

**Análise da expressão gênica da Na^+/K^+ -ATPase e dos
parâmetros fisiológicos no siri *Callinectes danae* submetido a
cenários futuros de acidificação oceânica em laboratório**

Andressa Cristina Ramaglia da Mota

Profº. Drº. Leandro M. de Castro
Orientador

Profª. Drª. Alessandra da S. Augusto
Co-orientadora

São Vicente, SP
2018

Análise da expressão gênica da Na^+/K^+ -ATPase e dos parâmetros fisiológicos no siri *Callinectes danae* submetido a cenários futuros de acidificação oceânica em laboratório

Andressa Cristina Ramaglia da Mota

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

Profº. Drº. Leandro M. de Castro
Orientador

Profª. Drª. Alessandra da S. Augusto
Co-orientadora

São Vicente, SP
2018

595.3 Ramaglia, Andressa Cristina da Mota

R140 Análise da expressão gênica da Na^+/K^+ -ATPase e dos parâmetros fisiológicos no siri *Callinectes danae* submetido a cenários futuros de acidificação oceânica em laboratório / Andressa Cristina Ramaglia da Mota. - São Vicente, 2018.

51 p.: il, figs., gráfs.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Campus do Litoral Paulista - Instituto de Biociências.

Orientador: Leandro Mantovani de Castro

1. Invertebrados. 2. Crustaceo decapode. 3. *Callinectes danae*. 4. Fisiologia. 5. Acidificação oceânica. I. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca da UNESP

Instituto de Biociências - Campus do Litoral Paulista

Dedicatória

Este trabalho é dedicado às famílias Ramaglia e Mota, em especial para:
Ana Teresa Francisca Ramaglia da Mota
Ana Júlia Ramaglia da Mota
André Vinicius Ramaglia da Mota
Armando Isaias Ferreira da Mota

Agradecimento

Agradeço primeiramente a Deus e a nossa Senhora que me acompanharam passo a passo desta minha trajetória, estando comigo diante todas as dificuldades e desafios encontrados nesse projeto.

Aos meus pais Ana Teresa Francisca Ramaglia da Mota e Armando Isaias Ferreira da Mota que são os responsáveis por me tornar o que sou hoje em dia, sempre me ensinando a ser uma mulher forte, digna e muito honrosa. Aos meus irmãos por fazeres parte de mim e sempre estarem juntos.

A Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho- Instituto de Biociências-Campus do Litoral Paulista, pelas oportunidades de crescimento nos anos vivenciados em suas dependências.

Aos professores doutores Wagner Valente responsável pelo Laboratório de Aquicultura e Sustentabilidade, a professora Tania Marcia Costa responsável pelo LABECOM (Laboratório de ecologia e comportamento animal) que auxiliaram quando precisei de materiais para a realização do trabalho. A Universidade de São Paulo (USP) campus Ribeirão Preto e ao professor doutor Jonh McNamara responsável pelo laboratório de fisiologia de crustáceos, onde pude ler as minhas amostras de hemolinfa e ao campus de São Paulo, no Instituto de Biociências, Laboratório do professor Emer Suavino, onde me receberam muito bem para a realização da parte molecular do trabalho.

Em especial agradeço a professora doutora Alessandra da Silva Augusto que esteve comigo desde os meus primeiros trabalhos e ao professor doutor Leandro Mantovani de Castro, que teve muita paciência e dedicação a me ensinar a trabalhar com a parte molecular, sem seu auxílio provavelmente esse trabalho não sairia do papel.

Aos meus colegas de laboratório: Isabel Andrade, Julia Raquel, Fernanda David, Carolina Costa, Paulo Mantoan, Tayna Strefezza, Dalton Belmudes, Marcel Miranda, Douglas Tenório, Gustavo Novaes.

Aos meus amigos pessoais que sempre estão dispostos a me auxiliarem e a escutarem: Caroline Fabri, Fernanda Custodio, Lucas Guedes, Juan Pardo, Priscila Granado, Murilo Rainha, Michelle dos Santos Batista, Laís Menezes, Rodrigo Zago, Nádia Zago, Gabriela Marchioreto, Camila Mizzi, Juli Moura, Marcilia Guiller, Virginia Carrara, Emanuelle Borges.

E para finalizar agradeço ao meu namorado Raphael Ferreira Gonçalves, pelo apoio, carinho, amor e paciência diante desse período.

Sou um pouco de todos que conheci, um pouco dos lugares que fui um pouco
das saudades que deixei e sou muito das coisas que gostei.
Antoine de Saint-Exupéry

Resumo	3
1. Introdução	4
<i>Respostas fisiológicas dos animais marinhos frente a alterações de pH</i>	5
<i>Controle fisiológico em crustáceos</i>	7
<i>O papel da Na⁺/K⁺-ATPase na osmorregulação e equilíbrio ácido base</i>	9
<i>O siri Callinectes danae</i>	12
2. Objetivos	13
3. Materiais e métodos	13
3.1 Coletas dos Animais	13
3.2 Exposição dos Animais a Diferentes pHs e Salinidades	14
3.3 Avaliação dos Parâmetros Fisiológicos	15
3.3.1 Consumo de Oxigênio	15
3.3.2 Excreção de Amônia	16
3.3.3 Substrato energético oxidado	16
3.3.4 Avaliação do Índice Hepatossomático	16
3.3.5 Obtenção da hemolinfa e avaliação da osmolalidade e concentração de Na ⁺ e Cl ⁻	16
3.4 Análise da expressão gênica do transportador de membrana Na ⁺ /K ⁺ -ATPase ..	17
3.4.1 Extração de RNA total do epitélio branquial	17
3.4.2 Quantificação da concentração de RNA total e Transcrição reversa	17
3.4.3 qRT-PCR	17
3.5 Análises Estatísticas	18
4. Resultados	18
4.1 Consumo de Oxigênio	18
4.2 Excreção de Amônia	20
4.3 Razão O:N	22
4.4 Índice hepatossomático	22
4.5 Avaliação da capacidade osmo- e ionoregulatória	23
4.5.2 Concentração de Cl ⁻ na hemolinfa	24
4.5.2 Concentração de Na ⁺ na hemolinfa	25
4.6 Análises moleculares	26
4.6.1 Teste da eficiência de amplificação dos oligonucleotídeos para os genes Na ⁺ /K ⁺ -ATPase, RPL10, β-actina e Arginina quinase e validação dos genes normalizadores da quantificação relativa por PCR em tempo real	26
4.6.2. Análise da transcrição do gene da subunidade α da (Na ⁺ , K ⁺)-ATPase	29

5. Discussão	31
5.1 Metabolismo	31
5.2 Excreção de Amônia	32
5.3 Razão O:N	33
5.4 Índice Hepatosomático	34
5.5 Capacidade osmo- e ionorregulatória	35
5.6 Análise da transcrição do gene da subunidade α da (Na⁺, K⁺)-ATPase em experimentos simulando a previsão futura de acidificação oceânica em diferentes salinidades	36
6. Considerações Finais	37
7. Referência Bibliográfica.....	38
Anexo I	49

RESUMO

Acidificação oceânica, processo resultante das emissões de gás carbônico (CO_2) na atmosfera pelas atividades de natureza antrópica, vem causando nas últimas décadas uma modificação no equilíbrio químico do sistema bicarbonato/carbonato e consequentemente uma diminuição do pH dos oceanos. Estimativas apontam que esta diminuição pode ser de 0,7 unidades até ano de 2300, o que pode afetar o crescimento, reprodução e até mesmo a sobrevivência das espécies. Nesse sentido, são necessários estudos que avaliem o impacto da acidificação oceânica ao nível fisiológico e molecular nas diferentes espécies marinhas. O siri *Callinectes danae* é um importante recurso ecológico e econômico da Região da Baixada Santista e habitante de diferentes faixas de salinidade. O presente estudo avaliou os efeitos da acidificação oceânica no siri *C. danae* sobre um conjunto de parâmetros fisiológicos (consumo de oxigênio, excreção de amônia, razão O:N, índice hepatossomático e capacidade osmo-e ionorregulatória da hemolinfa), e a expressão gênica da Na^+/K^+ -ATPase, enzima importante no processo de osmorregulação e equilíbrio ácido base. Os animais foram mantidos em diferentes salinidades (20, 25, 30, 35 e 40) e nos pHs 8,0 (controle) e 7,3 (acidificado) por um período de três e trinta dias. Foi observado aumento no consumo de oxigênio nas salinidades 25 (3 dias), 20 e 40 (30 dias) provavelmente devido a uma maior necessidade energética para a manutenção de sistemas relacionado a regulação ácido-base. Também foi observada depressão metabólica na salinidade de 30 (30 dias). A excreção de amônia sofreu redução nas salinidades 30 (3 dias), 25, 30 e 35 (30 dias) possivelmente devido a competição entre os transportadores Na^+/H^+ e $\text{Na}^+/\text{NH}_4^+$. O índice hepatossomático teve aumento nas salinidades de 30 (3 dias) e 40 (30 dias) devido a uma possível necessidade acumulo de reservas em situações estressantes. O substrato energético e o padrão osmorregulatório permaneceram inalterados em todos os tratamentos. Já a concentração de Cl^- e Na^+ foram reduzidas nas salinidades de 25 e 35 (30 dias), provavelmente devido a alguma alteração nos seus transportadores. Molecularmente, foi observada uma regulação da expressão da Na^+/K^+ ATPase, com diminuição nas salinidades de 35 e 40 (3 dias), e posterior aumento no período de 30 dias. O trabalho foi o primeiro a avaliar os parâmetros fisiológicos e moleculares de *C. danae* em diferentes salinidades. Os animais que permaneceram por mais tempo sobre a exposição de alta pCO_2 são mais

afetados negativamente do que os animais que foram expostos em 3 dias. As alterações observadas podem indicar que apesar de *C. danae* ser um animal eurialino e habitar diferentes ambientes, a acidificação oceânica pode alterar seus padrões fisiológicos e moleculares, tirando os organismos de sua homeostase, tendo consequências no crescimento, no desenvolvimento e na distribuição da espécie.

Palavras Chave: Sinergia, Variação da salinidade, crustáceos, mudanças climáticas, osmorregulação

1. Introdução

A acidificação oceânica, resultado do aumento da concentração do dióxido de carbono (CO_2) na atmosfera terrestre, possivelmente devido às ações antrópicas, como queima de combustíveis fósseis e florestas agrícolas, foi intensificada a partir do início da Revolução Industrial, passando de 280 ppm antes da revolução para 400 ppm atualmente (Seibel and Walsh, 2003; Widdicombe and Spicer, 2008; IPCC 2013 e 2014; Le Quéré et al., 2016). Aproximadamente um terço das emissões de carbono é absorvido passivamente pelos oceanos, representando um dos principais reservatórios deste elemento. Caso essa absorção oceânica não ocorresse a concentração de dióxido de carbono da atmosfera seria 55% maior (Sabine et al., 2004). O CO_2 se difunde na superfície oceânica produzindo prótons (H^+) e íons bicarbonato (HCO_3^-), que em concentrações elevadas podem causar uma queda no pH da água (Widdicombe and Spicer, 2008; Doney et al., 2009).

Estimativas futuras sugerem o pH da superfície da água pode ser reduzido de 0,1 a 0,4 unidade antes de 2100 e 0,7 unidade até 2300, podendo atingir níveis até 1900 ppm de dióxido de carbono. Tais reduções são 100 vezes mais rápidas do que as descritas nos últimos milênios (Caldeira and Wickett, 2005; IPCC, 2013; Hoegh- Guldberg et. al. 2016).

Segundo dados do Painel Intergovernamental de Mudanças Climáticas (IPCC, 2013 e 2014), a acidificação oceânica é considerada uma das alterações ambientais mais relevantes, porque a alteração da química da água do mar e dos ciclos biogeoquímicos de muitos elementos e compostos podem provocar efeitos adversos na estrutura e funcionalidade da biodiversidade e dos ecossistemas marinhos e na biologia dos animais interferindo direta ou indiretamente na sobrevivência, crescimento, desenvolvimento e reprodução das espécies (Fabry et al., 2008; Doney et al., 2009; Hutchins et al., 2009; Kroeker et al., 2010; Wittmann et al., 2013; Knapp et al., 2015; Sui et al., 2016). Contudo,

os efeitos da acidificação oceânica são difíceis de serem previstos, devido à complexidade dos sistemas biológicos, com variações de respostas entre diferentes habitats, populações, espécies e até mesmo entre indivíduos das mesmas espécies e a diversidade de processos que podem ser afetados (Pane and Barry, 2007; Fabry et al., 2008; Pistevo et al., 2011; Carter et al., 2013; Cooper et al., 2016).

Alterações no pH podem comprometer equilíbrio ácido-base, osmorregulação, excreção, taxa de ingestão, balanço energético e outros mecanismos fisiológicos (Pörtner et al., 2004; Orr et al., 2005; Spicer et al., 2007; Munday et al., 2009; Dixon et al., 2010; Findlay et al., 2010). Embora os trabalhos sobre o a acidificação oceânica tenham aumentado, os efeitos ainda são conhecidos em poucas espécies marinhas, com apenas alguns estudos em diferentes táxons, populações e espécies (Pane and Barry 2007; Kroeker et al., 2010; Lewis et al., 2013; Kroeker et al., 2013; Cripps et al., 2014).

Respostas fisiológicas dos animais marinhos frente a alterações de pH

As alterações ambientais seriam a principal causa de ruptura do meio intracelular, tecidual e das funções dos órgãos se não fosse atuação dos sistemas de controle fisiológicos que são modulados para a manutenção das condições relativamente estáveis do meio interno dos animais. A evolução desses sistemas de manutenção da homeostasia, fenômeno que ocorre quase que universalmente em todos os seres vivos, parece ser o fator primordial para a invasão e sobrevivência em ambientes hostis aos processos vitais. Os sistemas fisiológicos funcionam de maneira integrada e mantêm o meio interno razoavelmente constante sob condições ideais de pH, temperatura, salinidade, oxigênio, etc (Randall et al., 2000). Assim, alguns organismos que são acostumados a flutuações naturais de diversas variáveis podem anular ou diminuir os efeitos causados pela acidificação oceânica (Seibel, 2003; Thomsen and Melzner, 2010; Lewis et al., 2013). No copépoda *Pseudocalanus acuspes*, por exemplo, a acidificação oceânica não causou nenhuma modificação no processo natatório (Almén et al., 2017). Em outra espécie de copépoda *Tigriopus japonicus mori* a exposição ao pH reduzido, também não causou alterações quando avaliados a taxa de alimentação e na expressão de proteínas de choque térmico (Li et al., 2015). Larvas de

bacalhau *Gadus morhua* submetidas à acidificação oceânica não apresentaram diferenças na velocidade de natação (Maneja et al., 2012).

Entretanto, níveis subótimos variáveis ambientais podem romper as reações químicas básicas e causar alterações das funções fisiológicas. O pH e a temperatura adequados, por exemplo, são essenciais para o funcionamento celular (Putnam and Roos, 1997; Pan et al., 2007). A diminuição do pH da água do mar pode afetar os organismos por meio do aumento do CO₂ e/ou da redução do pH (Wood et al., 2008). Por exemplo, em uma espécie de krill do Pacífico, *Euphausia pacifica*, a exposição à alta pCO₂ após 24 h ou 21 dias levou a uma diminuição da taxa metabólica e a redução do crescimento (Cooper et al., 2016). Um estudo sobre a interação presa/predador feito com molusco *Mya arenaria* e com siri *Callinectes sapidus* também demonstrou um efeito negativo do aumento da pCO₂, já que ambas as espécies diminuíram sua capacidade de defesa e caça respectivamente (Galspie et al., 2017). Dissanayake and Ishimatsu (2011) verificaram que no camarão *Metapenaeus joyneri* a hipercapnia causa redução da capacidade osmorregulatória, atividade natatória e metabolismo, e consequentemente, elevada taxa de mortalidade. Holman et al., (2004) e Burggren et al., (2005) observaram que a sinergia entre hipóxia e hipercapnia no siri *C. sapidus* e no camarão *Litopenaeus vannamei* reduz a eficiência do sistema imunológico. No caranguejo aranha *Hyas araneus* mudanças do pH extracelular provocam alterações de genes que estão relacionados ao metabolismo e a regulação ácido-base (Harms et al., 2014).

As diferenças de respostas entre os grupos acabam tornando algumas espécies mais resilientes que outras, dando a essas uma maior capacidade de adaptação. Espécies com alta capacidade natatória e mecanismos de controle de pH intracelular e extracelular provavelmente sofrerão menos impactos com as alterações ambientais (Kroeker et al., 2010; Carter et al., 2013).

Adicionalmente, a acidificação dos oceanos também pode estar acompanhada de mudanças climáticas e/ou alterações locais, como a poluição, o que torna imprescindível o estudo de múltiplos fatores e habitats, pois os mesmos interferem diretamente nas respostas biológicas, podendo agravar ou reduzir os efeitos de apenas uma variável (Reynaud et al., 2003; Findlay et al. 2008; Munday et al. 2009).

Com os exemplos citados anteriormente, podemos perceber que há uma complexidade no ambiente e nos organismos, fazendo com que as respostas desencadeadas pelas alterações ambientais possam ser diferentes. Assim, são necessários estudos em diversas espécies, para uma avaliação mais completa e que permita responder a diversas lacunas a respeito dos impactos das mudanças globais sobre a vida e o ambiente marinho.

Controle fisiológico em crustáceos

Dentre os mecanismos fisiológicos e moleculares que podem ser investigados quanto ao efeito da acidificação oceânica, a capacidade osmorregulatória e os seus transportadores ganham um notável destaque, pois dão uma dimensão de como os organismos estão sendo afetados, uma vez que estão diretamente associados à distribuição das espécies na natureza.

