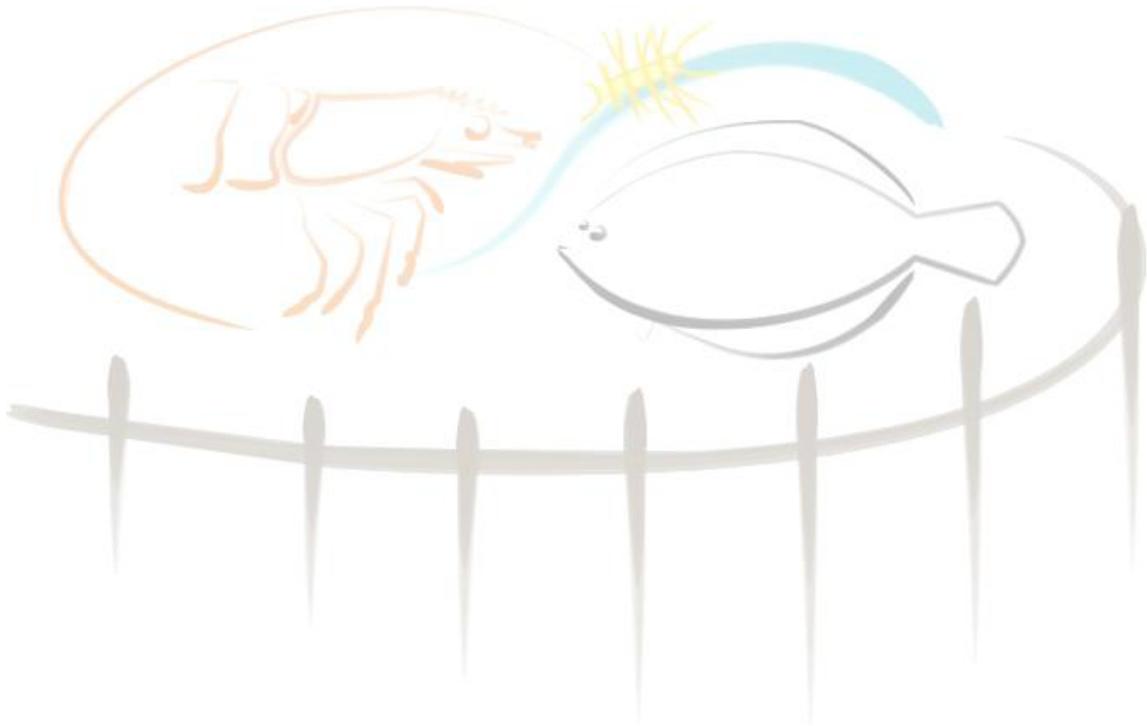


UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE – FURG
INSTITUTO DE OCEANOGRAFIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA



**EFEITO DA ALCALINIDADE DA ÁGUA SOBRE A
TOLERÂNCIA DE JUVENIS DO PAMPO *Trachinotus
marginatus* AO AMBIENTE HIPOOSMÓTICO.**

Paula Martins Beck

Rio Grande, 2012

Universidade Federal do Rio Grande – FURG
Instituto de Oceanografia

**Efeito da alcalinidade da água sobre a tolerância de juvenis do pampo
trachinotus marginatus ao ambiente hiposmótico.**

Aluna: Paula Martins Beck
Orientador: Prof. Dr. Luis André Nassr de Sampaio

Dissertação apresentada
como parte dos requisitos para
obtenção do grau de mestre em
Aqüicultura no Programa de Pós
Graduação em Aqüicultura da
Universidade Federal do Rio Grande - FURG

Rio Grande, RS
Dezembro de 2012.

ÍNDICE

Agradecimentos	
Resumo	i
Abstract	ii
Introdução	1
Objetivos	6
Material e Métodos	7
Resultados	11
Discussão	15
Conclusão	17
Referências Bibliográficas	18

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer ao Dr. Sampaio, meu orientador durante o meu tempo de estudos na Estação Marinha de Aquicultura, onde sempre esteve disposto a passar seus conhecimentos me ajudando a fazer o presente trabalho.

Também gostaria de agradecer ao professor Dr. Romano, Msc. Marta do Laboratório de Imunologia e Patologia de Organismos Aquáticos da FURG por dedicarem do seu tempo a me ensinar a realizar uma parte das minhas análises.

Ao MSc Ricardo Vieira Rodrigues e Dr. Marcelo Okamoto pelas ajudas durante o experimento e por me orientarem a compreender todo o âmbito da piscicultura marinha.

Em especial a Dra Marianna Basso Jorge, por meses e meses de dedicação, discussão, orientação e companheirismo neste trabalho e em outras empreitadas. Sua disposição foi crucial para a conclusão deste trabalho.

Aos meus pais, minha irmã e meus amigos queridos de Floripa que ficaram esses longos dois anos longe e que me mandaram energias boas e força para eu enfrentar todos os desafios.

As agências de fomento CNPq, CAPES, MPA e FAPERGS pelo financiamento do meu trabalho e da minha bolsa de estudos.

E principalmente a Estação Marinha de Aquicultura e seus colaboradores por me acolherem, pela amizade e companheirismo durante esses anos. Parabéns pelo grande trabalho que vocês realizam, tornando a EMA uma estação de alta tecnologia e de grandes publicações científicas.

André Colferai, sua força, determinação e carinho me ajudaram muito para a conclusão deste trabalho. Obrigada por ser tão companheiro e compreensivo comigo.

RESUMO

O objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito da redução da salinidade com e sem reposição da alcalinidade sobre a sobrevivência, a atividade das enzimas Na^+ K^+ ATPase (NKA) e anidrase carbônica e histopatologia branquial em juvenis do pampo *Trachinotus marginatus*. Os peixes do controle foram mantidos na salinidade 34‰, enquanto outros dois grupos de peixes (todos com quatro repetições) tiveram sua salinidade reduzida diariamente com ou sem reposição da alcalinidade até a salinidade atingir 0‰ (34 - 22 - 12 - 5 - 2,5 - 1 - 0‰). Os animais que não tiveram reposição da alcalinidade começaram a morrer a partir do 4º dia, quando a salinidade atingiu 5‰, enquanto nos pampos em que houve reposição da alcalinidade começaram a morrer a partir do 6º dia, na salinidade 1‰. O tempo letal médio foi de 5,3 e 6,5 dias, respectivamente para os peixes sem e com reposição da alcalinidade. Foi observada hiperplasia do epitélio branquial e hipertrofia e hiperplasia das células de cloreto após a redução da salinidade. A quantidade de células de cloreto nos peixes do controle foi menor que dos tratamentos com e sem reposição de alcalinidade em ambiente hiposmótico. Já para as enzimas analisadas, a atividade da NKA foi aumentada quando houve redução da salinidade para 2,5‰, sendo maior no tratamento sem reposição da alcalinidade. Também houve aumento da atividade da anidrase carbônica, quando houve redução da salinidade para 2,5‰, mas sem diferença em função da alcalinidade. Os resultados desse estudo mostram que a reposição da alcalinidade aumenta a tolerância do pampo à baixa salinidade.

