

FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE RIO GRANDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA

ESTUDOS GENÉTICO-FISIOLÓGICOS DA OSMOREGULAÇÃO NO LINGUADO

Paralichthys orbignyanus

KARINA MARIA MEIER

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

Orientador: Prof. Dr. Luis Fernando Marins

Co-orientador: Prof. Dr. Luís André Sampaio

RIO GRANDE – RS

MARÇO - 2005

*Ao Dr. Otávio Leite Gastal
e ao Dr. Márcio Valério Costa*

Agradecimentos

Ao Luf pela orientação, preocupação e pela paciência que teve comigo nos últimos tempos. Aos colegas do Laboratório de Bioquímica Marinha pelo carinho e pelos inúmeros favores prestados. A toda equipe do Laboratório de Maricultura e do Laboratório de Morfologia Funcional, pelo auxílio no experimento e nas análises.

Especialmente a Viviane, pela companhia, comidas e até injeções; e a Ana Luiza por ter se tornado minha amiga no momento mais difícil, quando pouco eu tinha a ofertar. Por praticamente terem feito as quimios comigo!

Àquelas que me ajudaram a levantar o astral nas inúmeras vezes que ele despencou: a Dani e a Liane, por simplesmente terem iluminado minha vida.

Ao Dr. Otávio e ao Dr. Márcio por terem sido um exemplo da medicina a ser praticada! Pela competência, pelo carinho e muita paciência. A *Clinicanp* e todos seus funcionários pela atenção e carinho com que cuidaram de mim.

Aos amigos de longa data, por terem sido os pilares tão sólidos que me mantiveram em pé, mesmo durante as tormentas. Pelas lágrimas, telefonemas, abraços e rezas. Por todo amor! Aos inúmeros amigos que surgiram de todos os lugares no momento em que mais precisei. Pelos olhares solidários, pelos gestos de apreço!

E finalmente, a minha família por ter ficado ao meu lado em todas as batalhas, especialmente aos meus pais por lutarem comigo na linha de frente. Pelas dores e alegrias sofridas e comemoradas juntas. Por me ajudarem a decolar novamente!

“...Todos levam consigo, até o fim, viscosidades e cascas de ovo de um mundo primitivo. Há os que não chegam jamais a ser homens, e continuam sendo rãs, esquilos ou formigas. Outros que são homens da cintura pra cima e peixes da cintura para baixo. Mas, cada um deles é um impulso em direção ao ser. Todos temos origens comuns: as mães, mas cada um - resultado de uma tentativa ou de um impulso inicial - tende ao seu próprio fim. Assim é que podemos entender-nos uns aos outros, mas somente a si mesmo pode cada um interpretar-se.”

Hermann Hesse

Índice

RESUMO GERAL.....	vii
ABSTRACT.....	viii
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
REFERÊNCIAS.....	5
CAPÍTULO I: Análises histológicas e fisiológicas do linguado <i>Paralichthys orbignyanus</i> Valenciennes, 1839 submetido a diferentes condições de salinidade.....	7
Resumo.....	9
Introdução.....	10
Material e Métodos.....	11
Resultados.....	12
Discussão.....	17
Referências.....	21
CAPÍTULO I: Isolamento, caracterização e expressão dos genes do hormônio do crescimento (GH) e do seu receptor (GHR) no linguado, <i>Paralichthys orbignyanus</i> aclimatado a diferentes salinidades.....	25
Resumo.....	27
Introdução.....	28
Material e Métodos.....	30
Resultados.....	32
Discussão.....	37
Referências.....	38
DISCUSSÃO GERAL.....	42
REFERÊNCIAS.....	43
CONCLUSÕES.....	44