A osmorregulação permite que os organismos consigam controlar o teor de água e osmolitos intra e extracelular, mantendo relativamente estável a concentração osmótica dos seus fluidos (Pequeux, 1995). A regulação osmótica e iônica ocorre por meio de mudanças na permeabilidade da superfície do corpo a íons e água e por mecanismos de absorção (meio hiposmótico) ou secreção de sal (meio hiperosmótico) que se localizam principalmente no epitélio branquial (Mantel and Farmer, 1983; McNamara and Torres, 1999; Freire et al., 2008; McNamara and Farias 2012). Os crustáceos apresentam diversos tipos de padrões osmorregulatórios. Podem ser desde estenoalinos, os quais suportam uma pequena variação na salinidade do meio externo, até eurialinos, os quais suportam uma ampla variação de salinidade (Pequeux, 1995; Randall et al., 2000). Também podem ser desde osmoconformadores, os quais mantêm a osmolalidade da sua hemolinfa próxima a do meio em que estão inseridos, até osmorreguladores, mantendo a osmolalidade da sua hemolinfa relativamente estável independentemente das variações do meio externo (Randall et al., 2000).

A regulação osmótica e iônica é formada por dois processos principais: a Regulação Isosmótica Intracelular, responsável pela manutenção do volume e composição do meio intracelular e a Regulação Anisosmótica Extracelular, responsável pela manutenção da osmolalidade e da composição da hemolinfa (Augusto et al., 2007; Faria et al., 2011;

Lignot and Charmantier, 2015). A Regulação Anisomótica Extracelular ocorre através de mudanças na permeabilidade das superfícies do corpo a íons e água, e por mecanismos de absorção (meio hiposmótico) ou secreção de sal (meio hiperosmótico) que se localizam nos epitélios de interface entre o organismo e o meio externo (Mantel and Farmer, 1983, McNamara and Torres, 1999). Quanto maior a eficiência da Regulação Anisomótica Extracelular, menor será a variação da osmolalidade da hemolinfa e, maior a proteção das células e dos tecidos à variação no seu volume (Freire et al., 2008).

Alguns autores conseguiram identificar proteínas relacionadas diretamente em órgãos osmorregulatórios como as brânquias os processos osmorregulatórios, devido às alterações nas expressões e/ou atividades das mesmas, em animais submetidos a mudanças de salinidades (Saez et al., 2009; Belli et al., 2009). Adicionalmente, as brânquias dos crustáceos são órgãos multifuncionais envolvidos com a osmorregulação, controle do pH, excreção nitrogenada e respiração e a alteração de uma dessas funções pode reverberar sobre as demais. Além disso, foi verificado em algumas espécies como caranguejo *Eriocheir sinensis*, *Pachygrapsus marmoratus*, que as brânquias anteriores são utilizadas para o processo de respiração, enquanto as posteriores são mais utilizadas no processo de osmorregulação (Barra et al., 1983; Pierrot et al., 1995; Lin et al., 2004).

Os mecanismos da Regulação Anisomótica Extracelular são intermediados pela atividade de enzimas como Na^+/K^+ ATPase e anidrase carbônica (Figuras 1A e 1B).

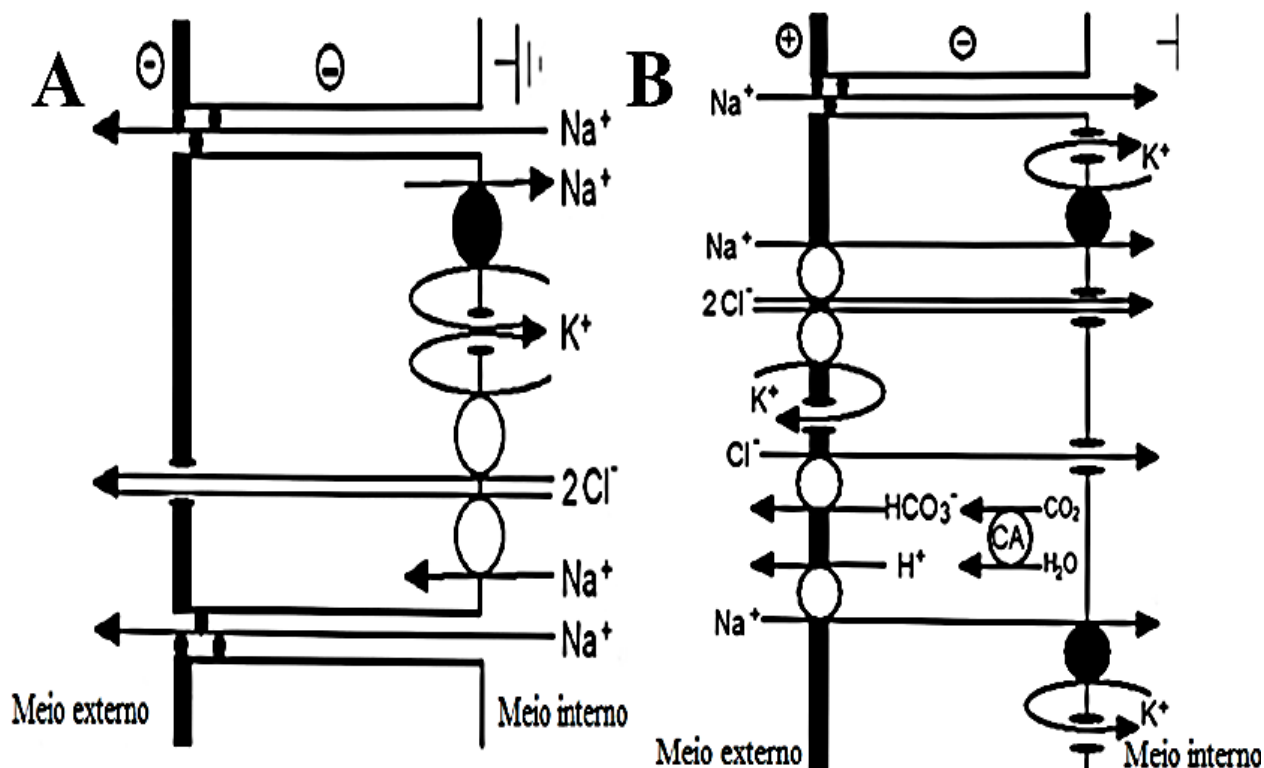


Figura 1. A: meio hiperosmótico (secreção de sal), mecanismos de Regulação Anisomótica Extracelular em meio hiperosmótico. A entrada de NaCl nas células ocorre através da membrana basolateral. O co-transporte de $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ é energizado pela gradiente de concentração de Na^+ gerado pela Na^+/K^+ ATPase basolateral. Figura 1 B: meio hiposmótico (absorção de sal), mecanismo de absorção de NaCl. Mecanismo de Regulação Anisomótica Extracelular em meio hiposmótico. Regulação da atividade da Na^+/K^+ ATPase. Os substratos celulares para estes trocadores são fornecidos através de hidratação do CO_2 catalisada pela anidrase carbônica (Modificadas de Freire, et al., 2008).

O papel da Na^+/K^+ ATPase na osmorregulação e equilíbrio ácido base

A regulação da osmolalidade da hemolinfa nas brânquias é intermediada pela atividade da Na^+/K^+ ATPase que é responsável pelo transporte de íons de Na^+ do citoplasma das células epiteliais para a hemolinfa e dos íons de K^+ da hemolinfa, para o citoplasma celular (Towle and Weihrauch, 2001). A Na^+/K^+ ATPase, ou bomba de sódio é uma proteína integral de membrana que utiliza a energia proveniente da hidrólise do fosfato terminal da molécula de ATP para transportar três Na^+ para o meio extracelular e dois K^+ para o meio intracelular (Kaplan, 2002; Jorgensen et al., 2003). A Na^+/K^+ ATPase está localizada nas membranas basolaterais das células e é responsável por criar um gradiente eletroquímico

utilizado por transportadores ativos secundários (como Na^+/H^+ e $\text{Na}^+/\text{K}^+ / 2\text{Cl}^-$) e canais aniônicos (Na^+ , K^+ e Cl^-) (Cameron, 1978; Henry et al., 2012). A Figura 2 mostra que a absorção de sais no epitélio branquial pode ocorrer também em epitélios responsáveis pela regulação ácido-base do fluido extracelular (Freire et al., 2008). Enquanto a Figura 2A mostra uma célula secretora de ácido que aumenta sua atividade diante de uma acidose extracelular, a Figura 2B mostra uma célula secretora de base diante de alcalose. Portanto, alterações no funcionamento dessas células podem alterar também o transporte de sais. Essa enzima é altamente induzida por mudanças tanto de salinidade quanto de pH nas brânquias de crustáceos decápodes (Luquet et al., 2005; Wang et al., 2012; Han et al., 2015). O aumento na atividade da Na^+/K^+ ATPase é atribuído a um aumento na subunidade do mRNA, de proteínas ou de ambos (Lin, et al., 2006).

No siri *C. danae* a enzima Na^+/K^+ ATPase das brânquias posteriores foi a primeira a ser descrita com dois lugares distintos de hidrólise de ATP, sendo estimulada pelos íons NH_4^+ e K^+ (Massui et al., 2002), uma vez que as brânquias são órgãos multifuncionais e são responsáveis pelos processos de osmorregulação e excreção em crustáceos (Pequeux, 1995; Weihrauch et al., 1999).

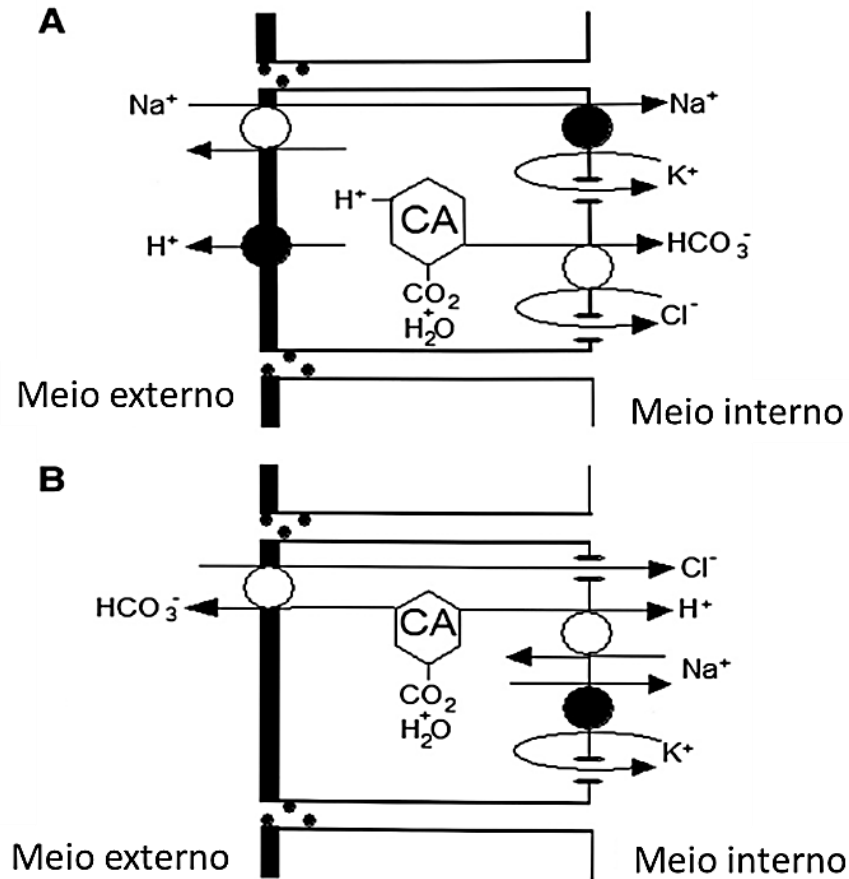


Figura 2. Modelo hipotético de regulação ácido-base em epitélio branquial (Modificada de Freire et al. 2008).

As alterações no equilíbrio ácido-base possuem efeitos metabólicos e fisiológicos variados, a incapacidade de compensação desses distúrbios de pH pode gerar em depressão metabólica, interrupção do funcionamento enzimático e alterações da expressão gênica (Seibel, 2003; Pörtner et al., 2005). No caranguejo aranha *Hyas araneus* exposto a redução do pH ocorrer alterações de genes relacionados ao metabolismo e a regulação ácido-base (Harms et al., 2014). Estudos mostram que a atividade da Na^+/K^+ ATPase pode aumentar em camarões e teleósteos submetidos a mudanças ambientais (Morgan and Iwama 1998; Imsland, et al., 2003). Em *Uca tangeri*, submetida a salinidades extremas observou-se um aumento na atividade da Na^+/K^+ ATPase nas brânquias posteriores (Drews, 1983).

Os exemplos citados anteriormente mostram que osmorregulação e a manutenção da homeostase ácido-base podem estar diretamente associadas (Whiteley et al., 2001). Assim,

alterações nas enzimas envolvidas na regulação ácido-base, devido a variação do pH ambiental podem provocar mudanças nos transportadores de íons tendo diversas consequências fisiológicas nos organismos (Stillman, et al., 2015).

O siri *Callinectes danae*

Os crustáceos são amplamente distribuídos e apresentam uma série de adaptações ao meio ambiente que lhes permitem o seu estabelecimento em diferentes habitats. De acordo com Taissoun (1973) as espécies da família portunidae além de um importante recurso pesqueiro, também são bons indicadores biológicos. Dentre as principais espécies desta família, encontramos o siri *C. danae*. Sua distribuição ocorre por todo Oceano Atlântico da Flórida, EUA, até a costa sul do Brasil (Melo 1996; Guerin and Stickle, 1997; Chacur and Negreiros-Fransozo, 2001). No litoral brasileiro é a segunda espécie mais abundante na região sul, sendo a primeira no litoral catarinense (Medeiros, 1982; Pita, 1985; Morerira, 1988), e a mais consumida na culinária da região nordeste (Calado and Souza, 2003). Geralmente costumam ser coletados junto à fauna acompanhante de muitas pescarias, como as de barcos camaroeiros, porém a captura pelas comunidades caiçaras de baixa renda, também são frequentes, para subsistência e /ou consumo (Severino-Rodrigues et al., 2001; Branco and Fracasso, 2004). Além de sua importância socioeconômica, *C. danae* também possui um grande valor ecológico dentro dos ecossistemas litorâneos, atuando como limpador e predador e recurso alimentar para outros organismos aquáticos e terrestres (Mantelatto, 1995). *C. danae* é um crustáceo eurialino e um nadador ativo, sendo encontrado em ambientes de águas salobras, estuários e áreas de mar aberto com cerca de 80 m de profundidade (Melo, 1996). Essa tolerância a variações de salinidade pelo siri *C. danae* estão diretamente relacionadas ao seu ciclo de vida. Em geral as larvas do gênero *Callinectes* se desenvolvem em ambiente de mar aberto, depois iniciam a migração para a região estuarina. Após o decorrer do desenvolvimento os juvenis e os machos adultos permanecem na região interior do estuário, as fêmeas que atingem o estágio da muda da puberdade são fecundadas pelo macho, o acasalamento ocorre no interior dos estuários, as fêmeas adultas inclusive as ovígeras migram para águas mais salinas no estuário e em mar aberto, essas áreas com maiores profundidades e salinidades são essenciais no

desenvolvimento embrionário e larval (Costa and Negreiros-Fransozo, 1998; Barreto et al., 2006).

Segundo alguns autores (Sastry, 1983; Bauer and Lin., 1994), as alterações ambientais relacionadas à luminosidade, salinidade e temperatura possuem forte influência sobre os mecanismos fisiológicos de *C. danae*. Mota et al., (2017) também observaram uma sinergia entre pH reduzido e variações de salinidade sobre o metabolismo e o padrão osmorregulatório por um período de 3 dias. Nesse contexto e com as atuais mudanças no cenário global, principalmente nas regiões costeiras, compreender as mudanças fisiológicas e moleculares em organismos como *C. danae* frente a esses impactos pode ser essencial para a criação de novas políticas de públicas de conservação de espécies e até mesmo ecossistemas, principalmente quando se trata de espécies com valores sócios econômicos e ecológicos.

2. Objetivos

O presente trabalho avaliou os efeitos da acidificação oceânica sobre um conjunto de respostas fisiológicas (consumo de oxigênio, excreção de amônio, substrato energético oxidado (O: N), índice hepatossomático, capacidade osmo- e ionorregulatória) e a expressão gênica do transportador de membrana Na^+/K^+ ATPase no siri *C. danae* exposto a diferentes pHs (8,0 e 7,3) e salinidades (20, 25, 30, 35 e 40) durante os períodos de 3 e 30 dias.

3. Materiais e métodos

3.1 Coletas dos Animais

Callinectes danae foi coletado na região de estuário da Praia Grande – SP (-23.986662 -46.403142), utilizando armadilhas. Foram coletados apenas animais que já tivessem atingido a maturação sexual, ou seja, animais maiores de 86,47 mm (Marochi et al., 2013). As variáveis da água do local de coleta como salinidade, pH e temperatura foram verificadas, respectivamente, com refratômetro, pHmetro e termômetro. Os animais foram transportados para o Laboratório de Fisiologia de Animais Aquáticos da UNESP/IB/CLP em São Vicente, Brasil, em caixas contendo água do local de coleta com aeração constante.

No laboratório os animais foram acondicionados em caixas de polipropileno contendo água do mar (30S e pH 8,0) e mantidos nessas condições durante quatro dias antes de se iniciar os experimentos. Durante esse período foram alimentados diariamente com filé de peixe.

Tabela 1: Massa (gramas) dos siris *C. danae* coletados na região da Praia Grande, SP-Brasil no período de dezembro 2016/ novembro 2017. Dados apresentados como Média $\pm$ EPM.

‰	3 dias		30 dias	
	pH 8,0	pH 7,3	pH 8,0	pH 7,3
20	69,10 $\pm$ 4,14	84,00 $\pm$ 8,11	63,98 $\pm$ 7,76	55,22 $\pm$ 9,03
25	49,51 $\pm$ 6,34	50,30 $\pm$ 10,87	69,24 $\pm$ 10,86	50,99 $\pm$ 6,98
30	53,00 $\pm$ 11,43	45,40 $\pm$ 7,55	52,44 $\pm$ 6,76	50,35 $\pm$ 3,72
35	47,96 $\pm$ 5,35	74,85 $\pm$ 9,92	58,42 $\pm$ 5,62	41,20 $\pm$ 5,00
40	48,13 $\pm$ 7,90	60,07 $\pm$ 11,43	57,10 $\pm$ 15,83	44,88 $\pm$ 8,76

Não foi encontrada diferença significativa entre as massas dos animais.