ABSTRACT

The aim of the present work is to evaluate the effect of salinity reduction with and without alkalinity reposition within the survival, $\text{Na}^+ \text{K}^+ \text{ATPase}$ (NKA) and carbonic anhydrase enzyme activity, and gills histopathology in juveniles of pompano *Trachinotus marginatus*. Fishes of the control were maintained in salinity 34‰, while other two groups of fishes (all with four repetitions) had their salinity daily reduced with and without alkalinity reposition until salinity reached 0‰ (34 - 22 - 12 - 5 - 2,5 - 1 - 0‰). Animals with no alkalinity reposition began to die in the fourth day, when salinity was 5‰, while mortality for those fish with alkalinity reposition only began in the sixth day, when salinity was 1 ‰. The medium lethal time was of 5,3 days and 6,5 days, respectively for fishes without and with alkalinity reposition. It was observed hyperplasia of the branchial epithelium and hypertrophy and hyperplasia of the chloride cells after the salinity reduction. The number of chloride cells of the control treatment was smaller than others treatments with and without reposition in hiposmotic environment. Activity of NKA was greater when salinity was reduced to 2.5‰, and it was even higher in the treatment without alkalinity reposition. It was also seen higher activity of the carbonic anhydrase when salinity was reduced, but no difference was observed in regard to alkalinity. The results of this study show that alkalinity reposition increases the tolerance of juvenile pompano to low salinity.

INTRODUÇÃO

O pampo *Trachinotus marginatus* é encontrado ao longo da costa atlântica e em estuários, desde o Rio de Janeiro (Brasil) até o Uruguai (Menezes e Figueiredo, 1980). Essa espécie é considerada eurialina, tolerando uma faixa ampla de salinidade que vai de 7 a 58‰, após a exposição aguda dos indivíduos aclimatados à água do mar (35‰) para salinidades mais baixas ou altas respectivamente (Sampaio et al., 2003).

Wu e Woo (1983) consideram os estuários como locais apropriados para a aquicultura pois podem apresentar ambientes mais fechados e protegidos, porém a variação nas condições de salinidade enfrentadas pelos animais que habitam esse ambiente pode lhes impor um estresse iônico e osmótico. Os estuários podem ser usados para piscicultura em tanque-rede, ou para a instalação de viveiros em suas margens. Além disso, o estabelecimento de instalações de maricultura em sistemas de recirculação de água pode permitir a criação de peixes marinhos em terras mais afastadas do litoral, normalmente com menor custo do que aquelas junto ao litoral (Brown, 2007).

Em 2011 a produção mundial de peixes marinhos e diádromos aumentou (19,3 milhões de toneladas) em comparação a 2000 que foi de 2,9 milhões de toneladas. (FAO 2012), isto aconteceu devido ao aumento de tecnologia e ao alto valor de mercado nos peixes marinhos e diádromos.

As espécies do gênero *Trachinotus* são consideradas de importância econômica (Cavalin & Weirich, 2009). Na América do Norte, o pampo da Flórida *Trachinotus carolinus* é muito apreciado e sua carne é considerada de boa qualidade (Williams et al 1985). Devido a sua boa adaptação a cultivos intensivos, aceitação de rações formuladas, crescimento relativamente rápido e do bom valor de mercado, ele vem sendo considerado para aquicultura (Williams et al 1985). Outras espécies de pampo, *Trachinotus goodei* e *Trachinotus falcatus* também estão sendo avaliadas para aquicultura (Cole et al 1997; Lazo et al 1998).

Salim (2011) em testes em laboratório com águas de diferentes salinidades, constatou que esta espécie, apesar de sofrer alterações significativas na fisiologia, demonstrou um bom crescimento em baixas salinidades, o que sugere a viabilidade de criação do pampo em águas estuarinas.

A salinidade, entre outros parâmetros abióticos, afeta diretamente as funções fisiológicas dos organismos aquáticos, principalmente em ambientes estuarinos e costeiros, onde sua variação é maior do que em alto mar. Esse fator pode influenciar no crescimento e sobrevivência dos peixes (Boeuf & Payan, 2001; Sampaio & Bianchini, 2002). Para manter seu equilíbrio interno, os peixes fazem a osmorregulação que consiste em uma compensação regulatória que permite ajuste de variáveis osmóticas e iônicas (Evans, 2010; Schmidt-Nielsen, 2002).

Os principais órgãos envolvidos na osmorregulação são as brânquias, rim e intestino (Evans, 2008). A osmorregulação é diferente para peixes de água doce e para peixes marinhos. Os peixes de água doce são hiperosmóticos em relação ao meio, isto é, sua concentração osmótica interna é maior do que a concentração osmótica da água onde está imerso. Por isso, eles enfrentam um ganho passivo de água pelas brânquias e perda de NaCl por difusão através do tecido branquial. Este ganho de água é compensado pela excreção de grandes volumes de urina diluída e captura ativa de NaCl através das brânquias. Para os peixes marinhos ocorre diferente, pois eles são hiposmóticos em relação à água marinha. Seus fluidos internos têm concentração osmótica menor do que a da água marinha. Portanto, ele perde água para o meio. Os mecanismos de compensação incluem ingestão de água salgada, absorção intestinal de água, Na^+ e Cl^- , excreção de pequenos volumes de urina isotônica (depois da reabsorção glomerular nos rins de água, Na^+ e Cl^- e secreção ativa de NaCl pelo epitélio das brânquias (Evans 2008; Hwang & Lee, 2007).

Durante o cultivo, os peixes incorporam CO_2 na água através da respiração e sua remoção é feita pela fotossíntese do plâncton, quando estes estão presentes. Estas ações fazem com que o pH varie ao longo do dia (Boyd, 1995). Em sistemas de recirculação de água, atenção deve ser dada a reposição da alcalinidade pois as bactérias nitrificantes consomem a alcalinidade, aumentando assim a concentração de CO_2 dissolvido, fazendo com que o pH diminua (Loyless & Malone, 1997). O pH é um parâmetro muito importante a ser considerado em aquicultura, já que afeta o metabolismo e processos fisiológicos de peixes, camarões e todos os organismos aquáticos. Portanto, a prática de correção do pH na aquicultura através da adição de cal, tanto na água quanto no fundo do viveiro é conhecido como calagem, aumentando a alcalinidade da água (Arana, 2002). Os efeitos benéficos da calagem são, entre outros, a incrementação do pH e da alcalinidade de águas ácidas para níveis desejáveis, estabelecendo uma reserva alcalina no sistema tampão do pH e também serve como um

desinfetante, ajudando a eliminar parasitas de peixes e seus hospedeiros intermediários (Tacon, 1989). Em geral, três produtos são utilizados para a calagem dos viveiros de cultivo: calcário pulverizado (pouco reativo), cal virgem e cal hidratada (bastante reativos). Os depósitos naturais de calcário são compostos puramente de carbonato de cálcio ou de uma mistura de carbonato de cálcio e de magnésio (Arana, 2010). Em viveiros inundados com águas marinhas ou salobras, por apresentarem elevada dureza, com o tempo passam a não precisar de produtos de correção, pois os carbonatos (CO_3^{2-}) e bicarbonatos (HCO_3^-) presentes na água marinha irão neutralizar os ácidos produzidos pelo alumínio e ferro do solo (Boyd, 1995).

A alcalinidade é mensurada pela quantidade de ácido (ion hidrogênio) que a água consegue absorver (capacidade tampão) antes de alcançar um determinado pH (Wurts, 1992). Esta capacidade tampão funciona através da disponibilização de, principalmente, íons carbonatos e bicarbonatos para que o pH não varie (Sawyer e McCarty 1978, Wurts & Durborow 1992). Os bicarbonatos (HCO_3^-) representam a maior parte da alcalinidade, já que estes são formados em quantidades consideráveis pela ação do dióxido de carbono (CO_2) com materiais básicos presentes no solo. Se a concentração dos íons de hidrogênio aumenta, este irá reagir com o bicarbonato para formar CO_2 e água; sendo assim, o equilíbrio é mantido e o pH varia apenas ligeiramente (Arana, 2002). Wurts & Durborow (1992) sugerem que uma alcalinidade total de 20 mg CaCO_3/L ou mais é necessário para uma boa produtividade do viveiro e sugere que é desejável para a criação de peixes a alcalinidade total entre 75 a 200 mg CaCO_3/L .