Resumo

O objetivo do presente trabalho foi quantificar a atividade da enzima Na^+ , K^+ -ATPase branquial e a concentração dos íons Na^+ , K^+ e Cl^- no plasma; identificar possíveis alterações histológicas nas brânquias, rins e esôfago e verificar a ação do hormônio do crescimento (GH) após transferência do linguado *Paralichthys orbignyanus* para água salgada. O isolamento, sequenciamento e expressão do cDNA do GH e parte da seqüência do cDNA do receptor do hormônio (GHR) foram realizados através da Transcrição Reversa – Reação em Cadeia da Polimerase (RT-PCR). Foi identificado a presença do cDNA do GHR nas brânquias, e o GH apresentou uma maior expressão nos exemplares aclimatados para salinidade 30. Não houve diferença histológica entre os indivíduos aclimatados as diferentes salinidades, nem na atividade da Na^+ , K^+ -ATPase. Os íons K^+ e Na^+ analisados apresentaram um aumento significativo 6 horas após o choque salino, e o Cl^- após 3 horas. Estes resultados parecem indicar que o GH possui um papel importante na osmoregulação de *P. orbignyanus* e possivelmente a origem marinha do linguado explique sua grande tolerância às variações de salinidade acima do seu ponto isosmótico, por possuir mecanismos bem desenvolvidos capazes de osmoregular sem grandes alterações morfológicas e enzimáticas.

Palavras-chave: *Paralichthys orbignyanus*, osmoregulação, hormônio do crescimento

Abstract

The objective of this study was to investigate the gill Na^+ , K^+ -ATPase activity, plasma ionic (Na^+ , K^+ e Cl^-) concentration, histological modifications on gill, kidney and oesophagus; and gene expression of growth hormone (GH) and your receptor (GHR) after transfer of flounder *Paralichthys orbignyanus* to seawater.

The isolation, sequence and expression of GH and partial sequence of GHR cDNA were obtained using the reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). After some days exposure to different salinities, no changes in gill Na^+ , K^+ -ATPase activity and histology were detected. Fishes reared in seawater (SW) displayed increased in plasma ionic (Na^+ e K^+) concentration after 6 hours, and in Cl^- after 3 hours. The expression level of growth hormone gene in the seawater-reared fish was higher than that of brackish water, and the mRNA growth hormone receptor was detected in the gill of this flounder. These results suggest the possible involvement of GH in SW adaptation in this species, and probably the marine origin of the flounder explains your high tolerance to salinity changes over its isomotic point without morfological and enzyme activity modifications.

Key-words: *Paralichthys orbignyanus*; osmoregulation; growth hormone.

Introdução Geral

O cultivo de várias espécies de linguados foi impulsionado nos últimos tempos, principalmente após o sucesso do cultivo de *Paralichthys olivaceus* no Japão. Nos EUA, atualmente três espécies diferentes de *Paralichthys* vêm sendo estudadas (Lee e Ostrowski, 2001). Na América do Sul, o Chile vem desenvolvendo e adaptando tecnologias de cultivo de linguados deste gênero (*P. olivaceus* e *P. adspersus*) através de programas de incentivo e parcerias com universidades (Alvial e Manríquez, 1999). Além disto, a Venezuela tem conduzido pesquisas sobre os aspectos reprodutivos e desova em ambientes laboratoriais com espécies deste gênero, tais como o *P. tropicus*, de alto valor comercial na região (Rosas *et al.*, 1999). No Brasil, já se obteve sucesso com a desova induzida e natural do *Paralichthys orbignyanus* (Cerqueira *et al.*, 1997; Robaldo, 2003), sendo esta espécie alvo de pesquisas na Estação Marinha de Aquicultura – Prof. Marcos Alberto Marchiori da Fundação Universidade Federal do Rio Grande (FURG).

O linguado *Paralichthys orbignyanus* Valenciennes, 1839 é um importante recurso pesqueiro no Brasil e ocorre em águas rasas de até pouco mais de 20m, entrando em lagoas costeiras, desde o estado do Rio de Janeiro até Mar del Plata, na Argentina podendo atingir mais de 100 cm de comprimento total e peso superior a 10 kg (Figueiredo e Menezes, 2000). Apresentam grande potencial para a aquicultura por possuir um alto valor comercial e grande tolerância a fatores ambientais (Sampaio *et al.*, 2001), tais como salinidade (Wasielesky *et al.*, 1995), compostos nitrogenados (Bianchini *et al.*, 1996) e estresse ácido (Wasielesky *et al.*, 1997).

