., Wright, P., 1995. Ammonia and urea metabolism in relation to gill function and acid-base balance in a marine elasmobranch, the spiny dogfish (*Squalus acanthias*). *J. Exp. Biol.* 198, 1545–58.
- Wood, C.M., 2001. Influence of feeding, exercise, and temperature on nitrogen metabolism and excretion, in: Wright, P., Anderson, P. (Eds.), *Nitrogen Excretion*. Academic Press, pp. 201–238.
- Wood, C.M., Bucking, C., Fitzpatrick, J., Nadella, S., 2007. The alkaline tide goes out and the nitrogen stays in after feeding in the dogfish shark, *Squalus acanthias*. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 159, 163–70. doi:10.1016/j.resp.2007.06.008
- Wood, C.M., Bucking, C., Fitzpatrick, J., Nadella, S., 2007. The alkaline tide goes out and the nitrogen stays in after feeding in the dogfish shark, *Squalus acanthias*. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 159, 163–170. doi:10.1016/j.resp.2007.06.008
- Wood, C.M., Giacomini, M., 2016. Feeding through your gills and turning a toxicant into a resource: how the dogfish shark scavenges ammonia from its environment. *J. Exp. Biol.* 219, 3218–3226. doi:10.1242/jeb.145268
- Wood, C.M., Kajimura, M., Mommsen, T.P., Walsh, P.J., 2005. Alkaline tide and nitrogen conservation after feeding in an elasmobranch (*Squalus acanthias*). *J. Exp. Biol.* 208, 2693–705. doi:10.1242/jeb.01678
- Wood, C.M., Kajimura, M., Mommsen, T.P., Walsh, P.J., 2005. Alkaline tide and nitrogen conservation after feeding in an elasmobranch (*Squalus acanthias*). *J. Exp. Biol.* 208, 2693–2705. doi:10.1242/jeb.01678
- Wood, C.M., Walsh, P.J., Kajimura, M., McClelland, G.B., Chew, S.F., 2010. The influence

- of feeding and fasting on plasma metabolites in the dogfish shark (*Squalus acanthias*). *Comp. Biochem. Physiol. - A Mol. Integr. Physiol.* 155, 435–444. doi:10.1016/j.cbpa.2009.09.006
- Wosnick, N., Freire, C.A., 2013. Some euryhalinity may be more common than expected in marine elasmobranchs: The example of the South American skate *Zapteryx brevirostris* (Elasmobranchii, Rajiformes, Rhinobatidae). *Comp. Biochem. Physiol. - A Mol. Integr. Physiol.* 166, 36–43. doi:10.1016/j.cbpa.2013.05.002
- Wright, P., 1995. Review Nitrogen Excretion : Three End Products , Many Physiological Roles. *J. Exp. Biol.* 281, 273–281.
- Wright, P.A., Part, P., Wood, C.M., 1995. Ammonia and urea excretion in the tidepool sculpin (*Oligocottus maculosus*): sites of excretion , effects of reduced salinity and mechanisms of urea transport 14, 111–123.
- Wright, P.A., Wood, C.M., 2016. Regulation of ions, acid-base and nitrogen waste excretion in elasmobranchs, in: Shadwick, R.E., Farrell, A.P., Brauner, C.J. (Eds.), *Physiology of Elasmobranch Fishes - Internal Processes*. Academic Press, San Diego, pp. 280–247.
- Wright, P.A., Wood, C.M., 2012. Seven things fish know about ammonia and we don't. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 184, 231–240. doi:10.1016/j.resp.2012.07.003
- Yamaguchi, Y., Takaki, S., Hyodo, S., 2009. Subcellular distribution of urea transporter in the collecting tubule of shark kidney is dependent on environmental salinity. *J. Exp. Zool. Part A Ecol. Genet. Physiol.* 311, 705–718. doi:10.1002/jez.558
- Yancey, P.H., 2016. Organic osmolytes in elasmobranchs, in: Shadwick, R.E., Farrell, A.P., Brauner, C.J. (Eds.), *Physiology of Elasmobranch Fishes - Internal Processes*. Academic Press, San Diego, pp. 222–279.
- Zall, D.M., Fisher, D., Garner, M.Q., 1956. Photometric Determination of Chlorides in Water. *Anal. Chem.* 28, 1665–1668. doi:10.1021/ac60119a009