O sistema tampão de neutralização do pH não acontece somente no ambiente aquático. Acontecem também nos fluidos internos dos seres vivos, pelo fato de serem líquidos e se comportarem como soluções, a tendência natural da mudança do equilíbrio ácido-base tem que ser contra-balanceada por efetivos mecanismos tampão. Quase todas as reações químicas dos seres vivos ocorrem com pH compreendido entre 6 e 8. O sangue dos organismos aquáticos, assim como dos terrestres, mantém-se a um pH quase constante (7,4), apesar de transportar uma série de substâncias ácidas e básicas. O pH atua diretamente nos processos de permeabilidade da membrana celular dos organismos integrantes, interferindo, então, no transporte iônico intra e extracelular, bem como entre os organismos e o meio (Arana, 1999).

Uma das enzimas responsáveis pela excreção do CO_2 , balanço ácido-base e transporte iônico em nível celular e de tecidos é a anidrase carbônica (AC) pois a sua

maior atividade é catalizar as reações do dióxido de carbono (CO₂) com a água mobilizando-os para bicarbonatos e carbonatos. Ela é uma das enzimas mais comuns nos organismos vivos (Burnett et al. 1985). A sua reação catalítica pode ser descrita através da equação a seguir:



Henry (1996) sugere que a anidrase carbônica atua em diversos processos fisiológicos como respiração, balanço ácido-base, fixação do carbono, formação de CaCO₃, transporte iônico e regulação iônica e troca intracelular de Na⁺/H⁺, Cl⁻/HCO₃⁻.

A regulação ácido-base em vertebrados, incluindo peixes, é ligada a excreção de carbono através das reações reversíveis de hidratação e desidratação do CO₂ e dos equivalentes ácido-base H⁺ e HCO₃⁻. Contudo, em peixes, a regulação ácido-base é também ligada a regulação iônica, pois essa compensação se baseia na transferência direta de H⁺ e HCO₃⁻ através das brânquias em troca pelo Na⁺ e Cl⁻, respectivamente. A regulação do movimento de NaCl através das brânquias é a principal reação para a manutenção do equilíbrio iônico e do balanço osmótico nos peixes. E a participante principal nestes processos é a anidrase carbônica (Gilmour & Perry, 2009).

É nas células de cloreto (CC) localizadas nos filamentos branquiais e na membrana opercular que está localizada a enzima Na⁺ K⁺ ATPase (NKA), que é responsável pelo transporte ativo de Na⁺ para fora e K⁺ para dentro das células (Baldisserotto, 2009). A NKA não é importante somente por manter a homeostase intracelular, mas por prover uma força motriz para vários sistemas de transportes nas brânquias (Hwang & Lee 2007). O modelo atual propõe que a extrusão de NaCl é mediado pelo cotransporte basolateral de NaCl provido por um gradiente eletroquímico gerado pela NKA, juntamente com a saída apical de Cl⁻ através de canais e a extrusão paracelular de Na⁺, ambos operados por seus respectivos gradientes eletroquímicos. Estes transportadores são além da NKA, a Na⁺/K⁺/2Cl⁻ (NKCC) e o fator transmembrana regulador da condutância da fibrose cística (CFTR) onde ambos estão ligados a secreção de Cl⁻, sendo o NKCC localizado na porção basolateral das CC e o CFTR mais abundante na porção apical das CC (Evans et al 2005, Hwang & Lee, 2007).

Teleósteos expostos a águas com salinidades próximas ao seu ponto isosmótico apresentam uma redução na atividade da NKA, exatamente por haver uma menor variação na concentração de íons entre aquelas águas e o plasma (Imsland et al. 2003). Alguns estudos com teleósteos mostram que a atividade da NKA pode variar em relação

a salinidade e ao gradiente de variação da salinidade (Amaral et al., 2001; Hiroi & McCormick, 2007; McCormick et al., 2009). Geralmente é observado um aumento na atividade da NKA em salinidades distantes do ponto isosmótico (McCormick et al., 2009). Estas mudanças podem ser atribuídas a maior dificuldade na manutenção da composição iônica do plasma sanguíneo causado pela mudança na salinidade do ambiente (Plaut, 1998).

O aumento na atividade da enzima NKA, causado pela variação de salinidade, pode refletir num maior gasto energético para osmorregulação (Morgan & Iwama, 1998; Lundgreen et al., 2008; Tseng & Hwang, 2008). Swanson (1998) observou um aumento significativo no custo metabólico para osmorregulação de juvenis de *Chanos chanos*, conforme elevação da salinidade. Contudo, Boeuf & Payan (2001) mostram que o custo metabólico para osmorregulação pode ser de apenas 10% do rendimento metabólico para teleósteos de água salgada.

Com base nas diferenças morfológicas e de localidade das CC, a literatura tem proposto que os teleósteos possuem dois subtipos celulares (α e β) e, provavelmente, a funcionalidade desses subtipos também possa diferir (Pisam et al. 1995; Uchida e Kaneko, 1996). As CC α são localizadas predominantemente na base da lamela branquial e são precursoras das CC em teleósteos adaptados à água marinha. Já as CC β são primariamente localizadas nos filamentos branquiais, na região inter-lamelar, e ocorrem somente em teleósteos que habitam águas doces. A membrana apical das células tipo α apresenta muitas dobras e projeções, enquanto que nas células tipo β a membrana apical é lisa (Perry 1997). Mudanças de salinidade afetam também a morfologia e a abundância das células de cloreto nos peixes (Fielder et al., 2007).

O tecido branquial é o principal prejudicado pela acidez do meio. Quando os peixes são expostos a baixos teores de pH, a quantidade de muco da superfície branquial se incrementa. O excesso de muco interfere no intercâmbio gasoso e iônico, que se realiza através das brânquias. Dessa forma, um desequilíbrio do balanço ácido-básico sanguíneo resulta em estresse respiratório e diminuição da concentração do cloreto de sódio plasmático, fato que provoca um sério distúrbio osmótico (Boyd, 1990).

Para entender melhor o efeito da correção da alcalinidade em ambiente hiposmótico sobre os juvenis de pampas, submetidos a redução gradual da salinidade para verificar eventuais diferenças na sobrevivência e nas vias de osmorregulação.

OBJETIVO GERAL

Entender a influência da alcalinidade e da exposição à salinidades reduzidas na sobrevivência e no comportamento iono-osmorregulatório de juvenis de pampo.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a sobrevivência em ambiente hipoosmótico em função da correção ou não da alcalinidade através da adição de bicarbonato de sódio;
- Determinar a influência da salinidade e da alcalinidade sobre a atividade da enzima NKA e anidrase carbônica nas brânquias de juvenis de pampo;
- Descrever as alterações morfológicas nas brânquias de pampo em ambiente hipoosmótico.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta dos peixes e sua manutenção em laboratório.

Juvenis de pampos (peso médio: $2,9 \pm 0,2$ g e comprimento médio: $6,2 \pm 0,2$ cm) foram coletados com rede de arrasto na Praia do Cassino ($32^{\circ}12'25''$ S $52^{\circ}10'31''$ O - Rio Grande, RS) e imediatamente levados para o Laboratório de Piscicultura Estuarina e Marinha da FURG. Os peixes foram aclimatados ao laboratório durante cinco dias em tanques de fibra (300L), com aeração constante, na densidade de 100 peixes por tanque. A salinidade foi mantida em 34‰ e a temperatura média de 22°C. Os peixes foram alimentados uma vez por dia com ração comercial (INVE NRD 5/8) até a saciedade aparente.

