

EFEITOS TÓXICOS DO FERRO SOBRE A CAPACIDADE
IONORREGULATÓRIA DE ROBALOS-PEVA (*CENTROPOMUS*
PARALLELUS) EM DIFERENTES SALINIDADES

LARISSA BELLEZI

SÃO VICENTE - SP

2020

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“Júlio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS
CAMPUS DO LITORAL PAULISTA

EFEITOS TÓXICOS DO FERRO SOBRE A CAPACIDADE
IONORREGULATÓRIA DE ROBALOS-PEVA (*CENTROPOMUS*
PARALLELUS) EM DIFERENTES SALINIDADES

LARISSA BELLEZI

Orientador: RAFAEL MENDONÇA DUARTE, Dr.

Coorientador: LEVY DE CARVALHO GOMES, Dr.

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

SÃO VICENTE – SP

2020

B442e Bellezi, Larissa

Efeitos tóxicos do ferro sobre a capacidade ionorregulatória de robalos-peva (*Centropomus parallelus*) em diferentes salinidades / Larissa Bellezi. -- São Vicente, 2020

55 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, São Vicente

Orientador: Rafael Mendonça Duarte

Coorientador: Levy de Carvalho Gomes

1. Fisiologia Experimental. 2. Enzimas Regulação. 3. Robalo (Peixe). I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências, São Vicente. Dados fornecidos pelo autor(a).

AGRADECIMENTOS

Agradeço com imensas saudades ao meu pai, Augusto Cezar Bellezi, por todo o apoio, todo o incentivo sempre. Segundo seu Augusto, “conhecimento não ocupa espaço”, e quanto mais, melhor. Seu apetite por conhecimento e sua excelência em sua profissão são indissociáveis. Estará pra sempre comigo em meu coração e memória.

Agradeço ao meu orientador Rafael, pela oportunidade, pela paciência, por todo conhecimento transmitido e tempo dedicado para que este projeto pudesse ser concretizado.

Agradeço ao meu coorientador Levy, à Dandara, ao Lázaro e a toda equipe do laboratório de Ictiologia Aplicada (LabPeixe) da Universidade de Vila Velha por todo o apoio prestado e toda infraestrutura cedida sem os quais este projeto não seria possível.

Agradeço ao meu companheiro, Cahue, e à amiga Fabiola por estarem ao meu lado tornando meus passos mais firmes e meu coração mais alegre.

Agradeço a possibilidade de utilizar o Laboratório de Ecofisiologia e Toxicologia Aquática da Universidade Estadual Paulista, ao Programa de Pós Graduação em Biodiversidade de Ambientes Costeiros da UNESP pela oportunidade e a todos os profissionais que fazem da universidade pública e de qualidade um instrumento para democratização do acesso ao conhecimento.

RESUMO

Após o desastre ambiental que ocorreu em novembro de 2015 provocado pelo rompimento da barragem de Fundão em MG, concentrações de ferro (Fe) em desacordo com o limite máximo estabelecido para águas de classe 2 pela resolução CONAMA 357 (i.e. 0,3 mg/L) vem sendo frequentemente reportadas na foz do Rio Doce/ES. Diversos estudos têm evidenciado uma forte influência da salinidade sobre a toxicidade de metais, como o cobre, zinco e cádmio e, além disso, os mecanismos de ação tóxica do ferro nos peixes ainda não são inteiramente compreendidos. Tendo em vista que as espécies eurialinas, como o robalo peva (*Centropomus parallelus*), encontram-se sob constante pressão no meio natural para realização de ajustes osmorregulatórios durante a sua movimentação em ambientes estuarinos, a presente proposta visou verificar a influência da salinidade nos efeitos tóxicos do ferro sobre a capacidade osmo- ionoregulatória de jovens de *C. parallelus*. Na primeira série experimental os jovens de *C. parallelus* foram aclimatados na salinidade 15‰ e, posteriormente, submetidos ao choque osmótico por meio da transferência direta para água do mar diluída para salinidade 5‰ e água doce (i.e. 0‰) por 24 h, na presença e ausência de 1,0 mg/L de ferro total. Na segunda série, os animais foram aclimatados por 10 dias às três salinidades selecionadas (i.e. 15‰, 5‰ e 0‰) e expostos por 24 h à concentração de 1,0mg/L de ferro total, além dos grupos controle. Ao final do experimento amostras de sangue foram coletadas para a determinação das concentrações de Na^+ , Cl^- , glicose e proteínas plasmáticas, amostras das brânquias foram retiradas para a determinação da atividade das principais enzimas ionoregulatórias (i.e. Na^+/K^+ -ATPase, H^+ -ATPase e anidrase carbônica) e amostras de água foram retiradas para verificação das taxas de excreção de amônia. Nossos resultados corroboram achados anteriores sobre a grande capacidade osmorregulatória da espécie; contudo, distúrbios foram associados a exposição ao ferro principalmente em água doce. Aumentos significativos de Na^+ e Cl^- plasmáticos foram verificados nos animais expostos ao ferro durante o período adaptativo à água doce, mas que não foi associado à alteração na atividade das enzimas ionoregulatórias nas brânquias. Já no período regulatório, a inibição na atividade das enzimas Na^+/K^+ -ATPase, anidrase carbônica e H^+ -ATPase (apenas em 0‰) foi relacionada à redução dos níveis plasmáticos de Na^+ e Cl^- . Apesar das diferenciadas respostas fisiológicas desencadeadas em função da exposição ao metal frente a choque/aclimação a salinidades reduzidas, nossos resultados apontam que a exposição ao ferro pode resultar em desequilíbrios iônicos e osmóticos na espécie.

Palavras-chave: osmorregulação, Na^+/K^+ -ATPase, H^+ -ATPase, anidrase carbônica, taxa de excreção de amônia.

ABSTRACT

After the environmental disaster in November 2015 caused by the collapse of the Fundão dam in MG, waterborne iron (Fe) concentration that is in disagreement with the maximum limit established for class 2 waters by CONAMA resolution 357 (ie 0.3 mg / L) has been usually reported at Doce River/ES mouth. Several studies have shown a strong influence of salinity on metals toxicity, such as copper, zinc and cadmium, and the mechanisms of toxic action of iron in fish are not fully understood. Given that euryhaline species, such as peva sea bass (*Centropomus parallelus*), are under constant pressure in the natural environment to perform osmoregulatory adjustments during their movement in estuarine environments, this study aimed to verify the influence of salinity on iron toxic effects on the osmo and ionoregulatory responses of *C. parallelus* juveniles. In the first experimental series, juveniles of *C. parallelus* were acclimated to salinity of 15‰, and then submitted to hyposmotic shock through the direct transfer to diluted sea water to 5‰ salinity and fresh water (i.e. 0 ‰) for 24 hours, in the presence and absence of 1.0 mg/L of total iron. In the second series, fish were acclimated for 10 days to the three selected salinities (i. e., 15‰, 5‰ and 0‰) and exposed for 24 hours to the concentration of 1.0 mg/L of total iron, besides to the control groups. Lastly, blood was sampled to determine the concentration of Na⁺, Cl⁻, glucose and proteins in plasma, and the gills were removed to determine the activity of the main ionoregulatory enzymes (i. e. Na⁺/K⁺-ATPase, H⁺-ATPase and carbonic anhydrase) and water samples were taken to verify the ammonia excretion rates. Our results corroborate previous findings about the great osmoregulatory ability of this fish species; however, disturbances were associated with iron exposure, mainly in fresh water. Increased levels of Na⁺ and Cl⁻ in plasma were observed in fish exposed to iron during the adaptive period to fresh water, which was not associated with changes in ionoregulatory enzymes activities in gills. In the regulatory period, the inhibition in the activity of the enzymes Na⁺/K⁺-ATPase, carbonic anhydrase and H⁺-ATPase (only at 0‰) were related to reduced plasmatic levels of Na⁺ and Cl⁻. Despite the different physiological responses triggered by exposure to the metal in face of shock/acclimatization to lowered salinities, our results suggest that the exposure to iron might result in osmo-ionoregulatory disturbances in this fish species.

Keywords: osmoregulation, Na⁺/K⁺-ATPase, H⁺-ATPase, carbonic anhydrase, ammonia excretion rates

Sumário

1. Introdução	11
2. Objetivos	18
2.1 <i>Objetivo Geral</i>	<i>18</i>
2.2 <i>Objetivos Específicos.....</i>	<i>18</i>
3. Material & Métodos	19
3.1 <i>Procedimentos experimentais.....</i>	<i>19</i>
3.2 <i>Procedimentos analíticos e cálculos</i>	<i>20</i>
3.3 <i>Análise estatística</i>	<i>22</i>
4. Resultados.....	22
5. Discussão	36
5.1 <i>Efeitos da exposição ao ferro sobre as respostas osmo- ionoregulatórias de C. parallelus durante choque hiposmótico</i>	<i>36</i>
5.2 <i>Respostas osmo- ionoregulatórias de C. parallelus expostos ao ferro após a aclimação ao meio hiposmótico</i>	<i>42</i>
6. Conclusões	48
7. Referências Bibliográficas	49

Lista de Figuras

- Figura 1.** Concentração plasmática de cloreto (A) e sódio (B) de jovens de *C. parallelus* aclimatados em salinidade 15‰ e, posteriormente, expostos por 24 horas às salinidades 5‰ e 0‰ na ausência e presença de 1 mg/L de ferro na água. Letras maiúsculas diferentes representam diferenças significativas na concentração plasmática dos íons entre os grupos expostos ao ferro nas diferentes salinidades. Asteriscos (*) representam diferenças significativas entre os animais do grupo controle e expostos ao ferro em uma mesma salinidade ($p < 0,05$). 25
- Figura 2.** Atividade das enzimas H^+ -ATPase, Na^+/K^+ -ATPase e anidrase carbônica de jovens de *C. parallelus* aclimatados em salinidade 15‰ e, posteriormente, expostos por 24 horas às salinidades 5‰ e 0‰ na ausência e presença de 1mg/L de ferro na água. Letras maiúsculas diferentes representam diferenças significativas entre os grupos expostos ao ferro nas diferentes salinidades. Letras minúsculas diferentes representam diferenças significativas entre os grupos controles nas diferentes salinidades. Asteriscos (*) representam diferenças significativas entre os animais controle e expostos ao ferro em uma mesma salinidade ($p < 0,05$). 26
- Figura 3.** Concentração plasmática de proteínas totais (A) e glicose em (B) de jovens de *C. parallelus* aclimatados em salinidade 15‰ e, posteriormente, expostos por 24 horas às salinidades 5‰ e 0‰ na ausência e presença de 1 mg/L de ferro na água. Letras maiúsculas representam diferenças significativas entre os grupos expostos ao ferro nas diferentes salinidades. Letras minúsculas diferentes representam diferenças significativas entre os grupos controles nas diferentes salinidades. 28
- Figura 4.** Taxa de excreção de amônia (0-24h) em jovens de *C. parallelus* aclimatados em salinidade 15‰ e, posteriormente, expostos por 24 horas às salinidades 5‰ e 0‰ na ausência e presença de 1 mg/L de ferro na água. 29
- Figura 5.** Concentração plasmática de cloreto (A) e sódio (B) de jovens de *C. parallelus* aclimatados por 10 dias a 15‰, 5‰ e 0‰ e expostos por 24 horas a 1 mg/L de ferro na água, além dos grupos controle. Letras maiúsculas diferentes representam diferenças significativas entre os animais controle e expostos ao ferro em uma mesma salinidade ($p < 0,05$). 31
- Figura 6.** Atividade das enzimas H^+ -ATPase, Na^+/K^+ -ATPase e anidrase carbônica de jovens de *C. parallelus* aclimatados por 10 dias a 15‰, 5‰ e 0‰ e expostos por 24 horas a 1mg/L de ferro na água, além dos grupos controle. Letras maiúsculas diferentes representam diferenças significativas entre os grupos expostos ao ferro nas diferentes salinidades. Letras minúsculas diferentes representam diferenças significativas entre os grupos controles nas diferentes salinidades.. Asteriscos (*) representam diferenças significativas entre os animais controle e expostos ao ferro em uma mesma salinidade ($p < 0,05$). 33

Figura 7. Concentração plasmática de proteínas totais (A) e glicose (B) de jovens de *C. parallelus* aclimatados por 10 dias a 15‰, 5‰ e 0‰ e expostos por 24 horas a 1 mg/L de ferro na água, além dos grupos controle. Letras maiúsculas diferentes representam nas diferentes salinidades. Letras minúsculas diferentes representam diferenças significativas entre os grupos controles nas diferentes salinidades.35

Lista de Tabelas

Tabela 1. Valores de ferro total na água dos aquários no ensaio em que houve redução aguda na salinidade de 15‰ para 5‰ e 0‰, durante o período de 24h de exposição ao ferro e nos respectivos grupos controle.23

Tabela 2. Concentrações de ferro total na água dos tanques utilizados nos ensaios em que os peixes foram aclimatados e expostos ao ferro em mesma salinidade, isto é, em 15‰, 5‰ e 0‰ pelo período de 24h e grupos controle.....30

1. Introdução

O Brasil é um dos três maiores produtores mundiais de minério de ferro, conforme dados obtidos pelo U.S. Geological Survey e a UNCTAD (Conferência das Nações Unidas para o Comércio e Desenvolvimento). Em 2011, o montante de minério de ferro produzido pelo Brasil atingiu 390 milhões de toneladas, direcionadas para atendimento das demandas das indústrias siderúrgicas, nacionais e internacionais, para produção de peças, acessórios e ferramentas (IBRAM, 2012). Minas Gerais destaca-se como o estado de maior participação na atividade, representando 67% da produção no país, acompanhado pelo estado do Pará com 29,3% da produção, seguido por outros estados com menor representatividade. A Vale, a Companhia Siderúrgica Nacional (CSN) e a Samarco são as principais empresas responsáveis pela produção brasileira (IBRAM, 2012).

Existe uma série de riscos ambientais associados à atividade de mineração envolvendo seus resíduos (escória), rejeitos do beneficiamento, efluentes líquidos das minas ou das indústrias siderúrgicas, de metalurgia e pelotização que podem comprometer a qualidade das águas da bacia hidrográfica onde se localizam os empreendimentos. Sedimentos finos em suspensão podem influenciar a turbidez de corpos d'água próximos, e o carreamento de efluentes e a lixiviação também são vias de contaminação de reservatórios, rios e lençóis freáticos à jusante dos locais onde ocorrem atividades de mineração (Sanches & Mechi, 2010). Além das vias de contaminação inerentes à atividade, sabe-se que acidentes e problemas operacionais podem culminar em significativas fontes de poluição ambiental não previstas.

Após o desastre ambiental que ocorreu em Novembro de 2015, provocado pelo rompimento da barragem de Fundão, localizada no município de Mariana em Minas Gerais, o Instituto Mineiro de Gestão das Águas (IGAM) tem monitorado com maior intensidade os parâmetros físico-químicos da água do rio Doce, desde o município de Rio Doce até Aimorés (SEDRU, 2016). Entre os meses de Novembro de 2015 a Março de 2017, de acordo com os dados obtidos nas estações de amostragem e divulgados pelo IGAM, observou-se concentrações de até 32,3 mg/L de ferro (Fe) na água (Novembro e Dezembro de 2015) logo após o desastre, o que representa valores até 100 vezes maiores do que o limite máximo estabelecido para águas de classe 2, conforme a resolução CONAMA 357 (i.e 0,3 mg/L) (CONAMA, 2005). Além disso, durante os anos de 2016 e 2017, na maior parte das estações de amostragem ao longo do rio Doce, foram registrados valores superiores aos limites legais

em pelo menos dois meses do período chuvoso na região. Dentre os valores identificados em desacordo com o previsto pela resolução CONAMA 357, entre Janeiro e Abril de 2016 ocorreram picos que superaram em até 6 vezes a concentração máxima fixada pela resolução, ao passo que no final de 2016 e início de 2017 variaram de 0,304 mg/L à 0,602 mg/L de Fe dissolvido (IGAM, 2017). Segundo Encarte Especial Sobre a Qualidade Das Águas do Rio Doce Após 4 Anos do Rompimento da Barragem de Fundão 2015-2019 (IGAM, 2019), até julho de 2019 ainda foram verificadas violações do limite legal, contudo sem exceder a concentração máxima de 0,5 mg/L de Fe dissolvido, o que sinaliza que a quantidade de até 1mg/L de Fe total representa uma concentração ambientalmente relevante do metal na bacia hidrográfica, uma vez que a fração dissolvida do elemento varia podendo ser reduzida em função do aumento da salinidade ambiental.

O ferro é um metal de transição que pode ser encontrado desde concentrações de nanogramas por litro em ambientes marinhos, até miligramas por litro em ambientes de água doce que recebem efluentes provenientes da atividade de mineração (BURY et al., 2012). Na bacia hidrográfica do rio Doce, em função da proximidade das atividades de mineração, verificou-se que em diversos pontos de monitoramento o máximo da série histórica, antes do rompimento da barragem, já apresentava concentrações de ferro que excediam os limites legais (IGAM, 2017), o que faz do ferro relevante fonte de contaminação para a fauna aquática da região. O ferro é um dos metais mais abundantes na terra sendo essencial à quase todos os organismos, uma vez que sua alta capacidade redutora permite ao elemento ser um componente integral da respiração celular, e sua inserção na estrutura química da molécula de hemoglobina permite a otimização do transporte de oxigênio no sangue em vertebrados aquáticos, como os peixes. Apesar dessas importantes funções bioquímicas e fisiológicas, o ferro pode ser tóxico dependendo das concentrações às quais os organismos aquáticos venham a ser expostos (Bury & Grosell, 2003).

Estudos têm evidenciado, por meio de ensaios de toxicidade aguda para a determinação da concentração letal média em 96 horas (CL_{50-96h}), variações na sensibilidade interespecífica de peixes ao ferro. Por exemplo, a CL_{50-96h} determinada para 3 espécies de Cypriniformes com 30 dias de vida variou de 50,56 mg/L de Fe total para *Labeo rohita*, 77,95 mg/L para *Cirrhina mrigala* e 92,11 mg/L para *Catla catla* (Javed, 2006), além disso, alterações na sensibilidade ao ferro também foram identificadas em uma mesma espécie em função da idade dos indivíduos. Estudo avaliando a toxicidade do ferro em diferentes espécies

de invertebrados observou que a espécie *Daphnia magna* apresentou maior sensibilidade ao ferro, apresentando valores de CL₅₀-48h de 5,9 mg/L ferro total, enquanto a espécie *Asellus aquaticus* foi mais resistente com valores de CL₅₀-48h variando entre 81,1 mg/L a 183 mg/L de ferro total (Vuori, 1995). Em solução o ferro pode ser encontrado na forma divalente (Fe²⁺) e trivalente (Fe³⁺), ocorrendo em ambientes aquáticos em diferentes estados de oxidação. Esse elemento pode também ser encontrado complexado a moléculas orgânicas como ácidos húmicos, em função da atividade de bactérias e do fitoplâncton. Além disso, sua especiação química depende fortemente de variáveis ambientais como pH, oxigênio dissolvido, intensidade luminosa, tipo e quantidade de matéria orgânica dissolvida (Vuori, 1995).

