

## RELATÓRIO DE ATIVIDADES 2009-2011

### DADOS DO PROJETO

**Título:** Avaliação do potencial invasor de peixes dulcícolas e do papel dos estuários como pontes dispersoras no processo de bioinvasão em corpos d'água continentais utilizando ferramentas fisiológicas

**Coordenador::** Viviane Prodocimo

**Setor :** Detor de Ciências Biológicas  
Fisiologia

**Depto.:** Departamento de

**Período de execução: início:** agosto/2009

**término:** agosto/2011

**Financiador:** Fundação O Boticário de Proteção à Natureza

### OBJETIVO DO PROJETO

#### OBJETIVO GERAL

O presente projeto pretende avaliar o potencial invasor de peixes dulcícolas e o papel dos estuários como pontes dispersoras efetivas nos processos de invasões biológicas de corpos d'água continentais utilizando ferramentas fisiológicas e a bacia do Guaraguaçu (PR) como modelo.

#### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Testar em campo e em laboratório os limites de tolerância (temperatura e salinidade) de espécies introduzidas (*Clarias gariepinus*, *Ictalurus punctatus*, *Oreochromis niloticus*) e nativas (*Rhamdia quelen*, *Geophagus brasiliensis*) próximas, com similaridade filogenética e/ou ecológica.
- Relacionar as capacidades fisiológicas das espécies estudadas a aspectos evolutivos, ecológicos e em relação à ocupação de ambientes degradados (dados de laboratório, de campo e da literatura).
- Utilizar o conhecimento plasticidade fisiológica de espécies invasoras em políticas de conservação do ambiente de floresta Atlântica e controle de espécies invasoras.
- Hipótese geral de trabalho: As espécies introduzidas têm maior faixa de tolerância térmica e maior grau de eurihalinidade (tolerância a aumento de salinidade) do que as espécies nativas comparadas.

### 1. RESULTADOS OBTIDOS

No primeiro semestre foi realizada uma fase de campo em dezembro de 2009 com esforço amostral de 48 horas/rede. Devido às condições climáticas não foi possível realizar todas as fases de campo previstas no primeiro semestre Ago 2009-Fev 2010. Choveu excepcionalmente durante todo o período o que inviabilizou a ida para o Rio Guaraguaçu e conseqüentemente a coleta principalmente das espécies invasoras que se alojam nas margens do rio onde a vegetação alagada serve de proteção contra predadores e fornece grande fonte de alimento.

Em março de 2009 foi realizada uma fase de campo piloto (antes do financiamento aprovado) e seus dados serão utilizados no projeto. Na fase de campo realizada em dezembro de 2009, após a coleta os animais (exemplares de espécies nativas *Rhamdia quelen* (n=11); *Geophagus brasiliensis* (n=8), *Pimelodela* (n=4) e da espécie invasora *Oreochromis niloticus* (n=1) foram submetidas à elevação de salinidade no estuário na foz do rio Guaraguaçu, onde permaneceram em uma gaiola durante maré enchente no estuário até a salinidade de ~20‰. Durante todo o período de experimento foram verificados os parâmetros abióticos. Em seguida os animais foram anestesiados e uma amostra de sangue foi coletada para posterior análise dos íons, glicose e osmolalidade do plasma no laboratório de Fisiologia Comparativa da Osmorregulação.

No segundo semestre, em maio de 2010, foi realizada uma fase de campo com esforço amostral de 48 horas/rede onde foram coletados 16 exemplares da espécie nativa *Geophagus brasiliensis*. Exemplares das espécies invasoras não foram coletados.

No Terceiro Semestre, em novembro de 2010 e janeiro de 2011, foram realizadas duas fases de campo com esforço amostral de 48 horas/rede em cada fase. Em novembro foram coletados seis exemplares da espécie de bagre invasora *Ictalurus punctatus* e em janeiro foram coletados apenas quatro exemplares da espécie nativa marinho-estuarina de robalo *Centropomus parallelus*.

Em 14 de maio de 2011 foi realizada a última fase de campo com esforço amostral de 24 horas/rede, onde foram coletados 3 exemplares do robalo *Centropomus parallelus* e 15 exemplares do bagre *Pimelodela sp.* ambas espécies nativas.

#### Experimentos de Campo

A osmolalidade e cloreto plasmáticos dos animais coletados no rio Guaraguaçu e submetidos à variação de salinidade em campo estão listados na tabela 1. Podemos observar que as espécies submetidas a estresse salino no estuário apresentaram elevação das concentrações osmóticas do plasma.

**Tabela 1:** Osmolalidade e cloreto plasmáticos dos animais coletados no rio Guaraguaçu e submetidos à elevação da salinidade no estuário.