Exposição dos peixes à baixa salinidade e correção da alcalinidade

Os peixes foram transferidos para unidades experimentais com 3 L, mantidas em um banho termostaticado para manutenção da mesma temperatura em todas as unidades experimentais. A mortalidade foi avaliada diariamente.

Os animais foram submetidos à três tratamentos:

1 - controle, salinidade 34‰ (TCC);

2 - redução gradual da salinidade e manutenção da alcalinidade com adição de bicarbonato de sódio (TC);

3 - redução gradual da salinidade sem controle da alcalinidade, sem adição de bicarbonato de sódio (TS).

A salinidade inicial foi de 34‰ e diariamente ela foi reduzida para 22, 12, 5, 2,5, 1 e 0‰, através da diluição da água marinha com água doce decolorada. Cada tratamento, foi realizado com 4 repetições e cada unidade experimental tinha 10 peixes. No controle os peixes foram mantidos constantemente na salinidade 34‰, porém sofreram o mesmo manejo de troca de água dos outros tratamentos. A densidade de estocagem foi de 3 g/L para todos os tratamentos.

Os animais foram mortos em banho de benzocaína (500ppm) e imediante as brânquias do lado esquerdo de três de cada unidade experimental (n=9 para cada tratamento) foram dissecadas e diretamente armazenadas em nitrogênio líquido.

Parâmetros físicos e químicos da água

Os parâmetros físicos e químicos da qualidade de água de cada tratamento foram aferidos diariamente pela manhã. A salinidade de cada tanque foi medida uma vez ao dia com um refratômetro portátil, a concentração de oxigênio dissolvido e a temperatura foram medidos com auxílio de um oxímetro digital (YSI), o pH com um pHmetro de mesa (HANNA), a concentração de amônia total ($N - NH_3 + NH_4^+$) foram determinadas pelo método espectrofotométrico UNESCO (1983) e a alcalinidade foi determinada através do método titrimétrico APHA (1989). A diluição da água e a adição de bicarbonato de sódio ($NaHCO_3$) foram feitas no dia anterior ao seu uso, para permitir a estabilidade dos parâmetros desejados.

Análise da atividade da enzima $Na^+K^+ATPase$

As amostras de brânquia foram homogeneizadas no gelo em meios contendo 100 μ L de tampão (300 mM de sacarose, 20 mM de EDTA, 100 mM de Imidazol e 0,5 g de ácido deoxicólico) para posterior centrifugação (1 min, 5.000 rpm, 4°C). A atividade da $Na^+K^+ATPase$ foi determinada no sobrenadante conforme metodologia descrita por McCormick (1993). Para as reações, foram utilizados 10 μ L do sobrenadante do homogeneizado, onde foram adicionados 150 μ L de meio de reação A (4 U/mL de lactato desidrogenase, 5 U/mL de piruvato quinase, 2,8 mM de fosfoenolpiruvato, 3,5 mM de ATP e 0,22 mM de NADH em 50 mM de tampão Imidazol, pH 7,5) e 50 μ L de salina (100 mM de NaCl, 10,5 mM de $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, em 50 mM tampão Imidazol, pH 7,5) com potássio (KCl 30 mM) ou 150 μ L de meio de reação B (contém as mesmas enzimas do meio de reação A mais 1 mM de Ouabaína, inibidor da atividade da $Na^+,K^+ATPase$) e 50 μ L de salina sem potássio. A quantidade de ADP produzido em cada reação foi determinada pela absorbância dos meios de reação em espectrofotômetro (340 nm) (Victor2 TM 1420, Perkin-Elmer, USA), a cada 1 min, durante 10 min. A diferença na produção de ADP entre as duas reações A e B foi considerada como sendo aquela atribuída à atividade da $Na^+,K^+ATPase$. A atividade da enzima foi expressa em μ mol ADP formado por mg de proteína (Biureto), no extrato por hora de reação.

Análise da atividade da enzima anidrase carbônica

A atividade da anidrase carbônica (AC) foi determinado através do método de variação de pH descrito por Henry (1991), no mesmo sobrenadante utilizado para a determinação da atividade da $\text{Na}^+ \text{K}^+$ ATPase. Este método baseia-se na catálise de uma solução saturada de CO_2 pela AC, através da liberação de H^+ e conseqüente diminuição do valor de pH. Para a análise da atividade da enzima, foram utilizados de 10 μL do sobrenadante, os quais foram adicionados a 6 mL do meio de homogeneização. A reação enzimática inicia-se após a adição de 1 mL de água destilada saturada com CO_2 a 4°C . A redução do pH foi medida durante 30 s, utilizando-se um pHmetro. A partir de uma regressão linear foram ajustados os dados de pH em função do tempo, determinando-se assim atividade da enzima. A atividade da enzima AC foi calculada através da equação = (taxa catalisada/taxa não catalisada - 1)/ concentração de proteínas no volume total de amostra utilizado.

Histologia das brânquias

Após a anestesia dos animais com MS-222, as brânquias do lado direito de três peixes por unidade experimental nas salinidades 2,5‰ e 1‰ e ao final do experimento para o tratamento controle foram coletadas e armazenadas em cassetes. As brânquias do lado direito foram fixadas em líquido de Bouin durante 4 horas e depois transferidas para álcool 70%. As amostras foram desidratadas em série crescente de etanol e embebidas em parafina, utilizando processador automático de tecidos (Lupe, PT05, BR), cortadas em seções de $4\mu\text{m}$, coradas com hematoxilina-eosina e montadas em lâminas permanentes com bálsamo do Canadá. As seções histológicas foram analisadas pelo método descrito por Weibel (1982) e modificado por Romano (1996). Para determinar a densidade de células (cc/mm^2) foi utilizado uma ocular de integração reticulada de 5 linhas e 25 pontos (Carl Zeiss). As medidas de frequência foram obtidas através de observação com microscópio óptico avaliando 10 campos histológicos de tecido branquial ao acaso.

Análise Estatística

As análises estatísticas foram feitas através da comparação dos resultados entre os tratamentos com ANOVA de uma via seguido do Teste de Tukey ($P < 0,05$).

RESULTADOS

Sobrevivência

No tratamento controle onde a salinidade foi mantida a 34‰, todos os animais sobreviveram. Para o tratamento sem reposição da alcalinidade, a sobrevivência letal média foi de 5,3 dias sendo que os peixes começaram a morrer a partir do 4º dia, onde a salinidade estava em 5‰ e ao atingir a salinidade 1‰ foi observada a mortalidade total. Entretanto, no tratamento com reposição da alcalinidade o tempo letal médio foi de 6,5 dias, sendo que os animais começaram a morrer a partir do 6º dia, quando a salinidade estava em 1‰ e na salinidade zero foi observada a mortalidade total (Figura 1).

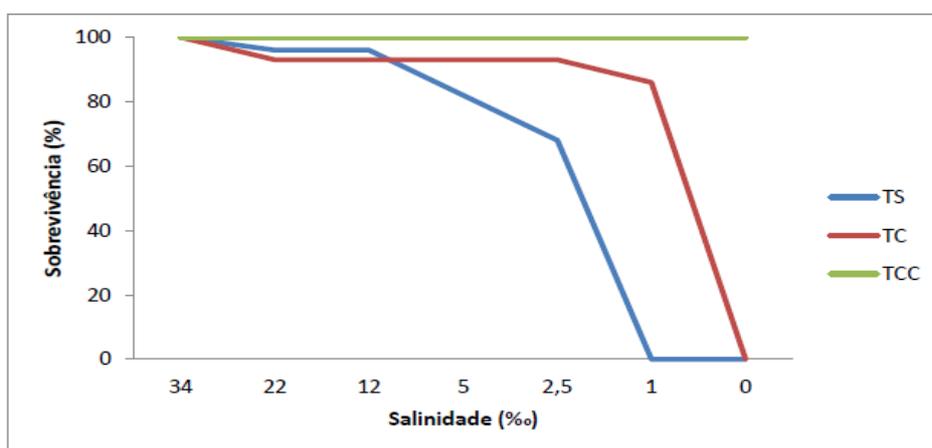


Figura 1: Sobrevivência dos juvenis do Pampo durante a redução gradual da salinidade. *TS: Tratamento sem reposição da alcalinidade; TC: Tratamento com reposição da alcalinidade; TCC: Controle.