O íon ferroso (Fe²⁺) é mais solúvel que seu estado férrico (Fe³⁺), formando ligações fracas com agentes complexantes, sendo geralmente mais biodisponível aos organismos aquáticos. Por esse motivo acredita-se que o Fe²⁺ seja mais tóxico, visto que devido à grande acumulação dessa forma química nos tecidos, há maior probabilidade de geração de radicais livres que provoquem danos oxidativos internos (BURY et al., 2012). Em ambientes aquáticos bem oxigenados, e com pH neutro, o Fe³⁺ é a espécie química preferencial por ser termodinamicamente mais estável; contudo, em condições redox favoráveis, como em ambientes com pH ácido e/ou anóxicos, a espécie Fe²⁺ possui sua meia vida estendida, estando disponível no ambiente por mais tempo (BURY et al., 2012). Embora o efeito da salinidade sobre a toxicidade do ferro não tenha sido amplamente estudada até o momento, diversos estudos têm evidenciado uma forte influência da salinidade sobre a toxicidade de metais, como o cobre, zinco, prata e cádmio (Bielmyer et al, 2012; Fergurson & Hogstrand, 1997; Blanchard & Grosell 2006; Zhang & Wang, 2007). Em geral, em maiores salinidades a toxicidade dos metais aos organismos aquáticos é reduzida, principalmente devido a diminuição dos metais livres disponíveis, visto que o aumento da salinidade favorece a complexação destes com ânions como cloretos, além de aumentar a competição entre os metais e os cátions presentes na águas, como Na⁺, Mg²⁺ e Ca²⁺, pela ligação com os sítios de ação tóxica nos epitélios dos organismos aquáticos (i.e brânquias e intestinos) (Bianchini & Gilles, 2000; Paquin et al., 2000; Gensemer et al., 2002). Por exemplo, para jovens de truta (*Salvelinus fontinalis*) a CL₅₀-96h do ferro determinada em água com baixa concentrações de sais dissolvidos foi de 1,89 mg/L, sendo a toxicidade do metal reduzida com o aumento da concentração de Ca²⁺ na água (Gonzalez et al., 1990).

Os mecanismos de ação tóxica do ferro nos peixes ainda não foram completamente elucidados (BURY et al., 2012), contudo, estudos têm evidenciado que o ferro pode promover distúrbios respiratórios e na homeostase iônica-osmótica dos animais, associados a alterações morfo-funcionais no epitélio branquial. Segundo Bury e colaboradores (2012), em experimentos nos quais houve mortalidade de peixes quando expostos à altas concentrações de ferro na água, observou-se acúmulo do metal no epitélio branquial, constituindo possível via de ação tóxica do ferro visto que essas alterações histopatológicas podem interferir negativamente nas trocas gasosas necessárias para a manutenção da pressão parcial de oxigênio no sangue dos animais (BURY et al., 2012). Por exemplo, em estudo realizado com a truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), foi reportado que a exposição por até dois dias às concentrações de 1 a 6 mg/L de Fe total resultou em danos significativos no epitélio respiratório, como descolamento epitelial, hipertrofia e degeneração dos tecidos braquiais dos animais (Fish, 2009). Exemplares de *Tilapia sparrmanii* expostos à 88 mg/L de ferro demonstraram comportamento anômalo, apresentando padrão respiratório errático, similar a “tosse”, associado a significativo aumento de consumo de oxigênio durante as primeiras 24h, 48h e 72h de exposição (Grobler et al., 1989). Em outro estudo realizado com a truta marrom (*Salmo trutta*), houve um significativo depósito de óxidos de ferro nas brânquias dos animais quando expostos a dois tipos de sulfato férrico, sendo determinado CL₅₀-96h de 28 mg/L e 47 mg/L de ferro total (Dalzell & MacFarlane, 1999). Já Peuranen e colaboradores (1994) demonstraram que exemplares de truta marrom apresentaram severos danos braquiais quando expostos a 2 mg/L de ferro, por dois a três dias em pH variando entre 5.0 e 6.0, sendo verificada fusão das lamelas e hipertrofia das células epiteliais, que culminaram no aumento da distância de difusão nas brânquias, prejudicando a absorção de oxigênio pelos peixes.

Por outro lado, estudos também sugerem que o ferro pode atuar de forma negativa na homeostase iônica e osmótica de peixes. Em exemplares de *S. fontinalis* expostos por 48h a 1 e 2,5 mg/L de ferro o conteúdo de Na⁺ corpóreo foi significativamente reduzido, enquanto os níveis plasmáticos de Na⁺ não foram alterados (Gonzalez et al., 1990). Por outro lado, exemplares do peixe branco *Coregonus lavaretus* expostos por 30 dias a 8 mg/L de ferro apresentaram níveis reduzidos de Na⁺ e K⁺ no plasma, efeito que foi não observado quando os animais foram expostos a mesma concentração de ferro em águas naturais ricas em ácidos húmicos (Lappivaara et al., 1999; Burry & Grosell, 2003). Adicionalmente, exemplares do bagre amazônico *Hoplosternum litoralle* (Tamoatá) expostos por três horas a 57 mg/L de

ferro exibiram fortes distúrbios na homeostase do Na^+ , apresentando perdas líquidas de Na^+ mais elevadas, além de inibição significativa da taxa de absorção de Na^+ associada à redução da atividade das enzimas Na^+/K^+ -ATPase e H^+ -ATPase nos rins dos animais (Duarte et al., 2018).

Evidências têm sugerido que os distúrbios ionoregulatórios observados em peixes expostos ao ferro se devem também à ativação de respostas de estresse, como visto pelo aumento dos níveis circulantes de glicose, cortisol e lactato, além da depleção dos estoques hepáticos de glicogênio, que em conjunto são amplamente utilizados como indicadores de stress nos peixes (Lappivaara & Marttinen, 2005; BURY et al., 2012). Nos teleósteos, as brânquias e o intestino são as principais vias de entrada de agentes tóxicos, de forma que alterações morfo-funcionais nesses órgãos em decorrência da exposição a diversos compostos químicos são frequentes. Estudos têm evidenciado que a presença de metais na água pode resultar em distúrbios na osmolaridade e na concentração dos principais íons (Na^+ , Cl^- , Ca^{2+} e Mg^{2+}) plasmáticos, podendo levar o animal a morte (GIULIO & HINTON, 2008). O controle hidromineral é de primordial importância para os peixes, visto que a maioria das espécies são consideradas estenoalinas. Essas espécies vivem estritamente na água doce, onde a osmolaridade do meio é em geral menor que 5 mOsmol/L e, portanto, abaixo da osmolaridade do plasma sanguíneo (e.g. de 300 a 325 mOsmol/L), ou habitam o ambiente marinho onde a osmolaridade é pelo menos três vezes maior (entre 950 à 1050 mOsmol/L) que o valor encontrado no fluido extracelular dos animais (GIULIO & HINTON, 2008). Assim, o efluxo de íons e a absorção passiva de água em peixes de água doce, assim como o ganho líquido de íons acompanhado pela perda osmótica de água em peixes de água salgada, são diretamente controlados pelo controle ativo da permeabilidade dos epitélios transportadores à água e sais, resultando em grandes gastos energéticos pelos animais (GIULIO & HINTON, 2008).

Por outro lado, as espécies de teleósteos eurialinos podem facilmente ajustar o funcionamento de seus sistemas fisiológicos às oscilações da salinidade do meio, podendo se movimentar entre os ambientes marinho, estuarino e de água doce. Essas adaptações fisiológicas, particularmente de sua capacidade osmo e ionoregulatória, ocorrem em dois momentos distintos e são dependentes do tempo em que o animal permanece em cada ambiente (Prodócimo & Freire, 2006). A primeira fase é conhecida como “período adaptativo” onde a osmolaridade dos fluidos corpóreos do animal (e.g. plasma) é alterada em função da salinidade do meio; ou seja, quando o animal se move para um ambiente mais

diluído (e.g. estuários e água doce) a osmolaridade do plasma é reduzida devido à perda de sais por difusão e ganho de água por osmose. Já quando o animal se move para o ambiente marinho ocorre o inverso, aumento da osmolaridade plasmática em decorrência do ganho de sais e perda de água. Na segunda fase, chamada de “período regulatório”, a osmolaridade e concentração de sais dissolvidos no plasma tendem a ser ativamente reguladas para que estas sejam mantidas dentro dos limites fisiológicos da homeostase (Prodocimo & Freire, 2006). Nessa fase são necessários ajustes hormonais visando ordenar o transporte e permeabilidade dos epitélios (e.g. brânquias, intestino e rins) aos íons e a água para a manutenção do equilíbrio iônico e osmótico interno (Baldisserotto, 2009). Assim, uma vez que a salinidade ambiental difere da concentração osmótica interna nos peixes, faz-se necessário que os órgãos responsáveis pela osmorregulação trabalhem em conjunto visando a manutenção da homeostase (McCormick, 2001; Sterzelecki et al., 2013).

Nesse contexto, as brânquias são os órgão que consomem mais energia durante esse processo (Sangiao- Alvarellos et al., 2003; Sterzelecki et al., 2013), mais especificamente devido a atividade da enzima Na^+/K^+ -ATPase, localizada na membrana basolateral dos ionócitos (i.e. células especializadas na troca de íons com o meio externo), que atuam diretamente na geração dos gradientes eletroquímicos necessários para a manutenção dos processos de absorção e/ou excreção ativa de sais em ambientes hipo ou hiperosmóticos, respectivamente (Sterzelecki et al., 2013). A atividade da Na^+/K^+ -ATPase despende pelo menos metade da energia consumida durante as trocas de Na^+/H^+ nos ionócitos e, por esta razão, a Na^+/K^+ -ATPase é considerada um bom biomarcador para se avaliar respostas iono-osmoregulatórias em peixes teleósteos (Sterzelecki et al., 2013).

Sabe-se que a taxa de excreção de amônia em peixes teleósteos é determinada pela magnitude do gradiente entre as concentrações de amônia na água e o sangue do animal. Contudo, a excreção de amônia para o ambiente também pode ser influenciada por diferentes fatores ambientais, sendo aumentada em animais alimentados com dietas de maior percentual proteico, e em maiores temperaturas e salinidades (Bucking, 2017). Além disso, a presença de contaminantes, como metais, podem causar distúrbios no equilíbrio ácido-base dos organismos estimulando a excreção de amônia para o ambiente (Wilson & Taylor, 1993; Branchard & Grosell, 2006; Carvalho et al, 2017; Bucking, 2017). Em soluções aquosas, a amônia existe em duas espécies químicas em equilíbrio $\text{NH}_3 + \text{H}_3\text{O}^+ \leftrightarrow \text{NH}_4^+ + \text{H}_2\text{O}$, sendo o NH_3 sua forma mais tóxica, favorecida em condições ambientais de pH reduzido (WRIGHT &

ANDERSON, 2001). A amônia excretada é produto do catabolismo de proteínas, como resultado da transaminação de amino ácidos seguido pela desaminação do glutamato e/ou pela desaminação de adenilatos (revisto por Bucking, 2017), que ocorre principalmente no fígado em decorrência da atividade muscular, sendo excretada pelas brânquias.

Os peixes chamados popularmente como robalo pertencem a família Centropomidae e possuem distribuição ampla pelos dois lados do continente americano (Cervignon, 1966 apud Tonini et al., 2007), povoando desde a região norte até o sul do Brasil. Segundo coleta realizada por Rodrigues (2005) na foz do rio Doce, *Centropomus undecimalis* (Robalo-flecha) e *Centropomus parallelus* (Robalo peva) são as espécies deste gênero capturadas com maior frequência na região, apresentando grande importância socioeconômica nas regiões em que ocorrem devido ao consumo humano, por sua procura para realização da prática de pesca esportiva e também para uso ornamental. De hábito carnívoro, *C. parallelus* costuma reproduzir-se apenas uma vez por ano (Tonini et al., 2007), sendo encontrada preferencialmente em águas costeiras estuarinas, em rios, baías enseadas e manguezais, sendo encontrado também em regiões de cabeceiras de rios (Alvarez- Lajonchère et al., 1982; Tucker Jr, 1985; Teixeira, 1997; Taylor et al., 2000; Tonini et al., 2007). Assim, essas espécies têm sido consideradas eurialinas visto que estudos têm demonstrado que as espécies suportam, e tendem habitar, ambientes com consideráveis variações de salinidade (Rivas, 1986; Maciel, 2005, Tsuzuki et al., 2007; Wosnick, 2009). Estudos laboratoriais demonstraram que *C. parallelus* possui grande capacidade de adaptação à variações de salinidade de 5‰ à 35‰, sem que fossem registradas alterações na sobrevivência, peso e comprimento dos animais após 30 e 60 dias. (Sterzelecki et al., 2013).

Uma vez que *C. parallelus* ocorre na foz do rio Doce e possui grande importância socioeconômica, mostra-se relevante aprimorar a compreensão dos mecanismos e vias de ação tóxica do ferro, já que a região possui histórico de contaminações e foi alvo de recente aporte de rejeitos de minério de ferro em decorrência do rompimento da barragem do Fundão. Além do grande aporte de ferro logo após o acidente que se estendeu até a área marinha, o que levou a um grande aumento na concentração do elemento na água, houve um significativo incremento na quantidade do metal junto ao sedimento ao longo da bacia hidrográfica, possibilitando que ocorram repetidos eventos de contaminação em função da ressuspensão do sedimento e da lixiviação do solo nos períodos chuvosos.

2. Objetivos

2.1 Objetivo Geral

O objetivo geral da proposta foi verificar a influência da salinidade nos efeitos tóxicos do ferro sobre a capacidade osmo e ionoregulatória de jovens de *Centropomus parallelus*, com o intuito de contribuir para melhor entendimento dos mecanismos fisiológicos desencadeados em resposta à contaminantes na espécie. Para atingir os objetivos gerais da proposta, os seguintes objetivos específicos foram traçados:

2.2 Objetivos Específicos

Série 1

- 1) Verificar o efeito do ferro sobre a homeostase iônica e osmorregulatória (concentrações de Na^+ , Cl^- , proteínas e glicose plasmáticas) em jovens de *Centropomus parallelus* submetidos à redução aguda da salinidade da água;
- 2) Analisar as respostas das enzimas osmorregulatórias (Na^+/K^+ -ATPase, H^+ -ATPase e anidrase carbônica) nas brânquias de jovens de *Centropomus parallelus* submetidos à redução aguda da salinidade da água e expostos ao ferro;
- 3) Determinar a taxa de excreção de amônia nos jovens de *Centropomus parallelus* durante exposição ao ferro concomitante à redução aguda de salinidade (de 15‰ para 5‰ e 0‰).

Série 2

- 1) Verificar a influência da aclimação a três salinidades (0‰, 5‰ e 15 ‰) sobre a homeostase iônica e osmorregulatória (concentrações de Na^+ , Cl^- , proteínas totais e glicose plasmáticas) de jovens de *Centropomus parallelus* expostos ao ferro;
- 2) Analisar as respostas das enzimas osmorregulatórias (Na^+/K^+ -ATPase, H^+ -ATPase e anidrase carbônica) nas brânquias de jovens de *Centropomus parallelus* aclimatados em três salinidades (0‰, 5‰ e 15‰) e expostos ao ferro.

3. Material & Métodos

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Ictiologia Aplicada (Lab Peixe) da Universidade de Vila Velha (UVV), localizada na cidade de Vila Velha/ES. Os jovens de *Centropomus parallelus*, pesando em média $17,64 \pm 2,40$ g e medindo de 11,6 a 14,9 cm foram adquiridos junto a Pandini Maricultura criadores comerciais, onde foram cultivados nos estágios iniciais de desenvolvimento em salinidade 25‰ a 35‰, sob fotoperíodo de 12/12. Posteriormente, os animais transportados até as dependências do Lab Peixe, sendo inicialmente aclimatados às condições de laboratório em caixas d'água de 150 L em salinidade 15‰. Nesse período inicial de aclimação os animais foram mantidos por no mínimo 7 dias nas condições de laboratório, sendo alimentados diariamente.

3.1 Procedimentos experimentais

Na primeira série experimental, após os animais serem aclimatados à 15‰ por 7 dias, e estes foram dispostos inicialmente em 48 aquários individuais de 5 L com água do mar diluída em salinidade 15‰ sob aeração constante durante o período de pré-aclimação aos aquários por 20 h. Após esse período, a água dos aquários foi renovada com água diluída do mar a 15‰, 5‰ e 0‰, de forma que os dois últimos grupos foram submetidos a um choque agudo na salinidade. Além disso, em cada uma das salinidades testadas, houve um grupo exposto a 1,0 mg/L de Fe (concentração nominal obtida através da diluição de sulfato ferroso FeSO_4), além dos aquários controles sem a adição de ferro (N=8 para cada tratamento). Os animais foram expostos a cada um dos tratamentos por 24 h de exposição, sendo anestesiados e eutanazidos ao final do período em solução de benzocaína a 10 µg/L para a retirada de amostras de sangue por punção da veia caudal, e retiradas amostras das brânquias.

Já na segunda série experimental, os exemplares de *C. parallelus* foram previamente aclimatados as salinidades 0‰, 5‰ e 15‰ em tanques de 150 L (N=10 por tanque, sendo dois tanques para cada salinidade testada). Para tanto, ao longo de 3 dias a salinidade da água foi reduzida diariamente em 33% até atingir a salinidade experimental desejada, sendo os animais então mantidos por mais 10 dias nestas condições. Ao longo da aclimação os animais foram alimentados *ad libitum* com ração comercial. A exposição à 1 mg/L de Fe total ocorreu nos próprios tanques de 150 L para cada uma das salinidades (0‰, 5‰ e 15‰), além dos respectivos grupos controles sem exposição ao metal. Após as 24 h de exposição aos tratamentos todos os indivíduos foram retirados dos tanques, anestesiados e eutanazidos em

solução de benzocaína a 10 µg/L para a coleta das amostras de sangue por punção da veia caudal, além da retiradas das amostras de brânquias. Ao longo do ensaio experimental foram avaliados parâmetros físicos químicos da água, tais como: temperatura, pH e salinidade.