Tabela 1

Tabela 1. Parâmetros bioquímicos plasmáticos de jovens de *Chiloscyllium punctatum* aclimatados em duas salinidades (32 e 20ppm) e mantidos sob regime normal de alimentação e privação alimentar por 7 dias. Letras diferentes representam diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre os animais mantidos em diferentes regimes alimentares em uma mesma salinidade. Asteriscos (*) representam diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$) entre os animais mantidos em um mesmo regime alimentar entre as duas salinidades testadas

Salinidade	Tratamento	Glicose	Proteínas	Osmolaridade	Ureia	Amônia	[Na]	[Cl]
32ppm	Alimentados	20,96±1,84 a	39,24±3,57	1029,12±92,93	442,51±20,64	162,21±15,07	233,12 ±17,83	251,02±11.15 a
	Jejum	34,92±1,97 b	33,50±2,33	978,71±36,30	385,25±22,06	134,32±13,77	231,77±11,21	222,49±5,28 b
20ppm	Alimentados	19,59±1,84	23,99±1,60*	821,62±89,78*	135,28±20,64*	158,51±17,78	205,59±12,90	164,04±12,08*
	Jejum	19,69±1,84*	20,98±1,36*	824,87±36,48	149,92±20,64*	135,03±8,78	214,37±3,37	141,76±4,59*