Embora os estuários sejam regiões consideradas próprias para a aquicultura por serem ambientes fechados e protegidos, eles apresentam amplas variações de salinidade, que podem ocasionar um estresse osmoregulatório nos peixes (Wu e Woo, 1983). Como a osmoregulação é um processo que necessita de energia, certas salinidades devem maximizar o crescimento e/ou reprodução pelo decréscimo da energia gasta com a osmoregulação. Por isto, a capacidade dos peixes estuarinos lidarem com flutuações de salinidade constitui um importante fator na tentativa de maximizar o crescimento e reprodução em cativeiro (Sampaio e Bianchini, 2002). Sampaio *et al.* (2001) observaram que o crescimento de juvenis de *P. orbignyanus* foi maior no grupo aclimatado para a salinidade 30 e salinidade 11, quando comparado com o grupo

mantido na salinidade 2. Num estudo posterior, Sampaio e Bianchini (2002) observaram que a sobrevivência de *P. orbignyanus* depois de 90 dias não foi afetada nas salinidades 0 e 30, porém a osmo- e ionoregulação foi significativamente afetada na água doce, sendo que os linguados mantidos neste meio apresentaram um crescimento menor quando comparados aqueles mantidos em água salgada.

Em peixes teleósteos, muitas espécies adaptam a ingestão dos alimentos à salinidade do meio, sendo um indício de que esta esteja relacionada com o crescimento. Além disto, muitos hormônios (da tireóide, TH; do crescimento, GH; fator de crescimento tipo-insulina I, IGF-I, entre outros) que estão claramente envolvidos no controle e regulação do crescimento, estão também envolvidos nos processos osmoregulatórios (Boeuf e Payan, 2001). Entre estes, o hormônio do crescimento, envolvido no controle do crescimento, afeta o metabolismo de gorduras, proteínas e carboidratos exercendo suas funções diretamente sobre os órgãos alvo como através do estímulo da produção do fator de crescimento tipo-insulina I (IGF-I). Além disto, estudos com diferentes espécies de peixes demonstraram que o GH atua nos processos osmoregulatórios para a água salgada aumentando a tolerância através do aumento da atividade da enzima $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ em brânquias (Bolton *et al.*, 1987; Richman e Zaugg, 1987; Sakamoto *et al.*, 1993, 1997, Auperin *et al.*, 1995).

Estudos analisando incrementos exógenos do hormônio de crescimento demonstraram um aumento na tolerância à salinidade em algumas espécies de salmonídeos (Bolton *et al.*, 1987; Richman e Zaugg, 1987; Sakamoto *et al.*, 1993), estimulando a expressão do gene do IGF-I em trutas (Sakamoto e Hirano, 1993), o que provavelmente explica a presença de sítios de ligação do GH em brânquias, intestino e rim. Isto porque a nível tissular, as ações pleiotrópicas do GH resultam da interação do hormônio com receptores específicos (GHR) presentes na superfície das células alvo. Este receptor é uma proteína de membrana que se liga ao GH com alta afinidade e especificidade e a partir desta ligação um sistema de sinalização pós-receptor é acionado, culminando com as ações biológicas características deste hormônio.

Isto explica a presença de moléculas de mRNAs do GHR encontrados em uma série de tecidos tais como fígado, músculo, rim, pulmão, glândula mamária, placenta e tecido adiposo, sendo que a expressão deste gene é específica em relação ao tipo de tecido e ao estágio de desenvolvimento em que o animal se encontra. Embora os fatores

que controlam esta expressão não sejam bem conhecidos, muito dos seus efeitos provavelmente são manifestados de acordo com o nível de transcrição do gene GHR, cuja regulação tem um papel crítico em numerosos processos fisiológicos e patológicos (Menon *et al.*, 1995).

Atualmente, a seqüência completa de aminoácidos do GH e do GHR de várias espécies está disponível no banco mundial de genes (Genbank, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), sendo que em peixes o número de seqüências disponíveis para estes genes tem aumentado significativamente nos últimos dois anos. O conhecimento das seqüências deste hormônio e de seu respectivo receptor tem permitido um aumento no número de estudos enfocando os processos de osmoregulação em peixes, nos quais eles certamente têm importante função.

O aumento na produção e liberação deste hormônio durante os processos de aclimação de espécies eurialinas a salinidades altas certamente produz um aumento na expressão dos genes de seus receptores em tecidos relacionados à atividade osmoregulatória do animal. Embora os peixes mantidos em salinidades próximas a seu ponto isosmótico possam apresentar um maior crescimento devido ao decréscimo da energia gasta com a osmoregulação, a atuação do hormônio do crescimento na aclimação para a água salgada pode contribuir para um maior crescimento em salinidades altas devido ao aumento dos níveis deste hormônio. Em vista disto, uma espécie eurialina como o linguado, *Paralichthys orbignyanus*, apresenta-se como um modelo adequado para o estudo da ação do GH e seu receptor nos processos osmoregulatórios desta espécie.