3.2 Procedimentos analíticos e cálculos

As concentrações de ferro total na água utilizada nos tanques e aquários de ambas as séries experimentais foram determinadas por espectrofotometria de chama (espectrofotômetro ICE 3000 AA05141602) à 248,3 nm. A concentração de Cl^- no plasma foi obtida por meio de ensaio colorimétrico utilizando os reagentes tiocianato de mercúrio ($\text{Hg}(\text{SCN})_2$), nitrato férrico ($\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ a 20,2% e água deionizada para formular solução de uso a 1:1:13 respectivamente. As amostras de plasma foram diluídas a 1:1000 em água deionizada e inseridos 150 µL de amostra diluída somado a 150 µL de solução de uso dispostas em triplicata nas microplacas para leitura em espectrofotômetro a 480nm, e posterior comparação à curva padrão obtida através da diluição de padrões de NaCl a 100mM, conforme Zall et al. (1956). A concentração de Na^+ foi lida em fotômetro de chama (Analyzer 910). A concentração de glicose plasmática foi obtida utilizando kit comercial de Glicose Enzimática, método colorimétrico via oxidação induzida pela glicose oxidase, lida em espectrofotômetro à 500 nm. A concentração de proteínas totais no plasma foi determinada colorimetricamente via método descrito por Bradford (1976).

A atividade da enzima anidrase carbônica foi obtida via catálise da enzima em solução de CO_2 , a partir de homogenato de tecido branquial a 10% em solução de 225 mM de manitol, 75 mM de sacarose, 10 mM de Tris e 10 mM de NaH_2PO_4 e solução de reação composta por 225 mM de manitol, 75 mM de sacarose, 10mM de Tris e 10 mM NaH_2PO_4 . A reação é operacionalizada em um béquer de vidro no qual coloca-se 7,5 ml da solução de reação e 0,05 ml de homegenizado em temperatura de 2,5°C registrando-se o pH. Na sequencia, foi adicionado 1ml de água destilada saturada com CO_2 , registrando-se ao longo de 30 segundos os novos valores de pH resultantes da geração de H^+ desencadeada na reação, cujos registros das variáveis pH vesus tempo permitiram determinar a “taxa de reação catalizada” por meio de regressão linear. Da mesma forma, são calculados “brancos”, sem a presença do homogenato, a partir da mesma solução de reação com 0,05 ml da solução utilizada na homogenização dos tecidos, cujos varoles das mesmas variáveis permitirão o cálculo da “taxa não catalizada”. Calcula-se a atividade enzimática (AE) a partir da diferença da inclinação da

reta ao final da reação catalisada e não catalisada, relativizadas pela concentração de proteína, segundo método de Henry (1991).

AE: (taxa catalizada/ taxa não catalizada -1)/mg proteína em 0,05 ml de homogenato

Para obtenção da atividade das enzimas Na^+/K^+ -ATPase e H^+ -ATPase foi aplicado método de Gibbs & Somero (1989), utilizando-se cerca de 100 mg de tecido branquial homogeneizado em 1 ml de tampão centrifugado por 5 min a 4 °C. O tampão de homogeneização foi composto pela diluição em cinco vezes em solução SEID a 0,5% (0,1 g de ácido deoxicólico em 20 ml de tampão SEI - 150 mM de sacarose, 50 mM de Imidazol, 10 mM de EDTA em pH ajustado em 7,5). A solução de reação foi composta por 1,0 mM de ATP, 0,2 mM de NADH, 3 IU/ml PK, 2IU/ml LDH, 0,1 mM de frutose 1,6 difosfato e 2 mM PEP, diluídos em solução de mistura composta por 30 mM Imidazol, 45 mM NaCl, 15 mM de KCl, 3 mM de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e 0,4 mM KCN. Os inibidores específicos da atividade enzimática foram preparados a 2mM de ouabaína e NEM, para Na^+/K^+ -ATPase e H^+ -ATPase respectivamente.

As leituras foram realizadas em microplacas de 96 poços, sendo distribuídas em três quadruplicatas por amostra, contendo 5 μL de homogenato e 200 μL da solução de reação nas primeiras (fração total), e nas duas subseqüentes acrescidos da solução de reação contendo ouabaína ou NEM. Foram verificadas em espectrofotômetro à 340 nm as inclinações (*slopes*) a partir do decaimento da absorbância das amostras, a partir das quais foram calculadas as diferenças de inclinações entre as frações totais e amostras com inibidores, relativizadas às concentrações de proteínas conforme equação:

$$\text{Atividade enzimática} = \{(\text{inclinação} \cdot 56,6)/([\text{Proteínas}] \cdot 0,005) \cdot 60/1000\} \cdot -1$$

A concentração de amônia na água foi determinada através do uso de 30 μL das soluções de salicilato de sódio a 40% (dissolução de 4g de $\text{C}_7\text{H}_5\text{NaO}_3$ em 10ml de água deionizada), nitroprussiato de sódio (dissolução de 0,02g de $\text{Na}_2\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ em 100ml de água deionizada) e hipoclorito a 6% (2:1 em citrato de sódio) somado a 120 μL de amostra por poço, dispostas em triplicata nas microplacas. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 650nm e comparada à curva padrão obtida através da diluição de NH_4Cl a 10mM. Para cálculo da taxa de excreção de amônia ($J_{\text{Amm-N}}$; nM/g/h), foram consideradas as variações nas concentrações de amônia na água ($\mu\text{M/L}$), relativizadas ao peso dos animais (g), ao volume

das dos aquários em que os indivíduos foram expostos (L), e ao tempo de intervalo de exposição (h). Para tanto, foi utilizada a equação a seguir:

$$J_{\text{Amm}}-N = [(X1-X2)*V] / (P*T)$$

Em que X1 e X2 são respectivamente as concentrações iniciais e finais de amônia total de cada intervalo experimental, V é o volume (L) do aquário, P o peso (g) do animal e T refere-se ao tempo (h) do intervalo de exposição.

3.3 Análise estatística

Os resultados obtidos foram expressos como média $\pm$ erro padrão. Os dados foram testados quanto a normalidade pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Em cada série experimental, diferenças estatísticas significativas entre os parâmetros iônico e osmorregulatórios, e atividades das enzimas (AC, NKA e H^+ -ATPase) nas brânquias dos jovens de *C. parallelus* expostos aos diferentes tratamentos foram avaliados por meio de uma análise de variância de dois fatores (ANOVA two-way), sendo a salinidade (15‰, 5‰ e 0‰) e a exposição ao ferro os fatores da ANOVA, seguido de teste *a posteriori* de comparação múltipla de pares Holm-Sidak. Foi mantido o nível de significância de $P < 0,05$.

4. Resultados

Os valores médios de temperatura e pH junto aos erros padrão da primeira série experimental foram respectivamente $28,4^\circ\text{C} \pm 0,056$ e $7,1 \pm 0,026$. Os valores médios de salinidade e erros padrão para os grupos considerados em 15‰, 5‰ e 0‰ foram respectivamente $15,0 \pm 0,008$, $5,0 \pm 0,008$ e $0,1 \pm 0,003$. Na **Tabela 1** são apresentados os dados correspondentes às concentrações de ferro total na água dos aquários da primeira série experimental, em mg/L. Não foram identificadas alterações estatisticamente significativas entre as três salinidades testadas.

Tabela 1. Valores de ferro total na água dos aquários no ensaio em que houve redução aguda na salinidade de 15‰ para 5‰ e 0‰, durante o período de 24h de exposição ao ferro e nos respectivos grupos controle.

Tratamento		Ferro Total (mg/L)
Sal 15‰	Controle	0,03
	Ferro	0,67
Sal 5‰	Controle	0,03
	Ferro	0,84
Sal 0‰	Controle	0,04
	Ferro	0,92

Os valores das concentrações de Cl^- e Na^+ plasmáticos dos jovens de *C. parallelus* submetidos ao protocolo de redução aguda da salinidade ao final de 24h de exposição ao ferro, além dos grupos controle, estão representados na **Figura 1**. Nos animais submetidos ao choque agudo à salinidade 0‰ e expostos ao ferro as concentrações de Cl^- e Na^+ plasmático foram significativamente aumentadas em comparação aos peixes expostos ao metal em salinidade 5‰ (1,6 e 1,1 vezes, respectivamente), e mantidos em 15‰ (1,8 e 1,2 vezes, respectivamente). Além disso, esses animais apresentaram níveis de Cl^- plasmático 1,4 vezes mais elevado em relação aos peixes do grupo controle submetidos aos choque agudo à salinidade 0‰ (**Fig. 1A**). Ainda em relação ao cloreto plasmático, não há interação estatisticamente significativa entre salinidade e tratamento. ($P = 0,072$). Já as concentrações plasmáticas de Na^+ do grupo exposto ao ferro e submetido à redução aguda para salinidade 0‰, apesar de também serem aumentadas, não apresentaram diferenças significativas em relação ao grupo controle ($P = 0,201$) (**Fig. 1B**). Quanto ao sódio plasmático, não há interação estatisticamente significativa entre salinidade e tratamento ($P = 0,716$). Interessante notar que, desconsiderando-se os efeitos associados ao ferro, não foram observadas diferenças significativas nas concentrações de Na^+ e Cl^- no plasma dos animais submetidos ao choque agudo às salinidades 5‰ e 0‰, em relação aos animais mantidos em 15‰ (**Fig. 1**).

A atividade das enzimas H^+ -ATPase, Na^+/K^+ -ATPase e anidrase carbônica nas brânquias dos jovens de *C. parallelus* submetidos à redução aguda de salinidade expostos ao ferro e grupos controle estão representadas na **Figura 2**. Não foram verificadas diferenças

significativas ao final de 24 h entre os tratamentos e salinidades para a atividade da enzima H^+ -ATPase (**Fig. 2A**). O grupo controle mantido em salinidade 15‰ apresentou atividade da enzima Na^+/K^+ -ATPase significativamente maior em relação aos grupos submetidos à redução aguda de salinidade para 5‰ (2,6 vezes) e 0‰ (2,5 vezes). Por outro lado, nos animais expostos por 24 h ao ferro, não foram observadas diferenças significativas na atividade da Na^+/K^+ -ATPase após o choque agudo as salinidades reduzidas. Além disso, os peixes expostos ao ferro e mantidos em salinidade 15‰ apresentaram atividade da Na^+/K^+ -ATPase 52,2% menor em relação ao grupo controle mantido em mesma salinidade (**Fig 2B**).

A atividade média da enzima anidrase carbônica nas brânquias dos exemplares de *C. parallelus* ao final do período experimental está representada na **Figura 2C**. O grupo controle mantido em salinidade 15‰ apresentou atividade da enzima significativamente maior em relação aos animais submetidos à redução aguda para as salinidades 5‰ (1,2 vezes) e 0‰ (1,2 vezes), enquanto os três grupos expostos ao ferro não apresentaram variações significativas entre as salinidades testadas ($P \geq 0,101$).

Não há interação estatisticamente significativa entre salinidade e tratamento para a atividade das enzimas H^+ -ATPase ($P = 0,967$) e anidrase carbônica ($P = 0,841$), ao passo que essa interação é significativa para Na^+/K^+ -ATPase ($P = 0,037$).

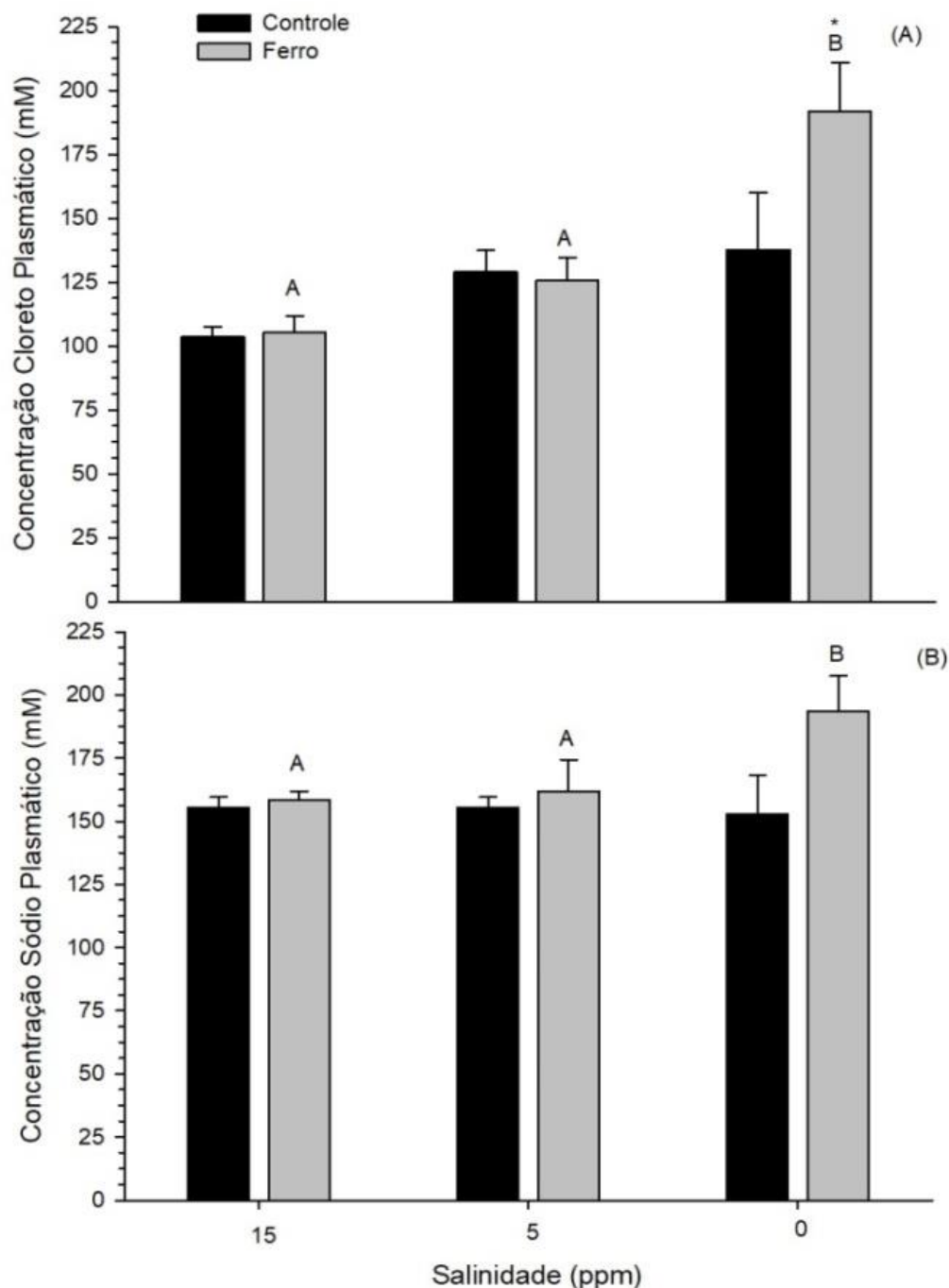


Figura 1. Concentração plasmática de cloreto (A) e sódio (B) de jovens de *Centropomus parallelus* aclimatados em salinidade 15‰ e, posteriormente, expostos por 24 horas às salinidades 5‰ e 0‰ na ausência e presença de 1 mg/L de ferro na água. Letras maiúsculas diferentes representam diferenças significativas na concentração plasmática dos íons entre os grupos expostos ao ferro nas diferentes salinidades. Asteriscos (*) representam diferenças significativas entre os animais do grupo controle e expostos ao ferro em uma mesma salinidade ($p < 0,05$).

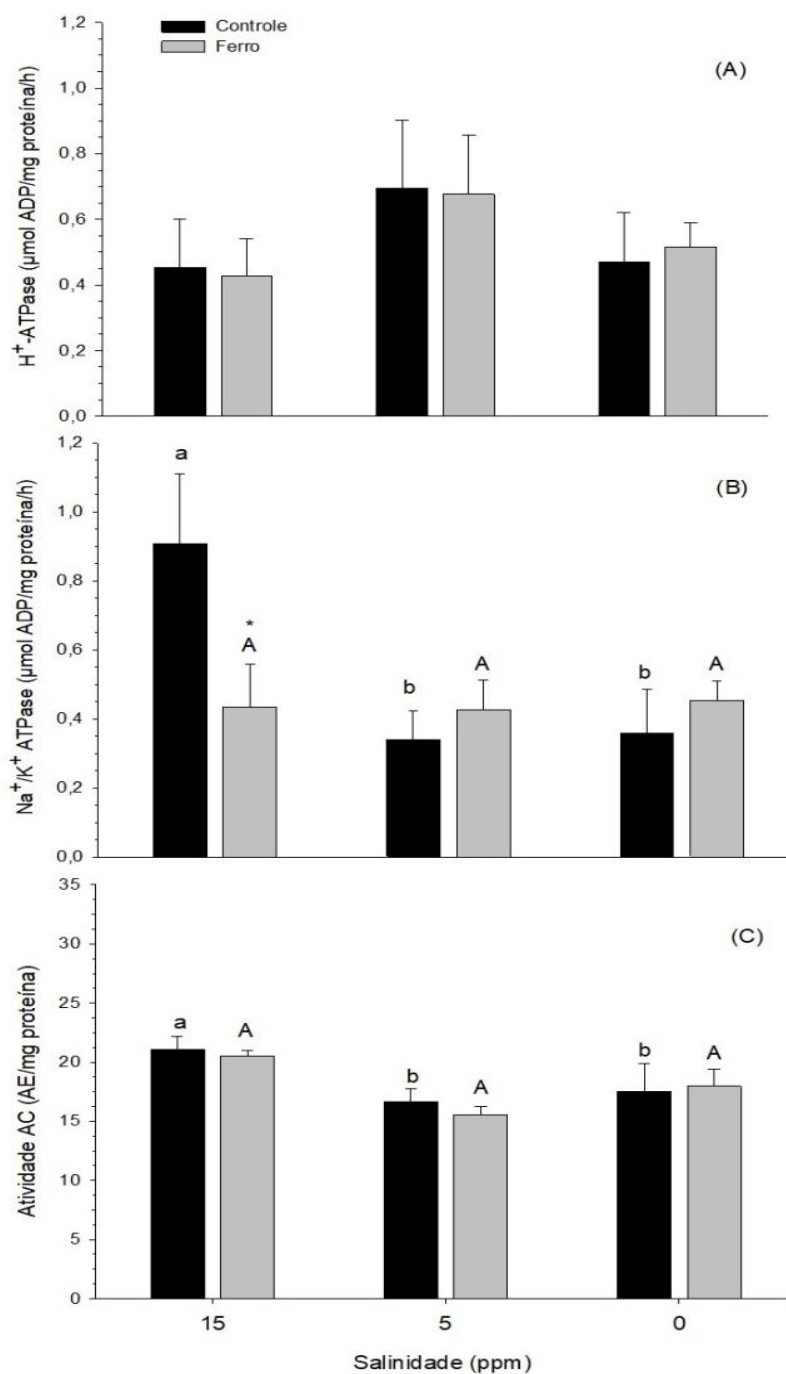


Figura 2. Atividade das enzimas H^+ -ATPase, Na^+/K^+ -ATPase e anidrase carbônica de jovens de *Centropomus parallelus* aclimatados em salinidade 15‰ e, posteriormente, expostos por 24 horas às salinidades 5‰ e 0‰ na ausência e presença de 1mg/L de ferro na água. Letras maiúsculas diferentes representam diferenças significativas entre os grupos expostos ao ferro nas diferentes salinidades. Letras minúsculas diferentes representam diferenças significativas entre os grupos controles nas diferentes salinidades. Asteriscos (*) representam diferenças significativas entre os animais controle e expostos ao ferro em uma mesma salinidade ($p < 0,05$).