<b>Espécie</b>	<b>Data da Coleta</b>	<b>Salinidade (‰)</b>	<b>Osmolalidade (mOsm.kgH<sub>2</sub>O<sup>-1</sup>)</b>	<b>Cloreto (mM)</b>
<b>Nativas</b>				
<i>E. brasilianus</i>	Mar 2010	0	258 (n=1)	77 (n=1)
<i>G. brasiliensis</i>	Mar 2010	0	316 (n=1)	109 (n=1)
	Dez 2009	15	358 (n=4)	
	Mai 2010	0		104 (n=5)
<i>H. malabaricus</i>	Mar 2010	0	275 (n=1)	59 (n=1)
	Dez 2009	24	333 (n=3)	
<i>Pimelodela sp</i> <i>R. quelen</i>	Dez 2009	0	272 (n=1)	
	Dez 2009	16	350 (n=6)	
	Mar 2009	20	440 (n=3)	201 (n=3)
	Dez 2009	24	497 (n=3)	
<b>Não nativas</b>				
<i>O. niloticus</i>	Dez 2009	0	330 (n=1)	

Foram realizados os experimentos de laboratório de exposição à elevação de salinidade. Exemplares das espécies nativas *R. quelen* (n=6-7 para cada condição experimental) e *G. brasiliensis* (n=2-6), e das espécies invasoras *Clarias gariepinus* (n=11-12), *O. niloticus* (10-11), *Ciprinus carpio* (n=10-12) e *Ictalurus punctatus* (n=6) foram expostos às salinidades 15‰ e 30‰ por 6 horas com os controles permanecendo em água doce. Após os experimentos, os peixes foram anestesiados com benzocaína foi coletada uma amostra de sangue que foi em seguida centrifugada, e o plasma obtido foi congelado a -20°C até a realização dos ensaios. As brânquias e o rim foram coletados para a determinação da atividade de enzimas atuantes na osmorregulação, anidrase carbônica e Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase. Uma amostra de músculo foi retirada para determinação do conteúdo total de água no tecido e verificação da expressão da proteína de estresse térmico HSP70 através de detecção imunológica por Western Blot.

Os parâmetros plasmáticos e a expressão de HSP70 foram analisados nas amostras de todas as espécies. As análises da atividade enzima anidrase carbônica foram realizadas para todas as espécies e da enzima Na,K-ATPase foram realizadas nas espécies *O. niloticus* e *C. carpio*.

Foram realizados experimentos *in vitro* para determinar a capacidade de regulação de volume celular frente a um estresse hiper-osmótico e hipo-osmótico para *R. quelen*, *O. niloticus* e *I. punctatus*. Uma amostra de músculo dos animais mantidos no aquário estoque em água doce (n=8 para cada espécie) foi utilizada nos experimentos. Não foi possível realizar os experimentos com *G. brasiliensis* e *C. gariepinus* devido a dificuldade de obtenção dos exemplares na natureza ou através de produtores locais.

**Os experimentos de exposição a elevação de temperatura foram realizados apenas com a espécie nativa *Rhamdia quelen* e com duas outras espécies de Siluriformes nativos *Corydoras ehrhardti* e *Scleromystax barbatus*.**

### **Experimento de laboratório**

Foram analisados os parâmetros plasmáticos (osmolalidade, íons cloreto, magnésio, sódio e potássio, e glicose), a expressão das proteínas de estresse térmico (HSP70) e a atividade da anidrase carbônica dos Siluriformes *R. quelen*, *C. gariepinus* e *I. punctatus*, dos Perciformes *G. brasiliensis* e *O. niloticus* e do Cypriniformes *C. carpio* submetidos às salinidades 15‰ e 30‰ por 6 horas. A atividade da enzima Na,K-ATPase foi analisada para as amostras de *C. carpio* e *O. niloticus*. Experimentos *in vitro* para determinar a capacidade de regulação de volume celular frente a um estresse hiper-osmótico e hipo-osmótico foram realizados para *R. quelen*, *O. niloticus* e *I. punctatus*.

Muitos exemplares de *G. brasiliensis* e *I. punctatus* possuíam tamanho reduzido não fornecendo amostra de sangue suficiente para realizar a análise dos íons. Após várias tentativas de coleta no ambiente natural e de aquisição em criadouros comerciais não foi possível a obtenção de mais exemplares dessas espécies para elevar o n amostral dos experimentos.

### **Osmolalidade**

A osmolalidade do plasma nas espécies de Siluriformes apresentou elevação acompanhando o aumento da salinidade. Não houve diferença entre os controles para todas as espécies, porém *I. punctatus* apresentou elevação da osmolalidade em 15‰ quando comparado a *R. quelen* e *C. gariepinus* na mesma condição e *R. quelen* exposto a 30‰ apresentou elevação da osmolalidade quando comparado as demais espécies de Siluriformes. *R. quelen* a osmolalidade foi maior em 30‰, quando comparado aos animais controle e 15‰ (controle: 252,2±4,83; 15‰: 280,6±8,43 e 478,7±16,6 mOsm/Kg.H<sub>2</sub>O). *C. gariepinus* apresentou elevação da osmolalidade nos animais expostos a 30‰ (412,0±10,32 mOsm/Kg.H<sub>2</sub>O) quando comparados ao controle (256,9±6,93 mOsm/Kg.H<sub>2</sub>O) e aos animais expostos 15‰ (300,3±5,74 mOsm/Kg.H<sub>2</sub>O) e elevação da osmolalidade dos animais expostos a 15‰ em relação aos controle em água doce. *I. punctatus* apresentou aumento na osmolalidade em 15‰ e 30‰ em relação ao controle (controle: 243,00±8,62; 15‰: 380,0±10,60 e 30‰: 410,2±9,35 mOsm/Kg.H<sub>2</sub>O) (Fig. 1A).