3.2 Exposição dos Animais a Diferentes pHs e Salinidades

Após o período de aclimação, os animais foram transferidos para caixas de polipropileno contendo água de 20, 25, 30, 35 ou 40 de salinidade em condição de normo- (pH 8,0) ou hipercapnia (pH 7,3) por três ou 30 dias. Os animais foram mantidos em aquários individuais e utilizaram-se sete animais para cada condição experimental. A temperatura da água foi mantida em 24°C. O pH reduzido foi obtido através do borbulhamento constante de CO₂ na água, utilizando-se um cilindro equipado com manômetro e difusor (Dissanayake and Ishimatsu, 2011; Haye et al., 2012). O pH foi medido com o auxílio de um pHmetro (Qualxtron, modelo Qx1500 plus) quatro vezes ao dia. Para manter a qualidade da água era trocada 50% do volume do aquários a cada dois dias. As salinidades de 20, 25 e 30 foram obtidas por meio da diluição da água do mar com água doce desclorificada. A salinidade de 40 foi obtida após congelamento da água do mar e recolhida às primeiras porções durante o descongelamento. Os fatores abióticos temperatura e salinidade foram verificados diariamente. Os parâmetros físico-químicos da água e a variação associada, para cada tratamento, são apresentados no Anexo I. Amostras diárias de água foram coletadas para determinar a alcalinidade total (AT) determinada por

titulação (Gran, 1950). A alcalinidade total média, a salinidade, a temperatura e o pH foram introduzidas no software CO₂SYS para calcular a pressão parcial de CO₂ (pCO₂) e os estados de saturação de calcita (Ω Cal) e aragonita (Ω Ag) para cada tratamento. As constantes de dissociação do carbonato K1 e K2 foram retiradas de Dickson and Millero (1987) e KSO₄ de Dickson (1990).

3.3 Avaliação dos Parâmetros Fisiológicos

Após o período de exposição, os animais foram retirados das caixas de polipropileno para a avaliação do consumo de oxigênio, excreção de amônio, razão atômica O: N, índice hepatossomático, osmolalidade e concentração de Cl⁻ e Na⁺ da hemolinfa.

3.3.1 Consumo de Oxigênio

O consumo de oxigênio e a excreção de amônio foram medidos de acordo com Augusto and Masui (2014), sendo expressos como massa seca específica ($\mu\text{g. Mg}^{-1}\text{massa seca. h}^{-1}$). Os animais foram colocados individualmente em câmaras respirométricas fechadas contendo água de salinidade, pH e temperatura idênticos aos dos aquários de onde os animais foram retirados. Os animais ficaram mantidos nessas câmaras respirométricas por 30 minutos sob aeração visando à redução do estresse causado pela manipulação. Após esse período, a aeração foi retirada e a concentração de oxigênio na água medida com o auxílio de um oxímetro (monitor e probe YSI, Modelos 53 e 5905, respectivamente). Após 60 minutos a concentração de oxigênio na câmara foi aferida novamente. Câmaras controles sem animais dentro foram mantidas nas mesmas condições experimentais. Variações na concentração do oxigênio foram calculadas pela diferença entre os valores obtidos no início e no final do experimento (após 60 minutos). A taxa respirométrica foi avaliada de acordo com a fórmula abaixo (Winddows and Johnson, 1988):

$$TR = \{[(Co - Cf) \cdot V/\Delta T] - f\}/MS$$

Onde, TR: taxa respirométrica ($\mu\text{g O}_2/\text{mg MS/h}$); Co: concentração inicial de oxigênio na câmara ($\text{ml O}_2/\text{l}$); Cf: concentração final de oxigênio na câmara ($\text{ml O}_2/\text{l}$); V: volume da câmara respirométrica (L); ΔT : duração do experimento (h); f: alteração na concentração de oxigênio nas câmaras controles; MS: massa seca do animal (mg).

3.3.2 Excreção de Amônio

A excreção de amônio foi determinada por colorimetria (Koroleff 1976), em amostras de água obtidas das câmaras respirométricas no final dos experimentos para avaliação do consumo de oxigênio. Câmaras controles sem animais dentro foram mantidas nas mesmas condições experimentais. Os dados são apresentados como a soma da amônia não ionizável (NH_3) e ionizável (NH_4^+).

3.3.3 Substrato energético oxidado

O substrato energético oxidado foi calculado por meio da razão O: N, relação atômica entre o oxigênio consumo e o amônio excretado. A relação O: N indica o tipo de substrato energético que o animal está predominantemente consumindo. Taxas abaixo de 7 indicam o uso de proteínas, entre 7 e 24 estão relacionadas ao uso de carboidratos e acima de 24 indicam o uso predominante de oxidação de lipídios (Mayzaud and Conover, 1988).

3.3.4 Avaliação do Índice Hepatossomático

O hepatopâncreas de cada animal foi dissecado, pesado e mantido em estufa a 60°C durante 48 horas, sendo pesado novamente após esse período. O restante do corpo de cada animal também foi pesado e seco. O índice hepatossomático foi calculado de acordo com a fórmula: Índice Hepatossomático = (Peso seco do órgão/Peso seco do animal) X 100.

3.3.5 Obtenção da hemolinfa e avaliação da osmolalidade e concentração de Na^+ e Cl^- .

Após o período de exposição os animais foram eutanasiados por congelamento. Foram retirados cerca de 20 μL de hemolinfa da região do último pereópodo, utilizando-se uma seringa de insulina e agulha #25-8. As amostras foram armazenadas em um freezer (-20°C) para posterior análise da osmolalidade e das concentrações de Na^+ e Cl^- . A osmolalidade da hemolinfa foi medida em amostras de 10 μL em um micro-osmômetro de pressão a vapor (Wescor, Modelo 5500) na Universidade de São Paulo – USP, campus de Ribeirão Preto. Os resultados são apresentados em mOsm/Kg água. As concentrações de cloreto e de sódio dos animais expostos a diferentes pHs e salinidades por 30 dias, foram medidas em 2,5 μL de hemolinfa diluída em 5mL de água deionizada, utilizado o método

fotométrico de determinação de cloreto na água, empregando nitrato férrico e tiocianato de mercúrio (Zall et. al, 1956). As leituras foram feitas em microplaca Versa Max e a concentração de sódio foi medida por emissão espectrofotométrica.

3.4 Análise da expressão gênica do transportador de membrana Na^+/K^+ ATPase

3.4.1 Extração de RNA total do epitélio branquial

As brânquias posteriores (6º par) foram removidas rapidamente, colocadas em Trizol (Trizol®Products Life Technologies) e congeladas em um ultrafreezer (-80° C) para posterior análise. Todas as amostras foram homogeneizadas e o RNA total foi extraído usando o reagente Trizol (Trizol®Products Life Technologies). Após a extração de RNA todas as amostras foram purificadas e tratadas com DNase usando Rneasy Mini Kit (Qiagen). A integridade do RNA foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1%.

3.4.2 Quantificação da concentração de RNA total e Transcrição reversa

A concentração do RNA total foi estimada através de espectrofotometria à 260 nm e 280 nm com o auxílio de um nanodrop. A pureza do RNA foi considerada adequada quando a relação 260/280 nm atingiu valores entre 1,8 – 2,0. As amostras que não atingiram o grau de pureza adequado foram descartadas. Os cDNAs de cada amostra foram sintetizados a partir do 1 µg do RNA total tratado com Dnase, por incubação com 200 unidades de transcriptase reversa Superscript II (Invitrogen) e 0,8 mmol L-1 de primers oligo(dT)12-18 (Invitrogen) à 37°C por 120 minutos.

3.4.3 qRT-PCR

As curvas padrão dos primers foram feitas para determinar a eficiência da amplificação dos genes alvos (Na^+/K^+ ATPase) e de referências (RPL10, beta actina e arginina quinase). A Tabela 2 apresenta as sequências dos primers utilizados neste estudo. PCR quantitativo foi realizado usando o sistema de detecção de sequência Prism 7900 (Applied Biosystems) com 100 nM de primer e 20 ng de cDNA. A expressão de mRNA alvos foi normalizada pela expressão de gene de referência e expressas como valores relativos utilizando o método (2DDCt) de acordo com as instruções do fabricante.

Tabela 2: Sequências de primers utilizados para os experimentos de PCR em tempo real para avaliação da expressão dos genes estudados

Gene	Primer	Sequência	Amplicon	Referência ou número de acesso
Na ⁺ , K ⁺ -ATPase	NaK_Co_FW	5'GGCATCAGCATCAAAAGGAT3'	139	Leone, et al 2015
Na ⁺ , K ⁺ -ATPase	NaK_Co_RV	5'TTGGGATGAGGAGATGAAGG3'		
RPL10	RPL10_Co_FW	5'CAAGGACCAGTTCATGTCC3'	150	Leone, et al 2015
RPL10	RPL10_Co_RV	5'ATTGAACCCTGGCTACCG3'		
Beta actina	Beta actina FW	5'TCTCACACACTGTCCCCATCTAC3'	114	AAY85815 <i>C.sapidus</i>
Beta actina	Beta actina RV	5'CTCGCTCGGTCAGGATTTT 3'		
Arginina Quinase	Arg_quinase FW	5'TCCAAGGTTTCCTCCACCCT 3'	118	AF233355 <i>C.sapidus</i>
Arginina quinase	Arg_quinase RV	5'TGAAGAGGAAGTGGTCGTCG 3'		

3.5 Análises Estatísticas

Os dados foram submetidos à análise de variância de dois fatores (ANOVA) para as avaliações dos efeitos fisiológicos e ao teste T-Student para verificação das alterações de expressão genica. Em seguidas, os dados foram submetidos ao teste de médias múltiplas de Student-Newman- Keuls (SNK) para localizar as médias estatisticamente diferentes. As análises foram feitas após averiguar as condições de normalidade de distribuição e igualdade de variância usando o programa Sigma Stat 2.0 e empregando um nível mínimo de significância de P = 0,05. Para a construção das figuras foram utilizado os programas GraphPad Prism e Excell.

4. Resultados

4.1 Consumo de Oxigênio

Em pH controle o consumo de oxigênio é maior na salinidade controle (30S), mas somente em três dias de exposição. Após 30 dias tal efeito desaparece (Figura 3). Quando comparamos os animais expostos ao pH 8,0 com o acidificado, notamos que há um aumento de 158% no consumo de oxigênio em 25S, posteriormente em 30 dias as

alterações se estendem as salinidade de 20 e 40 com aumento de 66 e 57% respectivamente e para a salinidade de 30 com redução de 50% no consumo de oxigênio

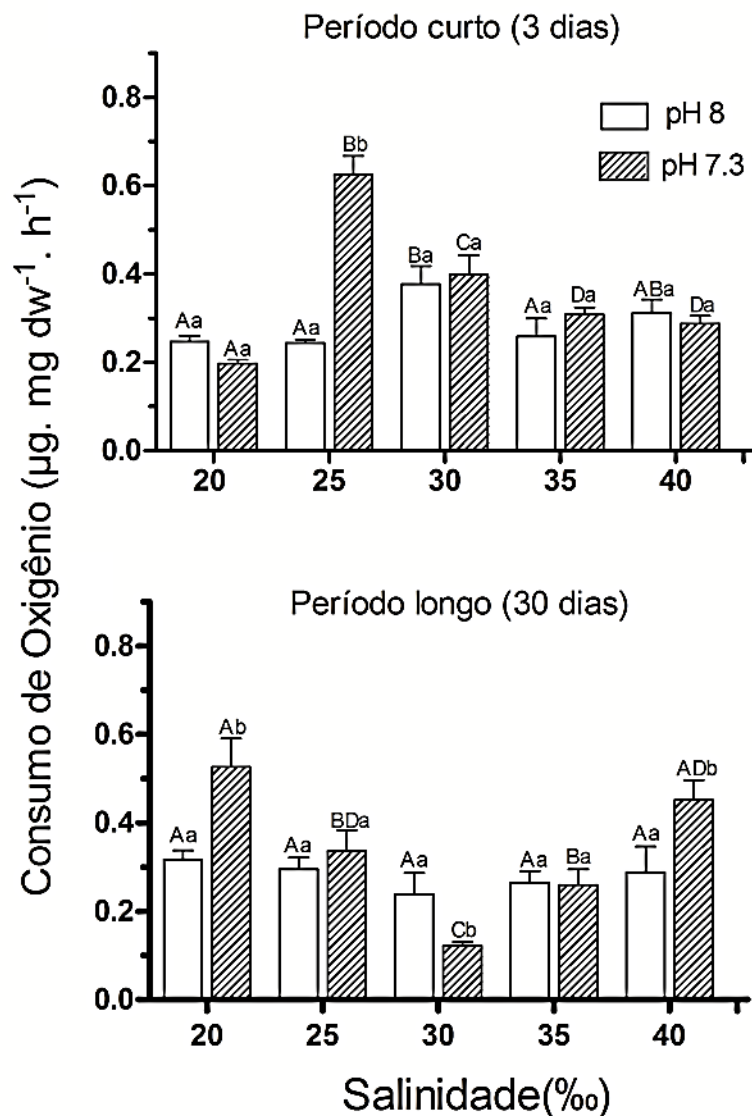


Figura 3: Consumo de oxigênio em siri *Callinectes danae* expostos as condições de normocapnia (pH 8,0) e hipercapnia (pH 7,3), em diferentes salinidades (20, 25, 30, 35 e 40) durante (3 e 30 dias) (Média $\pm$ EPM, N = 7). Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças estatísticas significantes entre os animais mantidos no mesmo pH; letras minúsculas indicam diferenças estatísticas significantes entre os animais mantidos na mesma salinidade ($P < 0,05$).

4.2 Excreção de Amônio

Callinectes danae apresentou diferenças significativas na excreção de amônio quando comparados as salinidades e os pHs nos períodos analisados (figura 4).

Em pH controle a excreção de amônio a salinidade 30 foi a que sofreu maior excreção de amônio (0,16) em relação as demais salinidades no período de 3 dias. Após a exposição a 30 dias, os animais mantidos em 30 e 35S apresentaram maior excreção em relação àqueles mantidos em salinidades reduzidas. Enquanto que em 3 dias a exposição ao pH reduzido diminuiu 60% a excreção de amônio apenas na salinidade controle (30S), a exposição a 30 dias causou maiores variações : aumento de 128% em 20 S e reduções de 67,45 e 54% nas salinidades de 25, 30 e 35 respectivamente.

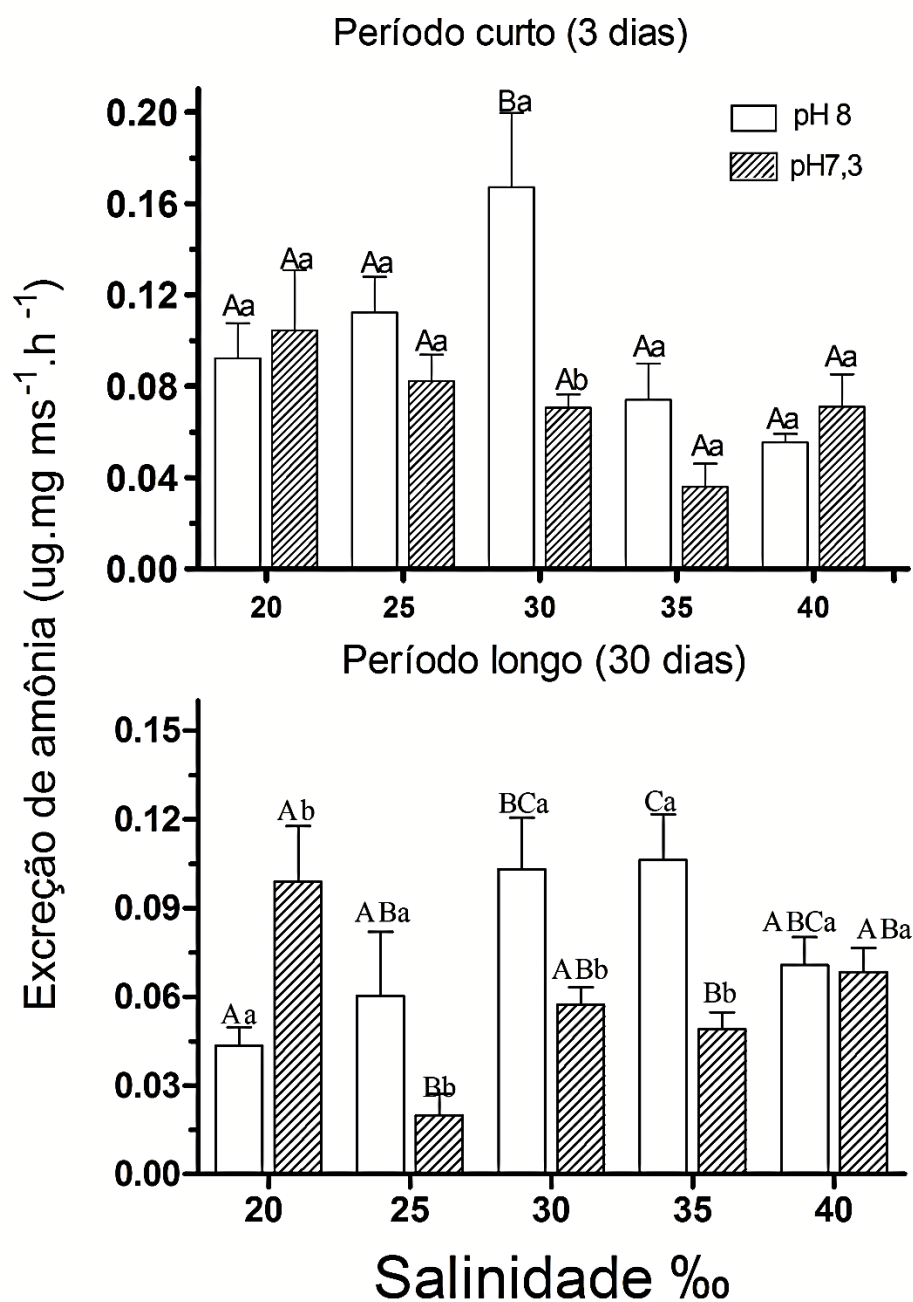


Figura 4: Excreção de amônia no siri *Callinectes danae* expostos as condições de normocapnia (pH 8,0) e hipercapnia (pH 7,3), a diferentes salinidades (20, 25, 30, 35 e 40) durante 3 e 30 dias (Média $\pm$ EPM, N = 7). Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças estatísticas significantes entre os animais mantidos no mesmo pH; letras minúsculas indicam diferenças estatísticas significantes entre os animais mantidos na mesma salinidade ($P < 0,05$).