Figura 1

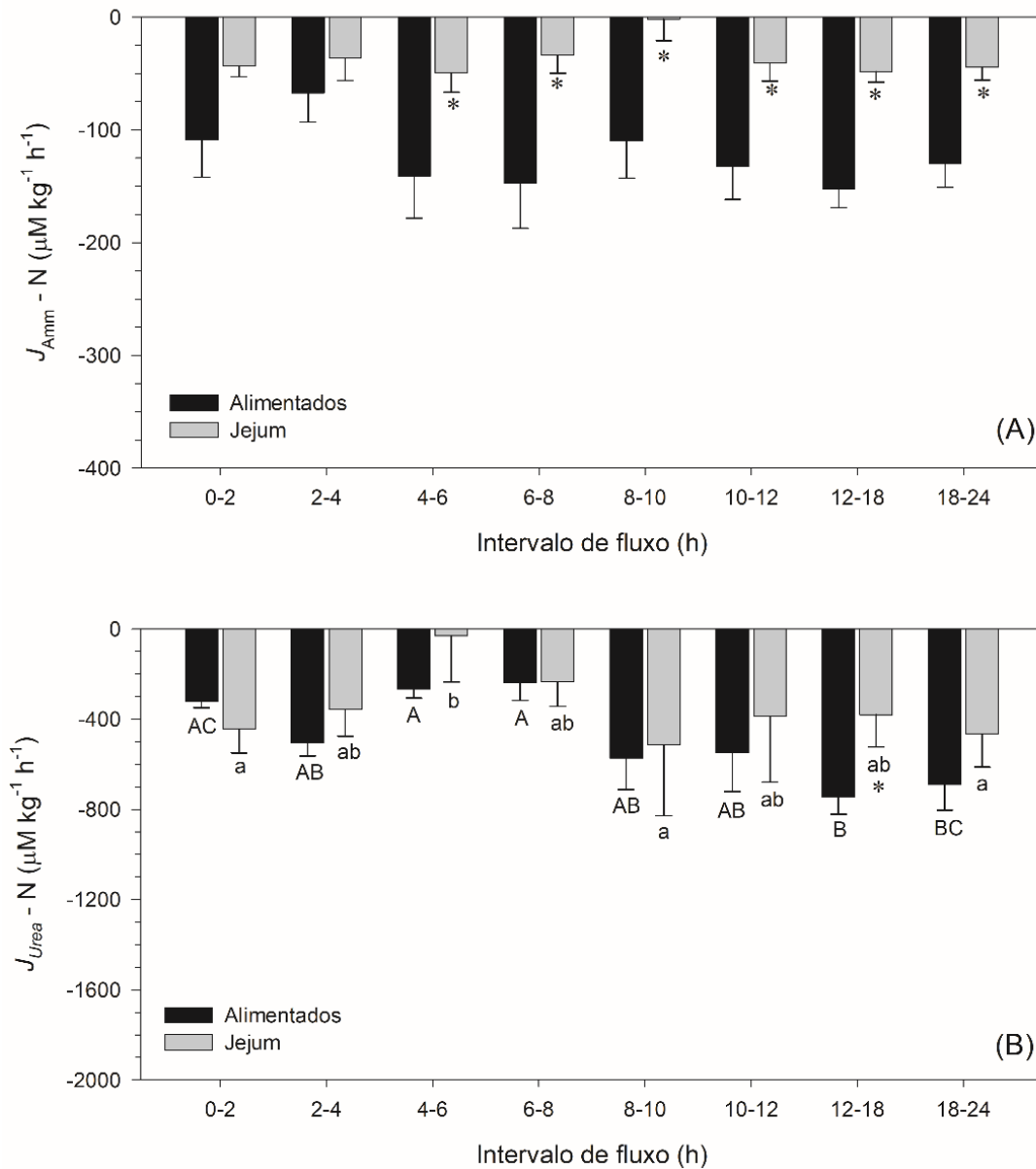


Figura 1. Taxas de excreção de amônia (J_{Amm-N}) (A) e ureia ($J_{ureia-N}$) (B) jovens de *Chiloscyllium punctatum* aclimatados em 32ppm e mantidos sob regime normal de alimentação e privação alimentar por 7 dias. Letras diferentes representam diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre os animais mantidos em diferentes regimes alimentares em uma mesma salinidade. Asteriscos (*) representam diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$) entre os animais mantidos em um mesmo regime alimentar entre as duas salinidades testadas