O objetivo do presente trabalho é correlacionar a expressão do gene do hormônio do crescimento e a presença de seu receptor em brânquias, com os aspectos fisiológicos, histológicos e histoquímicos nos processos osmoregulatórios do linguado *Paralichthys orbignyanus* para salinidade alta. Para isto, no primeiro capítulo será analisado ao longo do tempo, a concentração de íons no plasma, a atividade da enzima Na⁺, K⁺-ATPase nas brânquias, e a identificação de possíveis alterações histológicas e histoquímicas nas brânquias, rim e esôfago dos peixes aclimatados em diferentes salinidades. Já no segundo capítulo será apresentado o isolamento e caracterização do cDNA dos genes do hormônio do crescimento (GH) e do receptor do hormônio do

crescimento (GHR) do linguado *P. orbignyana* e a avaliação da expressão do gene do GH em indivíduos expostos a diferentes condições de salinidade.

Referências

- Alvial, A., Manrínquez, J., 1999. Diversification of flatfish culture in Chile. *Aquaculture* 176, 65-73.
- Auperin, B., Leguem, I., Rentier-Delrue, F., Smal, J., Prunet, P., 1995. Absence of a tGH effect on adaptability to brackish water in tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 97, 145-159.
- Bianchini, A., Wasielesky, W.Jr., Miranda Filho, K., 1996. Toxicity of nitrogenous compounds to juveniles of flatfish *Paralichthys orbignyanus*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 56, 453-459.
- Boeuf, G., Payan, P., 2001. How should salinity influence fish growth? *Comp. Biochem. Physiol. C* 130, 411-423.
- Bolton, J.P., Collie, N.L., Kawauchi, H., Hirano, T., 1987. Osmoregulatory actions of growth hormone in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *J. Endocrinol.* 112, 63-68.
- Cerqueira, V.R., Mioso, R., Macchiavello, J.A.G., Brügger, A.M., 1997. Ensaio de indução de desova do linguado *Paralichthys orbignyanus* Valenciennes, 1839. *B. Inst. Pesca* 24 (especial), 247-254.
- Figueiredo, J.L., Menezes, N.A., 2000. Manual de peixes marinhos do sudeste do Brasil. Universidade de São Paulo, São Paulo, Volume VI.
- Lee, C.-S., Ostrowski, A.C., 2001. Current status of marine finfish larviculture in the United States. *Aquaculture* 200, 89-109.
- Menon, R.K., Stephan, D.A., Singh, M., Morris, S.M., Jr., Zou, L., 1995. Cloning of the promoter-regulatory region of the murine growth hormone receptor gene. Identification of a developmentally regulated enhancer element. *J. Biol. Chem.* 270, 8851-8859.
- Richman, N.H., Zaugg, W.S., 1987. Effects of cortisol and growth hormone on osmoregulation in pre- and desmoltified coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 65, 189-198.
- Robaldo, R.B., 2003. Estudo comparativo da reprodução do linguado *Paralichthys orbignyanus* (Valenciennes, 1839) no ambiente e em cativeiro. Tese de Doutorado, Fundação Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 200p.