Os valores das concentrações plasmáticas de proteínas e glicose dos jovens de *C. parallelus* submetidos ao protocolo de redução aguda da salinidade ao final de 24 h de exposição ao ferro, além dos grupos controle, estão representados na **Figura 3**. Os animais expostos ao ferro e submetidos ao choque agudo à salinidade 0‰ apresentaram redução de 55% na concentração de proteínas plasmáticas em relação aos peixes nas salinidades 15‰ e 5‰, enquanto que para os grupos controle não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos em diferentes salinidades (**Fig. 3A**). Embora a concentração de proteínas totais no plasma dos peixes expostos ao metal em 15‰ e em 0‰ tenham apresentado aumento ($p = 0,120$) e redução ($p=0,221$), respectivamente, em relação aos grupos controle correspondentes, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas na concentração de glicose plasmática dos exemplares de *C. parallelus* entre as salinidades testadas, expostos ou não ao ferro, ao longo das 24 horas de exposição (**Fig. 3B**). Não foram verificadas interações estatisticamente significativas entre salinidade e tratamento para glicose ($P = 0,221$) e proteínas ($P = 0,155$) plasmáticas.

As taxas de excreção de amônia (0-24h) dos jovens de *C. parallelus* submetidos ao protocolo de redução aguda da salinidade ao final de 24h de exposição ao ferro, além dos grupos controle, estão representados na **Figura 4**. Não foram identificadas variações estatisticamente significativas entre os tratamentos e as salinidades testadas. As maiores taxas médias de excreção de amônia ocorrem nos grupos controle submetidos à redução aguda de salinidade para 5‰ ($0,693\mu\text{M/g/h}$) e 0‰ ($0,663\mu\text{M/g/h}$). Não foi verificada interação estatisticamente significativa entre salinidade e tratamento ($P = 0,899$) em relação às taxas de excreção de amônia.

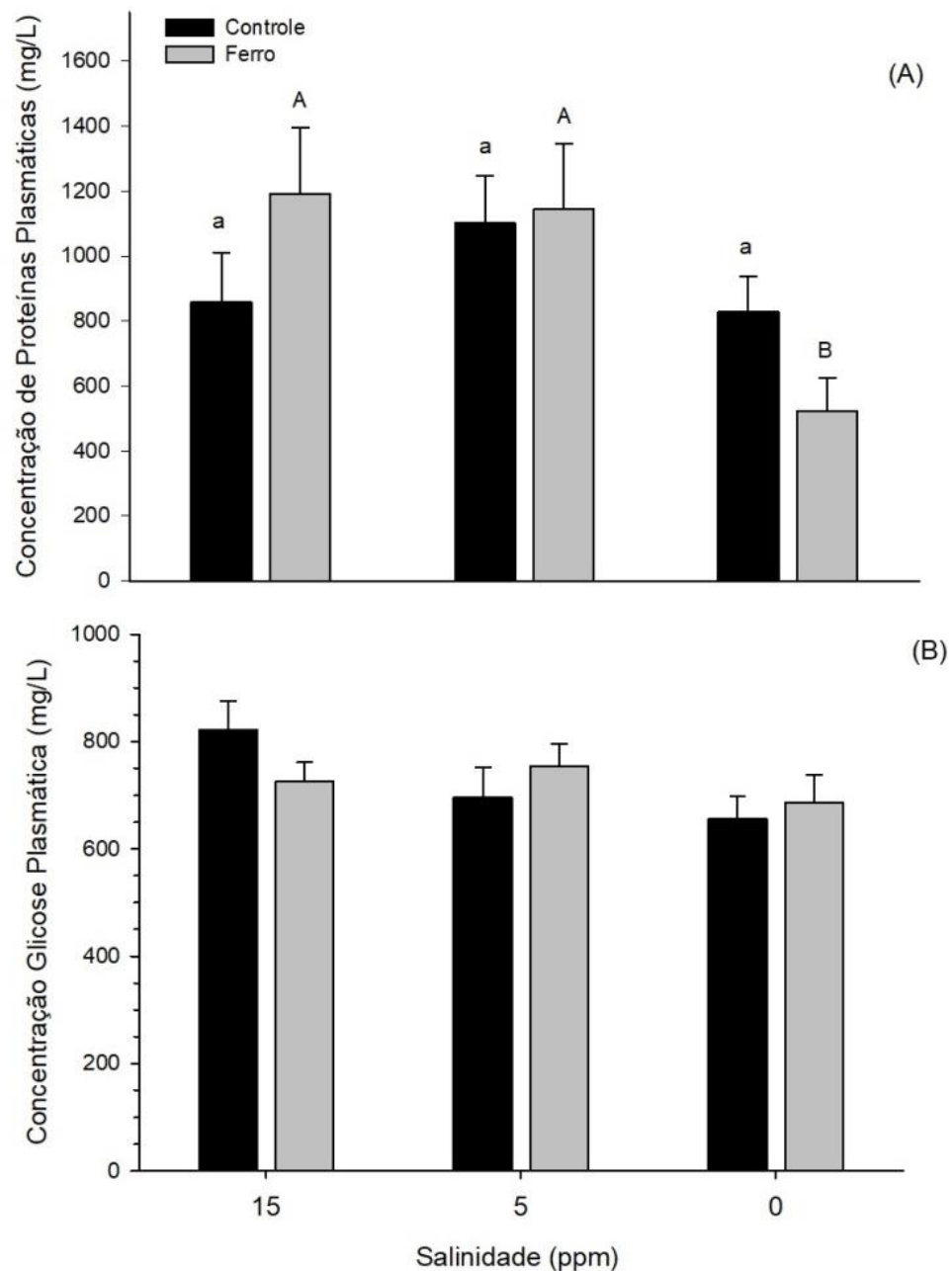


Figura 3. Concentração plasmática de proteínas totais (A) e glicose em (B) de jovens de *Centropomus parallelus* aclimatados em salinidade 15‰ e, posteriormente, expostos por 24 horas às salinidades 5‰ e 0‰ na ausência e presença de 1 mg/L de ferro na água. Letras maiúsculas representam diferenças significativas entre os grupos expostos ao ferro nas diferentes salinidades. Letras minúsculas diferentes representam diferenças significativas entre os grupos controles nas diferentes salinidades.

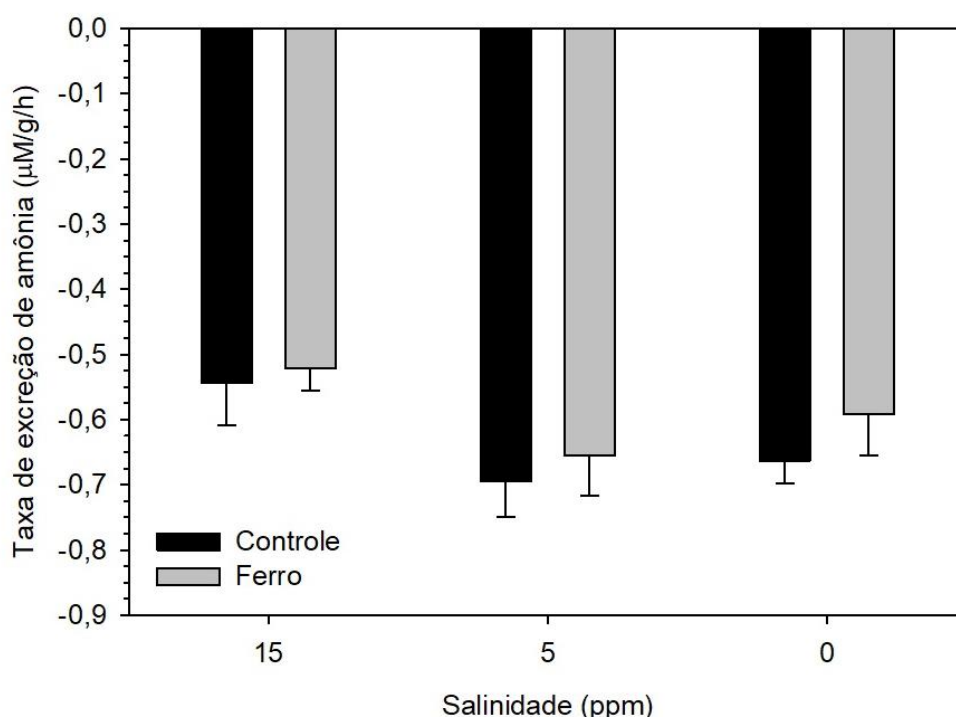


Figura 4. Taxa de excreção de amônia (0-24h) em jovens de *Centropomus parallelus* aclimatados em salinidade 15‰ e, posteriormente, expostos por 24 horas às salinidades 5‰ e 0‰ na ausência e presença de 1 mg/L de ferro na água.

Os valores médios de temperatura e pH junto aos erros padrão da segunda série experimental, em que os peixes foram expostos ao ferro nas mesmas salinidades de aclimação, foram respectivamente $27,6\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,0463$ e $7,1 \pm 0,026$. Os valores médios de salinidade e erros padrão para os grupos considerados em 15‰, 5‰ e 0‰ foram de $15,0 \pm 0,094$, $5,0 \pm 0,050$, e $0,2 \pm 0,046$. Na **Tabela 2** estão representadas as concentrações de ferro total determinadas a partir de amostras de água dos tanques utilizados na segunda série experimental, em mg/L. Não foram identificadas diferenças estatisticamente significativas na concentração de ferro entre as três salinidades testadas.

Tabela 2. Concentrações de ferro total na água dos tanques utilizados nos ensaios em que os peixes foram aclimatados e expostos ao ferro em mesma salinidade, isto é, em 15‰, 5‰ e 0‰ pelo período de 24h e grupos controle.

Tratamento		Ferro Total (mg/L)
Sal 15‰	Controle	0,04
	Ferro	0,84
Sal 5‰	Controle	0,03
	Ferro	1,05
Sal 0‰	Controle	0,02
	Ferro	1,27

As concentrações de Cl^- e Na^+ determinadas no plasma dos exemplares de *C. parallelus* aclimatados por 10 dias às salinidades 0‰, 5‰ e 15‰ e expostos à 1 mg/L ferro total por 24 horas estão representados na **Figura 5**. Não há interação estatisticamente significativa entre salinidade e tratamento para cloreto ($P = 0,121$) e sódio ($P = 0,137$) plasmáticos. A aclimação à salinidade de 5‰ promoveu a redução significativa da concentração plasmática de Cl^- dos animais do grupo controle (21,7%) em relação aos peixes mantidos em 15‰, enquanto os animais aclimatados à 0‰ apresentaram níveis de Cl^- plasmático similar aos peixes mantidos em 15‰ (**Fig. 5A**). Não foram observadas variações significativas nos níveis plasmáticos de Na^+ entre os grupos sem exposição ao ferro aclimatados nas três salinidades (**Fig. 5B**). Por outro lado, nos peixes expostos ao ferro os níveis plasmáticos de Cl^- e Na^+ foram significativamente reduzidos nos exemplares de *C. parallelus* aclimatados em 0‰ (28,6% e 25,4%, respectivamente), em comparação aos animais mantidos em 15‰ (**Fig 5**). O grupo exposto ao ferro em 5‰ apresentou redução estatisticamente significativa de 18,4% na concentração de cloreto plasmático em relação ao grupo exposto ao metal em 15‰ (**Fig 5A**), sem que diferenças estatisticamente significativas tenham sido verificadas em relação à concentração de sódio plasmático (**Fig 5B**). Nos animais expostos ao ferro após a aclimação à salinidade 0‰ a concentração de Cl^- plasmático foi 17,6% menor do que observados no grupo controle na mesma salinidade (**Fig. 5A**). Não foram observadas diferenças significativas nas concentrações de Na^+ plasmático entre os grupos expostos ao ferro e controle nas três salinidades testadas, apesar da redução verificada em 0‰ ($p = 0,056$) (**Fig. 5B**).

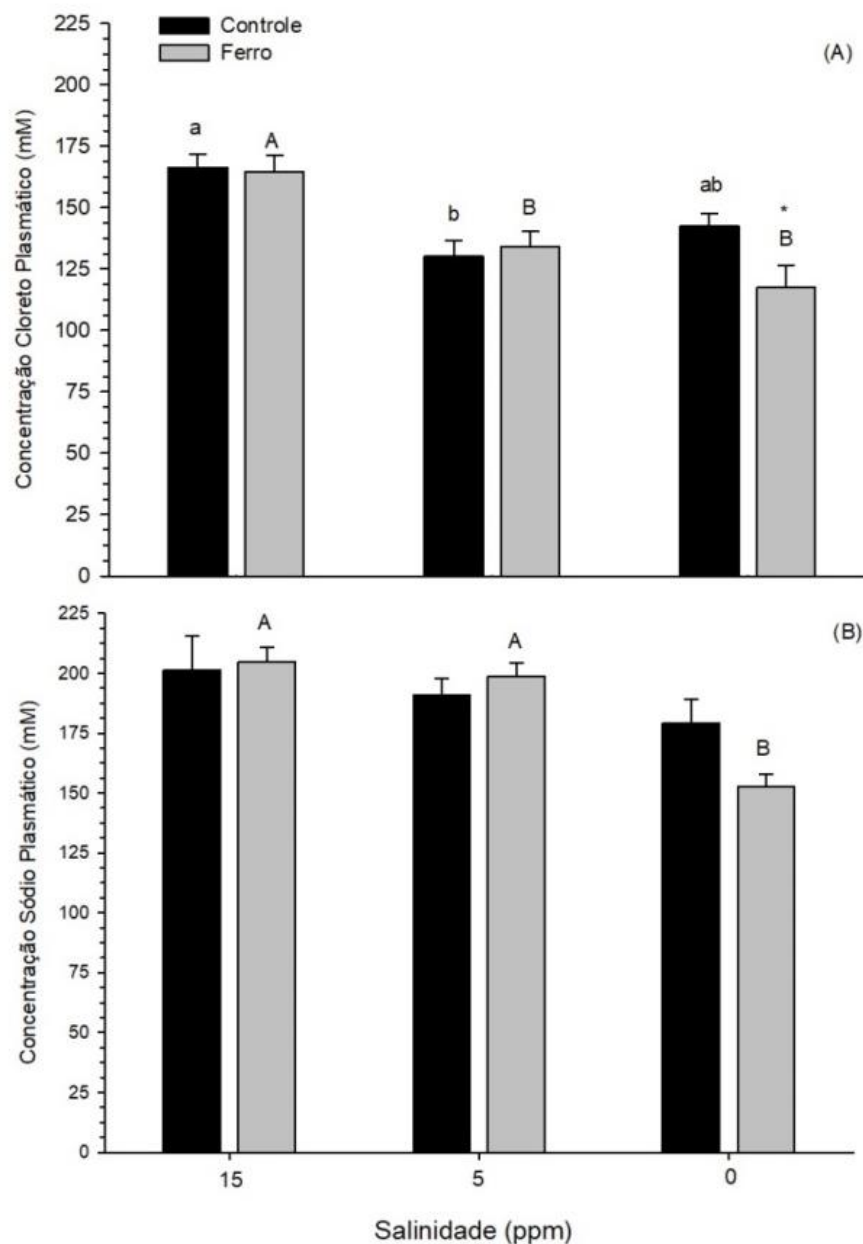


Figura 5. Concentração plasmática de cloreto (A) e sódio (B) de jovens de *Centropomus parallelus* aclimatados por 10 dias à 15‰, 5‰ e 0‰ e expostos por 24 horas a 1 mg/L de ferro na água, além dos grupos controle. Letras maiúsculas diferentes representam diferenças significativas na concentração plasmática dos íons entre os grupos expostos ao ferro nas diferentes salinidades. Letras minúsculas diferentes representam diferenças significativas entre os grupos controles nas diferentes salinidades. Asteriscos (*) representam diferenças significativas entre os animais do grupo controle e expostos ao ferro em uma mesma salinidade ($p < 0,05$).

A atividade das enzimas H^+ -ATPase, Na^+/K^+ -ATPase e anidrase carbônica verificadas nas brânquias dos jovens de *C. parallelus*, aclimatados 0‰, 5‰ e 15‰ e expostos à 1 mg/L ferro total por 24 horas estão representadas na **Figura 6**. A atividade da enzima H^+ -ATPase nos peixes do grupo controle aclimatados em salinidade 5‰ foi significativamente aumentada em relação aos grupos mantidos nas salinidades 15‰ (4,7 vezes) e 0‰ (7,8 vezes). Já nos animais expostos ao ferro, a atividade da H^+ -ATPase nas brânquias dos exemplares de *C. parallelus* aclimatados em 15‰ foi significativamente maior (4,9 vezes) em comparação aos animais mantidos em 0‰ (**Fig. 6A**). O grupo exposto ao ferro em salinidade 15‰ apresentou atividade da enzima significativamente aumentada (3,3 vezes) em relação ao grupo controle em mesma salinidade, enquanto nos peixes aclimatados em 5‰ a atividade da H^+ -ATPase foi reduzida em cerca de 56,4% em relação ao grupo controle (**Fig 6A**). A atividade da enzima Na^+/K^+ -ATPase nos animais do grupo controle aclimatados em salinidade 5‰ foi significativamente maior em relação aos peixes mantidos em salinidade 0‰ (4,2 vezes), não apresentando diferenças significativas em relação ao grupo mantido em salinidade 15‰ (**Fig 6B**). A aclimação às salinidades reduzidas (i.e 5‰ e 0‰) resultou em redução significativa da atividade da Na^+/K^+ -ATPase (em média 2,3 vezes) nas brânquias dos exemplares de *C. parallelus* expostos ao ferro, quando comparado com os animais mantidos em 15‰ e expostos ao metal (**Fig. 6B**). O grupo exposto ao metal em salinidade 15‰ apresentou atividade da enzima aumentada em relação ao grupo controle na mesma salinidade (2,1 vezes), enquanto a exposição ao ferro em salinidade 5‰ promoveu a redução da atividade da Na^+/K^+ -ATPase em 53,9%, em relação ao grupo controle na mesma salinidade (**Fig 6B**).