Nos Perciformes e Cypriniformes, *C. carpio* apresentou redução na osmolalidade na condição controle em relação a *G. brasiliensis* e *O. niloticus*. *O. niloticus* apresentou elevação da osmolalidade em 30‰ quando comparada as demais espécies. *G. brasiliensis* não apresentou diferença nos valores de osmolalidade entre os tratamentos. *C. carpio* elevou a osmolalidade nos animais expostos a 30‰ em relação ao controle (controle: 268,7±10,49; 15‰: 298,8±13,43 e 30‰: 337,2±12,17 mOsm/Kg.H<sub>2</sub>O). Para *O. niloticus* a osmolalidade foi elevada nos animais expostos a 30‰, quando comparada aos controle e aos expostos a 15‰ (controle: 305,2±10,04; 15‰: 309,4±14,68 e 30‰: 406,6±16,52 mOsm/Kg.H<sub>2</sub>O) (Fig. 1B).

Figura 1: **Osmolalidade do plasma** (média±erro padrão, mOsm/KgH<sub>2</sub>O) de peixes expostos por 6 horas em água doce e às salinidades de 15‰ e 30‰. (A) Espécies da ordem Siluriformes: *R. quelen* (n=6), *C. gariepinus* (n=11-12) e *I. punctatus* (n=5-9). (B) Espécies da ordem Perciformes: *G. brasiliensis* (n=2) e *O. niloticus* (n=7-8) e da ordem Cypriniformes: *C. carpio* (n=8-11). Letras diferentes indicam diferenças significativas entre as espécies dentro de uma mesma condição experimental. \* indicam diferença entre o controle e as condições 15‰ e 30‰ para a mesma espécie. # indicam diferenças entre 15‰ e 30‰ para a mesma espécie, sempre com P<0,05.

## Íons

Os íons cloreto, sódio, potássio e magnésio acompanharam a osmolalidade, elevando-se nas salinidade 15‰ e para valores extremos em 30‰, indicando perda da homeostase. O íon potássio para *O. niloticus* foi uma exceção, não apresentando alteração frente ao estresse salino. A salinidade de 30‰ mostrou-se um fator limitante para ocupação de ambientes tanto para as espécies nativas e quanto para as invasoras (Fig. 2; Fig. 3; Fig. 4; Fig. 5).

B  
A  
a  
\*  
a  
\*  
b\* #  
b  
\*  
a  
\* #  
b  
a  
b  
b  
a  
\*  
a  
\*  
a  
a  
b  
b  
a  
a  
a

**Figura 2:** Cloreto do plasma (média±erro padrão) de peixes expostos por 6 horas em água doce e às salinidades de 15‰ e 30‰. (A) Espécies da ordem Siluriformes: *C. gariepinus* (n:11-12), *R. quelen* (n:6-7), *I. punctatus* (n:4-7). (B) Espécies da Ordem Perciformes *O. niloticus* (n:5-6) e *G. brasiliensis* (n:1-2) e ordem Cypriniformes: *C. carpio* (n:10-12). Letras diferentes indicam diferenças significativas entre as espécies dentro de uma mesma condição experimental. \* indicam diferença entre o controle e as condições 15‰ e 30‰ para a mesma espécie. # indicam diferenças entre 15‰ e 30‰ para a mesma espécie, sempre com  $P < 0,05$ .

**Figura 3:** Sódio do plasma (média±erro padrão) de peixes expostos por 6 horas em água doce e às salinidades de 15‰ e 30‰. (A) Espécies da ordem Siluriformes: *C. gariepinus* (n:11-12), *R. quelen* (n:6-7), *I. punctatus* (n:4-7). (B) Espécies da Ordem Perciformes *O. niloticus* (n:4-7) e *G. brasiliensis* (n:1-2) e ordem Cypriniformes: *C. carpio* (n:10-12).

**Figura 4:** Potássio do plasma (média±erro padrão) de peixes expostos por 6 horas em água doce e às salinidades de 15‰ e 30‰. (A) Espécies da ordem Siluriformes: *C. gariepinus* (n:11-12), *R. quelen* (n:5-6). (B) Espécies da Ordem Perciformes *O. niloticus* (n:3-7) e *G. brasiliensis* (n:1-2) e ordem Cypriniformes: *C. carpio* (n:11-12).

**Figura 5:** Magnésio do plasma (média±erro padrão) de peixes expostos por 6 horas em água doce e às salinidades de 15‰ e 30‰. (A) Espécies da ordem Siluriformes: *C. gariepinus* (n:11-12), *R. quelen* (n:6-7). (B) Espécies da Ordem Perciformes *O. niloticus* (n:10-11) e *G. brasiliensis* (n:1-2) e ordem Cypriniformes: *C. carpio* (n:10-12).

A glicose plasmática (Fig. 6) não apresentou uma resposta padronizada em relação ao estresse salino, além de ser muito variável entre as espécies, podendo estar sendo afetada pelo metabolismo do animal e/ou por respostas diferenciadas ao estresse para cada espécie.

**Figura 6:** Glicose do plasma (média±erro padrão) de peixes expostos por 6 horas em água doce e às salinidades de 15‰ e 30‰. (A) Espécies da ordem Siluriformes: *C. gariepinus* (n:11-12), *R. quelen* (n:6-7). (B) Espécies da Ordem Perciformes *O. niloticus* (n:9-10) e ordem Cypriniformes: *C. carpio* (n:7-12).