4.3 Razão O: N

A relação O: N não ultrapassou o valor de 7 o que indica que o siri *C. danae* independentemente do período, da salinidade ou pH oxida preferencialmente de proteína (Tabela3).

Tabela 3: Substrato energético oxidado por siris *Callinectes danae* expostos a normocapnia (pH 8,0) ou hipercapnia (pH 7,3), e diferentes salinidades (20, 25, 30, 35 e 40) durante 3 e 30 dias. Dados apresentados como Média $\pm$ EPM (N =7).

Razão O: N				
	3 dias		30dias	
%	pH 8,0	pH 7,3	pH 8,0	pH 7,3
20	1,8 $\pm$ 0,8 ^{Aa}	1,9 $\pm$ 0,6 ^{Aa}	5,59 $\pm$ 0,58 ^{Aa}	2,87 $\pm$ 0,52 ^{Acb}
25	2,6 $\pm$ 0,6 ^{Aa}	3,1 $\pm$ 0,7 ^{Aa}	3,58 $\pm$ 0,52 ^{Ba}	7,15 $\pm$ 0,67 ^{Bb}
30	2,7 $\pm$ 0,6 ^{Aa}	2,7 $\pm$ 0,7 ^{Aa}	3,02 $\pm$ 0,58 ^{Bca}	1,74 $\pm$ 0,38 ^{Aa}
35	3,3 $\pm$ 0,6 ^{Aa}	3,4 $\pm$ 0,7 ^{Aa}	1,55 $\pm$ 0,52 ^{Ca}	3,62 $\pm$ 0,44 ^{Cb}
40	3,0 $\pm$ 0,6 ^{Aa}	2,8 $\pm$ 0,7 ^{Aa}	2,18 $\pm$ 0,58 ^{Bca}	3,01 $\pm$ 0,58 ^{Aa}

Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes na mesma coluna; letras minúsculas indicam diferenças estatisticamente significantes entre o mesmo parâmetro fisiológico analisado na mesma linha e tempo de exposição (P < 0,05).

4.4 Índice hepatossomático (IHS)

Nos animais mantidos em pH controle durante 3 e 30 dias o índice hepatossomático não variou. A exposição ao pH reduzido causou aumento de 45% e de 162% no IHS na salinidade controle (3 dias) e na salinidade 40S (30 dias) respectivamente e uma redução de 33% na salinidade 25 S nos animais mantidos por 3 dias (tabela 4)

Tabela 4: Índice Hepatosomático de *Callinectes danae* expostos a normocapnia (pH 8,0) e hipercapnia (pH 7,3), e diferentes salinidades (20, 25, 30, 35 e 40) durante 3 e 30 dias. Dados apresentados como Média $\pm$ EPM (N =7).

Índice Hepatosomático				
%	3 dias		30 dias	
	pH 8,0	pH 7,3	pH 8,0	pH 7,3
20	3,23 $\pm$ 0,211 ^{Aa}	2,82 $\pm$ 0,23 ^{Aa}	2,31 $\pm$ 0,34 ^{Aa}	3,09 $\pm$ 0,45 ^{Aa}
25	3,91 $\pm$ 0,25 ^{Aa}	2,62 $\pm$ 0,27 ^{Ab}	3,30 $\pm$ 0,45 ^{Aa}	3,25 $\pm$ 0,52 ^{Aa}
30	2,88 $\pm$ 0,28 ^{Aa}	4,18 $\pm$ 0,25 ^{Bb}	2,89 $\pm$ 0,40 ^{Aa}	3,78 $\pm$ 0,41 ^{Aa}
35	3,64 $\pm$ 0,28 ^{Aa}	4,32 $\pm$ 0,32 ^{Ba}	3,20 $\pm$ 0,37 ^{Aa}	4,33 $\pm$ 0,45 ^{Aba}
40	2,93 $\pm$ 0,25 ^{Aa}	2,32 $\pm$ 0,28 ^{Aa}	2,08 $\pm$ 0,52 ^{Aa}	5,44 $\pm$ 0,45 ^{Bb}

Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes na mesma coluna; letras minúsculas indicam diferenças estatisticamente significantes entre o mesmo parâmetro fisiológico analisado na mesma linha e tempo de exposição ($P < 0,05$).

4.5 Avaliação da capacidade osmo- e ionoregulatória

4.5.1 Capacidade osmorregulatória

Os animais mantidos em três e trinta dias possuem sua capacidade osmorregulatória semelhante, independente do pH em que foram expostos (Figura 5 A e B). Em ambas as condições normo-hipercapnia, o siri *C.danae* hiperregula até a salinidade de 30S, mas passam a hiperconformar nas salinidades maiores. Em três dias os animais expostos em pH 8,0 e pH 7,3 possuem a capacidade osmorreguladora de 0,59 e de 0,74 respectivamente, em trinta dias a capacidade osmorregulatória é de 0,64 e 0,57 nos animais expostos em pH 8,0 e 7,3.

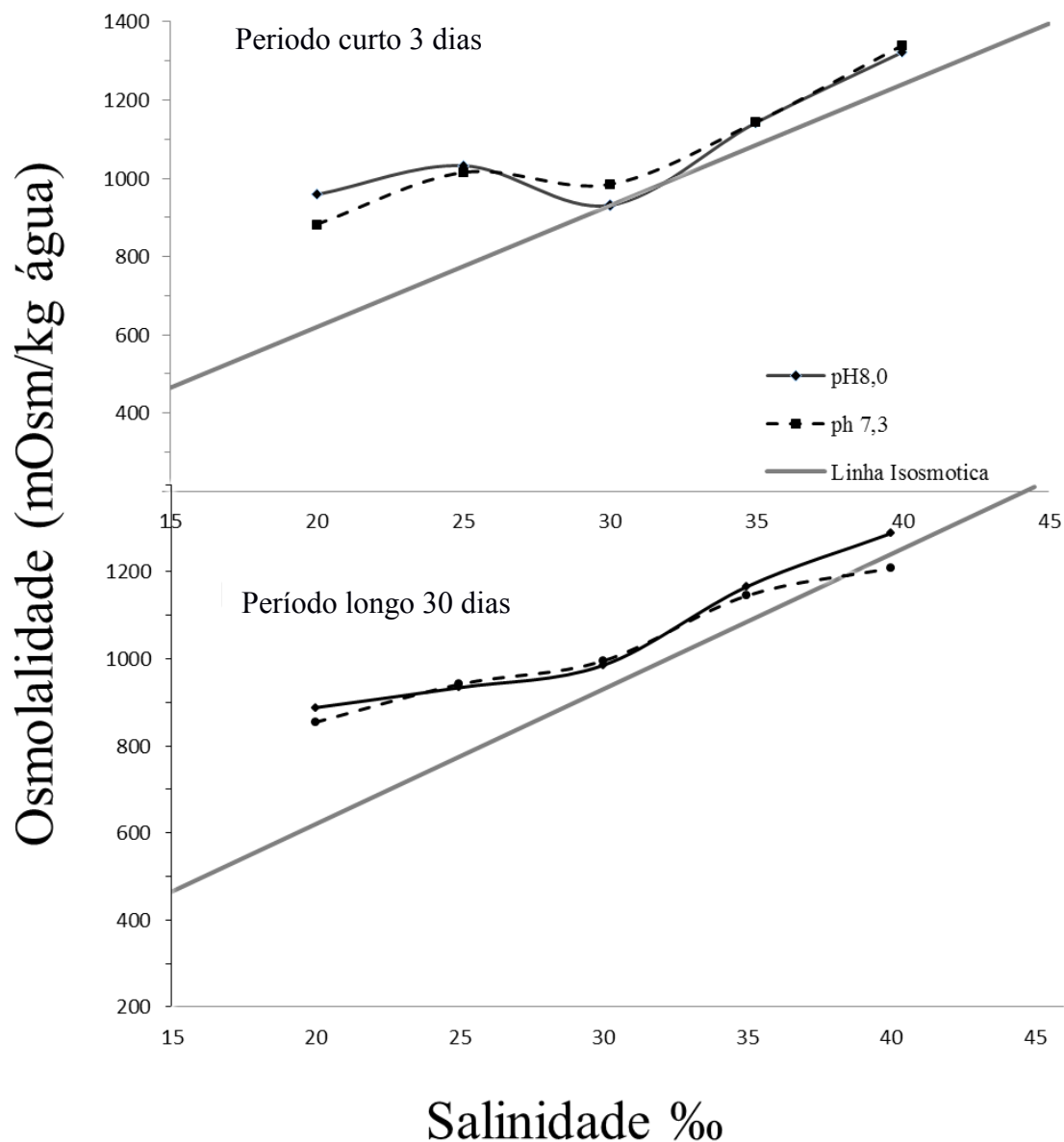


Figura 5: Osmolalidade da hemolinfa (mOsm/kg água) do siri *C. danae* expostos a normocapnia (pH 8,0) e hipercapnia (pH 7,3), a diferentes salinidades (20, 25, 30, 35 e 40) durante 3 e 30 dias (Média $\pm$ EPM, N = 7).

4.5.2 Concentração de Cl^- na hemolinfa

Os animais mantidos em trinta dias possuem sua capacidade osmorregulatória semelhante, independente do pH em que foram expostos (Figura 6), apresentam um padrão ionoconformador em todas as salinidades e pHs, embora em pH controle predomine a

hiperconformação e em pH acidificado a hipoconformação. Nos animais mantidos em pH reduzido houve uma redução 34 e 30% na concentração de cloreto nas salinidades de 25 e 35 respectivamente, quando comparados com os animais expostos a normocapnia.

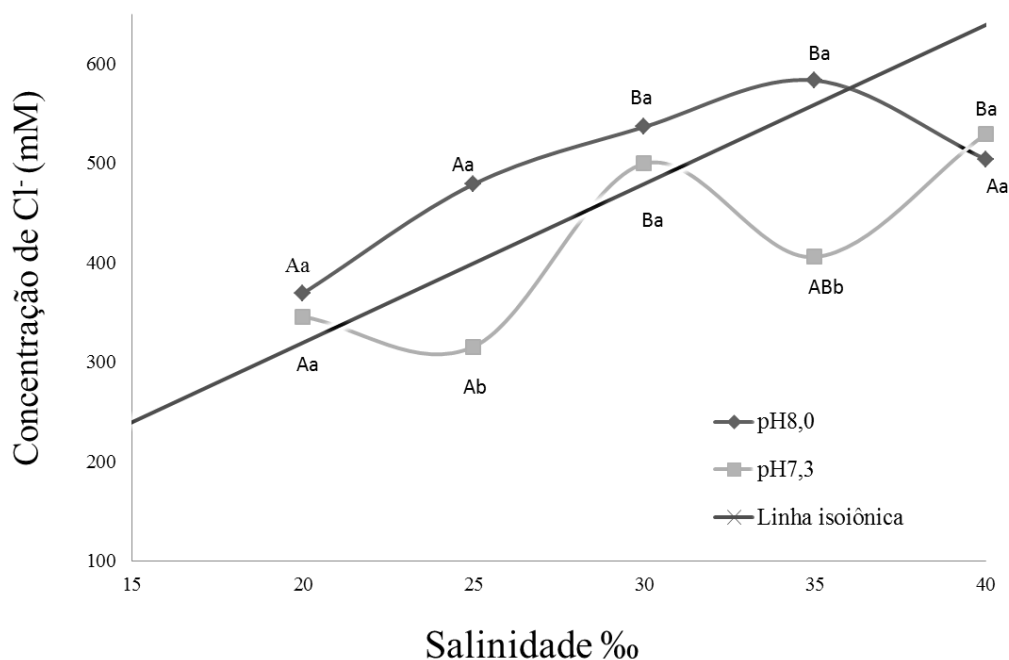


Figura 6 - Concentração de cloreto (mM) na hemolinfa de *Callinectes danae* expostos a normocapnia (pH 8,0) e hipercapnia (pH 7,3), e diferentes salinidades (20, 25, 30, 35 e 40) em 30 dias (Média $\pm$ EPM, N = 7). Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças estatísticas significantes entre os animais mantidos no mesmo pH; letras minúsculas indicam diferenças estatísticas significantes entre os animais mantidos na mesma salinidade ($P < 0,05$).

4.5.2 Concentração de Na^+ na hemolinfa

Em período longo a concentração de sódio na hemolinfa dos animais expostos a normocapnia e em salinidade controle (30‰) foi de $566,06 \pm 40\text{mM}$ (figura 6).

Os animais ionoconformam a concentração de sódio em todas as salinidades independente do pH que são expostos, porém na salinidade controle (30‰), a elevada concentração pode indicar um processo de ionoregulação. Semelhante a curva de cloreto no pH controle teve uma predominância a hiperconformação e em pH acidificado a

hipoconformação. A capacidade ionorregulatória dos animais mantidos em pH 8,0 e 7,3 foi de 0,58 e 0,80 respectivamente.

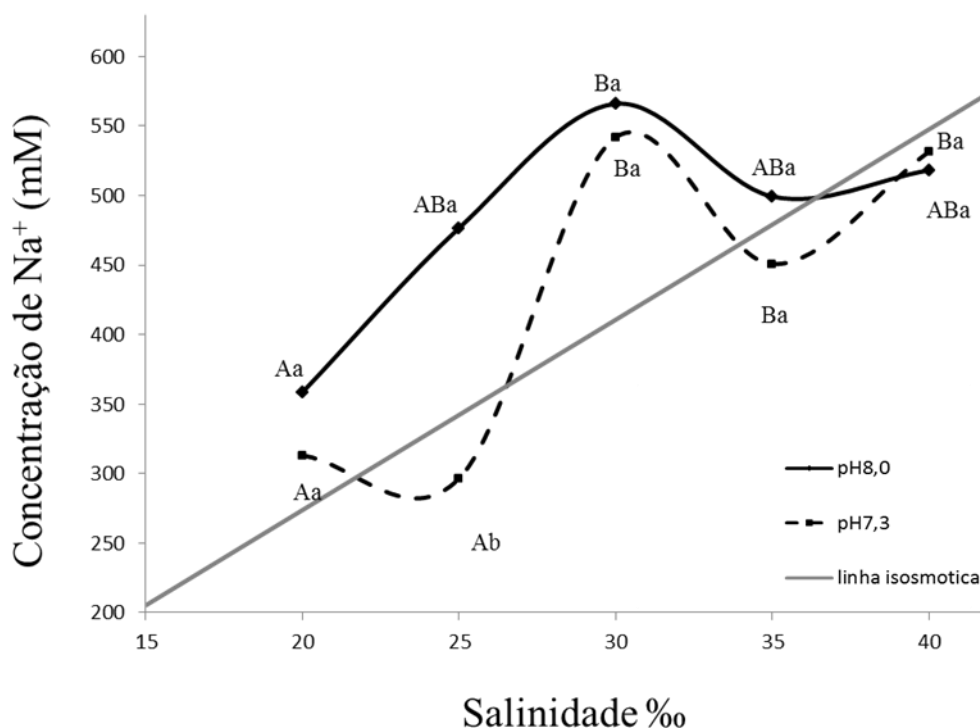


Figura 7- Concentração de sódio (mM) na hemolinfa de *Callinectes danae* expostos a normocapnia (pH8,0) e hipercapnia (pH 7,3), e diferentes salinidades (20, 25, 30, 35 e 40) em 30 dias (Média $\pm$ EPM, N = 7). Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças estatísticas significantes entre os animais mantidos no mesmo pH; letras minúsculas indicam diferenças estatísticas significantes entre os animais mantidos na mesma salinidade (P < 0,05).

4.6 Análises moleculares

4.6.1 Teste da eficiência de amplificação dos oligonucleotídeos para os genes Na⁺/K⁺-ATPase, RPL10, β -actina e Arginina quinase e validação dos genes normalizadores da quantificação relativa por PCR em tempo real

Os oligonucleotídeos descritos na literatura para o gene alvo (Na⁺/K⁺ATPase) e para os genes normalizadores (RPL10, beta-actina e arginina quinase) utilizados para o PCR em tempo real foram testados quanto a sua eficiência em brânquias de siri *C.danae*,

através de curvas de diferentes diluições de amostra (1/4,1/8,1/16,1/32,1/64) e de oligonucleotídeos (400, 300, 200 e 100 nM).

Inicialmente, o gene constitutivo de escolha seria o gene da RPL 10, contudo os oligonucleotídeos testados não apresentaram uma eficiência satisfatória para amostras de *C. danae* (Figura 8, A). Assim dois outros genes foram selecionados e testados quanto a sua eficiência e posteriormente sua validação como gene normalizador frente aos tratamentos realizados. A beta-actina foi escolhida por ser um gene constitutivo muito expresso empregado em ensaios de expressão gênica (Zheng et al., 2015). Já o gene da arginina quinase tem sido utilizado como gene normalizador em estudos de acidificação, envolvendo outras espécies de crustáceos (Fehsenfeld et al., 2011; Hu et al., 2016). Com relação à eficiência da reação de amplificação no PCR quantitativo, os genes da Na⁺/K⁺ATPase, β -actina e arginina quinase apresentaram uma eficiência dentro dos padrões aceitáveis ($\pm 10\%$ em relação a 100%) com valores de 109, 97 e 106%, respectivamente, na diluição 1/8 do cDNA sintetizado e 400 nM dos oligonucleotídeos (Figura 8, B, C e D).

Os tratamentos estabelecidos foram testados pela primeira vez, portanto foi necessário também verificar se os genes beta-actina e arginina quinase não sofriam alterações nestas condições. Como podemos observar na Figura 9, nas salinidades de 25, 30, 35 e 40 o gene da beta actina manteve um nível de expressão equivalente quando comparados as amostras de pH 8,0 e pH 7,3 para cada salinidade nos períodos de 3 e 30 dias, validando seu uso (Figura 9, A e B). Contudo, na salinidade de 20 nos dois períodos analisados, houve uma diferença significativa na amplificação de 1,8 a 2 Cts entre as amostras de pH 8,0 e pH 7,3 (Figura 9, item **a** e **b**), mostrando que nesta condição o gene da beta actina apresenta uma variação na sua expressão, restringindo seu uso como normalizador do ensaio.