Figura 2

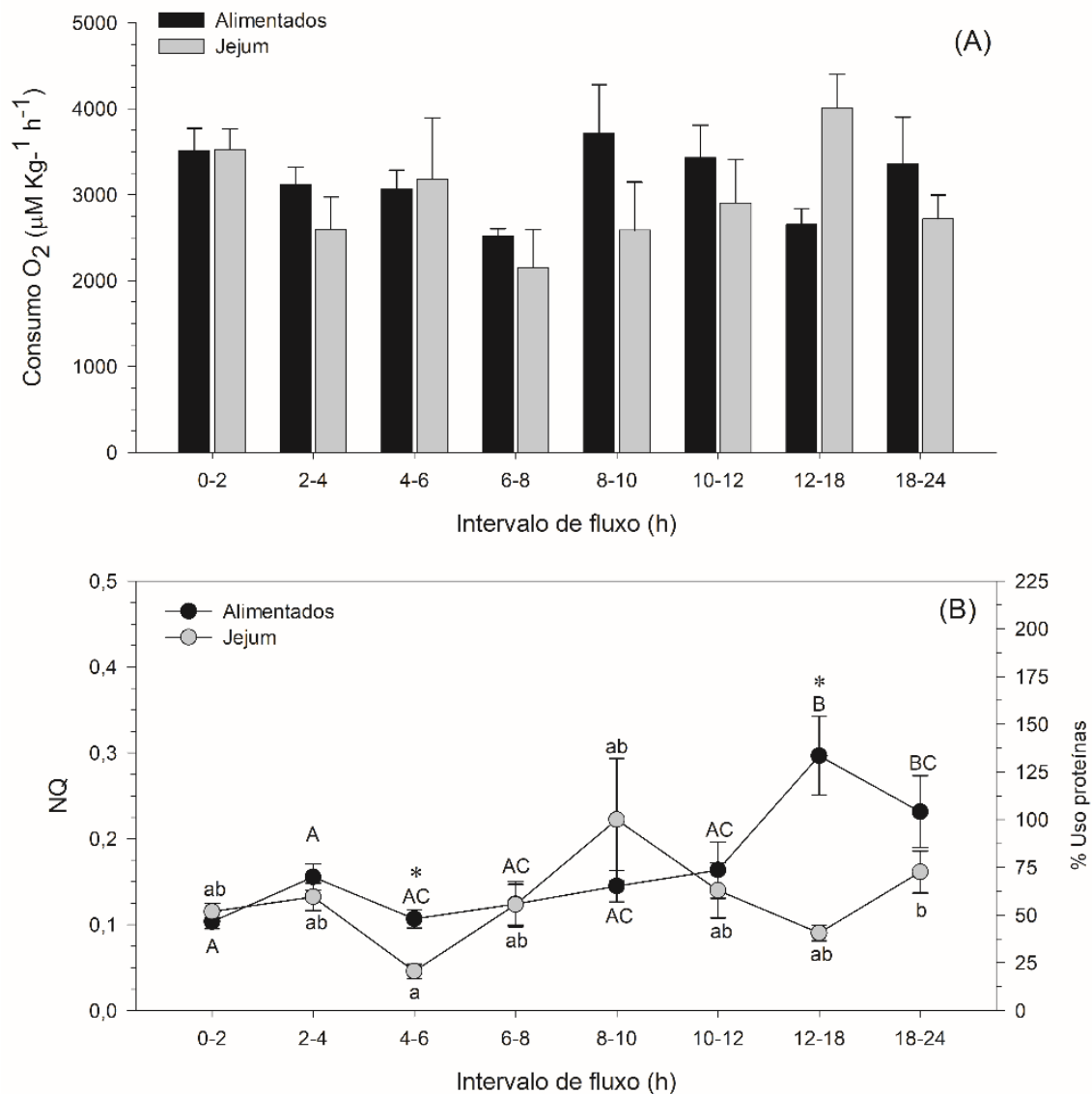


Figura 2. Taxas de consumo de oxigênio (MO_2) (A) e coeficiente de nitrogênio e porcentagem no uso de proteínas (B) pelos jovens de *Chiloscyllium punctatum* aclimatados em 32ppm e mantidos sob regime normal de alimentação e privação alimentar por 7 dias. Letras diferentes representam diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre os animais mantidos em diferentes regimes alimentares em uma mesma salinidade. Asteriscos (*) representam diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$) entre os animais mantidos em um mesmo regime alimentar entre as duas salinidades testadas