## Teor Hídrico

Nas espécies de Siluriformes, ocorreu a diminuição do teor hídrico muscular com o aumento da salinidade do meio. Valores reduzidos de teor hídrico muscular foram observados em *I. punctatus* na condição controle quando comparado a *R. quelen* e *C. gariepinus*, e em *R. quelen* em 15‰ quando comparado a *C. gariepinus* e *I. punctatus*. Em *R. quelen* houve diminuição do teor hídrico muscular em 15‰ e 30‰ comparados ao controle (controle:  $79 \pm 0,3\%$ ; 15‰:  $76 \pm 0,6\%$  e 30‰:  $75 \pm 0,9\%$ ). *C. gariepinus* apresentou redução do teor hídrico nos animais expostos a 30‰ quando comparados aos animais controle e aos expostos a 15 ‰ (controle  $80 \pm 0,3\%$ ; 15‰:  $79 \pm 0,1\%$  e 30‰:  $77 \pm 0,4\%$ ). Para *I. punctatus* houve diferença entre os três tratamentos, com diminuições do controle em relação a 15‰, e em 30‰ comparado ao controle e a 15‰ (controle:  $83 \pm 0,5\%$ ; 15‰:  $80,6 \pm 0,5\%$  e 30‰:  $76 \pm 0,4\%$ ) (Fig.7A).

Entre os Perciformes e Cypriniformes, as espécies apresentaram valores semelhantes de teor hídrico no controle. *C. carpio* apresentou redução do teor hídrico muscular em 15‰ quando comparado a *G. brasiliensis* e elevação em 30‰ quando comparado a *G. brasiliensis* e *O. niloticus*. *G. brasiliensis* apresentou redução do teor hídrico em 30‰ quando comparado aos valores dos animais controles e expostos a 15‰ (controle:  $78 \pm 0,1\%$ ; 15‰:  $78 \pm 0,8\%$  e 30‰:  $73 \pm 0,4\%$ ). Para *C. carpio* em 15‰ houve uma diminuição do teor hídrico em relação ao controle e 30‰ (controle:  $78 \pm 0,2\%$ ; 15‰ e 30‰:  $76 \pm 0,3\%$ ). Em *O. niloticus* ocorreu diminuição do valor de teor hídrico em 30‰, comparado ao controle e a 15‰ (controle:  $77 \pm 0,6\%$ ; 15‰:  $77 \pm 0,9\%$  e 30‰:  $74 \pm 0,3\%$ ) (Fig. 7B).

a  
a  
a  
a  
a  
b  
a  
b

Figura 7: **Teor hídrico muscular** (média±erro padrão) de peixes expostos por 6 horas em água doce e às salinidades de 15‰ e 30‰. (A) Espécies da ordem Siluriformes: *R. quelen* (n=6), *C. gariepinus* (n=6) e *I. punctatus* (n=6-9). (B) Espécies da ordem Perciformes: *G. brasiliensis* (n=4-6) e *O. niloticus* (n=5-6) e da ordem Cypriniformes: *C. carpio* (n=6). Letras diferentes indicam diferenças significativas entre as espécies dentro de uma mesma condição experimental. \* indicam diferença entre o controle e as condições 15‰ e 30‰ para a mesma espécie. # indicam diferenças entre 15‰ e 30‰ para a mesma espécie, sempre com  $P < 0,05$ .



## Atividade de Anidrase Carbônica (AAC)

A AAC branquial foi diferente nas três espécies de Siluriformes, havendo valores semelhantes somente na salinidade 30‰ das espécies *R. quelen* e *I. punctatus*. A atividade branquial de *R. quelen* apresentou elevação em 30‰ ( $10,8 \pm 0,99$  /mg de proteína) quando comparada a atividade dos animais controle ( $7,6 \pm 0,53$  /mg de proteína) e expostos a 15‰ ( $7,7 \pm 0,62$ /mg de proteína). *C. gariepinus* apresentou o mesmo padrão de atividade que *R. quelen*, apresentando elevação da AAC em 30‰ ( $5,5 \pm 0,58$ /mg de proteína) quando comparado ao animais controle ( $2,3 \pm 0,29$ /mg de proteína) e 15‰ ( $3,4 \pm 1,01$ /mg de proteína) *I. punctatus* não apresentou diferença na AAC branquial entre os tratamentos (Fig. 8A).

Para os Perciformes e Cypriniformes, todas as espécies apresentaram AAC branquial diferente na condição controle. *G. brasiliensis* apresentou redução da AAC branquial em 15‰ quando comparado a *C. carpio* e *O. niloticus*, a tilápia *O. niloticus* apresentou redução da AAC branquial em 30‰ quando comparada as demais espécies. A espécie *G. brasiliensis* apresentou aumento na AAC apenas em 30‰, em relação ao controle e a 15‰ (controle:  $3,7 \pm 0,30$ ; 15‰:  $3,6 \pm 0,29$  e 30‰:  $6,5 \pm 0,14$  /mg de proteína). Para *C. carpio*, a AAC em 30‰ foi maior que a AAC branquial dos animais controle (controle:  $5,4 \pm 0,07$ ; 15‰:  $6,0 \pm 0,38$ ; 30‰:  $6,6 \pm 0,29$ /mg de proteína). *O. niloticus* a AAC foi elevada em 15‰ e 30‰, quando comparadas ao controle (controle  $2,5 \pm 0,18$ ; 15‰:  $5,3 \pm 0,28$  e 30‰:  $5,3 \pm 0,50$ /mg de proteína) (Fig. 8B).