- Rosas, J., Arana, D., Cabrera, J. Millán, J. Darryl, J., 1999. The potential use of Caribbean flounder *Paralichthys tropicus* as an aquaculture species. *Aquaculture* 176, 51-54.
- Sakamoto, T., Hirano, T., 1993. Expression of insulin-like growth factor I gene in osmoregulatory organs during seawater adaptation of the salmonid fish: Possible mode of osmoregulatory action of growth hormone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 1912-1916.
- Sakamoto, T., McCormick, S.D., Hirano, T., 1993. Osmoregulatory actions of growth hormone and its mode of action in salmonids: a review. *Fish Physiol. Biochem.* 11, 155-164.
- Sakamoto, T., Shepherd, B.S., Madsen, S.S., Nishioka, R.S., Siharath, K., Richman III, N.H., Bern, H.A., Grau, E.G., 1997. Osmoregulatory actions of growth hormone and prolactin in an advanced teleost. *Gen. Comp. Endocrinol.* 106, 95-101.
- Sampaio, L.A., Bianchini, A., Cerqueira, V.R., 2001. Growth of juvenile brazilian flounder, *Paralichthys orbignyanus*, cultered at different salinities. *J. Appl. Aquacult.* 11(1/2), 67-75.
- Sampaio, L.A., Bianchini, A., 2002. Salinity effects on osmoregulation and growth of the euryaline flounder, *Paralichthys orbignyanus*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 269, 187-196.
- Wasielesky, W.Jr., Miranda Filho, K., Bianchini, A., 1995. Tolerância do linguado *Paralichthys orbignyanus* à salinidade. *Arq. Biol. Tecnol.* 38(2), 385-395.
- Wasielesky, W.Jr., Bianchini, A., Miranda Filho, K., 1997. Tolerancia a la temperatura de juveniles de linguado *Paralichthys orbignyanus*. *Frente Marit.* 17A, 55-60.
- 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.

Capítulo I

Atividade da enzima Na⁺, K⁺-ATPase, iono-regulação e avaliações histológicas no
linguado *Paralichthys orbignyanus* submetido ao choque hiperosmótico

Co-autores: João C. Cousin, Luís A. Sampaio, Christianne L. Paganini, Michel T.
Kamimura, Luis F. Marins.

Segundo normas da revista "Aquaculture"

Atividade da enzima Na⁺, K⁺-ATPase, iono-regulação e avaliações histológicas no
linguado Paralichthys orbignyanus submetido ao choque hiperosmótico

Karina M. Meier^{b,e}, João C. Cousin^c, Luís A. Sampaio^d, Christianne L. Paganini^a,
Michel T. Kamimura^{a,e}, Luis F. Marins^{a,*}

^aFundação Universidade Federal do Rio Grande, Departamento de Ciências Fisiológicas, Rio Grande, RS - Brasil

^bFundação Universidade Federal do Rio Grande, Departamento de Química, Laboratório de Bioquímica Marinha, Rio Grande, RS - Brasil

^cFundação Universidade Federal do Rio Grande, Departamento de Ciências Morfo-Biológicas, Rio Grande, RS - Brasil

^dFundação Universidade Federal do Rio Grande, Departamento de Oceanografia, Rio Grande, RS - Brasil

^eFundação Universidade Federal do Rio Grande, Programa de Pós-Graduação em Aqüicultura, Rio Grande, RS - Brasil

* Autor para correspondência: Fax: 55 53 2336850. Endereço eletrônico: dqmluf@furg.br

Resumo

O linguado Paralichthys orbignyanus é encontrado em águas costeiras e estuarinas no sul da costa oeste do oceano Atlântico. É um importante recurso pesqueiro no Brasil e apresenta grande potencial para a aquicultura por possuir um alto valor comercial e grande tolerância a fatores ambientais. Embora os estuários sejam regiões consideradas próprias para a aquicultura, apresentam amplas variações de salinidade, por isto, a capacidade dos peixes estuarinos em lidar com estas variações constitui um importante fator na tentativa de maximizar o crescimento e reprodução em cativeiro. Desta maneira, para melhor compreender os processos de osmoregulação do linguado P. orbignyanus, este trabalho teve como objetivo dosar a atividade da enzima Na^+ , K^+ -ATPase em suas brânquias, bem como a concentração dos íons Na^+ , K^+ e Cl^- no plasma, e identificar possíveis alterações histológicas nas brânquias, rins e esôfago. Exemplares de P. orbignyanus foram aclimatados durante uma semana a salinidade 11 e depois parte deles foi transferida para um tanque com salinidade 30, onde permaneceram durante três dias. Não houve diferença histológica entre os indivíduos das diferentes salinidades, nem diferenças na atividade da Na^+ , K^+ -ATPase. Os íons K^+ e Na^+ analisados apresentaram um aumento significativo 6 horas após o choque salino, e o Cl^- após 3 horas. Possivelmente a origem marinha do P. orbignyanus explique sua grande tolerância às mudanças de salinidade acima do seu ponto isosmótico, por possuir mecanismos já bem desenvolvidos capazes de osmoregular sem grandes alterações morfológicas e enzimáticas.