A atividade da enzima anidrase carbônica foi significativamente aumentada (1,2 vezes) nas brânquias dos peixes do grupo controle aclimatados à salinidade 0‰, em relação ao grupo mantido em salinidade 15‰ (**Fig. 6C**). Por outro lado, nos animais expostos ao ferro, a atividade da AC foi significativamente reduzida após a aclimação às salinidades de 5‰ (35,8%) e 0‰ (33,8% vezes), em comparação aos animais mantidos em 15‰ e expostos ao metal. Além disso, a atividade da AC foi significativamente reduzida nos animais expostos ao ferro nas salinidades 5‰ (35,3%) e 0‰ (36,9%), em relação a seus respectivos grupos controle (**Fig. 6C**).

Verificou-se interação estatisticamente significativa entre salinidade e tratamento para a atividade das enzimas H^+ -ATPase ($P = 0,004$), Na^+/K^+ -ATPase ($P = 0,012$) e anidrase carbônica ($P = <0,001$).

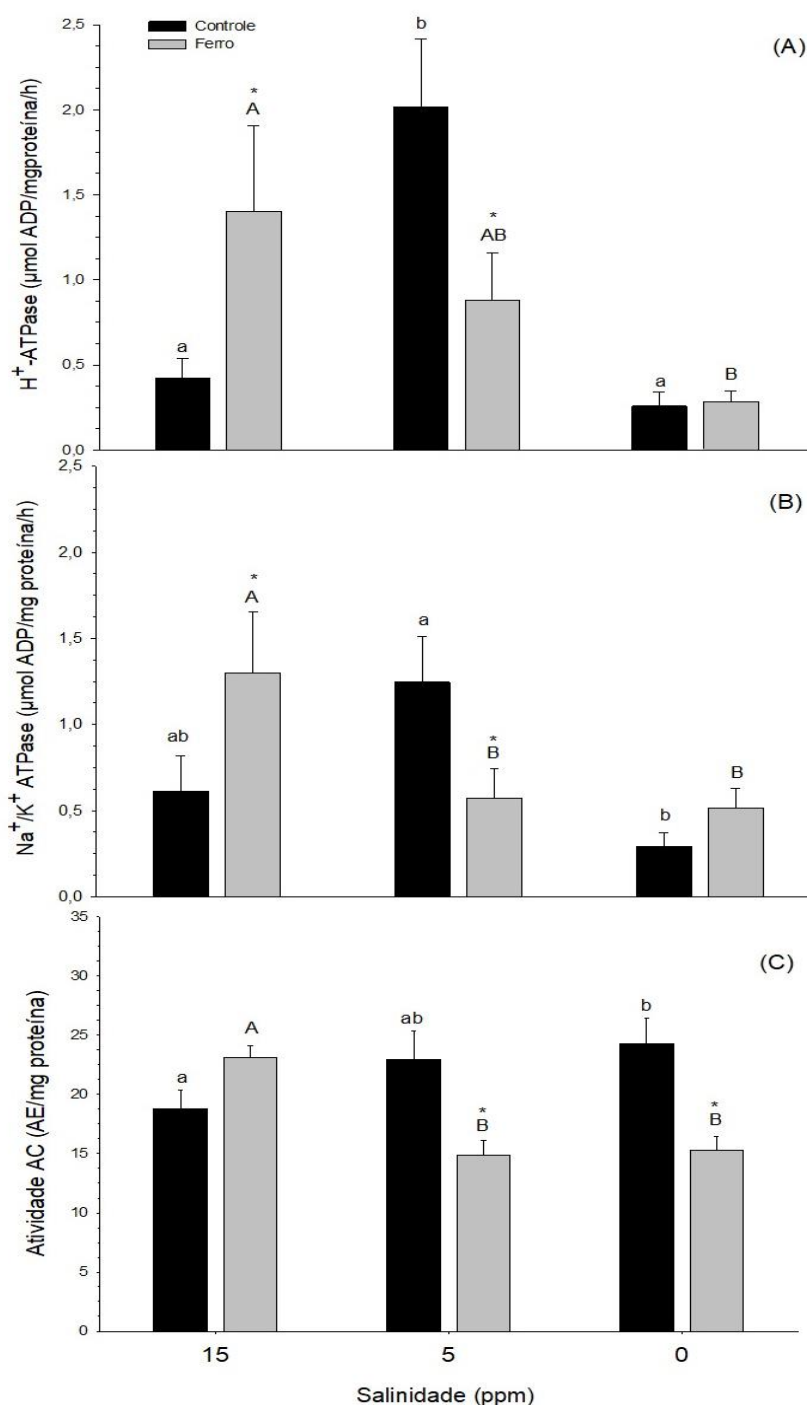


Figura 6. Atividade das enzimas $\text{H}^+\text{-ATPase}$, $\text{Na}^+\text{/K}^+\text{-ATPase}$ e anidrase carbônica de jovens de *Centropomus parallelus* aclimatados por 10 dias a 15‰, 5‰ e 0‰ e expostos por 24 horas a 1mg/L de ferro na água, além dos grupos controle. Letras maiúsculas diferentes representam diferenças significativas entre os grupos expostos ao ferro nas diferentes salinidades. Letras minúsculas diferentes representam diferenças significativas entre os grupos controles nas diferentes salinidades.. Asteriscos (*) representam diferenças significativas entre os animais controle e expostos ao ferro em uma mesma salinidade ($p < 0,05$).

Os valores médios de proteínas totais e glicose plasmáticas obtidos na série em que houve exposição ao ferro após aclimação as salinidades 15‰, 5‰ e 0‰ estão apresentados na **Figura 7**. Não houve variações significativas na concentração de proteínas plasmáticas entre os tratamentos e salinidades testadas (**Fig. 7A**). Por outro lado, a concentração de glicose plasmática dos exemplares de *C. parallelus* em salinidade 0‰ foi aumentada em média 1,38 vezes no grupo controle e em média 1,42 vezes nos animais expostos ferro, em comparação aos animais aclimatados em 15‰ e 5‰ ao final das 24h de exposição (**Fig. 7B**). Não foram observadas diferenças significativas nas concentrações plasmáticas de glicose entre os peixes expostos ao ferro e respectivos grupos controle nas três salinidades testadas (**Fig. 7B**). Foi verificado a ausência de interação estatisticamente significativa entre salinidade e tratamento para glicose ($P = 0,955$) e proteínas ($P = 0,673$) plasmáticas.

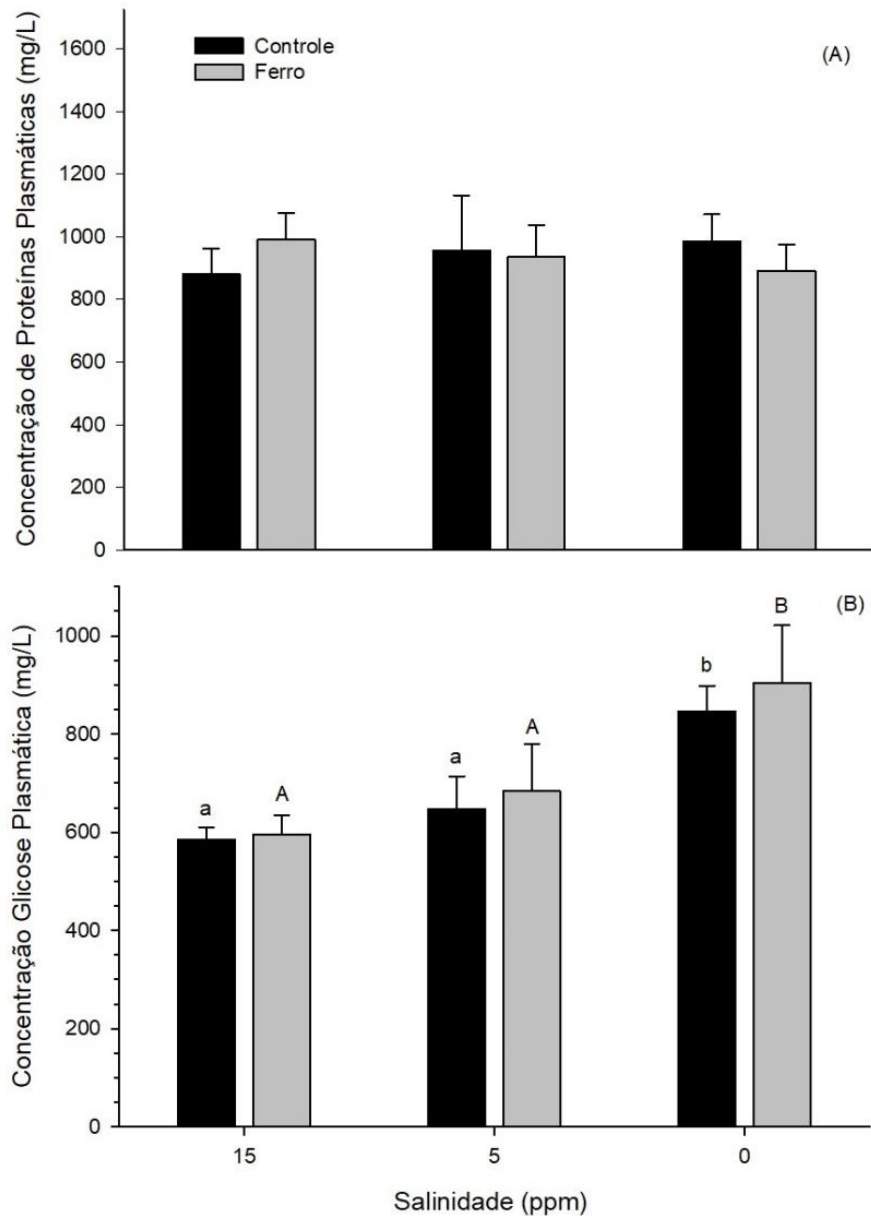


Figura 7. Concentração plasmática de proteínas totais (A) e glicose (B) de jovens de *Centropomus parallelus* aclimatados por 10 dias a 15‰, 5‰ e 0‰ e expostos por 24 horas a 1 mg/L de ferro na água, além dos grupos controle. Letras maiúsculas diferentes representam nas diferentes salinidades. Letras minúsculas diferentes representam diferenças significativas entre os grupos controles nas diferentes salinidades.

5. Discussão

5.1 Efeitos da exposição ao ferro sobre as respostas osmo- ionoregulatórias de *C. parallelus* durante choque hiposmótico

Teleósteos eurialinos, ao passarem pela fase aguda de aclimação a ambientes hiposmóticos, tendem a apresentar uma estratégia hiperosmoregulatória que resulta em uma temporária redução na osmolaridade e na concentração de íons plasmáticos, além do aumento no conteúdo de água nos tecidos (Evans et al., 2005; Edwards & Marshall, 2012). Isso ocorre, em geral, por meio de rápidas alterações morfo-funcionais nos epitélios transportadores (i.e. brânquias, rins e intestinos), mediadas pela ação de hormônios, como o cortisol, que são estimulados via sistema nervoso simpático, com o intuito de compensar as perdas iônicas líquidas e ganho de água em função da exposição ao meio mais diluído (Marshall, 2003; Evans et al., 2005; Edwards & Marshall, 2012). Por exemplo, o fechamento das criptas apicais na superfície dos ionócitos tendem a reduzir a taxa de secreção de sais (Cl^- e Na^+) pelas brânquias, que são acompanhadas pela redução na taxa de tomada de água (“*drinking*”), o que limita a absorção de água pelos intestinos, e aumento na taxa de filtração glomerular e reabsorção tubular para a produção de grandes volumes de urina diluída (hiposmótica) pelos rins (Marshall, 2003; Evans et al., 2005; Edwards & Marshall, 2012). Além disso, a alteração no gradiente ambiental de um meio hiperosmótico para hiposmótico também exige que mecanismos de transporte enzimáticos presentes nas superfícies dos epitélios reguladores sejam ajustados, para a manutenção da homeostase iônica e osmótica dos animais durante a fase regulatória ao choque hiposmótico (Sakamoto 2001; Evans 2005; Edward & Marshall, 2012).

No presente estudo, durante o protocolo de choque hiposmótico realizado na primeira série experimental, não foram observadas reduções significativas nas concentrações plasmáticas de Na^+ e Cl^- nos jovens de *C. parallelus* nos grupos controle (i.e. sem exposição ao ferro), tal como observado para outras espécies eurialinas, como *Sciaenops ocellatus* (redução da osmolaridade, Cl^- , Ca^{2+} e Mg^{2+} plasmáticos); *Chanos chanos* e *Salmo salar* (redução do Cl^- e Na^+ plasmáticos), e *Fundulus heteroclitus* (redução de Cl^- e Na^+ plasmáticos e corpóreo) submetidas ao choque hiposmótico (Marshall et al., 2000; Wood & Laurent, 2003; Lin et al., 2006; Bystriansky & Schulte, 2011; Watson et al., 2014). Em experimentos realizados por Wosnick (2009) com indivíduos de *C. parallelus* ($77,4 \pm 0,43$ g) submetidos a um protocolo de redução gradual na salinidade (i.e. redução de 5‰ a cada 24 h), também não

foram evidenciadas alterações significativas na concentração de Cl^- no plasma dos animais ao longo de um gradiente de salinidades de 30‰ a 0‰, onde a concentração de Cl^- se manteve entre 130 e 145 mM, em consonância com os resultados aqui verificados. No presente estudo, com indivíduos menores ($17,64 \pm 2,43$ g) e submetidos ao choque hiposmótico a partir da salinidade 15‰ para 5‰ e 0‰, a concentração de cloreto plasmático variou de 102 à 137 mM. Nossos dados reforçam estudos prévios que demonstram que a espécie *C. parallelus* é fortemente eurialina, e possui uma ampla capacidade de regular as concentrações dos principais íons plasmáticos, particularmente Na^+ e Cl^- , em função de grandes e abruptas variações na salinidade da água.

Estudos vêm demonstrando que nos teleósteos eurialinos a tolerância ao choque hiposmótico está diretamente relacionada a alterações funcionais nas brânquias, que passam a atuar absorvendo os íons do ambiente na água doce, e não mais secretando-os para o meio como nos ambientes hiperosmóticos (Evans et al., 2005; Takei & Hwang, 2016). Diferentes mecanismos e tipos celulares parecem estar envolvidos nesses processos e, em geral, a enzima Na^+/K^+ -ATPase exerce um papel central na regulação dessas funções gerando os gradientes eletroquímicos necessários tanto para a absorção (água doce) quanto para secreção (água do mar) de íons (Edwards & Marshall, 2012; Takei & Hwang, 2016). No ambiente marinho, a secreção de Cl^- pelas brânquias dos peixes envolve a participação do cotransportador $\text{Na}^+/\text{K}^+/2 \text{Cl}^-$ (NKCC) na membrana basolateral dos ionócitos, e a presença do canal CFTR na membrana apical. Por outro lado, a absorção de Na^+ e Cl^- pelas brânquias dos peixes na água doce envolve múltiplos transportadores (e.g. Rhcg, H^+ -ATPase, cotransportador Na^+/H^+ (NHE), canais de Na^+ e cotransportador $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$), e é altamente dependente da secreção de produtos ácidos (H^+/NH_4^+) e básicos (HCO_3^-) do metabolismo, sendo que estes mecanismos podem apresentar variações interespecíficas e são diretamente influenciados pelas condições ambientais, tais como pH e salinidade do meio (Wright & Wood, 2009; Wright & Wood, 2012; Bucking, 2017).

Embora a ação da enzima H^+ -ATPase esteja relacionada com a absorção de Na^+ nos ionócitos, onde a extrusão de H^+ pela bomba vacuolar geraria o gradiente eletroquímico necessário para a entrada de Na^+ (Perry, 2003; Sakamoto 2001; Evans 2005), configurando um importante mecanismo na íono e osmorregulação de teleósteos em água doce, não foram observadas diferenças significativas na atividade da H^+ -ATPase nas brânquias de *C. parallelus* submetidos ao choque hiposmótico (**Fig. 2A**). Por outro lado, os exemplares de *C.*

parallelus que experimentaram a redução aguda de salinidade para 5‰ e 0‰ apresentaram atividade das enzimas Na^+/K^+ -ATPase e anidrase carbônica significativamente reduzida ao final das 24 h de exposição (**Fig 2B e 2C**). Em estudo prévio conduzido por Sterzelecki e colaboradores (2013) um pico na atividade da Na^+/K^+ -ATPase foi verificado para *C. parallelus* após 96 h da troca da salinidade do meio de 20‰ para 5‰. Níveis reduzidos na atividade da Na^+/K^+ -ATPase nas brânquias, em função do choque hiposmótico, tem sido evidenciada em diferentes espécies de teleósteos eurialinos, tais como trutas e salmões (Madsen & Naamansen, 1989; Tipsmark et al., 2002; Hiroi & McCormick, 2007), enguia européia (Wilson et al., 2004; 2007); tilápia mozambicana (Chang et al., 2007; Tipsmark et al., 2008) e molinésia latipina (Yang et al., 2009). Segundo Bystriansky (2011), a exposição à água doce após aclimação a 32‰ não alterou a atividade das enzimas Na^+/K^+ -ATPase e H^+ -ATPase nas brânquias do salmão do Atlântico (*Salmo salar*) nas primeiras 24 h, mas estas enzimas apresentaram variações significativas após o quarto dia da transferência, o que demonstra que a resposta dessas enzimas pode ser considerada tempo-dependente. Além disso, estudos têm demonstrado que ao longo das primeiras 24 h de transição ao ambiente hiposmótico é verificado aumento significativo na subunidade- α catalítica da Na^+/K^+ -ATPase, que conjuntamente com a subunidade- β glicoproteica (que apresenta aumentos significativos de forma mais lenta) constituem a Na^+/K^+ -ATPase funcional (Bystriansky & Kaplan, 2007; Geering, 2005).