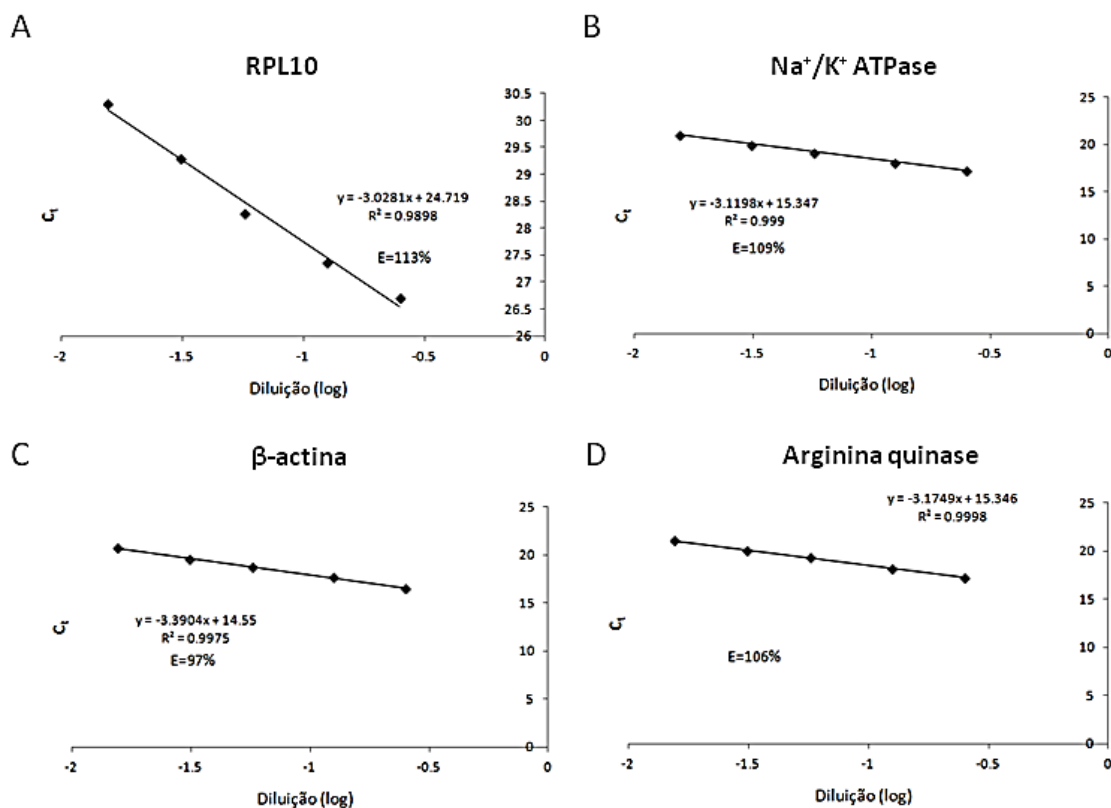


Figura 8: Gráficos representativos dos Cts obtidos na diluição 1/8 de amostras e 400 nM de oligonucleotídeo para o cálculo da eficiência para genes RPL10 (A), Na⁺/K⁺-ATPase (B), β-actina (C) e Arginina quinase (D).

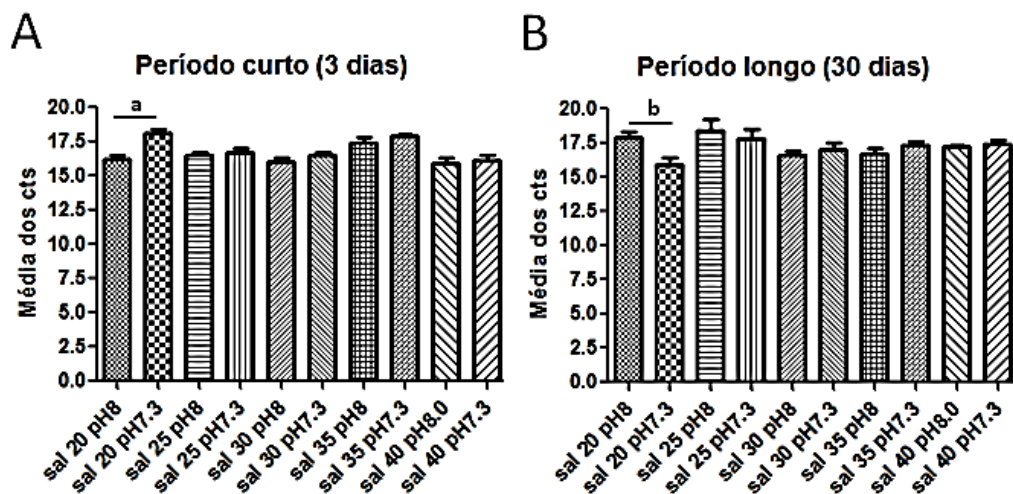


Figura 9: Gráficos representativos dos Cts observados para o gene da beta-actina em diferentes salinidades e pHs nos períodos de 3 (A) e 30 (B) dias. Na salinidade de 20

podemos observar que o gene da beta-actina apresentou uma mudança significativa na sua expressão, restringindo o seu uso para esta condição nos dois períodos testados.

O segundo gene testado como candidato a gene normalizador foi à arginina quinase, porém o mesmo também apresentou alterações na salinidade de 20 com média de 1,6 Cts no período de 3 dias e 0.9 Cts para 30 dias. Além disso, também foi observado uma variação na salinidade de 35 no período de 3 dias, com média de 2 Cts, e de 0.9 Cts na salinidade de 25 no período longo (Figura 10 A e B). Assim o gene da beta actina, por apresentar menor variabilidade, foi selecionado como normalizador.

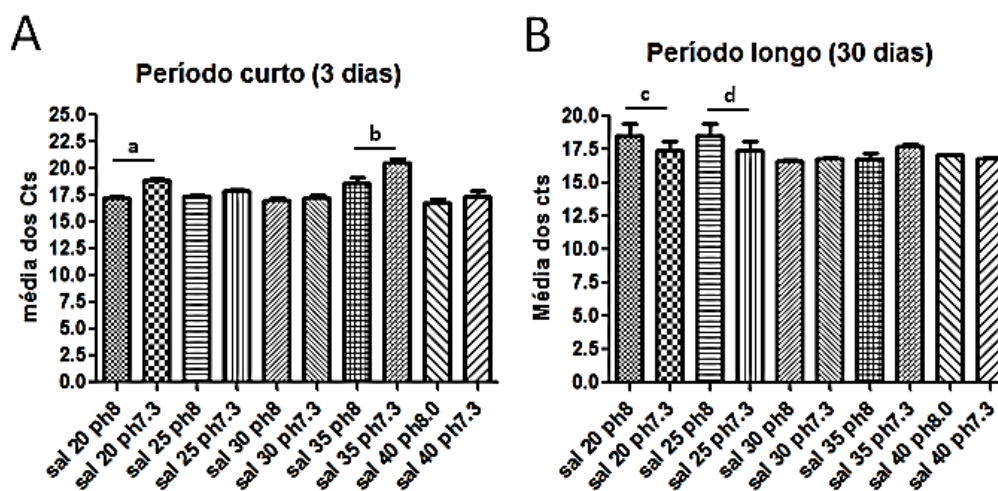


Figura 10: Gráficos representativos dos Cts observados para o gene da Arginina quinase em diferentes salinidades e pHs nos períodos de 3 (A) e 30 (B) dias.

4.6.2. Análise da transcrição do gene da subunidade α da Na^+/K^+ ATPase

As análises por qRT-PCR com os primers específicos para a subunidade α da (Na^+/K^+ ATPase foram realizadas nas amostras da 6ª brânquia dos animais submetidos a hiper (pH 7,3) e normocarpinia (pH 8,0) nas salinidades de 25, 30, 35, e 40 por um período de 3 e 30 dias. Os dados obtidos com a salinidade de 20 foram excluídos devido a grande variação observada para os genes normalizadores nesta condição.

Para as comparações dos níveis de transcrição em hipercapnia em diferentes salinidades nos dois períodos de tratamento, os valores de $\Delta\Delta\text{CT}$ foram calibrados pela média dos ΔCTs das amostras de normocapnia de cada salinidade.

Com relação ao período curto, não foram observados diferenças na expressão da Na^+/K^+ ATPase nas salinidades de 25 e 30 dias entre as amostras submetidas a condição de normocapnia e hipercapnia. Nas salinidades de 35 e 40 foram observados reduções na expressão deste gene (Figura 11, A).

Para o período longo, também não foram observadas diferenças nas salinidades de 25 e 30 na expressão da Na^+/K^+ ATPase. Já nas salinidades de 35 e 40 houve um aumento da expressão, porém esta diferença foi estatisticamente significativa com $p < 0,05$ apenas na salinidade de 40 (Figura 11, B).

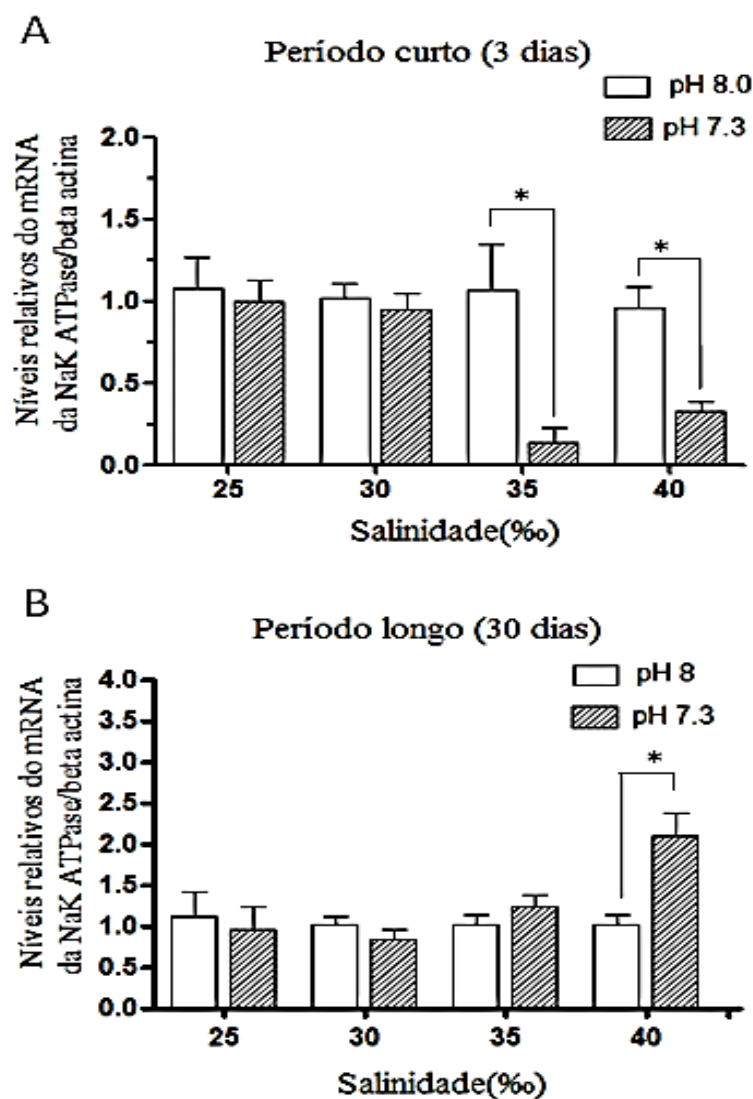


Figura 11: Efeito da acidificação nas salinidades 25, 30, 35 e 40 na expressão de RNAm da subunidade α da Na^+/K^+ ATPase presente na brânquia do siri *C. danae* submetidos a pH 7,3 e 8,0 e em 3 e 30 dias.

5. Discussão

Os resultados obtidos revelam alterações fisiológicas e moleculares resultantes da exposição à acidificação dos oceanos e a variação da salinidade no siri *C. danae*. Os animais sofreram alterações no metabolismo, excreção de amônia, índice hepatossomático, regulação ionoregulatória e expressão genica da Na^+/K^+ ATPase, não há alteração no substrato energético oxidado e na capacidade osmorregulatória. Essas alterações podem interferir indiretamente em outros fatores como na regulação ácido-base, crescimento, distribuição, entre outros. Tais achados são discutidos a seguir.

5.1 Metabolismo

A taxa do consumo de oxigênio é um parâmetro essencial a ser medido diante de situações que impõem desafio à homeostase dos animais, sendo essencial para a verificação da taxa metabólica (Waller et al., 2017). Quando exposto à hipercapnia, o siri *C. danae* apresentou um aumento do seu metabolismo nas salinidades de 25 (três dias), e nas salinidades extremas 20‰ e 40‰ (30 dias) em relação aos animais mantidos em normocapnia. No camarão *M. joyneri* exposto à hipercapnia a redução da atividade natatória é acompanhada por redução metabólica (Dissanayake and Ishimatsu, 2011), mas nas larvas da lagosta *Homarus americanus* a hipercapnia não causa efeito significativo no consumo de oxigênio (Waller et al., 2017). Embora as alterações no consumo de oxigênio em *C. danae* sejam pontuais elas podem indicar aumentos na demanda energética para processos ativos em situações específicas para a manutenção de sua homeostase.

O aumento dos custos metabólicos é visto frequentemente em animais expostos a elevadas temperaturas (Styf et al., 2013; Waller et al., 2017), mas incomum em animais expostos a elevada pCO_2 sugerindo que a sinergia entre a acidificação e a salinidade atuam em conjunto e causam um maior custo energético, provavelmente para a manutenção dos processos de regulação ácido-base. Outra hipótese que também pode ter corroborado para o aumento do consumo de oxigênio é aumento da atividade da enzima anidrase carbônica. Quando exposto a hipercapnia o anelídeo *Hediste diversicolor* tem um aumento da anidrase carbônica e da taxa metabólica para a manutenção da regulação ácido-base (Freitas et al., 2016). Além do maior gasto energético o aumento do consumo de oxigênio pode ter ocorrido devido a uma redução da afinidade da hemocianina pelo oxigênio, como visto na

lagosta *Jasus lalandii* exposta à hipercapnia (Knapp et al., 2015). No entanto organismos que possuem manutenção eficiente na regulação ácido-base podem ter em maiores gastos energéticos com o bombeamento ativo de íons, desviando energia de outros processos como crescimento e reprodução (Wood et al., 2008; Deigweiher et al., 2010; Whiteley, 2011; Stumpp et al., 2012). O aumento da taxa de ventilação em resposta a redução de oxigênio, provavelmente será a causa do aumento metabólico (Pörtner et al., 2004).

Após 30 dias na salinidade controle o siri *C. danae* apresentou uma redução do consumo de oxigênio de 50%, essa redução pode indicar uma depressão metabólica. Em organismos mantidos em hipercapnia a redução do consumo de oxigênio é bastante encontrada (Gutowska et al., 2010; Hans et al., 2014; Schiffer et al., 2014; Cooper et al., 2016) e pode estar relacionado a incapacidade de compensar completamente as variações de pH nos fluidos intra e / ou extracelulares (Pörtner et al., 2005). Alguns autores (Guppy et al., 1999; Melzner et al., 2009; Paganini, et al., 2014) têm sugerido que a redução da taxa metabólica durante exposição à hipercapnia pode ser uma estratégia relacionada as dificuldades enfrentadas em um meio estressante, fazendo assim com que o gasto energético seja direcionado essencialmente às funções vitais.

O fato das alterações observadas no consumo de oxigênio ser diferentes entre os animais expostos durante três e 30 dias, sugere-se que os processos metabólicos de *C. danae* e dos outros organismos marinhos precisam ser estudados em longo prazo a fim de termos um conhecimento real a respeito os efeitos das mudanças climáticas. As consequências das alterações no consumo de oxigênio podem incluir reduções no crescimento desenvolvimento, alimentação, natação, e reprodução (Widdicombe and Spicer 2008; Hu et al., 2014; Cooper et al., 2016), uma vez que os processos fisiológicos estão todos correlacionados e a alteração de um deles pode reverberar sobre o outro.

5.2 Excreção de Amônio

A taxa de excreção de amônio é um indicador do catabolismo proteico, estado nutricional e reprodutivo e da exposição dos animais aquáticos a ambientes estressantes (Griffiths e Griffiths, 1987). Em *C. danae* a exposição à hipercapnia durante três dias, reduziu cerca de 60% na salinidade de 30S, mas após 30 dias as reduções também ocorreram nas 25, 30 e 35.

Mudanças no pH podem afetar as proporções de NH_3 e NH_4^+ , bem como o gradiente de difusão de NH_3 entre compartimentos intra e extracelulares (Goldsmith and Hilton, 1992). Alguns autores têm mostrado que reduções na excreção de resíduos nitrogenados em animais mantidos em hipercapnia, podem ocorrer devido à elevação da concentração do H^+ extracelular, levando-o a competir com o NH_4^+ no antiporter apical $\text{NH}_4^+/\text{Na}^+$ e também porque proteínas básicas podem ser usadas como tampões, reduzindo o catabolismo destas em aminoácidos (Dissanayake et al., 2010; Hans et al., 2014; Fehsenfeld and Weihrauch, 2016). Adicionalmente, o pH reduzido pode inibir os trocadores $\text{NH}_4^+/\text{Na}^+$, o que poderia influenciar a excreção de amônio e a absorção de sal (Henry and Cameron 1982; Blanchard et al. 1998).

Outra hipótese levantada por Hans, et al., (2014) é que a redução da excreção de amônio pode ocorrer devido aos organismo passarem a reter ou eliminar outras formas de resíduos nitrogenados, como ureia ou aminoácidos. Essas alterações já foram observadas em crustáceos como no caranguejo *Carcino maenas* (Spaargaren 1982) e o camarão tigre japonês marinho *Marsupenaeus japonicus* (Chen e Cheng, 1993) e que pode ter ocorrido em *Callinectes danae* quando colocado em pH reduzido e diferentes salinidades.