Parâmetros de Qualidade de Água

Os valores dos parâmetros de qualidade de água analisados durante o experimento estão descritos na tabela 2. Nos tratamentos TC2,5 e TC1, o pH foi significativamente diferente do tratamento sem reposição (TS2,5), porém este foi estatisticamente igual ao controle (TCC). Para a alcalinidade, o tratamento TS2,5, foi significativamente diferente dos outros tratamentos, que foram iguais entre si. A amônia gasosa foi estatisticamente diferente no tratamento TC1 que obteve o maior valor. Os outros tratamentos foram iguais entre si (Tabela 1).

Tabela 1: Qualidade da água durante a exposição de juvenis do pampo *Trachinotus marginatus* à salinidade reduzida com e sem reposição da alcalinidade .

Parâmetros	TC2,5	TS2,5	TC1	TCC
Temperatura °C	21,9 ± 0,0	21,9 ± 0,0	22 ± 0,0	21,4 ± 0,0
OD (mg O ₂ /L)	7,96 ± 0,10	7,92 ± 0,26	8,36 ± 0,23	7,97 ± 0,03
pH	8,35 ± 0,03 ^a	7,93 ± 0,15 ^b	8,39 ± 0,04 ^a	8,1 ± 0,03 ^{ab}
Alcalinidade (mg CaCO ₃ /L)	111,2 ± 4,3 ^a	36,2 ± 5,2 ^b	108,7 ± 12 ^a	142,5 ± 2,5 ^a
Amônia Gasosa (mg N-NH ₃ /L)	0,14 ± 0,01 ^b	0,05 ± 0,02 ^b	0,31 ± 0,08 ^a	0,14 ± 0,02 ^b
Amônia total (mg N-NH ₃ +NH ₄ ⁺ /L)	1,46 ± 0,05 ^b	1,11 ± 0,14 ^b	3,12 ± 0,99 ^{ab}	4,12 ± 0,37 ^a

*Tratamento Com Reposição da alcalinidade em salinidade 2,5‰; ** Tratamento Sem reposição da alcalinidade em salinidade 2,5‰, Tratamento com reposição da alcalinidade em salinidade 1‰; Controle com salinidade 34‰. Letras diferentes representam as diferenças estatísticas.

Atividade da enzima Na⁺ K⁺ ATPase

O tratamento com salinidade 2,5‰ onde não foi reposta a salinidade (TS2,5) foi o que alcançou o maior valor de atividade da NKA, sendo significativamente superior ao dos outros tratamentos (Figura 2).

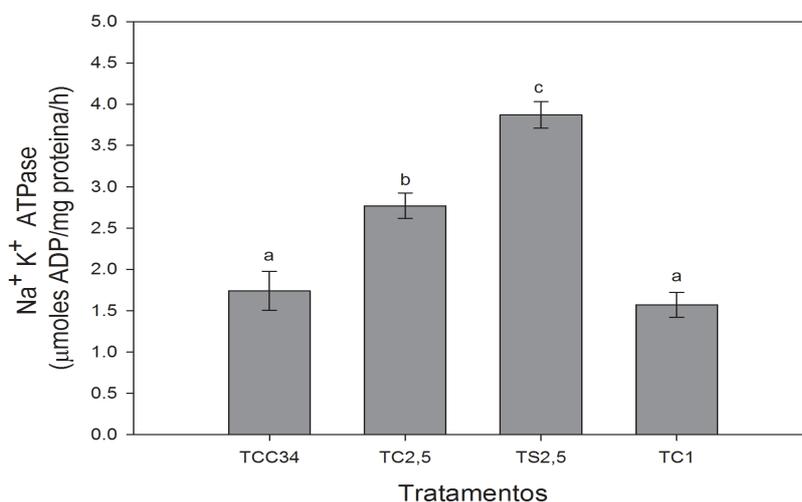


Figura 2. Atividade da enzima Na⁺ K⁺ ATPase em brânquias de juvenis do pampo *Trachinotus marginatus* expostos a baixas salinidades. TC2,5: Tratamento com reposição da alcalinidade em salinidade 2,5‰; TS2,5: Tratamento sem reposição da alcalinidade em salinidade 2,5‰; TC1: Tratamento com reposição da alcalinidade em

salinidade 1‰; TCC: Controle em salinidade 34‰. Letras diferentes correspondem as diferenças estatísticas e o intervalo ao erro padrão.

Atividade da enzima Anidrase Carbônica

A atividade da enzima anidrase carbônica foi aumentada nos tratamentos TC2,5 e TS2,5 quando comparadas ao tratamento controle (TCC). Estas duas foram estatisticamente iguais entre si (Figura 3).

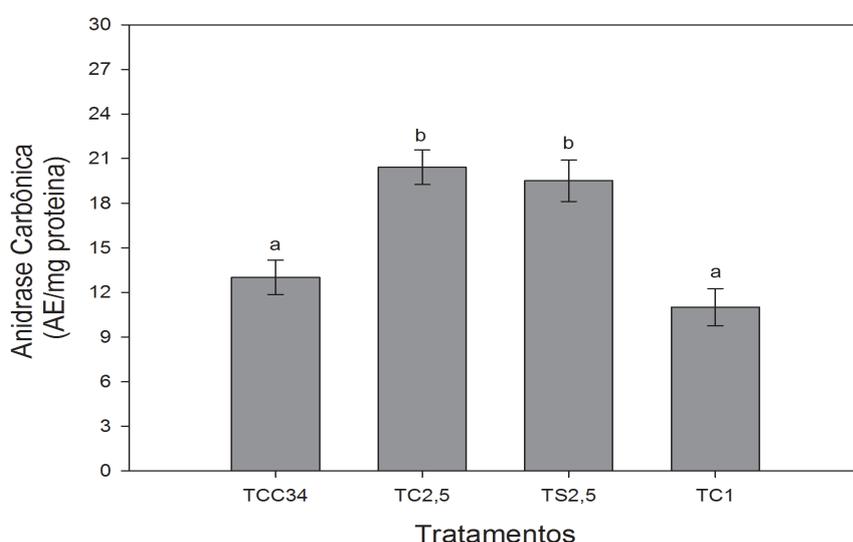


Figura 3. Atividade da enzima Anidrase Carbônica em brânquias de juvenis de pampo *Trachinotus marginatus* expostos a baixas salinidades. TC2,5: Tratamento com reposição da alcalinidade em salinidade 2,5‰; TS2,5: Tratamento sem reposição da alcalinidade em salinidade 2,5‰; TC1: Tratamento com reposição da alcalinidade em salinidade 1‰; TCC: Controle em salinidade 34‰. Letras diferentes correspondem as diferenças estatísticas e o intervalo ao erro padrão.

Morfologia das brânquias

Quando houve redução da salinidade foi observada hiperplasia das células epiteliais das brânquias e hipertrofia e hiperplasia das células de cloreto (Figura 4). As brânquias dos peixes controle apresentaram densidade de células de cloreto igual a 14,9 cc/mm², valor significativamente inferior ($P < 0,05$) aos demais tratamentos. Porém, com

a redução da salinidade, foi observado um aumento no número de células de cloreto nos demais tratamentos (TC2,5, TS2,4 e TC1) que atingiram a quantidade de 35,2 cc/mm².