Assume-se que em meio hiposmótico a absorção de Cl^- ocorre em contrapartida pela excreção de bicarbonato, uma vez que inibidores específicos dos trocadores $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ demonstraram induzir à alcalose metabólica, assim como impedir a absorção de Cl^- (Perry, 2003; Goss et al., 1998 apud Sakamoto 2001). O mecanismo que conduz essa troca não foi totalmente elucidado, já que o gradiente entre o citoplasma e a água doce não favorece a absorção de Cl^- , e o verdadeiro gradiente apical do HCO_3^- é desconhecido. Assim, a geração de H^+ e HCO_3^- necessários para o funcionamento desse mecanismo ocorre a partir da hidratação do CO_2 , visto que a anidrase carbônica catalisa a reação $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{H}^+ + \text{HCO}_3^-$ utilizando o zinco como co-fator, e a inibição de sua ação é associada à redução da excreção de prótons (Vitale, 1999; Sakamoto, 2001). Uma vez que a rápida exposição ao meio hiposmótico pode resultar em fechamento das criptas apicais dos ionócitos com auxílio das células acessórias (Marshall, 2003; Sakamoto, 2001), promovendo a redução das taxas de influxo de Na^+ e Cl^- branquiais (Marshall et al., 2000; Wood & Laurent, 2003); a manutenção

da estabilidade dos principais íons (Na^+ e Cl^-) no plasma de *C. parallelus* nas primeiras 24 h após o choque hiposmótico sugere a participação das enzimas Na^+/K^+ -ATPase e anidrase carbônica, tanto na geração do gradiente eletroquímico na membrana basolateral dos ionócitos necessário para absorção de íons em meio hiposmótico (Kirschner, 2004; Bystriansky & Schulte 2001; Sakamoto 2001), quanto na manutenção do equilíbrio ácido-base dos animais (Perry, 2003; Evans 2005).

Peixes submetidos a situações de estresse (como o choque hiposmótico) reagem com respostas endócrinas que incluem a hipersecreção de catecolaminas e corticoesteróides, parâmetros considerados indicadores de resposta primária ao estresse. Esses mediadores químicos, por sua vez, disparam respostas fisiológicas e bioquímicas que resultam em efeitos considerados como respostas secundárias, que incluem hiperglicemia, consumo das reservas de glicogênio, inibição da síntese proteica e lipólise (Winkaler et al 2001). Nesse contexto, alterações na salinidade do meio tendem a ter um grande efeito sobre o catabolismo de aminoácidos livres no meio intracelular de peixes teleósteos, oxidando-os para a produção de ATP para subsidiar o requerimento energético com fins da manutenção da homeostase iônica e osmótica dos animais (Branchard & Grosell, 2006; Frick & Wright 2002). O maior recaimento sobre a oxidação de aminoácidos resulta no aumento da produção endógena de amônia e, conseqüentemente, da taxa de excreção de amônia. Em conjunto, essas respostas metabólicas são consideradas um mecanismo adaptativo que disponibiliza reservas energéticas durante a exposição aguda a agentes externos causadores de estresse.

Nos peixes a amônia é excretada preferencialmente pelas brânquias na forma gasosa (NH_3) utilizando a simples difusão do NH_3 por intermédio do transportador glicoproteico Rhesus (Rh), a favor do gradiente de pressão do NH_3 entre o sangue e o ambiente externo (Bucking, 2017). No entanto, diversos estudos têm evidenciado que a excreção da forma iônica da amônia (NH_4^+) pode ser acoplada a absorção de Na^+ , principalmente nos peixes de água doce, utilizando diferentes mecanismos de transporte (Wright & Wood, 2012; Bucking 2017). Além disso, o controle da homeostase osmótica celular em teleósteos eurialinos também envolve a regulação das concentrações de variados osmólitos orgânicos intracelulares, tais como aminoácidos, para manutenção da pressão osmótica, já que íons inorgânicos em concentrações alteradas podem causar efeitos celulares deletérios (Edwards & Marshall, 2012).

No presente estudo, não foram observadas alterações na taxa de excreção de amônia, e na concentração plasmática de proteínas totais e glicose nos exemplares de *C. parallelus* após 24 h de exposição ao choque hiposmótico (**Figs 3 e 4**). Wosnick (2009) também verificou que *C. parallelus* submetidos a protocolo de redução da salinidade de 30‰ a 0‰, a uma taxa de 5‰ a cada 24 h, não apresentou variações significativas na concentração de glicose, o que também foi observado por Farias et al (2017) para a espécie *C. undecimalis*, após 24 h de transferência dos animais aclimatados a 15‰ para 5‰ e 0‰. No entanto, estudos realizados com *C. parallelus* ($5,84 \pm 0,162$ g) verificaram que a taxa de excreção de amônia apresenta uma relação inversa com a salinidade, onde as mais altas taxas de excreção de amônia no período de 24 h foram verificadas em salinidade 0‰ (cerca de 23 $\mu\text{g/g/dia}$), diminuindo a cerca de 14 $\mu\text{g/g/dia}$ com o aumento da salinidade (Medeiros, 2015). Similarmente, Rocha e colaboradores (2005) evidenciaram que a mesma espécie também apresentou taxas de excreção de amônia significativamente mais elevadas quando mantidos a 5‰, em comparação aos animais aclimatados por 15 e 30 dias a 30‰. Ambos os estudos evidenciam a demanda aumentada pelo catabolismo de aminoácidos em *C. parallelus* em salinidades reduzidas. Em contraposição, peixes oriundos de habitats de água doce, em geral, quando mantidos em meio hiperosmótico tendem a apresentar maiores taxas de excreção de amônia (e.g. truta arco-íris e *guppy*) em comparação aos animais mantidos em água doce, no entanto, para a espécie *F. heteroclitus* a aclimação a água doce aumenta a taxa de excreção de amônia (Bucking, 2017). Neste estudo, taxas médias de excreção de amônia aumentadas foram determinadas nos grupos submetidos à redução aguda de salinidade, contudo sem que diferenças significativas fossem assinaladas em relação ao grupo que não sofreu choque hiposmótico ao final de 24 h. Dessa forma, os resultados do presente estudo reforçam a grande capacidade regulatória de *C. parallelus* para evitar alterações metabólicas em função de grandes variações na salinidade do meio.

Em contraste, alterações significativas no balanço iônico foram observadas nos exemplares de *C. parallelus* após 24 h de exposição ao ferro na fase aguda de aclimação à salinidade 0‰. Nesses animais foram observados concentrações aumentadas de Cl^- e Na^+ no plasma em relação aos peixes expostos ao metal nas salinidades de 15‰ e 5‰, enquanto a concentração de Cl^- também foi significativamente maior em relação ao controle em salinidade 0‰ (**Fig 1**). Interessante notar que esses distúrbios iônicos observados em *C. parallelus* exposto ao Ferro durante o choque a salinidade 0‰ não foram diretamente

relacionados a alterações na atividade das enzimas H^+ -ATPase, Na^+/K^+ -ATPase e anidrase carbônica nas brânquias dos animais (**Fig. 2**). De fato, a exposição ao ferro resultou na inibição da atividade de Na^+/K^+ -ATPase branquial apenas nos peixes mantidos em 15‰ (**Fig. 2B**), o que pode estar relacionado à uma maior taxa de absorção do metal pela maior ingestão de água realizada pelos teleósteos em salinidades ambientais elevadas, neste caso ligeiramente acima do ponto isosmótico da espécie. Apesar dos efeitos verificados na atividade da enzima em função da presença do metal, não foram verificados reflexos imediatos na concentração de Na^+ plasmático. Na espécie amazônica *Hoplosternum litoralle* a exposição por 3 h ao Ferro não alterou significativamente a atividade branquial da H^+ -ATPase e Na^+/K^+ -ATPase, mas resultou em grande inibição na atividade de ambas as enzimas nos rins dos animais (Duarte et al., 2018), sugerindo que o ferro pode impactar diretamente funções renais relacionadas à reabsorção de sais, excreção ácida (H^+) e balanço hídrico. Dessa forma, os níveis aumentados de Na^+ e Cl^- no plasma de *C. parallelus* submetidos ao choque à 0‰ podem estar relacionados a possíveis efeitos do ferro sobre a função renal dos indivíduos, em decorrência de pequenas alterações no status ácido-base dos animais no período adaptativo, e podem se tratar de respostas fisiológicas para a manutenção do pH sanguíneo dos animais. Considerando que os mecanismos de ação tóxica do ferro podem interferir de forma sistêmica em peixes teleósteos, notadamente nas funções renais e hepáticas associadas à função hematopoética, estudos futuros avaliando os efeitos do ferro sobre os demais sistemas, incluindo a atividade de enzimas ionoregulatórias nos rins e a composição iônica da urina e plasma, são fundamentais para total compreensão das respostas fisiológicas.

Embora não tenha sido observadas diferenças significativas na taxa de excreção de amônia de *C. parallelus* expostos ao ferro durante o protocolo de choque hiposmótico, a concentração de proteínas totais no plasma foi reduzida em cerca de 55% nos peixes expostos ao metal em 0‰, em comparação aos animais em 15‰ e 5‰ (**Fig 3A**). É reportado na literatura que alterações nas taxas de excreção de amônia têm sido evidenciadas em peixes durante a exposição a contaminantes ambientais, como os metais. Por exemplo, Branchard e Grosell (2006) observaram que a taxa de excreção de amônia foi significativamente reduzida na espécie eurialina *F. heteroclitus* durante exposição por 24 h ao cobre em água do mar (28‰), enquanto que nos animais mantidos em água doce expostos ao metal não foram observadas alterações na excreção de amônia. Esse resultado também foi associado a efeitos deletérios provocados por distúrbios no equilíbrio ácido-base dos peixes, uma vez que a

redução na excreção não foi relacionada a menor produção endógena de amônia (Wilson & Tailor, 1993). Nossos dados sugerem que a redução de proteínas observadas em *C. parallelus* expostos ao ferro em 0‰ possa estar associada a conversão de aminoácidos em carboidratos e lipídeos, por meio dos processos de gliconeogênese e lipogênese, respectivamente, para a sua utilização como substrato energético para a produção metabólica de energia. Além disso, essa redução pode também ser interpretada como uma resposta compensatória ao efeito do ferro sobre os níveis plasmáticos de Na^+ e Cl^- , na tentativa de contrabalancear o aumento de pressão osmótica do plasma resultante dos maiores níveis plasmáticos de Na^+ e Cl^- observados nos animais.

5.2 Respostas osmo- ionoregulatórias de *C. parallelus* expostos ao ferro após a aclimação ao meio hiposmótico

Teleósteos eurialinos possuem diferentes níveis de plasticidade osmorregulatória, característica que permite que esses animais mantenham pequenas variações dos principais íons plasmáticos em função da salinidade ambiental em que o animal está aclimatado (Edwards & Marshall, 2012). Na série em que os exemplares de *C. parallelus* foram aclimatados por 10 dias às salinidades de 15‰, 5‰ e 0‰ pôde-se verificar a grande capacidade de controle da concentração iônica plasmática da espécie frente à pressão exercida pela salinidade ambiental durante a fase regulatória de aclimação, sendo observada apenas a redução da concentração de Cl^- nos animais mantidos em 5‰, em relação aos peixes aclimatados à 15‰ (**Figura 5A**). Além disso, a aclimação a salinidades reduzidas não teve efeito sobre os níveis de Na^+ plasmático dos peixes (**Fig. 5B**). Resultados similares foram observados por Lee e colaboradores (2000) em experimento realizado com a espécie eurialina *Oreochromis mossambicus*, após aclimação por duas semanas às salinidades 5‰ (hipotônica) e 10‰ (isotônica), onde não foram verificadas variações significativas na concentração de Na^+ plasmático dos animais. Além disso, Lin e colaboradores (2003) demonstraram que tanto a osmolaridade quanto a concentração de Cl^- e Na^+ plasmáticos de *Chanos chanos* não foram afetadas pela aclimação a um grande gradiente de salinidade do meio, indo da água doce (0‰) a água do mar (35‰). Nossos dados também corroboram os achados de Wosnick (2009), no qual não foram observadas variações significativas na concentração de Cl^- plasmático ao final de 7 dias após aplicação de protocolo de redução de 5‰ a cada 24h (30‰ a 0‰). Embora em algumas espécies eurialianas, como salmões e enguias, sejam observadas reduções transientes nas concentrações de Na^+ e Cl^- no plasma ao

longo dos primeiros dias de aclimação a ambientes hiposmótico, esse não parecer ser o caso de *C. parallelus* que apresenta plena capacidade de aclimação a água doce, e sem indícios de distúrbios na regulação da concentração dos níveis dos principais osmólitos inorgânicos após 10 dias de aclimação à água doce.

Durante a aclimação à salinidades reduzidas e água doce as brânquias das espécies eurialinas sofrem marcadas alterações morfo-funcionais para evitar perdas iônicas substanciais para o meio mais diluído, particularmente reduzindo tanto a permeabilidade paracelular (aumentando a espessura das junções paracelulares) quanto transcelular (pela inativação dos mecanismos enzimáticos de secreção de íons) (Richards et al., 2003; Scott et al., 2004; Marshall & Edwards, 2012). A resposta da atividade das enzimas Na^+/K^+ -ATPase e H^+ -ATPase em *C. parallelus* apresentou forte tendência de aumento nos animais mantidos em 5‰, em relação ao peixes em 0‰ e 15‰ (**Fig. 6A e B**), caracterizando um padrão em “U invertido”. Em estudo prévio, Sterzeleck e colaboradores (2013) observaram um pico na atividade da Na^+/K^+ -ATPase nas brânquias de *C. parallelus* ao final das primeiras 96 h de aclimação a salinidade 5‰, mas os valores retornaram a níveis similares aqueles vistos nos peixes mantidos em 20 e 35‰ após 30 e 60 dias. Uma vez que o ponto isosmótico da espécie parece estar entre 11-12‰ (Marciel, 2015), os valores mais elevados de atividade da Na^+/K^+ -ATPase e H^+ -ATPase nas brânquias de *C. parallelus* em 5‰ sugere uma grande participação desses transportadores na transição da função do epitélio para absorção de íon em meio hiposmótico. Tendo em vista que nesses animais foram encontrados níveis reduzidos de Cl^- no plasma, é provável que ambas as enzimas estejam atuando na geração do gradiente eletroquímico para manter a tomada apical de Cl^- , e assim evitar maiores distúrbios na homeostase iônica plasmática dos animais.

Em peixes aclimatados à ambientes hiposmóticos, padrões diferenciados na regulação da atividade branquial da Na^+/K^+ -ATPase, H^+ -ATPase e anidrase carbônica têm sido reportados e relacionados a tolerância das espécies em manter níveis iônicos plasmáticos mais elevados do que o meio, o que é reconhecido como “Paradigma dos diádromos” (Lin et. al., 2003). Em geral, é observado uma correlação positiva entre a salinidade ambiental e atividade da Na^+/K^+ -ATPase branquial, como visto em salmonídeos e anguilídeos, aumentando a participação relativa da H^+ -ATPase na geração do gradiente eletroquímico necessário para o funcionamento de um mecanismo de alta afinidade para a absorção apical de Na^+ , acoplado à secreção ácida (Sakamoto 2001; Evans et al., 2005; Blanchard & Grosell, 2006; Hwang et al.,

2011). Além disso, a inserção da H^+ -ATPase na membrana basolateral dos ionócitos pode auxiliar no acúmulo de HCO_3^- , produzido a partir da ação catalítica da anidrase carbônica, por meio de excreção de H^+ para o fluido extracelular, participando da geração do gradiente para a absorção apical de Cl^- por meio do trocador Cl^-/HCO_3^- (Marshall & Edwards, 2012).

Por exemplo, na espécie eurialina *C. chanos* aclimatada por duas semanas às salinidades 0‰, 10‰, 20‰ e 35‰ foram observados aumento de 5 à 7 vezes na atividade da enzima Na^+/K^+ -ATPase, e maior abundância relativa da subunidade α nas lamelas brânquias, nos peixes em água doce e salobra em relação ao grupo mantido em 35‰, sem que houvesse variações significativas na osmolaridade e concentração dos íons Cl^- e Na^+ plasmáticos (Lin et al., 2003). Níveis aumentados de atividade da Na^+/K^+ -ATPase e expressão relativa da subunidade $\alpha 1a$ também foram evidenciados nas brânquias de *F. heteroclitus* durante a aclimação (4 a 14 dias) à água doce, sendo observado redução significativa nos níveis plasmáticos de Na^+ e Cl^- (24 e 96 h, respectivamente), quando comparados aos animais mantidos a 10‰ (Scott et al., 2004). Já na espécie *Oreochromis mossambicus* aclimatada por duas semanas às salinidades 5‰ (hipotônica) e 10‰ (isotônica) não foram verificadas variações significativas na atividade da enzima Na^+/K^+ -ATPase e na concentração de Na^+ plasmático, em comparação ao animais mantidos em meio hipertônico (30‰) (Lee et al., 2000). O que foi associado ao aumento da quantidade de ionócitos, e de suas criptas apicais, em função da maior demanda pela secreção de Na^+ e Cl^- gerada pelo aumento da salinidade ambiental. Não obstante, há também espécies eurialinas que apresentam atividade da enzima com padrão “U-shaped”, como observado por Lisboa e colaboradores (2015) para a tainha *Mugil liza*, onde a aclimação por 40 dias à 0‰, 6‰ 12‰ e 24‰ foi verificado menores níveis de atividade da Na^+/K^+ -ATPase nas salinidades mais próximas ao ponto isosmótico (i.e. 6‰ e 12‰), e maiores atividades nas salinidades 0‰ e 24‰, indicando que o padrão poderia representar um mecanismo adaptativo para otimização dos gasto energético para o osmoregulação na faixa do gradiente de salinidade ambiental próximo ao ponto isosmótico (Jensen 1998 apud Lisboa 2015; Lasserre 1971).