A AAC renal de *C. gariepinus* foi reduzida quando comparada as demais espécies de Siluriformes (controle:  $0,3 \pm 0,03$ ; 15‰:  $0,8 \pm 0,10$  e 30‰:  $0,8 \pm 0,08$  /mg de proteínas). *I. punctatus* apresentou elevação da AAC nas salinidade 15‰ e 30‰ em relação as mesmas condições para *R. quelen*. *R. quelen* elevou AAC na salinidade 30‰, quando comparado ao controle e 15‰ (controle:  $3,8 \pm 0,11$ ; 15‰:  $4,1 \pm 0,21$  e 30‰:  $6,5 \pm 0,40$  /mg de proteína). A AAC renal em *C. gariepinus* não sofreu alteração frente ao estresse salino. *I. punctatus* apresentou elevação na AAC em 15‰ e 30‰, quando comparado ao controle (controle:  $4,7 \pm 0,66$ ; 15‰:  $8,8 \pm 0,67$  e 30‰:  $9,1 \pm 0,19$  /mg de proteína) (Fig. 9A).

Em *O. niloticus* a AAC renal foi menor quando comparada a AAC de *C. carpio* em todas as condições experimentais. *C. carpio* não apresentou diferença na atividade da AC entre os tratamentos e *O. niloticus* apresentou atividade elevada apenas na salinidade 30‰ quando comparados ao controle (controle:  $2,1 \pm 0,17$ ; 15‰:  $3,5 \pm 0,37$  30‰:  $4,1 \pm 0,25$ /mg de proteína) (Fig. 9B). Os rins de *G. brasiliensis* não foram analisados devido a impossibilidade de coleta dos mesmos, visto que os exemplares de peixes eram muito pequenos.

a  
a

c  
c  
a

b  
b  
a  
a  
c

b  
b

\* #  
b

\* #  
a

\* #  
a

\*  
a  
\*  
b  
\*  
b

Figura 8: **Atividade da enzima Anidrase Carbônica em Brânquias** (média±erro padrão, AAC/mg de proteína) de peixes expostos por 6 horas em água doce e às salinidades de 15‰ e 30‰. (A) Espécies da ordem Siluriformes: *R. quelen* (n=5-6), *C. gariepinus* (n=6) e *I. punctatus* (n=4-5). (B) Espécies da ordem Perciformes: *G. brasiliensis* (n=4-5) e *O. niloticus* (n=5) e da ordem Cypriniformes: *C. carpio* (n=5). Letras diferentes indicam diferenças significativas entre as espécies dentro de uma mesma condição experimental. \* indicam diferença entre o controle e as condições 15‰ e 30‰ para a mesma espécie. # indicam diferenças entre 15‰ e 30‰ para a mesma espécie, sempre com  $P < 0,05$ .

a  
a  
b  
b  
\*  
b  
a  
a

a  
b  
b  
b  
a  
\*  
c  
\*  
c

\* #  
a

Figura 9: **Atividade da enzima Anidrase Carbônica Renal** (média±erro padrão, AAC/mg de proteína) de peixes expostos por 6 horas em água doce e às salinidades experimentais de 15‰ e 30‰. (A) Espécies da ordem Siluriformes: *R. quelen* (n=8), *C. gariepinus* (n= 5-6) e *I. punctatus* (n=4-5). (B) Espécie da ordem Perciformes: *O. niloticus* (n=5) e da ordem Cypriniformes: *C. carpio* (n=5). Letras diferentes indicam diferenças significativas entre as espécies dentro de uma mesma condição experimental. \* indicam diferença entre o controle e as condições 15‰ e 30‰ para a mesma espécie. # indicam diferenças entre 15‰ e 30‰ para a mesma espécie, sempre com  $P < 0,05$ .

### Atividade de Na,K-ATPase

*C. carpio* apresentou grande variação nos valores da atividade da enzima Na,K-ATPase branquial entre os indivíduos do mesmo grupo experimental, tanto para os animais controle, quanto para os expostos às salinidades de 15‰ e 30‰, não apresentando padrão de alteração frente ao estresse salino (controle: 0,253; 15‰: 1,33 e 30‰: 1,86 mmol ADP/mg proteína/hora).

A atividade da Na,K-ATPase branquial para *O. niloticus* apresentou valores similares após 6 horas de exposição à salinidade de 20 quando comparada ao controle em água doce. Os animais mantidos em água doce apresentaram atividade de  $0,402 \pm 0,13$  mmol ADP/mg proteína/hora e após 6h de exposição às salinidades 20‰ a atividade foi  $0,412 \pm 0,11$  mmol ADP/mg proteína/hora. No rim a atividade da Na,K-ATPase apresentou uma pequena redução nos animais expostos a 20 ( $1,07 \pm 0,30$  mmol ADP/mg) quando comparado aos controles ( $1,85 \pm 0,32$  mmol ADP/mg).