Figura 3

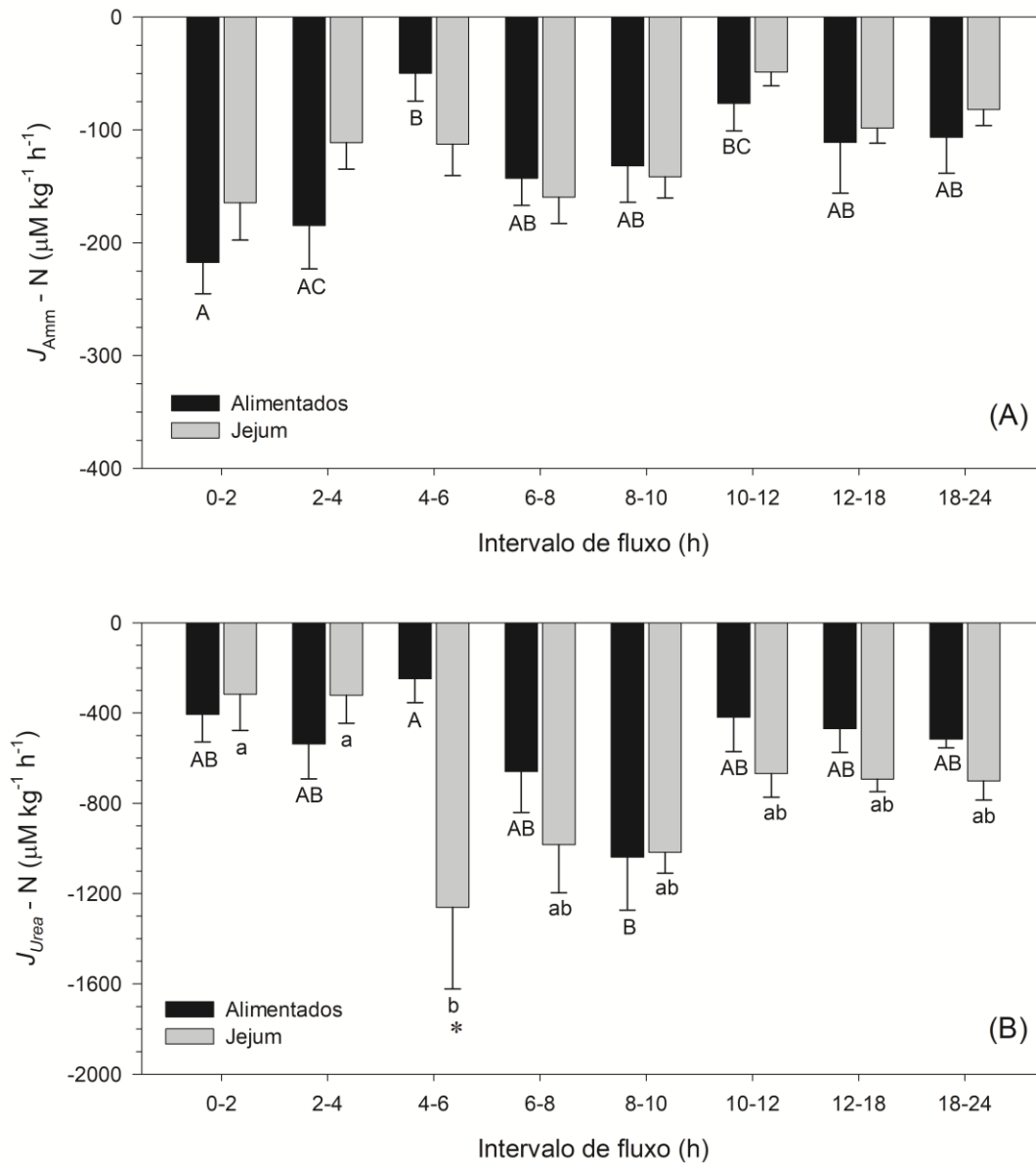


Figura 3. Taxas de excreção de amônia (J_{Amm-N}) (A) e ureia (J_{ureia_N}) (B) jovens de *Chiloscyllium punctatum* aclimatados em 20ppm e mantidos sob regime normal de alimentação e privação alimentar por 7 dias. Letras diferentes representam diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre os animais mantidos em diferentes regimes alimentares em uma mesma salinidade. Asteriscos (*) representam diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$) entre os animais mantidos em um mesmo regime alimentar entre as duas salinidades testadas