Com relação à atividade da H^+ -ATPase em função da salinidade ambiental, no estudo conduzido com a espécie anádroma *Tenualosa ilisha* coletada em corpos d’água com diferentes salinidades foi verificado relação inversa entre salinidade ambiental e atividade branquial H^+ -ATPase, em que as menores atividades da enzima foram verificadas em água salgada (26- 28‰) em contraposição à atividade aumentada em dois grupos coletados em

salinidades baixas (i.e. grupo 1 de 1- 5 ‰ e grupo 2 em 0‰) (Kumar et al., 2019), visto que esse mecanismo auxilia a absorção ativa de sódio em meio hiposmótico. Bystriansky & Schulte (2011) obtiveram resultados similares em experimento realizado com o salmão do atlântico (*Salmo salar*) criado em água salgada (32‰) e aclimatado a água doce, no qual foi constatado aumento na atividade da H^+ -ATPase após 14 dias de exposição à água doce com manutenção dos mesmos níveis de atividade até o final do experimento em 30 dias. Neste experimento, reduções na concentração de Na^+ plasmático foram verificadas até 4º dia de exposição à água doce, mantendo-se similares aos controles após o sétimo dia de exposição até o final do período experimental. Portanto, houve um intervalo de 10 dias entre a estabilização do sódio plasmático e o aumento da atividade da H^+ -ATPase que indica que outros mecanismos atuam de forma mais imediata na manutenção da estabilidade iônica plasmática da espécie, relacionados à ação das subunidades que compõe a Na^+/K^+ -ATPase basolateral que seriam capazes de gerar o gradiente necessário para a absorção de Na^+ (Kirschner, 2004; Bystriansky & Schulte 2011). Segundo Lin (2003), sob um ponto de vista ecofisiológico, os teleósteos que não se enquadram no modelo dos diádromos são, de forma geral, animais marinhos como linguados e tainhas, que se aproximam de áreas com menor salinidade ambiental para obtenção de recursos estuarinos, posto que os ajustes fisiológicos demandados em salinidades reduzidas exigem maiores gastos energéticos em relação ao exigido no habitat marinho.

Por outro lado, a atividade da Na^+/K^+ -ATPase e H^+ -ATPase nas brânquias de *C. parallelus* em 0‰ não diferiu dos níveis observados nos peixes em 15‰, enquanto a atividade da anidrase carbônica foi significativamente aumentada (**Fig 6**). Já na espécie *Tenualosa ilisha*, a aclimação à água doce resulta em marcado aumento da atividade da H^+ -ATPase e anidrase carbônica nas brânquias, e redução da Na^+/K^+ -ATPase e níveis plasmáticos de Na^+ e Cl^- , sugerindo que ambos os transportadores estão atuando em conjunto para a tomada de Na^+ apical na espécie. Como nos exemplares de *C. parallelus* aclimatados em 0‰ não foram observados alterações nos níveis plasmáticos de Na^+ e Cl^- , a maior atividade da anidrase carbônica estaria associada a manutenção do suprimento intracelular de H^+ e HCO_3^- para a absorção de Na^+ (via o cotransportador Na^+/H^+ ou NH_4^+) e Cl^- (Cl^-/HCO_3^-), sugerindo uma baixa participação da Na^+/K^+ -ATPase e H^+ -ATPase branquiais no forte controle dos níveis plasmáticos dos principais osmólitos inorgânicos nesses animais em água doce. Além disso, os níveis plasmáticos de glicose foram significativamente elevados nos

peixes aclimatados à 0‰, em relação aos animais mantidos em 15 e 5‰ (**Fig. 7B**). De acordo com Vijayan e colaboradores (1997), concentrações de glicose aumentadas em peixes submetidos à situações de estresse estão relacionadas a maior mobilização de glicose, por meio da quebra dos estoques de glicogênio hepático, como resposta ao aumento da demanda metabólica para realização de ajustes fisiológicos associados à manutenção da homeostase. Em conjunto, as respostas apresentadas por *C. parallelus* após 10 dias de aclimação sugerem um aumento do custo energético para a manutenção da homeostase iônica plasmática nos animais em água doce e possível participação de outros sistemas, como o sistema renal hepático e intestinal, na composição das respostas fisiológicas verificadas.

A exposição aguda (24 h) ao ferro na água promoveu marcadas alterações nas respostas osmo-ionoregulatórias dos exemplares de *C. parallelus* aclimatados às três salinidades testadas, mas que foram mais evidentes e intensas nos peixes mantidos à 5‰ e 0‰, o que, a princípio, pode estar relacionado a uma maior disponibilidade dos metais em ambientes de menor salinidade (Bury & Grosell, 2003; Bury, et al., 2003). Primeiramente, a exposição ao ferro resultou na estimulação da atividade das enzimas Na^+/K^+ -ATPase e H^+ -ATPase nas brânquias de *C. parallelus* mantidos em 15‰. Em água do mar, ou condições levemente hiperosmóticas como 15‰ para *C. parallelus*, a tomada de ferro da água pelos teleósteos ocorre principalmente através dos intestinos (Bury & Grosell, 2003), uma vez que este órgão atua na absorção da água por meio de mecanismos acoplados a absorção de íons monovalentes (Na^+ e Cl^-) e divalentes (Ca^{2+} e Mg^{2+}) (Evans, 2005). Portanto, é provável que a presença de altas concentrações de ferro na água resultem em alterado movimento osmótico através dos intestinos, em decorrência de uma maior absorção de sais. Assim, para evitar um aumento na concentração iônica plasmática uma maior secreção de Na^+ e Cl^- para o meio externo é necessária, o que estaria associado a uma maior atividade da Na^+/K^+ -ATPase e H^+ -ATPase nas brânquias dos animais.

Já nos animais aclimatados às salinidades reduzidas, a exposição ao ferro por 24 h resultou em marcada inibição na atividade das enzimas Na^+/K^+ -ATPase (apenas em 0‰), H^+ -ATPase e anidrase carbônica nas brânquias de *C. parallelus*, quando comparado aos peixes mantidos em 15‰ (**Fig. 6**). Além disso, nos peixes aclimatados em 5‰ a atividade da Na^+/K^+ -ATPase e H^+ -ATPase foi reduzida em relação aos animais controles (i.e sem exposição ao ferro) mantidos na mesma salinidade, enquanto a atividade da anidrase carbônica foi menor nos exemplares de *C. parallelus* expostos ao ferro em 5‰ e 0‰ em

comparação aos animais que não foram expostos ao metal. Interessante notar que nos animais aclimatados às salinidades reduzidas e expostos ao ferro os níveis plasmáticos de Cl^- foram fortemente reduzidos (em média 23%), em relação aos animais expostos ao metal em 15‰, sendo que nos peixes em 0‰ a concentração de Cl^- foi também reduzida em relação ao controle (**Fig. 5A**). Além disso, em *C. parallelus* expostos ao ferro em 0‰, os níveis plasmáticos de Na^+ também foram marcadamente reduzidos (24%) em relação aos peixes mantidos em 15‰ e 5‰ e expostos ao metal (**Fig 5B**). Uma vez que a redução da salinidade do meio tende a aumentar a disponibilidade do ferro, e também a interação das diferentes espécies químicas do metal com as membranas biológicas dos organismos aquáticos (BURY et al., 2012), os maiores distúrbios ionoregulatórios observados em *C. parallelus* aclimatados às salinidades reduzidas sugerem um forte efeito tóxico do metal sobre os mecanismos de transporte iônico transcelular, tal como visto pela forte inibição da atividade das principais enzimas iônicas regulatórias nas brânquias. Ainda, um provável aumento da permeabilidade iônica paracelular em decorrência da maior exposição ao ferro pode estar, em conjunto, associado à ocorrência de severas alterações na composição iônica plasmática dos animais em menores salinidades do meio.

Em estudo conduzido com a espécie *Salvelinus fontinalis* ($18,0 \pm 1,3$ g) aclimatada em água doce, não foi observada alteração na concentração plasmática de Na^+ dos indivíduos expostos a 1,0 e 2,5 mg/L de ferro por 48 h; contudo, a concentração de Na^+ corpórea foi significativamente reduzida nos animais expostos ao metal (Gonzalez et al., 1990), o que pode estar associado à perda intracelular do íon, uma vez que a concentração de Na^+ no fluido extracelular se manteve estável ao longo do período de exposição. Além disso, em exemplares de *Salmo trutta* ($22,7 \pm 1,4$ g) expostos ao ferro por 72 h em água doce (pH 6,0) foi observada redução nos níveis plasmáticos de Cl^- (cerca de 23%) em relação ao grupo controle, o que foi associado ao acúmulo de metal nas brânquias causando o rompimento das lamelas branquiais, à redução das taxas de consumo de oxigênio e ao aumento da viscosidade plasmática, atribuída ao aumento das concentrações de proteínas na ordem de 30% (Peuranen et al, 1994). Ainda, Lappivaara e colaboradores (1999) verificaram que a exposição por 30 dias a 8 mg/L de ferro em água doce (pH 5,9-6,2) também reduziu significativamente a concentração plasmática de Na^+ de *Coregonus lavaretus* (em média 77,3 g), o que foi relacionado ao acúmulo do metal nas brânquias, fígado e intestinos, sendo observado também aumento nos níveis de lactato e cortisol sanguíneo nos peixes expostos ao metal, ambos indicadores de

estresse fisiológico. Tal como visto nos animais do grupo controle, os exemplares de *C. parallelus* aclimatados 0‰ apresentaram aumento na concentração de glicose plasmática, mas não nas proteínas totais, após 24 h de exposição ao ferro, quando comparados aos peixes expostos ao metal em 15‰ e 5‰ (**Fig. 7B**), sugerindo que a exposição ao ferro em água doce não resultou em alterações adicionais sobre o metabolismo de carboidratos dos peixes. Em conjunto, nossos dados indicam que a exposição ao ferro pode resultar em distúrbios osmoregulatórios, mas não metabólicos, em *C. parallelus* aclimatados à salinidades reduzidas, promovendo alterações significativas no funcionamento das principais enzimas ionoregulatórias nas brânquias e comprometendo a capacidade de controle da espécie sobre a composição dos principais íons plasmáticos em ambientes hiposmóticos.

6. Conclusões

C. parallelus demonstrou ter uma ampla capacidade de manutenção de sua homeostase iônica plasmática durante os períodos adaptativo (choque hiposmótico) e regulatório (aclimação) à salinidades reduzidas, sendo observado apenas pequena redução na concentração plasmática de Cl^- nos animais aclimatados em 5‰. Por outro lado, o padrão de resposta das enzimas ionoregulatórias nas brânquias de *C. parallelus* foi fortemente dependente do tempo de exposição às condições hiposmóticas, que refletem ajustes diferenciais na atividade das enzimas com o intuito de controlar a composição iônica plasmática. Enquanto nos peixes submetidos aos protocolo de choque hiposmótico as enzimas Na^+/K^+ -ATPase e anidrase carbônica foram levemente inibidas nas brânquias dos animais em menores salinidades, sem que houvesse efeito sobre a atividade da H^+ -ATPase, a aclimação de *C. parallelus* às diferentes salinidades resultou em um padrão de "U invertido" sobre a atividade da Na^+/K^+ -ATPase e H^+ -ATPase, com as menores atividades sendo observadas nos animais expostos a 15 e 0‰, além de níveis aumentados da atividade da anidrase carbônica apenas nos peixes aclimatados em 0‰. A espécie também apresentou um forte controle sobre respostas metabólicas em função da exposição à salinidades reduzidas, não apresentando alterações em suas taxas de excreção de amônia e concentrações de proteínas totais e glicose no plasma durante o choque hiposmótico, sendo observada apenas um leve aumento na concentração de glicose plasmáticos dos peixes aclimatados em 0‰

Por outro lado, nossos dados demonstram que a exposição aguda ao ferro pode causar efeitos tóxicos ionoregulatórios em *C. parallelus*, promovendo severos distúrbios sobre a capacidade da espécie em controlar sua homeostase iônica, particularmente após a

aclimação à ambientes hiposmóticos. Durante o protocolo de choque hiposmótico, a exposição ao ferro resultou em níveis aumentados de Na^+ e Cl^- no plasma de *C. parallelus*, o que não foi diretamente relacionado a alterações na atividade das enzimas ionoregulatórias nas brânquias dos animais. Embora não tenham sido observados distúrbios nos níveis plasmáticos de glicose e na taxa de excreção de amônia, a redução dos níveis de proteínas no plasma podem ser interpretados como uma resposta compensatória para a redução da osmolaridade plasmática dos peixes expostos ao ferro durante o choque à 0‰, na tentativa de evitar alterações no balanço osmótico decorrente de grandes ganhos de água do meio mais diluído, em virtude dos níveis mais elevados de osmólitos inorgânicos (Na^+ e Cl^-) observados nos animais. Ao contrário, a exposição ao ferro nos exemplares de *C. parallelus* aclimatados às salinidades reduzidas promoveu uma intensa redução dos níveis plasmáticos de Na^+ e Cl^- , particularmente nos animais mantidos em água doce. Além disso, foi observada uma grande inibição das enzimas Na^+/K^+ -ATPase, anidrase carbônica e H^+ -ATPase (apenas em 0‰), sendo observado também nesses animais um aumento nos níveis plasmáticos de glicose, indicando um forte efeito do ferro sobre os mecanismos branquiais relacionados à manutenção da homeostase iônica plasmática de *C. parallelus*. Apesar das respostas diferenciais, os resultados observados sugerem uma maior vulnerabilidade de *C. parallelus* ao ferro em salinidade 0‰, que pode ter sido induzida pela maior biodisponibilidade do metal associada à sua fração dissolvida na água doce. Seja movimentando-se ao longo do gradiente ambiental proporcionado pelo estuário, ou permanecendo prolongadamente em localidades em que há manutenção da salinidade ambiental, a concentração de 1 mg/L de ferro total demonstrou interferir no equilíbrio iônico-osmótico da espécie.

7. Referências Bibliográficas

- Alvarez-Lajonchère, L.; Hidalgo, M. & Gotera, G. 1982. Estudio de la biología pesquera del robalo de ley, *Centropomus undecimalis* (Bloch) (Pisces, Centropomidae), en Tunas de Zaza, Cuba. *Rev. Investig. Marinas*, 3(1): 159- 200.
- BALDISSEROTTO, B. 2009. Fisiologia de Peixes Aplicada à Piscicultura. Santa Maria. Editora UFSM. 2ª Edição. 95-111.
- Bucking, C. 2017. A broader look at ammonia production, excretion, and transport in fish: a review of impacts of feeding and the environment. *J Comp Physiol B* 187: 1–18.
- Bielmyer, G. K.; Bullington, J. B.; DeCarlo, C. A.; Chalk, S. J.; Smith K. 2012. Effects of Salinity on Acute Toxicity of Zinc to Two Euryhaline Species of Fish, *Fundulus heteroclitus* and *Kryptolebias marmoratus*. *Integr. and Comp. Biol.* 52(6): 753–760.

- Bianchini, A. 2018. O Modelo do Ligante Biótico e suas aplicações em exotoxicologia. Universidade Federal do Rio Grande. Instituto de Ciências Biológicas Rio Grande, RS, Brasil. Apresentação CONSEMA.
- Bianchini, A. & Gilles, R., 2000. Is the digestive tract an important access route for mercury in the Chinese crab *Eriocheir sinensis* (Crustacea, Decapoda)? *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 64: 412–417.
- Blanchard J. & Grosell , M. 2006. Copper toxicity across salinities from freshwater to seawater in the euryhaline fish *Fundulus heteroclitus*: Is copper na ionoregulatory toxicant in high salinities? *Aquat. Toxicol.* 80: 131–139.
- Bradford, M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein– dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248–254.
- Bury, N.R. & Grosell, N. 2003. Iron acquisition by teleost fish. *Comp.Bioch. and Physiol.* 13: 97–105.
- BURY, N.R.; BOYLE D. & COOPER C. 2012. **Homeostasis and Toxicology of Essential Metals**. Elsevier Vol. 31^a, 202p.
- Bystriansky, J. S. & Kaplan, J. H. 2007. Sodium pump localization in epithelia. *Joun. of Bioenerg. Biomembr.* 39: 373-378.
- Bystriansky J. S. & Schulte P. M. 2011. Changes in gill H⁺-ATPase and Na⁺/K⁺-ATPase expression and activity during freshwater acclimation of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *The Journal of Exp. Biol.* 21: 2435-2442.
- Carvalho M. A. G.; Fernandes L. F. L.& Gomes L. G. 2017. Digestibility, protein retention rate and ammonia excretion in juvenile fatsnook (*Centropomus parallelus*) fed with different protein levels. *Ciênc. Rural, Sta Maria*, 47: 1678-4596.
- CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente, 2005. Resolução Conama nº357, de 17 de março de 2005. Brasília: D.O.U., 2005. Disponível em:<http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf>. Acessado: 15 de Maio de 2018.
- Dalzell, D.J.B. & MacFarlane, N.A.A. 1999. The toxicity of iron to brown trout and effects on the gills: a comparison of two grades of iron sulphate. *Journal Fish Biol.* 55: 301–315.
- Duarte, R.M., Benaduce, A.N.; Garcia, L., Gomes, L.C. & Gomes, A.C., 2018. High waterborne Mg does not attenuate the toxic effects of Fe, Mn, and Ba on Na⁺ regulation of Amazonian armored catfish tamoatá (*Hoplosternum litoralle*). *Env. Sci. and Pol. Res.* vol 25: 18027.

- Edwards S. L. & Marshall W.S. 2012. Osmoregulation and euryhalinity in fishes, 1-44. In: McCormick, S.D.; Farrel A.P. Brauner C. (ed). **Euryhaline Fishes**. Oxford: Academic Press, Vol 32.
- Evans, H.D; Piermarini M. P. & Choe K.P. 2005. The Multifunctional Fish Gill: Dominant Site of Gas Exchange, Osmoregulation, Acid-Base Regulation, and Excretion of Nitrogenous Waste. *Physiol Rev* 85: 97–17.
- Farias J. L.; Zarzar C. A.; Silva-Neto N.G.; Silva F. S.; Silva-Junior R.F.; & Cavalli R. O. 2017. Tolerance and growth of juveniles of the common snook (*Centropomus undecimalis*) exposed to different salinities. *Acta Fish* 5 (3): 54-60.
- Ferguson, E. A. & Hogstrand, C. 1998. Acute Silver Toxicity to Seawater- Acclimated Rainbow Trout: Influence of Salinity On Toxicity and Silver Speciation. *Env. Tox. and Chem.* 17:589–593.
- Fish J.T. 2009. Groundwater water treatment for iron and manganese reduction and fish rearing studies applied to the design of the Ruth Burnett sport fish hatchery Fairbanks, Alaska. *Aquac Eng* 41: 41-97.
- Farias J. L.; Zarzar C. A.; Silva-Neto N.G.; Silva F. S.; Silva-Junior R.F.; & Cavalli R. O. 2017. Tolerance and growth of juveniles of the common snook (*Centropomus undecimalis*) exposed to different salinities. *Acta Fish* 5 (3): 54-60.
- Frick N. T. & Wright P. A. 2002. Nitrogen metabolism and excretion in the mangrove killifish *Rivulus marmoratus*. The influence of environmental salinity and external ammonia. *Journal of Exp. Biol.* 205: 79-89.
- Geering, K. 2005. Subunit assembly and functional maturation of Na,K-ATPase. *J. Membr. Biol.* 115: 109-121
- Gensemer, R.W.; Naddy R.B.; Stubblefield W.A.; Hockett, J.R.; Santore, J.R. & Paquin P. 2002. Evaluating the role of ion composition on the toxicity of copper to *Ceriodaphnia dubia* in very hard water. *Comp. Bioch. Physiol. C*, 133: 87-97.
- Gibbs, A. & Somero, G. N. 1989. Pressure adaptation of Na⁺/K⁺- ATPase in gills of marine teleosts. *J. Exp. Biol.* 143: 475–492.
- GIULIO R.T. & HINTON D.E. 2008. **The Toxicology of Fishes**. New York: Taylor & Francis Group, LLC, *Intern. Stand. Book Number-13*. 402.
- Gonzalez, R. J., Grippo, R. S., and Dunson, W. A. (1990). The disruption of sodium balance in brook trout *Salvelinus fontinalis* (Mitchell), by manganese and iron. *J. Fish Biol.* 37:765–774.