### Proteínas de Estresse Térmico (HSP70)

Para as espécies da ordem Siluriformes, *R. quelen* não apresentou diferença na expressão de HSP70 (controle:  $18,3 \pm 0,99$ ; 15‰:  $31,2 \pm 2,70$  e 30‰:  $33,1 \pm 3,09$  unidade arbitrária) quando comparada a *C. gariepinus* (controle:  $18,9 \pm 1,92$ ; 15‰:  $31,8 \pm 5,20$  e 30‰:  $35,5 \pm 2,15$  unidade arbitrária). Ambas as espécies apresentaram aumento significativo da expressão de HSP70 nas salinidades 15‰ e 30‰ quando comparadas ao controle em água doce. *I. punctatus* apresentou a expressão de HSP70 mais elevada dentre os Siluriformes em todas as condições experimentais (controle:  $40,6 \pm 2,17$ ; 15‰:  $48,6 \pm 5,67$  e 30‰:  $49,3 \pm 2,92$  unidade arbitrária), e esta foi mantida constante frente a elevação da salinidade (Fig. 10A).

Nas espécies das ordens Perciformes e Cypriniformes, *G. brasiliensis* apresentou valores menores de expressão da proteína de estresse térmico nos animais controle ( $22,5 \pm 5,08$  unidade arbitrária) e nos animais expostos a 30‰ ( $27,8 \pm 0,62$  unidade arbitrária) quando comparado a *C. carpio* e *O. niloticus*. *G. brasiliensis* expostos a 15‰ ( $32,0 \pm 1,33$  unidade arbitrária) apresentaram elevação da expressão de HSP70 quando comparados ao controle e aos animais expostos a 30‰. *C. carpio* (controle:  $42,6 \pm 1,98$ ; 15‰:  $40,6 \pm 3,02$  e 30‰:  $38,7 \pm 2,83$  unidade arbitrária) e *O. niloticus* (controle:  $44,6 \pm 1,79$ ; 15‰:  $50,4 \pm 2,15$  e 30‰:  $46,8 \pm 1,43$  unidade arbitrária) não apresentaram alteração da expressão de HSP70 frente a elevação da salinidade; comparando as duas espécies apenas a salinidade 15‰ foi diferente entre elas (Fig. 10B).

a  
b  
a  
\*  
a  
b  
b  
a  
b  
b  
a  
b  
a  
\*  
a  
\*  
a  
\*  
a  
\*  
a  
b  
b

Figura 10: **Expressão de HSP70** (média±erro padrão, unidade arbitrária) em músculos de peixes expostos por 6 horas ao controle em água doce e às salinidades de 15‰ e 30‰. (A) Espécies da ordem Siluriformes: *R. quelen* (n=5), *C. gariepinus* (n= 5-6) e *I. punctatus* (n=4-5). (B) Espécies da ordem Perciformes *G. brasiliensis* (n=4-5) e *O. niloticus* (n=4-5) e da ordem Cypriniformes *C. carpio* (n=5). Letras diferentes indicam diferenças significativas entre as espécies dentro de uma mesma condição experimental. \* indicam diferença entre o controle e as condições 15‰ e 30‰ para a mesma espécie, sempre com  $P < 0,05$ .

Experimentos *in vitro* foram realizados para determinar a capacidade de manutenção da concentração da água tecidual. Fragmentos de músculo de *R. quelen*, *O. niloticus* e *I. punctatus* mantidos em água doce foram submetidos à solução hiper-osmótica, hipo-osmótica e isosmóticas (solução controle com a mesma concentração que o sangue dos animais). *R. quelen* e *O. niloticus* apresentaram regulação da concentração da água do músculo tanto na solução hiper- quanto na solução hipo-osmótica quando comparado ao controle isosmótico. *I. punctatus* apresentou ganho de água nos fragmentos de músculo submetidos a solução hipo-osmótica (Fig.11).

**Figura 11:** Alteração no peso úmido do músculo em *R. quelen* (n=8), *I. punctatus* (n=8) e *O. niloticus* (n=8). Fragmentos do músculo de todos os exemplares foram incubados na solução controle (iso-osmótica) (-○-,

azul), ou experimental hipo-osmótica (-□-, verde) ou hiper-osmótica (-△-, vermelho). \*indica diferença significativa ( $P < 0,05$ ) entre os valores na salina experimental e controle no mesmo tempo de exposição (Teste T de Student).

#### Experimentos de Temperatura

A temperatura crítica máxima determinada para *R. quelen* aclimatado a 20 °C foi 31 °C indicando que essa espécie é sensível a elevação da temperatura do ambiente.

As temperaturas críticas máximas de *Corydoras ehrhardti* e *Scleromystax barbatus* (Fig. 12) foram determinadas utilizando indivíduos adultos aclimatados em grupos de temperatura de 20, 25 e 30°C. Para cada temperatura de aclimação as temperaturas críticas máximas foram  $35,3 \pm 0,17$ ;  $37,02 \pm 0,1$  e  $37,67 \pm 0,04$  °C para *C. ehrhardti* e  $34,24 \pm 0,09$ ;  $34,63 \pm 0,11$  e  $35,2 \pm 0,12$  °C para *S. barbatus*. Ambas as espécies são provenientes da Floresta Atlântica, mas cada uma delas tem seu microclima específico. O *C. ehrhardti* é proveniente da vertente ocidental da serra do mar com uma maior variação sazonal de temperatura se comparada ao *S. barbatus* proveniente da vertente oriental da serra do mar e com um ambiente termicamente mais estável. Esta amplitude de variação térmica do ambiente faz com que indivíduos tenham um gasto maior de energia em mecanismos contra o estresse térmico, explicando o motivo de *C. ehrhardti* apresentar maior temperatura crítica máxima se comparado a *S. barbatus*.