Na salinidade de 20 em período longo ocorreu um aumento de 128% da excreção de amônio *C. danae* após 30 dias de exposição, provavelmente devido a sinergia entre a salinidade mais baixa e a redução do pH. Esses resultados podem indicar um aumento do catabolismo proteico. No caranguejo *Scylla serrata* exposto a hipercapnia também ocorre aumento da excreção de amônio, porém em salinidade elevadas, este atribuído a alto do catabolismo proteico (Paital & Chainy, 2010).

5.3 Razão O: N

Embora as proteínas sejam fundamentais para a construção celular, diversos crustáceos a utilizam como substrato energético [*Litopenaeus vannamei* (Comoglio et al., 2005), *Peneaus japonicus*, *Metapenaeus ensis* (Chen and Nan, 1994), *Xiphopenaeus kroyeri* (Mota et al., 2017)]. Diversos fatores como dieta, sexo, padrão de atividade também podem influenciar o tipo de substrato energético oxidado por crustáceos (Gauquelin et al., 2007; McGaw and Penney, 2014; Augusto and Masui, 2014).

Não parece existir algum ajuste fisiológico após exposição a diferentes salinidades ou pHs que resultem em alterações no uso de proteínas como substrato energético por *C. danae*. Diferentemente no molusco *Manila Ruditapes philippinarum*, a exposição ao pH reduzido diminui a razão O: N, passam a usar proteínas ao invés de carboidratos (Xu, et al., 2016). No *Sipunculus nudus* a exposição à hipercapnia também causa redução da relação O N e os animais passam a oxidar proteínas. Langenbuch and Pörtner, (2002), sugerem que tais reduções não indicam aumento do catabolismo de aminoácidos, mas uma maior oxidação de: asparagina (O/N = 3,3), ácido glutâmico (O/N = 3,0), glutamina (O/N = 1,5), glicina (O/N = 1,0) ou histidina (O/N = 3,0). Esses aminoácidos não essenciais seriam utilizados na produção de energia e ao mesmo tempo poderia funcionar no tamponamento e na compensação de um pH reduzido através de uma maior produção de HCO_3^- (Langenbuch and Pörtner, 2002).

5.4 Índice Hepatossomático

O hepatopâncreas é um órgão de extrema importância para os crustáceos, sendo responsável pela secreção de enzimas digestivas, absorção de nutrientes, pelo armazenamento de reservas energéticas, reprodução e metabolismo (Kangpanich et al., 2016).

Alterações no índice hepatossomático podem ocorrer após exposição a diferentes condições como jejum, temperaturas variáveis, assimilação de nutrientes, entre outros. Durante exposição a esses agentes estressores, a energia estocada no hepatopâncreas pode ser direcionada para atender a demanda energética aumentada ou para suprir a energia reduzida durante o jejum (James et al., 2013; Xie et al., 2014). No presente trabalho a exposição do siri *C. danae* à hipercapnia causou redução do índice hepatossomático nas salinidades de 25 (três dias) e aumento na salinidade de 30‰ (três dias) e 40‰ (30 dias) em relação aos animais mantidos em normocapnia.

A diminuição do índice hepatossomático pode ter ocorrido devido a um aumento da demanda energética que não conseguiu ser suprido nem com o aumento do consumo de oxigênio. Em altas salinidades (de 36 a 44‰) os juvenis do caranguejo *Scylla serrata* também apresentam uma redução do índice hepatossomático (Romano et al., 2014). O aumento da demanda energética pode ser devido a maior necessidade de energia para a

manutenção da homeostase como no caso da regulação ácido-base e/ ou em alguma dificuldade na obtenção do alimento. Haye et al., (2012) mostraram que a hipercapnia reduz a quimiorrecepção no ermitão *Pagurus bernhardus* interferindo na busca por alimento.

O aumento do índice hepatossomático em *C.danae* na salinidade de 30 e 40 pode ser devido a uma diminuição do uso das reservas energéticas. Em *Xiphopenaeus kroyeri* exposto a hipercapnia também se observa aumento do índice hepatossomático (Augusto et al., 2017). Esse acúmulo pode ocorrer devido à necessidade de armazenar energia pela situação de estresse, fazendo com que os organismos deixem de utilizar essas reservas para outras funções.

5.5 Capacidade osmo- e ionorregulatória

C. danae é um organismo habituado a variações de salinidades e, portanto eurialino (Massui et al., 2002; Freire et al., 2011) Foi observado aqui que o *C. danae* mantém um padrão osmorregulador, apenas até a salinidade de 30 ‰, torna se osmoconformador em salinidades maiores esse comportamento é observado em ambas às condições, ou seja, em Hiper e normocapnia. Diferentemente do camarão *Metapenaeus joyneri*, a redução do pH causa uma diminuição na osmolalidade e no pH da hemolinfa (Dissanayake and Ishimatsu, 2011). A regulação da acidose causada pela hipercapnia, esta diretamente relacionada com a capacidade regulatória dos crustáceos (Cameron and Iwama, 1987). Fortes reguladores iônicos podem compensar a redução ativamente a queda do pH corporal, aumentando o transporte dos íons de H^+ ou de HCO_3^- , ambos diretamente relacionados ao transporte de Na^+ e Cl^- (Cameron, 1985; Henry and Wheatly, 1992, Liu et al., 2015). Alguns desses mecanismos compensatórios ainda são desconhecidos, porém tem sido sugerido que estejam ligados às trocas iônicas (Dissanayake and Ishimatsu, 2011). Como não foram observadas mudanças nos padrões osmorregulatórios de *C. danae*, sugere-se que a mudança de pH consiga ser compensada de outras maneiras, como por exemplo pelo o aumento da concentração de bicarbonato na hemolinfa como observado por Pörtner et al., 2004.

Apos os 30 dias de exposição foi observado em *C. danae* que os íons de Na^+ e Cl^- possuem um padrão ionoconformador independente da variação do pH, porém os animais expostos a um pH reduzido sofrem a redução de íons de cloreto nas salinidades de 25 e 35 e

uma redução de Na^+ na salinidade de 25. Os íons de Na^+ e Cl^- são os predominantes na hemolinfa dos animais e participam de diversos transportadores responsáveis pela regulação ácido-base. Em *Daphnia magna* a diminuição da concentração de íons de Na^+ também foi diminuída, devido a exposição a pH reduzido, uma das hipóteses dessa diminuição é o fato de que o pH baixo acaba bloqueando alguns transportadores como por exemplo Na^+/H^+ , o que afetaria diretamente a concentração desse íon na hemolinfa (Glover and Wood, 2005).

5.6 Análise da transcrição do gene da subunidade α da Na^+/K^+ ATPase em experimentos simulando a previsão futura de acidificação oceânica em diferentes salinidades

A análise da expressão gênica pode auxiliar para caracterização de fenótipos moleculares onde as alterações celulares sustentem as adaptações fisiológicas, podendo ser usados para desvendar mecanismos que definam a plasticidade de respostas dos organismos (Harms et al., 2014). Nos crustáceos marinhos, as brânquias, além de um órgão multifuncional são a primeira linha de defesa em relação aos distúrbios ácido-base nos fluidos corporais. A regulação desses distúrbios deve-se principalmente pelo envolvimento de transportadores de íons ativos, onde a Na^+/K^+ ATPase vai ser a principal responsável pelo gradiente dos mesmos (Schiffer et al., 2014).

C. danae submetidos à hipercapnia tem uma redução na expressão da Na^+/K^+ ATPase nas salinidades mais elevadas (35 e 40‰) após 3 dias. Já em período longo a Na^+/K^+ ATPase tende a ser regulada na salinidade de 35, porém mantém o aumento na salinidade de 40. Aumentos na expressão da Na^+/K^+ ATPase em animais expostos ao pH reduzido foram identificadas em alguns crustáceos como no lagostim *Cherax quadricarinatus* (Ali et al., 2015) e no camarão *L. vannamei* (Pan et al., 2007). Já em larvas de zoeas II de *Hyas araneus* a Na^+/K^+ ATPase foi regulada para baixo quando exposta a alta pressão de CO_2 . Em *Callinectes ornatus*, a expressão da Na^+/K^+ ATPase teve uma redução durante no período de 24h de aclimação a baixa salinidade e após 10 dias foi observado um aumento da expressão. Provavelmente a compensação dos distúrbios ácido-base implica em um custo metabólico alto, devido à necessidade de ATP para a eliminação dos íons de H^+ em excesso (Harms et al., 2017). Essa necessidade de energia para a regulação ácido-

base pode estar diretamente relacionada ao aumento de consumo de oxigênio e com a hiporregulação de cloreto observada em *C. danae* mantido na salinidade 40. Estudos demonstram que alterações no pH ambiental interferem em íons monovalentes como Na^+ , K^+ , H^+ e Cl^- (Fehsenfeld and Weihrauch, 2013; Ali et al., 2017). Por exemplo, a diminuição de Na^+ ou aumento de K^+ que ocorre em *Orconectes rusticus* após a exposição a hipercapnia (Zanotto and Wheatly 1993), em *Carcinus maenas* os íons de K^+ aumentaram devido a exposição a uma maior pCO_2 , podendo ser essencial para manter o pH intracelular estável, devido a sua interação com o co-transportador $\text{Na}^+ / 2\text{HCO}_3^-$ (Fehsenfeld and Weihrauch, 2013) assim como ocorreu no nosso estudo em *C. danae* com a redução de Cl^- nas salinidades de 25 e 35. Essas alterações podem indicar uma diminuição no transporte de íons ou na capacidade de suporte, devido a exposição a maior pCO_2 , o que pode interferir na regulação ácido-base, pois são processos diretamente relacionados (Todgham and Hofmann, 2009). De acordo com Ali et al., (2017) um dos motivos que pode alterar a expressão genica da Na^+/K^+ ATPase é o aumento da atividade enzimática da mesma, que é fundamental no funcionamento da bomba de Na^+ e na entrada de K^+ . Uma vez que a concentração de íons é modificada pela alteração no pH a Na^+/K^+ ATPase também sofre alterações e assim equilibra a concentração de íons na hemolinfa, bem como nas células. Já Todgham and Hofmann, 2009, sugerem que em resposta ao aumento do CO_2 , reduções em ATPases como a Na^+/K^+ ATPase seriam estratégias potenciais para poupar gastos, visto que alguns transportadores seriam mais eficientes nessas condições. Em alguns organismos o aumento do bicarbonato na hemolinfa também é utilizado como estratégia para reduzir os efeitos da hipercapnia.

6. Considerações Finais

Estudos a respeito das mudanças globais que vem acontecendo no planeta tornam-se cada vez mais relevantes. Nesse sentido, é essencial conhecermos os efeitos da acidificação oceânica sobre a biologia dos animais marinhos. Os organismos que forem capazes de ajustar a sua homeostase às novas condições, provavelmente sobressairão em relação aos demais (Carter et al., 2013). Os impactos da redução do pH podem variar entre espécies, grupos e até mesmo ecossistemas. Os resultados do presente trabalho contribuem para o

conhecimento a respeito dos efeitos da acidificação oceânica sobre a fisiologia e biologia molecular de *C. danae*, sendo também o primeiro a descrever tais parâmetros nessa espécie exposta a diferentes salinidades.

Foi observado que alguns efeitos do pH reduzido como alterações no consumo de oxigênio e excreção de amônia se intensificam após trinta dias de exposição, o que pode interferir diretamente na disponibilidade de energia, nos mecanismos ativos e, portanto, na homeostase do organismo. Adicionalmente, foram observados efeitos distintos na regulação da expressão da Na^+/K^+ ATPase e aumento do índice hepatossomático nos dois períodos, principalmente nas salinidades mais elevadas. A manutenção da capacidade osmorregulatória sugere uma regulação eficiente de sais e água diante de variações no pH do meio ambiente. Em suma os resultados mostram que mesmo os organismos estuarinos que estão habituados a variações físico-químicas como o siri *C. danae*, poderão sofrer os efeitos negativos da redução do pH, os quais se intensificaram após um período de 30 dias e que podem ter como consequências alterações no crescimento e desenvolvimento da espécie, interferindo diretamente na questão social, econômica e ecológica dessas regiões.

7. Referência Bibliográfica

- Ali MY, Pavasovic A, Amin S, Mather, PB (2015) Comparative analysis of gill transcriptomes of two freshwater crayfish, *Cherax cainii* and *C. destructor*. Mar Genomics 22:11–13. doi: 10.1016/j.margen.2015.03.004
- Ali MY, Pavasovic A, Mather PB, Prentis PJ (2017) Expression patterns of two Carbonic anhydrase genes, Na^+/K^+ -ATPase and V-type H^+ -ATPase in the freshwater crayfish, *Cherax quadricarinatus*, under different pH. doi: 10.7287/peerj.preprints.1385v1
- Almén AK, Brutemark A, Jutfelt F, et al (2017) Ocean acidification causes no detectable effect on swimming activity and body size in a common copepod. Hydrobiologia 802:235–243. doi: 10.1007/s10750-017-3273-5
- Augusto A, Greene LJ, Laure HJ, McNamara JC (2007) The ontogeny of isosmotic intracellular regulation in the diadromous, freshwater Palaemonid shrimps, *Macrobrachium amazonicum* and osmotic water influx and diffusive salt losses across their broadly distinct, homeostatic processes: anisosmotic extra- t. 27:626–634.
- Augusto A, Masui DC (2014) Sex and reproductive stage differences in the growth, metabolism, feed, fecal production, excretion and energy budget of the Amazon River prawn (*Macrobrachium amazonicum*). Mar Freshw Behav Physiol 47:373–388. doi: 10.1080/10236244.2014.942547

- Augusto, A.; Ramaglia, A. C.M.; Mantoan, P. V.L. (2017) Effect of carbon dioxide-induced water acidification and seasonality on the physiology of the sea-bob shrimp *Xiphopenaeus kroyeri* (Heller, 1862). (Submetido)
- Barra JA, Pequeux A, Humbert W (1983) Morphological-Study on Gills of a Crab Acclimated To Fresh-Water. *Tissue Cell* 15:583–596. doi: 10.1016/0040-8166(83)90009-5
- Barreto ADV, Batista-Leite LDM , Aguiar MC (2006) Maturidade sexual das fêmeas de *Callinectes danae* (Crustacea, Decapoda, Portunidae) nos estuários dos rios Botafogo e Carrapicho, Itamaracá, PE, Brasil. *Iheringia Série Zool* 96:141–146. doi: 10.1590/S0073-47212006000200003
- Bauer RT, Lin J (1994) Temporal patterns of reproduction and recruitment in populations of the penaeid shrimps *Trachypenaeus similis* (Smith) and *T. constrictus* (Stimpson) (Crustacea: Decapoda) from the Northcentral Gulf of Mexico. *J Exp Mar Bio Ecol* 182:205–222. doi: 10.1016/0022-0981(94)90052-3
- Belli NM, Faleiros RO, Firmino KCS, et al (2009) Na^+/K^+ -ATPase activity and epithelial interfaces in gills of the freshwater shrimp *Macrobrachium amazonicum* (Decapoda, Palaemonidae). *Comp Biochem Physiol - A Mol Integr Physiol* 152:431–439. doi: 10.1016/j.cbpa.2008.11.017
- Blanchard A, Eladari D, Levieil F, et al (1998) NH_4^+ as a substrate for apical and basolateral Na^+/H^+ exchangers of thick ascending limbs of rat kidney: Evidence from isolated membranes. *J Physiol* 506:689–698. doi: 10.1111/j.1469-7793.1998.689bv.x
- Branco JO, Fracasso HAA (2003) Ocorrência e abundância da carcinofauna acompanhante na pesca do camarão sete-barbas, *Xiphopenaeus kroyeri* Heller (Crustacea, Decapoda), na Armação do Itapocoroy, Penha, Santa Catarina, Brasil. *Rev Bras Zool* 20:91–96.
- Burggren WW (2005) Developing animals flout prominent assumptions of ecological physiology. *Comp Biochem Physiol Part A Mol Integr Physiol* 141:430–439. doi: 10.1016/j.cbpb.2005.03.010
- Calado TC, Sousa, EC (2003) Crustáceos do complexo estuarino-lagunar Mundaú/Manguaba-Alagoas. Fapeal.
- Caldeira K, Wickett ME (2005) Ocean model predictions of chemistry changes from carbon dioxide emissions to the atmosphere and ocean. *J Geophys Res* 110:C09S04. doi: 10.1029/2004JC002671
- Cameron JN, Batterton C V (1978) Temperature and blood acid-base status in the blue crab, *Callinectes sapidus*. *J. Comp. Physiol.*, 123, 137–141.
- Cameron JN (1985) Compensation of hypercapnic acidosis in the aquatic blue crab, *Callinectes sapidus*: the predominance of external sea water over carapace carbonate as the proton sink, *J. Exp. Biol.*, 114, 197–206.
- Cameron JN, Iwama GK (1987) Compensation of progressive hypercapnia in channel catfish and blue crabs. *J Exp Biol* 197:183–197.
- Carter HA, Ceballos-Osuna L, Miller NA, Stillman JN (2013) Impact of ocean acidification on metabolism and energetics during early life of the intertidal porcelain crab