- Goss G.G.; Perry S. F.; Wood C. M.; Laurent P. 1992b. Mechanisms of ion and acid-base regulation at the gills of freshwater fish. *Journal Exp Zool* 263:143–159.
- Grobler, E., Du Preez, H. H., & Van Vuren, J. H. J. 1989. Toxic effects of zinc and iron on the routine oxygen-consumption of *Tilapia sparrmanii* (Cichlidae). *Comp. Biochem. Physiol. C*, 94: 207–214.
- Hiroi J. & McCormick S.D. 2007. Variation in salinity tolerance, gill Na^+/K^+ -ATPase, $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ cotransporter and mitochondria-rich cell distribution in three salmonids *Salvelinus namaycush*, *Salvelinus fontinalis* and *Salmo salar*. *Journal of Exp. Biol.* 293(2):106-18.
- Henry, R. P. 1991. Techniques for measuring carbonic anhydrase in vitro: the electrometric delta pH and the pH stat methods. *The Carbonic Anhydrases. Plenum.* 119-125.
- Henry, R. P.; 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. *Frontiers in Physiology.* 431 (3):1-33.
- Herzog, S.D.; Persson P. & Kritzberg, E.M. 2017. Salinity Effects on Iron Speciation in Boreal River Waters. *Envir. Scienc. and Technol.* 51: 9747–9755.
- Hwang, P.P.; Lee, T.H.; Lin, L.Y. 2011. Ion regulation in fish gills: recent progress in the cellular and molecular mechanisms. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 301: 28-47.
- IBRAM - Instituto Brasileiro de Mineração, 2012. Informações e análises da economia mineral brasileira 7ª edição. Disponível em: <http://www.ibram.org.br/sites/1300/1382/00002806.pdf>. Acessado: 22 de Maio de 2018.
- IGAM- Instituto Mineiro de Gestão das Águas. 2017. Gerência de monitoramento de Qualidade das Águas- Monitoramento da Qualidade das Águas Superficiais do Rio Doce no Estado de Minas Gerais. Relatório Técnico de acompanhamento da Qualidade das Águas do Rio Doce Após o Rompimento da Barragem da Samarco no distrito de Bento Rodrigues – Governo do Estado de Minas Gerais, Mariana/MG. Disponível em: http://www.igam.mg.gov.br/images/stories/2017/INFORMATIVO_RD/Relatorio_valiacaoQualidadeEmergencial_junho2017.pdf. Acessado: 20 de Maio de 2018.
- IGAM- Instituto Mineiro de Gestão das Águas. 2019. Gerência de monitoramento de Qualidade das Águas- Monitoramento da Qualidade das Águas Superficiais do Rio Doce no Estado de Minas Gerais. Encarte Especial Sobre a Qualidade Das Águas do Rio Doce Após 4 Anos do Rompimento da Barragem de Fundão 2015-2019. Governo do Estado de Minas Gerais, Mariana/MG. Disponível em: <http://200.198.57.118:8080/jspui/bitstream/123456789/3215/1/Encarte%204%20anos.%20Desastre%20Rio%20Doce.pdf>. Acessado: 18 de setembro de 2020.

- Janssen, C.R.; Heijerick, D.G.; De Schamphelaere, K.A.C. & Allen, H.E., 2003. Environmental risk assessment of metals: tools for incorporating bioavailability. *Environ. Int.* 28: 793–800.
- Javed, M. & Abdullah, S. 2006. Studies on Acute and Lethal Toxicities of Iron and Nickel to the Fish. *Pak. J. of Biol. Scienc.* 9 (3): 330-335.
- Kirschner, L. B. 2004. The mechanism of sodium chloride uptake in hyperregulating aquatic animals. *Joun. of Exp. Biol.* 207: 1439-1452.
- Kumar M.; Varghese T.; Sahu N.P.; Prasad N.; Gupta G.; Dasgupta S. 2019. Pseudobranch mimics gill in expressing Na^+K^+ -ATPase 1 α -subunit and carbonic anhydrase in concert with H^+ -ATPase in adult hilsa (*Tenualosa ilisha*) during river migration. *Fish Physiol Biochem.* 46(2):725-738.
- Lappivaara, J. & Oikari, A. 1999. Bioaccumulation and Subchronic Physiological effects of Waterborne Iron Overload on Whitefish Exposed in Humic and Nonhumic Water. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 37: 196–204.
- Lappivaara J. & Marttinen, S. 2005. Effects of waterborne iron overload and simulated winter conditions on acute physiological stress response of whitefish. *Ecotox. and Env.. Safet.* 60 : 157–168.
- Lasserre, P. 1971. Increase of Na^+K^+ -dependent ATPase activity in gills and kidneys of two euryhaline marine teleost, *Crenimugil labrosus* and *Dicentrarchus labrax* during adaptation to fresh water. *Life Sci.* 10: 113-119.
- Lee, T. H.; Hwang, P. P.; Shieh, Y. E.; Lin, C. H. 2000. The relationship between ‘deep-hole’ mitochondria-rich cells and salinity adaptation in the euryhaline teleost, *Oreochromis mossambicus*. *Fish. Physiol. Biochem.* 23: 133–14.
- Lin, H. & D. J. Randall. 1991. Evidence for the presence of na electrogenic proton pump on the trout gill epithelium. *Joura of. Exp.Biol.* 161: 119–134.
- Lin Y. M.; Chen C. N.; Lee T. H. 2003. The expression of gill Na^+K^+ -ATPase in milkfish, *Chanos chanos*, acclimated to seawater, brackish water and fresh water. *Comp. Biochem. Physiol. A* 135: 489–497.
- Lisboa V.; Barcarolli F.; Sampaio L. A.; Bianchini A. 2015. Effect of salinity on survival, growth and biochemical parameters in juvenile Lebranch mullet *Mugil liza* (Perciformes: Mugilidae). *Neot. Ichthyol.* 13(2): 447-452.
- Madsen S. S. & Naamansen E. T. 1989. Plasma ionic regulation and gill Na^+K^+ -ATPase changes during rapid transfer to sea water of yearling rainbow trout, *Salmo gairdneri*: time course and seasonal variation. *Journal of Fish Biol.* 34(6):829 – 840.

- Maciel, J.C., 2005. Efeito da salinidade na sobrevivência e no crescimento de jovens de robalo-peva *Centropomus Parallelus*. Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Aquicultura da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Santa Catarina, 2p (*Dissertação de Mestrado*).
- Marshall W. S.; Bryson S. E.; Darling P.; Whitten C.; Patrick M.; Wilkie M.; Wood C. M.; Buckland N. J. 1998. NaCl transport and ultrastructure of opercular epithelium from a freshwater-adapted euryhaline teleost, *Fundulus heteroclitus*. *Joura of Exp. Zool.* 277: 23–37.
- Marshall, W. S.; Bryson, S. E. & Luby, T. 2000. Control of epithelial Cl^- secretion by basolateral osmolality in the euryhaline teleost *Fundulus heteroclitus*. *J. Exp. Biol.* 203: 1897-1905.
- Marshall W.S. 2003. Rapid regulation of NaCl secretion by estuarine teleost fish: coping strategies for short-duration freshwater exposures. *Bioch. et Bioph. Acta* 1618: 95– 105.
- Medeiros L.S.; Pavione P.M.; Baroni V. D.; Gomes A.R.C. & Gomes L. C. 2015. Ammonia excretion in fat snook (*Centropomus parallelus* Poey, 1860) at different salinities. *Aquac. Res.* 46: 3084–3087.
- McCormick, S.D.; Farrel A.P.; Brauner C. J. 2013. **Euryhaline Fishes**. Fish Physiology. Vol 32.
- McCormick, S.D. 2001. Endocrine Control of Osmoregulation in Teleost Fish. *Am. Zool.* 41(4): 781-794.
- Nelson, I. D.; Potts W. T. W.; and H. Huddart. 1997. The use of amiloride to uncouple branchial sodium and proton fluxes in the brown trout, *Salmo trutta*. *Journal Comp. Physiol. B*, 167: 123–128.
- Panquin P.R.; Santore R.C.; Wu B.K.; Kavvadas C.D & Di Toro D.M. 2000. The biotic ligand model: a model of the acute toxicity of metals to aquatic life. *Env. Pol. & Pol.* 3: 175-182.
- Park J., Kim S. Yoo, J., Lee S. J., Park J.W. & Jung J., 2014. Effect of salinity on acute copper and zinc toxicity to *Tigriopus japonicus*: The difference between metal ions and nanoparticles. *Mari. Pollut. Bulletin*, 8: 526–531.
- Payan, P. 1978. A study of the $\text{Na}^+ / \text{NH}_4$ exchange across the gill of the perfused head of the trout (*Salmo gairdneri*). *Journal Comp. Physiol.* 124: 181-188.
- Peuranen, S., Vuorinen, P.J., Vuorinen, M. & Hollender, A., 1994. The effects of iron, humic acids and low pH on the gills and physiology of brown trout (*Salmo trutta*). *Ann. Zool. Fenn.* 31: 389–396.

- Perry, S.F.; Shahsavarani, A.; Georgalis, T.; Bayaa, M.; Furimsky, M.; Thomas, S.L. 2003. Channels, pumps, and exchangers in the gill and kidney of freshwater fishes: their role in ionic and acid–base regulation. *Journal of Exp. Zool. A Comp. Exp. Biol.* 300A: 53–62.
- Prodócimo, V.; Souza, C.F.; Pessini, C.; Fernandes, L.C. & Freire, C.A. 2008. Metabolic substrates are not mobilized from the osmoregulatory organs (gills and kidney) of the estuarine pufferfishes *Sphoeroides greeleyi* and *S. testudineus* upon short-term salinity reduction. *Neotr. Ichth.*, 6(4): 613-620.
- Prodócimo, V. & Freire, C. 2006. The $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ cotransporter of estuarine pufferfishes (*Sphoeroides testudineus* and *S. greeleyi*) in hypo and hyper regulation of plasma osmolality. *Comp. Biochem. and Physiol., C* 142: 347– 355.
- Richards, J.G., Semple, J.W.; Bystriansky, J.S.; Schulte, P.M. 2003. Na^+/K^+ -ATPase α -isoform switching in gills of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during salinity transfer. *Journal of Exper. Biol.* 206: 4475-4486.
- Rivas, L.R. 1986. Sistematic Review of the Perciform fishes of the genus *Centropomus*. *Am. Soc. of Ichth. and Herpetologist. Cop.* 3: 579-611.
- Rocha A. J. S.; Gomes V.; Ngan V.P.; Passos M.J.A.C.R. & Furia R.R. 2005. Metabolic demand and growth of juveniles of *Centropomus parallelus* as function of salinity. *Journal of Exp. Mar. Biol. and Ecol.* 316: 157– 165.
- Rodrigues, P.P. 2005. Aspectos Reprodutivos do Robalo Peba, *Centropomus parallelus*, na Foz do Rio Doce, em Linhares/ES. Centro de Ciências Humanas e Naturais, Departamento de Ecologia e Recursos Naturais. Universidade Federal do Espírito Santo (UFES). (monografia).
- Sanches, D. L. & Mechi, A. 2010. Impactos ambientais da mineração no Estado de São Paulo. *Estud. Avanç.* 24 (68).
- Sangiao-Alvarellos, S., R. Laiz-Carrión, J. M. Guzmán, M. P. M. del Río, J. M. Míguez, J. M. Mancera & J. L. Soengas. 2003. Acclimation of *S. aurata* to various salinities alters energy metabolism of osmoregulatory and non-osmoregulatory organs. *Amer. Journal of Physiol.*, 285:897-907.
- Scott, G.R.; Rogers, J.T.; Richards, J.G.; Wood, C.M.; Schulte, P.M. 2004. Intraespecific divergence of ionoregulatory physiology in the euryhaline teleost *Fundulus heteroclitus*: possible mechanisms of freshwater adaptation. *Journal of Exper. Biol.* 207: 3393-3410.
- SEDRO- Secretaria do Estado de Desenvolvimento Regional, Política Urbana e Gestão Metropolitana, Governo do estado de Minas Gerais, 2016. Relatório: Avaliação dos efeitos e desdobramentos do rompimento da Barragem de Fundão em Mariana-MG

Responsável: Grupo da Força-Tarefa Decreto nº 46.892/2015. Belo Horizonte.
Disponível em:

http://www.agenciaminas.mg.gov.br/ckeditor_assets/attachments/770/relatorio_final_ft_03_02_2016_15h5min.pdf. Acessado: 02 de Maio de 2018.

- Sterzelecki, F.C.A, Rodrigues, E.B., Fanta, E.A. & Ribeiro, C.A.O.A., 2013. The effect of salinity on osmoregulation and development of the juvenile fat snook, *Centropomus parallelus* (POEY). *Braz. J. Biol.* 73 (3) 609-615.
- Takei P. Y & Hwang P. 2016. Homeostatic Responses to Osmotic Stress. *Fish Physiol.* Vol 35: 207- 249.
- Taylor, R.G.; Whittington J.A.; Grier, H. J. & Crabtree, R.E. 2000. Age, growth, maturation, and protandric sex reversal in common snook, *Centropomus undecimalis*, from the east and west coasts of south Florida. *Fish Bull.* 98: 612-624.
- Teixeira, R.L. 1997. Distribution and feeding habits of the young common snook, *Centropomus undecimalis* (Pisces: Centropomidae), in the shallow waters of a tropical Brazilian estuary. *Bol. do Mus. de Biol. Mello Leitão.* 6: 35-46.
- Tipsmark, C. K.; Madsen, S. S.; Seidelin, M.; Christensen, A. S.; Cutler, C. P. & Cramb, G. 2002. Dynamics of Na⁺,K⁺,2Cl⁻ cotransporter and Na⁺,K⁺-ATPase expression in the branchial epithelium of brown trout (*Salmo trutta*) and Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Journal of Exp. Zool.* 293:106 -118.
- Tipsmark C. K.; Küllerich P.; Nilsen T.O.; Ebbesson L.O.E.; Stefansson S.O.; Madsen S.S. 2008. Branchial expression patterns of claudin isoforms in Atlantic salmon during seawater acclimation and smoltification. *Journal Physiol Regul Integr Comp Physiol* 294: 1563–1574.
- Tonini W.C.T., Braga, L. G. T. & Vila Nova D. L. D., 2007. Dieta de Jovens do Robalo *Centropomus parallelus* (POEY) no sul da Bahia. *Inst. Pesca, São Paulo*, 33(1): 85 - 91.
- Tsuzuki, M.Y.; Sugai, J.K.; Maciel, J.C.; Francisco, C.J.& Cerqueira, V.R., 2007. Survival, growth and digestive enzyme activity of juveniles of the fat snook (*Centropomus parallelus*) reared at different salinities. *Aquac.* 271: 319-325.
- Tucker Jr, J.W; Laudau, M.P.& Faulkner, B.E. 1985. Culinary value and composition of wild and captive common snook, *Centropomus undecimalis*. *Flor. Scient.*, 48(4): 196-200.
- Verdouw, H.; Van Echteld, C.J.A.; Dekkers, E.M.J. 1978. Ammonia determination based on indophenol formation with sodium salicylate. *Water Res.* 12(6): 399–402.
- Vijayan, M.M.; Pereira, C.; Grau, E.G. 1997. Metabolic responses associated with confinement stress in tilapia: the role of cortisol. *Comp. Bioch. and Physiol, C.* 116: 89-95.

- Vitale, A.M.; Monserrat, J.M.; Castilho, P.; Rodriguez, E.M. 1999. Inhibitory effects of cadmium on carbonic anhydrase activity and ionic regulation of the estuarine crab *Chasmagnathus granulata* (Decapoda Grapsidae). *Comp. Biochem. Physiol. C*.122: 121–129.
- Vuori, M. K. 1995. Direct and indirect effects of iron on river ecosystems. *Ann. Zoo. Fennici*. 32 (3): 317-329.
- Wilson, J.M.; Antunes, J.C.; Bouça, P.D.; Coimbra, J. 2004. Osmoregulatory plasticity of the glass eel of *Anguilla anguilla*: freshwater entry and changes in branchial iontransport protein expression. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 61: 432–442.
- Wilson, J.M.; Leitão A.; Gonçalves A.F.; Ferreira C. 2007. Modulation of branchial ion transport protein expression by salinity in glass eels (*Anguilla anguilla* L.). *Mar. Biol.* 151 (5) :1633-1645.
- Wilson R.W. & Taylor E.W. 1993. Differential responses to copper in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) acclimated to sea water and brackish water. *Journal of Comp Physiol B* 163:239-246.
- Wood C. & Laurent, P. 2003. Na⁺ versus Cl⁻ transport in the intact killifish after rapid salinity transfer. *Bioch. et Bioph. Acta* 1618(2):106-1.
- Wosnick, N. 2009. Plasticidade osmorregulatória em *Centropomus parallelus* (Poey, 1860) - Robalo-peva. Curitiba (PR): Departamento de Fisiologia, Universidade Federal do Paraná. (monografia).
- WRIGHT P. & ANDERSON P. 2001. **Nitrogen Excretion**. Academic Press Vol 20, 112p.
- Wright P. A. & Wood C. M. 2012. Seven things fish know about ammonia and we don't. *Resp. Physiol. & Neurob.* 184: 231-240.
- Wright, P.A.& Wood, C.M. 2009. A new paradigm for ammonia excretion in aquatic animals: role of Rhesus (Rh) glycoproteins. *Journal of Experimental Biology* 212: 2302 – 2312.
- Zall, D.M.; Fisher, D.& Garner, M.Q. 1956. Photometric Determination of Chlorides in Water. *Anal. Chem.* 28: 1665–1668.
- Zhang, L. & Wang W. 2007. Waterborne cadmium and zinc uptake in a euryhaline teleost *Acanthopagrus schlegeli* acclimated to different salinities. *Aquat. Toxicol.* 84: 173–181.