Figura 12: Temperatura crítica máxima (°C) para *Corydoras ehrhardti* (CE, losangos azuis) e *Scleromystax barbatus* (SB, quadrados rosas). Retas representam a regressão linear entre as médias de temperatura crítica máxima (°C) e as temperaturas de aclimação (°C) (CE,  $r^2 = 0,9364$ ; SB,  $r^2 = 0,9884$ ). Asterisco (\*) indica diferença estatística entre as espécies na mesma temperatura de aclimação, e as letras diferentes indicam diferença para cada espécie entre as temperaturas de aclimação.

As espécies estudadas (tanto as invasoras quanto as nativas), com exceção da tilápia *O. niloticus* e do *G. brasiliensis*, apresentaram baixo grau de eurihalidade após exposição por 6 horas a salinidade de 15‰, não suportando exposição a 30‰ por períodos superiores a 3 horas. A elevação de salinidade demonstrou-se osmoticamente impactante, havendo uma perda na capacidade de manutenção da homeostase dos indivíduos, culminando na morte da maioria das espécies. As diferenças na ativação dos mecanismos de resposta podem ser explicadas pela ação espécie-específica de defesa frente ao fator estressante (Willmer et al. 2005).

Neste trabalho foi possível observar que os indivíduos de *R. quelen* conseguiram manter a osmolalidade e a atividade da anidrase carbônica constantes em 15‰, porém houve uma perda de água no músculo e aumento na expressão de HSP70 na mesma salinidade, significando que salinidades iguais ou superiores a 15‰, como aconteceu em 30‰ (sobreviveram apenas ~1,5 horas) afetam sua capacidade osmorregulatória e podem ser letais. Estudos já demonstraram certo grau de eurihalidade em *R. quelen* nas salinidades de 5‰ e 15‰, reforçando que há perda da capacidade de manutenção da homeostase em salinidades de 25‰, corroborando registros de ocorrência esporádica da espécie em regiões estuarinas (Marchioro e Baldisserotto 1999; Souza-Bastos e Freire 2009). Espécies do gênero *Rhamdia* também ocorrem em habitats estuarinos (Loebmann e Vieira 2006; Milani e Fontoura 2007; Vargas e Bessonart 2007; Vitule 2007), o que salienta a plasticidade do grupo e corrobora com a idéia de possível invasão de novos ambientes em água salobras.

*C. gariepinus* da mesma forma que *R. quelen* sofreram aumento na osmolalidade já em 15‰, porém o teor hídrico muscular manteve-se constante na mesma salinidade. A expressão de HSP70 aumentou significativamente apenas em 30‰ (sobreviveram ~3 horas) , e a AAC foi bastante baixa comparada às demais espécies, mas não foram respostas suficientes para evitar a perda da capacidade osmorregulatória com o aumento na salinidade.

Como demonstrado na literatura, a tolerância salina de *I. punctatus* seria de até 15‰ (Allen e Avault 1971; Stickney e Simco 1971; Perry 1973), e apesar dos indivíduos da espécie apresentarem altos níveis de expressão de HSP70 e as maiores AAC neste trabalho, mesmo em salinidade 15‰ eles sofreram perda da capacidade osmorregulatória tanto no meio intra quanto no extracelular portanto essas respostas fisiológicas não foram suficientemente alta para evitar que a regulação osmótica fosse alterada em salinidades maiores que a natural.

Corroborando dados anteriores para a espécie, *G. brasiliensis* apresentou resistência à salinidade de 15‰, mantendo sua capacidade osmorregulatória (Freire et al. 2008), auxiliada possivelmente pelo aumento encontrado na expressão de HSP70 nessa salinidade. Porém em 30‰ houve diminuição no teor hídrico muscular, demonstrando uma perda de regulação osmótica, e conseqüentemente, perda da homeostase.

*O. niloticus* também apresentou capacidade osmorregulatória em 15‰, mantendo os níveis de HSP70 constantes, à AAC branquial elevada, porém, em 30‰ tanto a osmolalidade quanto o teor hídrico muscular sofreram alterações, e mesmo com a AAC branquial e renal elevadas, não conseguiu manter a regulação osmótica. Mesmo com estudos demonstrando que esta espécie é resistente à salinidade superior a 30‰ (Popper e Lichatowich 1975; Villegas 1990; Kamal 2005), foi possível identificar alterações fisiológicas que levaram a perda da homeostase e, mesmo havendo sobrevivência dos indivíduos nessa salinidade, sua dispersão por estuários poderia acontecer em água com salinidades próximas a 15‰, ao passo que em 30‰ o custo fisiológico e energético seria alto e limitante.

Para a *C. carpio* a literatura também aponta que a espécie é resistente a salinidades de até 15‰ (Crivelli 1981; Wang et al. 1997; De Boeck 2000; Cardona et al. 2008), como corroborado no presente trabalho, onde os indivíduos conseguiram manter a osmolalidade na mesma salinidade, sem apresentar alteração na expressão de HSP70 e na AAC branquial e renal. Porém em 30‰, com níveis de AAC branquial altos, houve diminuição da osmolalidade, e conseqüentemente, da capacidade de regulação osmótica.