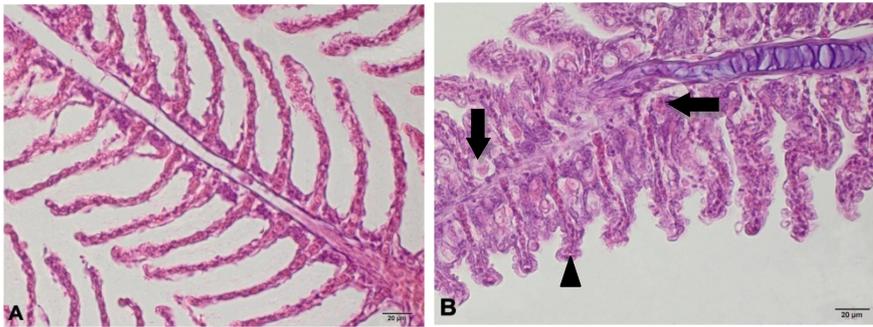


Figura 4. Microfotografia das brânquias de juvenis do pampo *Trachinotus marginatus* coradas com H-E. (A) Controle (salinidade 34‰) apresentando estrutura normal das lamelas branquiais; (B) Salinidade 2,5‰ sem controle da alcalinidade, mostrando hiperplasias do epitélio das lamelas secundárias (indicado pela cabeça da seta) e hipertrofia e hiperplasia das células de cloreto (indicado pelas setas).

DISCUSSÃO

O pampo é considerado um peixe de bom preço comercial e boa adaptabilidade às condições de cativeiro. Estudar seus meios de cultivo é importante para adquirir conhecimento sobre seu comportamento a fim de viabilizar sua criação na piscicultura marinha. Peixes eurialinos tem sido considerados também pois podem ser criados em salinidades baixas assim podemos ver algumas vantagens como, por exemplo, as estruturas de cultivo que podem ser construídas em terrenos mais afastados das margens com utilização de águas subterrâneas salobras, assim como utilizar águas mais calmas de estuários com tanques-redes.

A prática da calagem em viveiros também é rotineira na aquicultura (Arana, 2002), conferindo ao viveiro maior alcalinidade e conseqüentemente maior capacidade tampão, através da disponibilização de íons carbonatos e bicarbonatos para que o pH não varie drasticamente durante o dia (Sawyer e McCarty, 1978).

Neste trabalho, analisamos a sobrevivência em baixas salinidades para entender o comportamento osmorregulatório desta espécie. A alcalinidade foi reposta afim de atender uma quantidade mínima de íons dissolvidos na água que é importante para o funcionamento do organismo aquático assim como para manter a estabilidade do pH. Foi observado nesse experimento, que os peixes expostos ao ambiente hiposmótico sem reposição da alcalinidade tiveram altas mortalidades. Observamos nesse experimento que a mortalidade dos peixes expostos à água com reposição da alcalinidade começaram a morrer na salinidade 1‰ e morreram todos na salinidade zero. Já os animais expostos a água sem reposição da alcalinidade começaram a morrer na salinidade 5‰ e todos estavam mortos na salinidade 1‰. Atwood et al. (2004) descobriram que juvenis de bijupirá mantidos a 20‰ e que foram submetidos a redução gradual de 2‰ por dia, a mortalidade começou na salinidade 8‰ e foi total abaixo da salinidade 2‰.

A enzima $\text{Na}^+ \text{K}^+ \text{ATPase}$ está localizada nas células de cloreto presentes nos filamentos branquiais e é responsável pelo transporte ativo de Na^+ e K^+ nas células (Baldisserotto, 2009). Alguns estudos com teleósteos mostram que a atividade da NKA pode apresentar variação em relação a mudanças na salinidade (Amaral et al., 2001). Geralmente é observado um aumento na atividade da NKA conforme o aumento do gradiente de variação da salinidade (Hiroi & McCormick, 2007; McCormick et al.,

2009). Em *Paralichthys orbignyanus*, a atividade da NKA foi maior nos peixes mantidos em água doce (Sampaio & Bianchini, 2002). O mesmo aumento na atividade foi mostrado por Lin *et al* (2003) para *Chanos chanos* aclimatados em água doce e água salobra (10 e 20‰). Porém, estudos com *Gilfichthys mirabilis*, um peixe marinho eurialino, não demonstrou aumento na atividade da NKA após 24h de choque abrupto de 30‰ para as salinidades 1,5 e 6‰ (Yoshikawa *et al* 1993). No presente estudo, a atividade da NKA foi aumentada nos tratamentos TC2,5 e TS2,5, sendo significativamente maior quando não houve reposição da alcalinidade. Chakoumakos *et al* (1979) sugere que a alcalinidade e a dureza são os fatores que controlam a toxicidade do cobre e águas com alcalinidade baixa fazem favorecerem a toxicidade do cobre sobre a truta. Este comportamento foi também observado, porém com adição de outros íons, por Forsberg e Neill (1997). Eles notaram que a sobrevivência e o crescimento de peixes marinhos em água doce é possível quando estiverem presentes concentrações mínimas de determinados íons, como cálcio, cloreto e magnésio. Wurts e Stickney (1989) também fizeram um trabalho com juvenis do red drum eurialino (*Sciaenops ocellatus*) criando-os em água doce com concentração inadequada de cálcio, tiveram performance ruim, enquanto não houve diferenças significativas no crescimento e sobrevivência entre os peixes criados em água doce, com níveis altos de cálcio dissolvido, com aqueles criados em água salgada.

Juvenis de bijupirá em fase inicial de 6-7g podem ser cultivados com sucesso num espectro de salinidade de 5 a 30 ppm (Resley *et al* 2006). Este resultado mostra que o bijupirá não necessita estar na costa marinha onde tem salinidades mais elevadas e o custo da terra e permissões ambientais são mais difíceis de obter. Gatlin *et al* (1992) também sugeriu a adição de sais na alimentação, pois através de um experimento, mostraram que a perda passiva de íons em águas com baixa salinidade pode ser compensada pelo transporte ativo de íons através da adição de eletrólitos na alimentação. Miranda-Filho *et al* (2008) após transferência direta da salinidade natural (34‰) para água salobra observou que a salinidade letal (SL50) após 24h para papa-terra foi de 2,3‰.