Figura 4

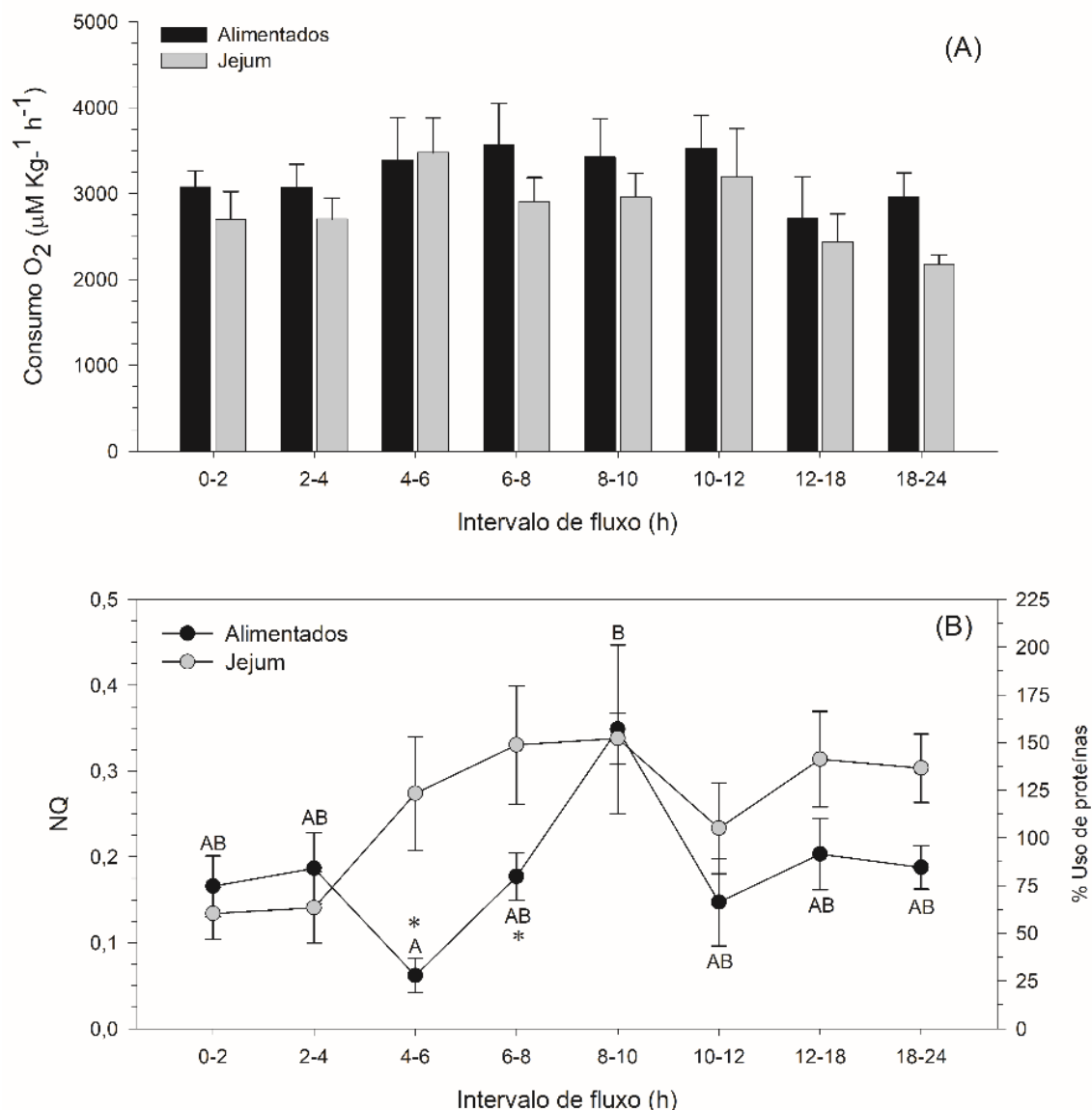


Figura 4. Taxas de consumo de oxigênio (MO_2) (A) e coeficiente de nitrogênio e porcentagem no uso de proteínas (B) pelos jovens de *Chiloscyllium punctatum* aclimatados em 32ppm e mantidos sob regime normal de alimentação e privação alimentar por 7 dias. Letras diferentes representam diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre os animais mantidos em diferentes regimes alimentares em uma mesma salinidade. Asteriscos (*) representam diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$) entre os animais mantidos em um mesmo regime alimentar entre as duas salinidades testadas