O sucesso para ocupação de novos ambientes pelas espécies está ligado às características da história de vida do animal e à pré-adaptações ligadas a questões fisiológicas e evolutivas (Shea e Chesson 2002; Schofield e Nico 2009). Espécies geralmente consideradas como de água doce, podem na verdade tolerar variações de salinidade, possuindo uma plasticidade fisiológica ainda não estudada, podendo utilizar estuários tanto para alimentação, quanto para dispersão (Brown et al. 2001, 2007). Essa idéia, da ocupação de novos corpos d'água por estuários e águas costeiras, entretanto, é raramente considerada (Brown et al. 2001; Bringolf et al. 2005), pois esses ambientes são geralmente taxados como barreiras para dispersão (Brown et al. 2007).

Estuários são ambientes instáveis e, conseqüentemente, muito estressantes, mas espécies introduzidas geralmente conseguem se estabelecer e prevalecer em ambientes com tais características por serem mais resistentes a variações ambientais (Elliott e Quintino 2007).



Quando há variações na salinidade da água, como ocorre em regiões estuarinas, espécies estenohalinas tem pouca chance de sobrevivência, logo provavelmente acabam mudando para locais com condições mais favoráveis (Ubeda et al. 2009). Porém, espécies eurihalinas possuem grande potencial de dispersão por esses ambientes devido a sua plasticidade fisiológica que lhes garante suportar variações de salinidade sem alteração drástica em seus processos vitais (Bringolf et al. 2005; Brown et al. 2007; Rahel 2007; Rahel e Olden 2008).

Os resultados demonstram que as espécies dulcícolas estudadas possuem capacidade de ativação de mecanismos de resposta fisiológica frente a um estresse salino de até 15‰, que pode ser suficiente para dispersão por estuários. Essa capacidade fisiológica que garante vantagens na distribuição por novos ambientes foi demonstrada tanto para as espécies invasoras, quanto para as espécies nativas, sugerindo que o período de 6 horas seria suficiente para que os indivíduos alcançassem novos corpos d'água próximos aos de origem utilizando os estuários como pontes. A invasão de novos ambientes utilizando locais com salinidade de 30‰ ou superior, seria bastante custosa fisiológica e energeticamente, e possivelmente letal para essas espécies.

Devido à falta de estudos que avaliam os efeitos fisiológicos de parâmetros abióticos nas espécies estudadas, reforça-se a necessidade de pesquisas complementares, afinal trata-se de espécies invasoras, sendo assim, a possibilidade de apresentar plasticidade fisiológica a muitos parâmetros provavelmente é elevada (Espínola e Julio 2007; Savini 2010). Levando em considerações os dados fisiológicos de resposta à alteração salina encontrados nesse trabalho, e possíveis estudos complementares que testem outras variáveis ambientais, tais como pH, temperatura e oxigênio, é possível extrapolar os resultados e considerar que essas espécies, de fato, podem sim utilizar estuários como pontes de dispersão e acentuar a problemática das invasões biológicas.

## 2 CONCLUSÕES DO PROJETO

Não houve grandes diferenças de resposta fisiológica entre espécies nativas e invasoras. As espécies nativas *R. quelen* e *G. brasiliensis* e a invasora *C. gariepinus* tenderam a aumentar a expressão HSP70 com o aumento da salinidade. Em geral, não houve um padrão na expressão de HSP70 entre as espécies estudadas, inferindo que a resposta é espécie-específica, podendo variar de acordo com a intensidade e duração do estresse e com o tipo de tecido.

A anidrase carbônica apresentou um padrão de aumento da atividade branquial e renal decorrente do aumento na salinidade, mas algumas espécies (brânquia de *I. punctatus* e rim de *C. gariepinus* e *C. carpio*) mantiveram a atividade constante apesar da variação salina. A atividade da anidrase carbônica pode ter aumentado tanto em resposta ao aumento de salinidade, quanto para suprir a função de equilíbrio ácido-básico, não sendo possível afirmar a exclusividade na resposta osmorregulatória. A Na,K-ATPase não apresentou padrão de atividade relacionado com estresse salino nas espécies estudadas. A osmolalidade e íons plasmáticos e o teor hídrico muscular apresentaram um padrão de variação inversamente proporcional entre eles na maioria das espécies. Conclui-se que as espécies perderam a capacidade regulatória do meio intra e extracelular frente ao aumento na salinidade.

Os resultados indicaram que as espécies classificadas como de água doce, possuem tolerância a variações salinas, e podem utilizar estuários com salinidades de até 15‰ como pontes de dispersão para outros corpos d'água continentais. Além disso, reforça-se que as espécies estudadas tanto nativas quanto invasoras possuem resistência fisiológica ao estresse salino, revelando certo grau de eurihalidade.

#### EQUIPE TÉCNICA

<b>Nome</b>	<b>Instituição</b>	<b>Nº Matrícula SIAPE (para servidor UFPR)</b>	<b>Função no Projeto</b>	<b>Carga horária /mês dedicada ao projeto</b>
Viviane Prodocimo	UFPR	2581197	Coordenador	30 h/mês
Carolina Arruda de Oliveira Freire	UFPR	1203252	Colaboradora	10 h/mês
Jean Ricardo Simões Vitule	UFPR		Colaborador	20h/ mês
Silvia Maria Millan Gutierre	UFPR		Aluna de Mestrado PPGECO	Dedicação exclusiva ao projeto
Ligia Strey	UFPR		Aluna de Iniciação científica	30h/mês
Vinicius Abilhoa	MHNCI		Colaboardor	10/mês