- Pretolisthes cinctipes*. J Exp Biol 216, 1412-1422.
- Chacur MM, Negreiros-Fransozo ML (2001) Spatial and Seasonal Distributions of *Callinectes Danae* (Decapoda, Portunidae) in Ubatuba Bay, São Paulo, Brazil. J Crustac Biol 21:414–425. doi:10.1651/0278-0372(2001)021[0414:SASDOC]2.0.CO;2
- Chen J-C, Nan F-H (1994) Comparisons of Oxygen Consumption and Ammonia-N Excretion of Five Penaeids. J Crustac Biol 14:289. doi: 10.2307/1548909
- Chen JC, Cheng S yen (1993) Studies on haemocyanin and haemolymph protein levels of *Penaeus japonicus* based on sex, size and moulting cycle. Comp Biochem Physiol -- Part B Biochem 106:293–296. doi: 10.1016/0305-0491(93)90303-M
- Comoglio L, Smolko L, Amin O (2005) Effects of starvation on oxygen consumption, ammonia excretion and biochemical composition of the hepatopancreas on adult males of the False Southern King crab *Paralomis granulosa* (Crustacea, Decapoda). Comp Biochem Physiol Part B Biochem Mol Biol 140:411–416. doi: 10.1016/j.cbpc.2004.11.003
- Cooper HL, Potts DC, Paytan A (2016) Metabolic responses of the North Pacific krill , *Euphausia pacifica* , to short - and long - term pCO₂ exposure. Mar Biol 163:1–13. doi: 10.1007/s00227-016-2982-z
- Costa TM, Negreiros-fransozo ML (1998) The Reproductive Cycle of *Callinectes danae* Smith , 1869 (Decapoda , Portunidae) in the Ubatuba Region , Brazil. BRILL Crustaceana 71 (6).
- Cripps G, Lindeque P, Flynn, KJ (2014) Have we been underestimating the effects of ocean acidification in zooplankton? Glob Chang Biol 20(11):3377–3385.
- Deigweiher K, Hirse T, Bock C, Lucassen M, Pörtner HO (2010) Hypercapnia induced shifts in gill energy budgets of Antarctic notothenioids. J Comp Physiol B 180(3):347–359.
- Dickson AG (1990) Standard potential of the reaction: $\text{AgCl(s)} + 1/2 \text{H}_2\text{(g)} = \text{Ag(s)} + \text{HCl(aq)}$, and the standard acidity constant of the ion HSO_4^- in synthetic sea water from 273.15 to 318.15 K. J Chem Thermodyn 22:113–127. doi: 10.1016/0021-9614(90)90074-Z
- Dickson AG, Millero FJ (1987) A comparison of the equilibrium constants for the dissociation of carbonic acid in seawater media. Deep Sea Res Part A Oceanogr Res Pap 34:1733–1743. doi: 10.1016/0198-0149(87)90021-5
- Dissanayake A, Clough R, Spicer JI, Jones MB (2010) Effects of hypercapnia on acid-base balance and osmo-/iono-regulation in prawns (Decapoda: Palaemonidae). Aquat Biol 11:27–36. doi: 10.3354/ab00285
- Dissanayake A, Ishimatsu A (2011) Synergistic effects of elevated CO₂ and temperature on the metabolic scope and activity in a shallow-water coastal decapod (*Metapenaeus joyneri*; Crustacea: Penaeidae). ICES J Mar Sci 68:1147–1154. doi: 10.1093/icesjms/fsq188
- Dixon DL, Munday PL, Jones GP (2010) Ocean acidification disrupts the innate ability of fish to detect predator olfactory cues. Ecol Lett 13:68–75. doi: 10.1111/j.1461-

- Doney SC, Fabry VJ, Feely RA, Kleypas JA (2009) Ocean Acidification: The Other CO₂ Problem. *Ann Rev Mar Sci* 1:169–192. doi: 10.1146/annurev.marine.010908.163834
- Drews, G. (1983). Na⁺/K⁺ATPase activity in the gills and Na⁺ concentration in the haemolymph of *Uca tangeri* during osmotic stress. *Abstr 5th Conf. Eur. Soc. Comp. Physiol. Biochem*, 138-139.
- Fabry VJ, Seibel BA, Feely RA, Orr JC (2008) Impacts of ocean acidification on marine fauna and ecosystem processes. *ICES J Mar Sci* 65:414–432.
- Faria SC, Augusto AS, McNamara JC, 2011. Intra- and extracellular osmotic regulation in the hololimnetic Caridea and Anomura: a phylogenetic perspective on the conquest of fresh water by the decapod Crustacea. *Journal of Comparative Physiology. B, Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology*, vol. 181, no. 2, p. 175-186. <http://dx.doi.org/10.1007/s00360-010-0522-6>
- Fehsenfeld S, Kiko R, Appelhans Y, Towle DW, Zimmer M, Melzner F (2011) Effects of elevated seawater pCO₂ on gene expression patterns in the gills of the green crab, *Carcinus maenas*. *BMC Genomics* 12, 488.
- Fehsenfeld S, Weihrauch D (2013) Differential acid-base regulation in various gills of the green crab *Carcinus maenas*: Effects of elevated environmental pCO₂. *Comp Biochem Physiol - A Mol Integr Physiol* 164:54–65. doi: 10.1016/j.cbpa.2012.09.016
- Fehsenfeld S, Weihrauch D (2016) Mechanisms of acid–base regulation in seawater-acclimated green crabs (*Carcinus maenas*). *Can J Zool* 107:95–107. doi: 10.1139/cjz-2015-0132
- Findlay HS, Tyrrell T, Bellerby RGJ, Merico A, Skjelvan I (2008) Carbon and nutrient mixed layer dynamics in the Norwegian Sea. *Biogeosciences* 5:1395–1410. doi:10.5194/bg-5-1395-2008
- Findlay HS, Kendall MA, Spicer JJ, Widdicombe S (2010) Relative influences of ocean acidification and temperature on intertidal barnacle post-larvae at the northern edge of their geographic distribution. *Estuar Coast Shelf Sci* 86:675–682. doi: 10.1016/j.ecss.2009.11.036
- Freire CA, Onken H, McNamara JC (2008) A structure-function analysis of ion transport in crustacean gills and excretory organs. *Comp Biochem Physiol - A Mol Integr Physiol* 151:272–304. doi: 10.1016/j.cbpa.2007.05.008
- Freire CA, Togni VG, Hermes-Lima M (2011) Responses of free radical metabolism to air exposure or salinity stress, in crabs (*Callinectes danae* and *C. ornatus*) with different estuarine distributions. *Comp Biochem Physiol - A Mol Integr Physiol* 160:291–300. doi: 10.1016/j.cbpa.2011.06.024
- Freitas R, Pires A, Velez C, Almeida A, Moreira A, Wrona FJ, Soares, AMVM Figueira E (2016) Effects of seawater acidification on *Diopatra neapolitana* (Polychaete, Onuphidae): biochemical and regenerative capacity responses. *Ecol. Indic.* 60, 152e161
- Gauquelin F, Cuzon G, Gaxiola G, Rosas C, Arena L, Bureau DP, Cochard JC (2007) Effect

- of dietary protein level on growth and energy utilization by *Litopenaeus stylirostris* under laboratory conditions. *Aquaculture* 271:439–448. doi: 10.1016/j.aquaculture.2006.05.062
- Glaspie CN, Longmire K, Seitz RD (2017) Acidification alters predator-prey interactions of blue crab *Callinectes sapidus* and soft-shell clam *Mya arenaria*. *J Exp Mar Bio Ecol* 489:58–65. doi: 10.1016/j.jembe.2016.11.010
- Glover CN, Wood CM (2005) Physiological characterisation of a pH and calcium-dependent sodium uptake mechanism in the freshwater crustacean, *Daphnia magna*. *J Exp Biol* 208:951–959. doi: 10.1242/jeb.01426
- Goldsmith DJA, Hilton PJ (1992) Relationship between intracellular proton buffering capacity and intracellular pH. *Kidney Int* 41:43–49. doi: 10.1038/ki.1992.6
- Gran G (1950) Determination of the equivalent point in potentiometric titrations. *Acta Chem. Scand.* 4:559–577.
- Griffiths, C.L., Griffiths, R.J., (1987). *Animal Energetics. Vol. 2 Bivalvia through ebehavior*. In: Pandian, T.J., Vernberg, F.J. (Eds.), *Bivalvia*. Academic Press, New York, pp. 1–88.
- Guerin JL, Stickle WB (1997) A comparative study of two sympatric species within the genus *Callinectes*: Osmoregulation, long-term acclimation to salinity and the effects of salinity on growth and moulting. *J Exp Mar Bio Ecol* 218:165–186. doi: 10.1016/S0022-0981(97)00070-1
- Guppy M, Withers P (1999) Metabolic depression in animals: physiological perspectives and biochemical generalizations. *Biol Rev Camb Philos Soc* 74(1):1–40.
- Gutowska MA, Melzner F, Langenbuch M, et al (2010) Acid-base regulatory ability of the cephalopod (*Sepia officinalis*) in response to environmental hypercapnia. *J Comp Physiol B* 180:323–335. doi: 10.1007/s00360-009-0412-y
- Hans, S., Fehsenfeld, S., Treberg, J.R., and Weihrauch, D. 2014. Acid–base regulation in the Dungeness crab (*Metacarcinus magister*). *Mar. Biol.* 161(5): 1179– 1193. doi:10.1007/s00227-014-2409-7
- Harms, L., Frickenhaus, S., Schiffer, M., Mark, F., Storch, D., Held, C., Pörtner, H.-O. and Lucassen, M. (2014). Gene expression profiling in gills of the great spider crab *Hyas araneus* in response to ocean acidification and warming. *BMC Genomics* 15, 789
- Haye KL, Spicer JJ, Widdicombe S, Briffa M (2012) Reduced pH sea water disrupts chemo-responsive behaviour in an intertidal crustacean. *J Exp Mar Bio Ecol* 412:134–140. doi: 10.1016/j.jembe.2011.11.013
- Henry RP, Cameron JN (1982) The distribution and partial characterization of carbonic anhydrase in selected aquatic and terrestrial decapod crustaceans. *J Exp Zool* 221:309–321. doi: 10.1002/jez.1402210306
- Henry RP, Lucu C, Onken H, Weihrauch D (2012) Multiple functions of the crustacean gill: Osmotic/ionic regulation, acid-base balance, ammonia excretion, and bioaccumulation of toxic metals. *Front Physiol* 3 NOV:1–34. doi: 10.3389/fphys.2012.00431
- Henry RP, Wheatly MG (1992) Interaction of respiration, ion regulation, and acid– base balance in the everyday life of aquatic crustaceans. *Am. Zool.* 32, 407–416

- Hoegh-Guldberg O, Cai R, Poloczanska, et al (2014) The ocean.
- Holman JD, Burnett KG, Burnett LE (2004) Effects of Hypercapnic Hypoxia on the Clearance of *Vibrio campbellii* in the Atlantic Blue Crab, *Callinectes sapidus* Rathbun. Biol Bull 206:188–196. doi: 10.2307/1543642
- Hu MY, Guh Y-J, Stumpp M, et al (2014) Branchial NH_4^+ -dependent acid–base transport mechanisms and energy metabolism of squid (*Sepioteuthis lessoniana*) affected by seawater acidification. Front Zool 11:55. doi: 10.1186/s12983-014-0055-z
- Hu MY, Guh YJ, Shao YT, Kuan PL, Chen GL, Lee JR, Jeng MS, Tseng, YC (2016) Strong ion regulatory abilities enable the crab *Xenograpsus testudinatus* to inhabit highly acidified marine vent systems. Front Physiol 7:1–11. doi: 10.3389/fphys.2016.00014
- Hutchins, D. A., Mulholland, M. R., and Fu, F. X.: Nutrient cycles and marine microbes in a CO_2 -enriched ocean, Oceanography, 22, 128–145, 2009
- Imslund AK, Foss A, Stefansson SO, Gunnarsson S (2003) Gill Na^+/K^+ -ATPase activity, plasma chloride and osmolality in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*) reared at different temperatures and salinities. Aquaculture 218:671–683.
- IPCC. Climate Change: the physical science basis . Working group I contribution to the fifth assessment report of the Intergovernmental Panel on Climate Change, Geneva, 2013.
- IPCC. Climate Change: the physical science basis . Working group I contribution to the fifth assessment report of the Intergovernmental Panel on Climate Change, Geneva, 2014
- James P, Vasilyev R, Siikavuopio S, et al (2013) The effects of varying the percentage of herring versus salmon protein in manufactured diets on the survival, meat content, hepatosomatic index and meat sensory quality of adult red king crab *Paralithodes camtschaticus* held in captivity. Aquaculture 416–417:390–395. doi: 10.1016/j.aquaculture.2013.08.002
- Jorgensen PL, Håkansson KO, Karlsh SJD (2003) Structure and Mechanism of Na,K -ATPase: Functional Sites and Their Interactions. Annu Rev Physiol 65:817–849. doi: 10.1146/annurev.physiol.65.092101.142558
- Kangpanich C, Pratoomyot J, Siranonthana N (2016) Effects of arachidonic acid supplementation in maturation diet on female reproductive performance and larval quality of giant river prawn (*Macrobrachium rosenbergii*). doi: 10.7717/peerj.2735
- Kaplan JH (2002). Biochemistry of Na^+/K^+ -ATPase. Ann Rev Biochem 71:511–535.
- Knapp JL, Bridges CR, Krohn J, Hoffman, LC, Auerswald L (2015) Acid-base balance and changes in haemolymph properties of the South African rock lobsters, *Jasus lalandii*, a palinurid decapod, during chronic hypercapnia. Biochem Biophys Res Commun 461:475–480. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.04.025
- Koroleff F (1976) Determination of nutrients. Methods of seawater analysis. Verlag Chemie Weinheim 1–3.
- Kroeker KJ, Kordas RL, Crim R, et al (2013) Impacts of ocean acidification on marine organisms: quantifying sensitivities and interaction with warming. Glob Chang Biol

- 19:1884–1896. doi: 10.1111/gcb.12179
- Kroeker KJ, Kordas RL, Crim RN, Singh GG (2010) Meta-analysis reveals negative yet variable effects of ocean acidification on marine organisms. *Ecol Lett* 13:1419–1434. doi: 10.1111/j.1461-0248.2010.01518.x
- Langenbuch M, Pörtner HO (2002) Changes in metabolic rate and N excretion in the marine invertebrate *Sipunculus nudus* under conditions of environmental hypercapnia: identifying effective acid-base variables. *J Exp Biol* 205:1153–1160. doi: 10.1016/j.rser.2012.11.069
- Leone FA, Garçon DP, Lucena MN, Faleiros RO, Azevedo SV, Pinto MR, McNamara JC (2015) Gill-specific (Na^+/K^+)-ATPase activity and α -subunit mRNA expression during low-salinity acclimation of the ornate blue crab *Callinectes ornatus* (Decapoda, Brachyura) *Comp. Biochem. Physiol. - B Biochem. Mol. Biol* 186 (2015) 59–67 Contents.
- Lewis CN, Brown KA, Edwards LA, Cooper G, Findlay HS (2013) Sensitivity to ocean acidification parallels natural pCO_2 gradients experienced by Arctic copepods under winter sea ice. *Proc Natl Acad Sci USA* 110(51):E4960–E4967
- Li L, Lu W, Sui Y, et al (2015) Conflicting effects of predator cue and ocean acidification on the mussel *Mytilus coruscus* byssus production. *J Shellfish Res* 34:393–400. doi: 10.2983/035.034.0222
- Lignot JH, Charmantier G. (2015). Osmoregulation and excretion. *The Natural History of Crustacea*, 4, 249-285.
- Lin CH, Tsai RS, Lee TH (2004) Expression and distribution of Na^+/K^+ -ATPase in gill and kidney of the spotted green pufferfish, *Tetraodon nigroviridis*, in response to salinity challenge. *Comp Biochem Physiol - A Mol Integr Physiol* 138:287–295. doi: 10.1016/j.cbpb.2004.04.005
- Lin YM, Chen CN, Yoshinaga T, Tsai SC, Shen ID, Lee TH (2006) Short-term effects of hyposmotic shock on Na^+/K^+ -ATPase expression in gills of the euryhaline milkfish, *Chanos chanos*. *Comp Biochem Physiol - A Mol Integr Physiol* 143:406–415. doi: 10.1016/j.cbpa.2005.12.031
- Liu M, Liu S, Hu Y, Pan L (2015) Cloning and expression analysis of two carbonic anhydrase genes in white shrimp *Litopenaeus vannamei*, induced by pH and salinity stresses. *Aquaculture* 448:391–400. doi: 10.1016/j.aquaculture.2015.04.038
- Luquet CM (2005) Induction of branchial ion transporter mRNA expression during acclimation to salinity change in the euryhaline crab *Chasmagnathus granulatus*. *J Exp Biol* 208:3627–3636. doi: 10.1242/jeb.01820
- Maneja RH, Frommel AY, Browman HI, Clemmensen C, Geffen AJ, Folkvord A, Piatkowski A, Durif CMF, Bjelland R, Skiftesvik AB (2013) The swimming kinematics of larval Atlantic cod, *Gadus morhua* L., are resilient to elevated seawater pCO_2 . *Mar Biol* 160:1963–1972. doi: 10.1007/s00227-012-2054-y
- Mantel LH, Farmer LL, (1983). Osmotic and ionic regulation. *Internal anatomy and physiological regulation*, 5, 53-161.