CONCLUSÕES

- Juvenis de pampo sobrevivem na salinidade 1‰ quando a água teve reposição da alcalinidade, enquanto os peixes mantidos sem reposição da alcalinidade apresentam mortalidade total nessa salinidade.
- A atividade da NKA foi maior para os juvenis de pampo na salinidade 2,5‰ quando não houve reposição da alcalinidade.
- A atividade da anidrase carbônica foi igual para os tratamentos com e sem reposição da alcalinidade na salinidade 2,5‰.
- As brânquias de juvenis de pampo expostos a baixa salinidade sem reposição de alcalinidade apresentam maior densidade de CC quando comparado aos peixes mantidos em água salgada.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMARAL, C, CRISTINA, A, BONECKER, T, ORTIZ, CH. 2001. Activity determination of Na^+/K^+ - ATPase and Mg^{++} - ATPase enzymes in the gill of *Poecilia vivipara* (Osteichthyes, Cyprinodontiformes) in different salinities. Brazilian Archives of Biology and Technology 44:1-6.
- ARANA, LV. 1997. Principios químicos da qualidade de água em aquicultura. Florianópolis, Editora da UFSC. 166p.
- ATWOOD, HL, YOUNG, SP, TOMASSO, JR, SMITH, TIJ. 2004. Resistance of cobia, *Rachycentrum canadum*, juveniles to low salinity, low temperature, and high environmental nitrite concentrations. J. Appl. Aquac. 15, 191-195.
- BALDISSEROTTO, B. 2002. Fisiologia de peixes aplicada a piscicultura. Editora da USM, Santa Maria, RS, Brasil.
- BROWN, BJ. 2007. Evaluation of three fish species for culture using low salinity groundwater in the Black Belt Region of Alabama. Tese de Mestrado. Auburn University. Alabama, USA. 60p.
- BOEUF, G, PAYAN, P. 2001. How should salinity influence fish growth? Comparative Biochemistry and Physiology Part C 130(4):411-23.
- BOYD, C. 1990. Water quality in warm water fish ponds. Agricultural Experiment Station. Auburn University. Opelika, Alabama, USA, 359p.
- BOYD, C. 1995. Bottom soils, sediment, and pond aquaculture. New York : Chapman e Hall.
- CATALDI, E, CICCOTTI, E, DI MARCO, P, DI SANTO, O, BRONZI, P, CATAUDELLA, S. 1995. Acclimation trials of juvenile Italian sturgeon to different salinities: morpho-physiological descriptors. J Fish Biol 47:609–618
- CAVALIN, FG, WEIRICH, CR. 2009. Larval performance of aquacultured Florida pompano (*Trachinotus carolinus*) fed rotifers (*Brachionus plicatilis*) enriched with selected commercial diets. Aquaculture 292 (1-2):67-73.
- CHAKOUMAKOUS, C, RUSSO, RC, THURSTON, V. 1979. Toxicity of copper to cutthroat trout (*Salmo clarki*) under different conditions of alkalinity, ph and hardness. Environmental Science and Technology. 13(2), pp 213-129.
- CHAVES, IS, LUVIZZOTTO-SANTOS, R, SAMPAIO, LAN. 2006. Immune adaptive

- response induced by *Bicotylophora trachinoti* (Monogenea: Diclidophoridae) infestation in pompano *Trachinotus marginatus* (Perciformes: Carangidae). *Fish & Shellfish Immunology* 21:242-250.
- COLE, WN, RAKOCY, TE, SHULTZ, KA, HARGREAVES, A. 1997. Effects of feeding four formulated diets on growth of juvenile Palometa (*Trachinotus goodei*). *Journal of Applied Aquaculture*, 7:51-60
- CUNHA, VL, RODRIGUES, RV, OKAMOTO, MH, SAMPAIO, LAN. 2009. Consumo de oxigênio pós-prandial de juvenis de pampos *Trachinotus marginatus*. *Ciência Rural* 39:1257-1259.
- DENSON, MR, STUART, KR, SMITH, TIJ. 2003. Effects of salinity on growth, survival, and selected hematological parameters of juvenile cobia *Rachycentron canadum*. *Journal of the World Aquaculture Society* 34, 496-504.
- EVANS, DH, PM PIERMARINI, KP CHOE. 2005. The multifunctional fish gill: dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation, and excretion of nitrogenous waste. *Physiol. Rev.*, 85: 97-177.
- EVANS, DH. 2008. Teleost fish osmoregulation: what have we learned since August Krogh, Homer Smith, and Ancel Keys. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 295: 704- 713.
- EVANS, DH. 2010. Co-ordination of osmotic stress responses through osmosensing and 491 signal transduction events in fishes. *J. Fish Biol.*, 76: 1903–1925.
- FAO. 2008. The State of World Fisheries and Aquaculture. Organización de las Naciones Unidas Para la Agricultura y la Alimentación. Fisheries Department. Roma. 218p.
- FIELDER, DS, ALLAN, GL, PEPPERALL, D, PANKHURST, PM. 2007. The effects of changes in salinity on osmoregulation and chloride cell morphology of juvenile Australian snapper, *Pagrus auratus*. *Aquaculture* 272:656-666.
- FORBERG, JA, NEILL, WH. 1997. Salinity groundwater as an aquaculture medium: physiological studies on the red drum *Sciaenops ocellatus*. *Environmental Biology of Fishes* 49, 119-128.
- GATLIN III, DM, MACKENZIE, DS, CRAIG, SR, NEILL, WH. 1992. Effects of dietary sodium chloride on red drum juveniles in waters of various salinities. *The Progressive Fish-Culturist* 54, 220-227.
- GILMOUR, KM & SF PERRY. 2009. Carbonic anhydrase and acid–base regulation in fish. *J. Exp. Biol.*, 212: 1647-1661.

- GRECO, AM, GLMOUR, KM, FENWICK, JC, PERRY, SF. 1995. The effects of soft-water acclimation on respiratory gas transfer in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Journal of Experimental Biology*.
- HARADER JR, RR, ALLEN, GH. 1983. Ammonia toxicity to Chinook salmon parr: reduction in saline water. *Trans. Am. Fish. Society*. 112, 834-837.
- HWANG, PP & TH LEE. 2007. New insights into fish ion regulation and mitochondrion-rich cells. *Comp. Biochem. Phys. A*, 148: 479-497.
- HENRY, RP. 1996. Multiple roles of carbonic anhydrase in cellular transport and metabolism. *Annual Reviews Physiology*, 58, 523-538.
- HIRAI, N, TAGAWA, M, KANEKO, T, SEIKAI, T, TANAKA, M. 1999. Distributional changes in branchial chloride cells during freshwater adaptation in Japanese sea bass *Lateolabrax japonicus*. *Zoological Science*. 16, 43-49.
- HIROI, J, MCCORMICK, SD. 2007. Variation in salinity tolerance, gill Na⁺/K⁺-ATPase, Na⁺/K⁺/2Cl⁻ cotransporter and mitochondria-rich cell distribution in three salmonids *Salvelinus namaycush*, *Salvelinus fontinalis* and *Salmo salar*. *The Journal of experimental Biology*, 210(6):1015-1024.
- HOAR, WS, RANDALL, DJ. 1969 . Excretion, Ionic regulation, and Metabolism. *Fish Physiology*. Academic Press, New York and London. vol. 1: 465p.
- HOLMES, WN, DONALDSON EM. 1969. The body compartments and distribution of electrolytes. In *Fish Physiology* (Edited by W.S. Hoar and Randall D.J.) Vol 1. Academic Press, New York, 1-89.
- IMSLAND, AK, S GUNNARSSON, A FOSS & SO STEFANSSON. 2003. Gill Na⁺, K⁺-ATPase activity, plasma chloride and osmolality in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*) reared at different temperatures and salinities. *Aquaculture*.218: 671–683.
- KAPLAN, JH. 2002. Biochemistry of Na⁺/K⁺-ATPase. *Annual review of Biochemistry*, 71:511-35.
- LAZO, J, ALLEN DAVIS, D, ARNOLD, CR. 1998. The effects of dietary protein level on growth, feed efficiency and survival of juvenile Florida pompano (*Trachinotus carolinus*). *Aquaculture*,169(3-4):225-232.
- LUNDGREEN, K, KIILERICH, P, TIPSMARK, CK, MADSEN, SS, JENSEN, FB. 2008. Physiological response in the European flounder (*Platichthys flesus*) to variable salinity and oxygen conditions. *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology*, 178:909-915.