- Marochi M, Thaís M, Lacerda M, et al (2013) Sexual maturity and reproductive period of the swimming blue crab *Callinectes danae* Smith, 1869 (Brachyura: Portunidae) from. Nauplius 21:43–52. doi: 10.1590/S0104-64972013000100006
- Masui DC, Furriel RPM, Mcnamara JC, Leone FA(2002) Modulation by ammonium ions of gill microsomal Na^+/K^+ -ATPase in the swimming crab *Callinectes danae*: a possible mechanism for regulation of ammonia excretion. Comp Biochem Physiol Part C 132:471–482.
- Mayzaud P, Conover R (1988) O:N atomic ratio as a tool to describe zooplankton metabolism. Mar Ecol Prog Ser 45:289–302. doi: 10.3354/meps045289
- McGaw IJ, Penney CM (2014) Effect of meal type on specific dynamic action in the green shore crab, *Carcinus maenas*. J Comp Physiol B 184:425–436. doi: 10.1007/s00360-014-0812-5
- McNamara JC, Torres AH (1999) Ultracytochemical location of Na^+/K^+ -ATPase activity and effect of high salinity acclimation in gill and renal epithelia of the freshwater shrimp *Macrobrachium olfersii* (Crustacea, Decapoda). J. Exp. Zool. 284, 617–628.
- McNamara JC, Faria SC (2012). Evolution of osmoregulatory patterns and gill ion transport mechanisms in the decapod Crustacea: a review. Journal of Comparative Physiology B, 182(8), 997-1014.
- Medeiros MFST, Oshiro LMY (1992). Aspectos reprodutivos de *Callinectes danae* Smith, 1869 (Crustacea, Decapoda, Portunidae), na Baía de Sepetiba RJ II Abstracts. Simpósio de ecossistemas da Costa sul e sudeste Brasileira, Estrutura, Função e Manejo 4: 150–159.
- Melo GAS (1996) Manual de identificação dos Brachyura (Caranguejos e siris) do litoral brasileiro.
- Melzner F, Gutowska MA, Langenbuch M, et al (2009) Physiological basis for high CO_2 tolerance in marine ectothermic animals: pre-adaptation through lifestyle and ontogeny? Biogeosciences 6:2313–2331.
- Morgan JD, Iwama GK (1998) Salinity effects on oxygen consumption, gill Na^+/K^+ -ATPase and ion regulation in juvenile coho salmon. J Fish Biol 53:1110–1119. doi: 10.1006/jfbi.1998.0780
- Mota, A. C.R., Mantoan. P.V. L., Augusto, A. S. The effect of ocean acidification on physiology Shrimp seven beards, *Xiphopenaeus kroyeri* (Decapoda, Penaeidae)”, in the L Congress of the Brazilian Society of Physiology, held in Águas de Lindóia, São Paulo, Brazil, 2015.
- Munday P, Crawley N, Nilsson G (2009) Interacting effects of elevated temperature and ocean acidification on the aerobic performance of coral reef fishes. Mar Ecol Prog Ser 388:235–242. doi: 10.3354/meps08137
- Orr JC, Fabry VJ, Aumont O, Bopp L, Doney S C, Feely R A, Gnanadesikan A, Gruber N, Ishida A, Joos F et al. (2005) Anthropogenic ocean acidification over the twenty-first century and its impact on calcifying organisms. Nature 437, 681-686.
- Paganini AW, Miller NA, Stillman JH (2014) Temperature and acidification variability

- reduce physiological performance in the intertidal zone porcelain crab *Petrolisthes cinctipes*. J Exp Biol 217:3974–80. doi: 10.1242/jeb.109801
- Paital, B.; Chainy, G. B. N. (2010) Antioxidant defenses and oxidative stress parameters in tissues of mud crab (*Scylla serrata*) with reference to changing salinity. Comp biochem phys c.V 151, n.1, p. 142-151
- Pan L-Q, Zhang L-J, Liu H-Y (2007) Effects of salinity and pH on ion-transport enzyme activities, survival and growth of *Litopenaeus vannamei* postlarvae. Aquaculture 273:711–720. doi: 10.1016/j.aquaculture.2007.07.218
- Pane EF, Barry JP (2007) Extracellular acid–base regulation during short-term hypercapnia is effective in a shallow-water crab, but ineffective in a deep-sea crab. Mar Ecol Prog Ser Mar Ecol Prog Ser 334:1–9.
- Pequeux, A., 1995. Osmotic regulation in crustaceans. J. Crustacean Biol. 15 1, 1–60
- Pierrot C, Pequeux A, Thuet P (1995) Effects of ions substitutions and of inhibitors on transepithelial potential difference and sodium fluxes in perfused gills of the crab *Pachygrapsus marmoratus*. Arch Physiol Biochem 103:466–475. doi: 10.3109/13813459509047141
- Pistevos JCA, Calosi P, Widdicombe S, Bishop JDD (2011) Will variation among genetic individuals influence species responses to global climate change? Oikos 120:675–689. doi: 10.1111/j.1600-0706.2010.19470.x
- Pita JB, Rodrigues ES, Graga Lopez R, Coelho JPA (1985) Observações bioecológicas sobre o siri *Callinectes danae* Smith, 1869 (Crustacea, Decapoda, Portunidae) no complexo Baía-Estuário de Santos, SP, Brasil. Bolm Inst. Pesca, São Paulo, 12(4):35-43.
- Pörtner HO, Langenbuch M, Michaelidis B (2005) Synergistic effects of temperature extremes, hypoxia, and increases in CO₂ on marine animals: From Earth history to global change. J Geophys Res 110:C09S10. doi: 10.1029/2004JC002561
- Portner HO, Langenbuch M, Reipschlag A (2004) Biological Impact of Elevated Ocean CO₂ Concentrations: Lessons from Animal Physiology and Earth History. J Oceanogr 60:705–718. doi: 10.1007/s10872-004-5763-0
- Putnam RW, Roos A (1997) Intracellular pH regulation. In: Hoffman, J.F., Jamieson, J.D. (Eds.), Handbook of Physiology, Cell Physiology. Oxford University Press, New York, pp. 389–440
- Quéré C Le, Andrew RM, Canadell JG, et al (2016) Global Carbon Budget 2016 Please. Earth Syst Sci Data 8:1–14. doi: 10.5194/essd-8-1-2016
- Randall, D, Burggren W, French K (2000) Animal Physiology, Mechanisms and Adaptations. WH Freeman and Company. 4o edição. 729 pp.
- Reynaud S, Leclercq N, Romaine-Liuod S, et al (2003) Interacting effects of CO₂ partial pressure and temperature on photosynthesis and calcification in a scleractinian coral. Glob Chang Biol 9:1660–1668. doi: 10.1046/j.1529-8817.2003.00678.x
- Romano N, Wu X, Zeng C, Genodepa J, Elliman J (2014) Growth, osmoregulatory responses and changes to the lipid and fatty acid composition of organs from the mud

- crab, *Scylla serrata* , over a broad salinity range. Mar Biol Res 10:460–471. doi: 10.1080/17451000.2013.819981
- Sabine C, Feely RA, Gruber N, et al The Oceanic sink for anthropogenic CO₂.
- Sáez AG, Lozano E, Zaldívar-Riverón A (2009) Evolutionary history of Na⁺/K⁺-ATPases and their osmoregulatory role. Genetica 136:479–490. doi: 10.1007/s10709-009-9356-0
- Sastry, A. N. (1983). Ecological aspects of reproduction. The biology of Crustacea, 8, 179-270.
- Schiffer M, Harms L, Lucassen M, Mark FC, Storch D (2014) Temperature tolerance of different larval stages of the spider crab *Hias araneus* exposed to elevated seawater PCO₂. Front Zool. doi: 10.1186/s12983-014-0087-4
- Seibel BA, Walsh PJ (2003) Summary Commentary Biological impacts of deep-sea carbon dioxide injection inferred from indices of physiological performance. J Exp Biol 206:641–650. doi: 10.1242/jeb.00141
- Seibel BA (2003) Biological impacts of deep-sea carbon dioxide injection inferred from indices of physiological performance. J Exp Biol 206(4):641–650.
- Severino-Rodrigues E, Pita JB, Graça-Lopes R (2001) Pesca Artesanal De Siris (Crustacea , Decapoda , Portunidae) Na Região Estuarina de Santos e São Vicente (SP) , Brasil. Bol do Inst Pesca 27:7–19.
- Spaargaren DH (1982) The ammonium excretion of the shore crab, *Carcinus maenas*, in relation to environmental osmotic conditions. Netherlands J Sea Res 15:273–283. doi: 10.1016/0077-7579(82)90008-4
- Spicer JJ, Raffo A, Widdicombe S (2007) Influence of CO₂-related seawater acidification on extracellular acid–base balance in the velvet swimming crab *Necora puber*. Mar Biol 151:1117–1125. doi: 10.1007/s00227-006-0551-6
- Stillman JH, Paganini W (2015) Biochemical adaptation to ocean acidification. J Exp Biol 218:1946–1955. doi: 10.1242/jeb.115584
- Stumpp M, Trübenbach K, Brennecke D, Hu MY, Melzner F (2012) Resource allocation and extracellular acid–base status in the sea urchin *Strongylocentrotus droebachiensis* in response to CO₂ induced seawater acidification. Aquat Toxicol 110–111:194–207
- Styf HK, Nilsson Sköld H, Eriksson SP (2013) Embryonic response to long-term exposure of the marine crustacean *Nephrops norvegicus* to ocean acidification and elevated temperature. Ecol Evol 3:5055–5065. doi: 10.1002/ece3.860
- Sui Y, Kong H, Shang Y, et al (2016) Effects of short-term hypoxia and seawater acidification on hemocyte responses of the mussel *Mytilus coruscus*. Mar Pollut Bull 108:46–52. doi: 10.1016/j.marpolbul.2016.05.001
- Taissoun NE (1973) Los cangrejos de la familia "Portunidae" (Crustaceos Decapodos Brachyura) en el occidente de Venezuela. Boletín del Centro de Investigaciones Biológicas, 8: 1-77.
- Thomsen J, Melzner F (2010) Moderate seawater acidification does not elicit long-term metabolic depression in the blue mussel *Mytilus edulis*. Mar Biol 157:2667–2676. doi:

10.1007/s00227-010-1527-0

- Todgham AE, Hofmann GE (2009) Transcriptomic response of sea urchin larvae *Strongylocentrotus purpuratus* to CO₂-driven seawater acidification. J Exp Biol 212:2579–2594. doi: 10.1242/jeb.032540
- Towle DW, Weihrauch D (2001) Osmoregulation by gills of euryhaline crabs: Molecular analysis of transporters. Am Zool 41:770–780. doi: 10.1093/icb/41.4.770
- Waller JD, Wahle RA, Mcveigh H, Fields DM (2017) Original Article Linking rising p CO₂ and temperature to the larval development and physiology of the American lobster (*Homarus americanus*). 74:1210–1219. doi: 10.1093/icesjms/fsw154
- Wang L, Wang W-N, Liu Y, Cai DX, Li JZ, Wang AL (2012). Two types of ATPases from the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, in response to environmental stress. Molecular Biology Reports 39, 6427–6438. doi:10.1007/s11033-012-1461-y
- Weihrauch D, Becker W, Postel U, et al (1999) Potential of active excretion of ammonia in three different haline species of crabs. J Comp Physiol - B Biochem Syst Environ Physiol 169:25–37. doi: 10.1007/s003600050190
- Widdicombe S, Spicer JJ (2008). Predicting the impact of ocean acidification on benthic biodiversity: what can animal physiology tell us? J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 366, 366, 187e197
- Wheatly MG, Henry RP (1992) Extracellular and intracellular acid-base regulation in crustaceans : Intracellular and extracellular acid-base regulation in animals. J Exp Zool 263:127–142.
- Whiteley N (2011) Physiological and ecological responses of crustaceans to ocean acidification. Mar Ecol Prog Ser 430:257–271. doi: 10.3354/meps09185
- Whiteley NM, Scott JL, Breeze SJ, McCann L (2001) Effects of water salinity on acid-base balance in decapod crustaceans. J Exp Biol 204:1003–1011.
- Wittmann F, Householder E, Piedade MTF, Asis RL, Schongart J, Parolin P, Junk WJ (2013) Habitat specificity, endemism and the neotropical distribution of Amazonian white-water floodplain trees. Ecography (Cop) 36:690–707. doi: 10.1111/j.1600-0587.2012.07723.x
- Wood HL, Spicer JJ, Widdicombe S (2008) Ocean acidification may increase calcification rates, but at a cost. Proc Biol Sci 275:1767–73. doi: 10.1098/rspb.2008.0343
- Xie S, Tian L, Jin Y, et al (2014) Effect of glycine supplementation on growth performance, body composition and salinity stress of juvenile Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* fed low fishmeal diet. Aquaculture 418–419:159–164. doi: 10.1016/j.aquaculture.2013.10.023
- Xu X, Yang F, Zhao L, Yan X (2016) Seawater acidification affects the physiological energetics and spawning capacity of the Manila clam *Ruditapes philippinarum* during gonadal maturation. Comp Biochem Physiol -Part A Mol Integr Physiol 196:20–29. doi: 10.1016/j.cbpa.2016.02.014
- Zall DM., Fisher D, Garner MQ (1956). Photometric determination of chlorides in water. Analytical Chemistry, 28(11), 1665-1668.

Zheng C qun, Jeswin J, Shen K li, Lablche M, Wang K, Liu H (2015) Detrimental effect of CO₂-driven seawater acidification on a crustacean brine shrimp, *Artemia sinica*. Fish Shellfish Immunol 43:181–190. doi: 10.1016/j.fsi.2014.12.027

Anexo I

Parâmetros químicos da água

O pH se manteve estável em todos os tratamentos, a temperatura foi mantida em 24°C. Os parâmetros calculados são apresentados na Tabela 2.

Tabela 1. Os parâmetros de água do mar, pH e salinidade (‰) em período curto (3 dias) foram medidos diariamente e amostras de água (média $\pm$ SE, n = 7) foram coletadas para análise de Alcalinidade Total ($\mu\text{mol Kg}^{-1}$) submetidos ao tratamento por um período curto. O software CO2-SYS foi utilizado para calcular pressões parciais de CO2 (μatm) e estados de saturação de água do mar para calcita (ΩCal) e aragonite (ΩAr).

Período curto (3 Dias)						
Conditions	pH	S (‰)	AT (mmol Kg^{-1})	pCO ₂ (matm)	Ω Cal	Ω Ar
pH 8.0 (Control)	7.90 $\pm$ 0.10	20	2142.46 $\pm$ 197.8	743.86 $\pm$ 68.3	2.630 $\pm$ 0.3	1.64 $\pm$ 0.16
	7.99 $\pm$ 0.01	25	2459.18 $\pm$ 204.4	800.97 $\pm$ 66.7	3.307 $\pm$ 0.3	2.11 $\pm$ 0.18
	8.03 $\pm$ 0.03	30	2292.48 $\pm$ 13.0	745.43 $\pm$ 41.0	3.381 $\pm$ 0.2	2.19 $\pm$ 0.13
	7.96 $\pm$ 0.04	35	2897.83 $\pm$ 123.0	844.66 $\pm$ 35.9	4.622 $\pm$ 0.2	3.04 $\pm$ 0.13
	7.96 $\pm$ 0.04	40	2991.03 $\pm$ 150.3	839.14 $\pm$ 42.2	5.074 $\pm$ 0.2	3.35 $\pm$ 0.17
pH 7.3	7.33 $\pm$ 0.03	20	2642.49 $\pm$ 186.8	5001.48 $\pm$ 353.7	0.689 $\pm$ 0.1	0.427 $\pm$ 0.03
	7.37 $\pm$ 0.07	25	1824.65 $\pm$ 408.4	3251.48 $\pm$ 728.2	0.534 $\pm$ 0.1	0.340 $\pm$ 0.08
	7.36 $\pm$ 0.06	30	2727.66 $\pm$ 250.1	4631.35 $\pm$ 424.8	0.888 $\pm$ 0.1	0.576 $\pm$ 0.05
	7.36 $\pm$ 0.06	35	3350.99 $\pm$ 182.4	5484.74 $\pm$ 298.5	1.195 $\pm$ 0.1	0.785 $\pm$ 0.04
	7.38 $\pm$ 0.08	40	3346.42 $\pm$ 245.9	5342.32 $\pm$ 392.8	1.286 $\pm$ 0.1	0.849 $\pm$ 0.06

Tabela 2. Os parâmetros de água do mar, pH e salinidade (‰) em período longo (30 dias) foram medidos diariamente e amostras de água (média $\pm$ SE, n = 7) foram coletadas para análise de Alcalinidade Total ($\mu\text{mol Kg}^{-1}$) submetidos ao tratamento por um período curto. O software CO2-SYS foi utilizado para calcular pressões parciais de CO2 (μatm) e estados de saturação de água do mar para calcita (ΩCal) e aragonite (ΩAr).

Período Longo (30 dias)						
Conditions	pH	S (‰)	AT (mmol Kg^{-1})	pCO ₂ (matm)	Ω Cal	Ω Ar

pH 8.0 (Control)	7.90 ± 0.10	20	1685 ± 385	405 ± 49	$2,77 \pm 0,3$	$1,72 \pm 0,2$
	7.94 ± 0.06	25	1999 ± 152	448 ± 34	$3,59 \pm 0,3$	$2,29 \pm 0,2$
	$7,99 \pm 0.04$	30	2122 ± 210	450 ± 44	$4,13 \pm 0,41$	$2,68 \pm 0,27$
	7.96 ± 0.04	35	2985 ± 206	608 ± 42	$6,14 \pm 0,56$	$4,12 \pm 0,41$
	$8,03 \pm 0.03$	40	2729 ± 253	540 ± 50	$5,93 \pm 0,55$	$3,91 \pm 0,36$
pH 7.3	7.32 ± 0.05	20	1761 ± 284	2353 ± 380	$0,64 \pm 0,1$	$0,40 \pm 0,06$
	7.27 ± 0.04	25	1995 ± 280	2530 ± 355	$0,81 \pm 0,11$	$0,51 \pm 0,07$
	7.24 ± 0.05	30	2138 ± 171	2138 ± 171	$0,95 \pm 0,08$	$0,62 \pm 0,05$
	7.35 ± 0.04	35	3073 ± 366	3648 ± 435	$1,48 \pm 0,18$	$0,97 \pm 0,12$
	7.29 ± 0.02	40	3551 ± 494	4161 ± 579	$1,82 \pm 0,25$	$1,20 \pm 0,17$

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

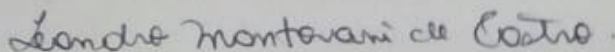
TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Análise da expressão gênica da Na^+/K^+ -ATPase e dos parâmetros fisiológicos no siri *Callinectes danae* submetido a cenários futuros de acidificação oceânica em laboratório

AUTORA: ANDRESSA CRISTINA RAMAGLIA DA MOTA

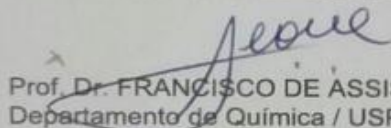
ORIENTADOR: LEANDRO MANTOVANI DE CASTRO

COORIENTADORA: ALESSANDRA DA SILVA AUGUSTO

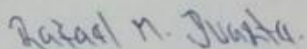
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em BIODIVERSIDADE AQUÁTICA, área: BIODIVERSIDADE pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. LEANDRO MANTOVANI DE CASTRO
Instituto de Biociências - Câmpus do Litoral Paulista / UNESP



Prof. Dr. FRANCISCO DE ASSIS LEONE
Departamento de Química / USP



Prof. Dr. RAFAEL MENDONÇA DUARTE
Instituto de Biociências - Câmpus do Litoral Paulista / UNESP

São Vicente, 19 de fevereiro de 2018