- LIN, YM, CHEN, CN, LEE, TH. 2003. The expression of Na⁺, K⁺ - ATPase in milkfish *Chanos chanos*, acclimated to seawater, brackish water and fresh water. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*. Vol 135, Issue 3, pp 489 – 497.
- LOYLESS, JC, MALONE, RF. 1997. A sodium bicarbonate dosing methodology for pH management in freshwater-recirculating aquaculture systems. *The progressive Fish-Culturist*. 59:3, 198-205p.
- MAETZ, J. 1974. Aspects of adaptation to hypo-osmotic and hyperosmotic environments. In *Biochemical and biophysical perspectives in marine biology* (Edited by Malind D.C. and Sargent, J.R). Academic Press, London, 1-167.
- MARTI'NEZ-A'LVAREZ, RM, HIDALGO, MC, DOMEZAIN, A, MORALES, AE, GARCIA-GALLEGO, M, SANZ, A. 2002. Physiological changes of sturgeon *Acipenser naccarii* caused by increasing environmental salinity. *J Exp Biol* 205:3699–3706.
- MARTINS, SA, BIANCHINI, AD. 2008. Copper accumulation and toxicity in the Plata pompano *Trachinotus marginatus* Cuvier 1832 (Teleostei, Carangidae). *Journal of Aquatic Sciences*, 1832:384-390.
- MCCORMICK, SD. 1996. Effects of growth hormone and insulin-like growth factor I on salinity tolerance and gill Na⁺, K⁺-ATPase in Atlantic salmon (*Salmo salar*): interaction with cortisol. *Gen Comp Endocrinol* 101:3–11.
- MCCORMICK, SD, REGISH, M, CHRISTENSEN, K. 2009. Distinct freshwater and seawater isoforms of Na⁺/K⁺-ATPase in gill chloride cells of Atlantic salmon. *The Journal of Experimental Biology*, 212(24):3994-4001.
- MENEZES, NA, FIGUEIREDO, JL. 1980. Manual de peixes marinhos do sudeste do Brasil: Teleostei, v. 4, n. 3. Museu de Zoologia, Universidade de São Paulo. São Paulo, 96 pp.
- MIRANDA-FILHO, KC, ROBALDO, RB, WASILIESKY, WJ. 2008. Tolerância de Juvenis do Papa-terra *Menticirrhus littoralis* (Holbrook, 1860) (Pisces: Sciaenidae) a Baixas Salinidades. *Atlântica*, v. 30, p. 101-106, 2008.
- MORGAN, JD, IWAMA, GK. 1998. Salinity effects on oxygen consumption , gill Na⁺/K⁺-ATPase and ion regulation in juvenile coho salmon. *Journal of Fish Biology.*, 53:1110-1119.
- NATOCHIN, YV, LUKIANENKO, VI, KIRSANOV, VI, LAVROVA, EA, MCTOLLOY, GF, SHAKHMOTOVA, HJ. 1985. Features of osmotic and ionic

- regulations in Russian sturgeon (*Acipenser guldenstadtii* Brandt). *Comp Biochem Physiol* 80A(3):297–302.
- OKAMOTO, MH, TESSER, MB, LOUZADA, RL, SANTOS, RA, SAMPAIO, LAN. 2009. Benzocaína e eugenol como anestésicos para juvenis do pampo *Trachinotus marginatus*. *Ciência Rural.*, 39:866-870.
- PERRY, SF. 1998. Relationships between branchial chloride cells and gas transfer in freshwater fish. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 119A, 9-16
- PERRY, SF. 1997. The chloride cell: Structure and function in the gills of freshwater fishes. *Annu. Rev. Physiol.* 59: 325–347.
- PISAM, M, CL MOAL, B AUPERIN, P PRUNET & A RAMBOURG. 1995. Apical structures of “mitochondria-rich” α and β cells in euryhaline fish gill: their behaviour in various living conditions. *Anat. Rec.* 241: 13–24.
- PLAUT, I. 1998. Comparison of salinity tolerance and osmoregulation in two closely related species of blennies from different habitats. *Fish Physiology and Biochemistry*, 19, 181-188.
- RESLEY, M, WEBBJR, K, HOLT, G. 2006. Growth and survival of juvenile cobia, *Rachycentron canadum*, at different salinities in a recirculating aquaculture system. *Aquaculture* 253 (1-4), 398-407.
- ROMANO LA, FERDER, MD, STELLA, IY, INSERRA, F, FERDER, L. 1996. High Correlation in Renal Tissue Between Computed Image Analysis and Classical Morphometric Analysis. *J. of Histotechnology*, 19: 121- 123.
- ROMBOUGH, PJ. 1999. The gill of fish larvae. Is it primarily a respiratory or an ionoregulatory structure? *Journal of Fish Biology* 55, 186-204.
- SALIM, IAA. 2011. Efeito da salinidade sobre o crescimento de juvenis de pampos *Trachinotus marginatus*. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande – FURG.
- SAMPAIO, LA, BIANCHINI, A. 2002. Salinity effects on osmoregulation and growth of the euryhaline flounder *Paralichthys orbignyanus*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 269:187-196.
- SAMPAIO, LA, TESSER, MB, BURKERT, D. 2003. Tolerância de juvenis do pampo *Trachinotus marginatus* (Teleostei, Carangidae) ao choque agudo de salinidade em laboratório. *Ciência Rural*, 33:757-761.

- SAMPAIO, LA, WASIELESKY, W Jr, MIRANDA FILHO, KC. 2002. Effect of salinity on acute toxicity of ammonia and nitrite to juvenile *Mugil platanus*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 68: 668-674.
- SAWYER, C, McCARTY, P. 1978. *Chemistry for environmental engineering*. McGraw-Hill Inc., New York.
- SCHMIDT-NIELSEN, K. 2002. *Fisiologia animal, adaptação e meio ambiente*. 5ª Ed. Santos 700 Livraria e Editora.
- SWANSON, C. 1998. Interactive effects of salinity on metabolic rate, activity, growth and osmoregulation in the euryhaline milkfish (*Chanos chanos*). *The Journal of Experimental Biology*, 201:3355-3366.
- TSENG, Y, HWANG, P. 2008. Some insights into energy metabolism for osmoregulation in fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, 148(4):419-429.
- UCHIDA, K, KANEKO, T. 1996. Enhanced chloride cell turnover in the gills of chum salmon fry in seawater. *Zoological Science*. 13: 655-660.
- VAN WYK, P, SCARPA, J. 1999. Water quality and management. In: VAN WYK, P, DAVIS-HODGKINS, M, LARAMORE, R, MAIN, KL and SCARPA, J. (Eds.). *Farming marine shrimp in recirculating freshwater systems*. Florida department of agriculture and consumer services, Tallahassee, pp. 128-138.
- YOSHIKAWA, JSM, McCORMICK, SD, YOUNG, G, BERN,HA. 1993. Effects of salinity on chloride cells and Na⁺, K⁺ -ATPase activity in the teleost *Gilfichthys mirubilis*. *Comparative Biochemistry and Physiology* 105A, 311-317.
- WEIBEL, ER. 1982. *Stereological Methods*, Vol 1. Academic Press, London.
- WU, R.S.S., WOO, N.Y.S., 1983. Tolerance of hypo-osmotic salinities in thirteen species of adult marine fish: implications for estuarine fish culture. *Aquaculture* 32, 175-181.
- WURTS, WA, STICKNEY, RR. 1989. Responses of red drum (*Sciaenops ocellatus*) to calcium and magnesium concentrations in fresh and salt water. *Aquaculture* 76, 21-35.
- WURTS, WA, DURBOROW, RM. 1992. Interactions of pH, carbon dioxide, alkalinity and hardness in fish ponds. Southern Regional Aquaculture Center Publication n. 464.

ZADUNAISKY, JA. 1984. The chloride cell: the active transport of chloride and the paracellular pathways. In: Fish Physiology. (Edited by Hoar W.S. and Randall D.J.), Vol. XB, 129-176. Academic Press, New York.