Palavras-chaves: linguado; osmoregulação; Na^+ , K^+ -ATPase; íons plasmáticos; histologia

1. Introdução

O linguado Paralichthys orbignyanus Valenciennes, 1839 é um importante recurso pesqueiro no Brasil e apresenta grande potencial para a aquacultura por possuir um alto valor comercial e grande tolerância a fatores ambientais (Sampaio *et al.*, 2001), tais como salinidade (Wasielisky *et al.*, 1995), compostos nitrogenados (Bianchini *et al.*, 1996) e estresse ácido (Wasielisky *et al.*, 1997). Após o sucesso do cultivo de Paralichthys olivaceus no Japão, o cultivo de várias espécies de linguados foi impulsionado nos últimos anos, sendo que no Brasil têm-se desenvolvido estudos com a espécie P. orbignyanus (Cerqueira *et al.*, 1997; Robaldo *et al.*, 2003; Sampaio *et al.*, 2001, 2002).

A maioria dos teleósteos vive em ambientes onde estão sujeitos a diferenças osmóticas e iônicas entre os fluidos do seu meio interno e o meio externo. Porém, através de mecanismos osmoregulatórios, são capazes de manter um balanço osmótico e iônico, através das brânquias, rins, intestino (Pelis e McCormick, 2001) e também através do esôfago (Laurent e Kirsch, 1975; Hirano e Mayer-Gostan, 1976; Cataldi *et al.*, 1988; Abaurrea-Equisoah e Ostos-Gamido, 1997). No caso do linguado P. orbignyanus a salinidade que corresponde ao seu ponto isosmótico é a salinidade 11 (Sampaio e Bianchini, 2002). Os principais sítios de secreção e absorção dos íons são as células de cloreto presentes no epitélio branquial, através da enzima Na^+ , K^+ -ATPase que mantém a concentração intracelular do K^+ alta e do Na^+ baixa em relação ao meio extracelular (Hoar, 1988). O envolvimento da Na^+ , K^+ -ATPase na aclimação para água salgada têm sido amplamente estudado, principalmente em salmonídeos, mas também em teleósteos eurialinos (Yamauchi *et al.*, 1991; Avella *et al.*, 1993; Borski *et al.*, 1994; Cataldi e Ciccotti, 1995; Sakamoto *et al.*, 1997; Eliassen *et al.*, 1998; Mancera e McCormick, 1998; Uchida *et al.*, 1998; Nielsen *et al.*, 1999; Seidelin *et al.*, 1999; Caberoy e Qunitio, 2000; Pelis e McCormick, 2001; Imsland *et al.*, 2003; Kaneko e Katoh, 2004).

Desta maneira, para melhor compreender os processos de osmoregulação do linguado P. orbignyanus, este trabalho teve como objetivo dosar a atividade da enzima Na^+ , K^+ -ATPase nas brânquias, bem como dos íons Na^+ , K^+ e Cl^- no plasma,

relacionando estes resultados com possíveis alterações histológicas nas brânquias, rins e esôfago.

2. Material e Métodos

Excluído: ¶

Oitenta exemplares de P. orbignyanus, de tamanho entre 10 e 50 cm, coletados na Praia do Cassino (Rio Grande – RS) foram levados para a Estação Marinha de Aquacultura (EMA), e aclimatados durante uma semana a salinidade 11. Depois disto, quarenta peixes foram transferidos para um tanque com salinidade 30, onde permaneceram durante três dias. Durante todo o experimento estes tanques foram mantidos a temperatura de 24°C ($\pm 2^\circ\text{C}$), fotoperíodo 12 horas claro/12 horas escuro, com renovação diária de 100% da água e aeração constante. Os peixes foram alimentados uma vez por dia ad libitum, com juvenis de Mugil platanus vivos, até a transferência para a alta salinidade.

Cinco exemplares de cada tratamento foram sacrificados para coleta dos tecidos, no momento da transferência para a alta salinidade e 3, 6, 12, 24, 48, 72 horas depois da transferência. No momento da coleta os peixes foram anestesiados com benzocaína, 50ppm. De cada exemplar foi coletado sangue para as análises das concentrações de íons e fragmentos de brânquia para determinação da atividade da enzima Na^+ , K^+ -ATPase. Nos tempos 24 e 72 horas também foram coletados fragmentos de brânquia, rim e esôfago, dos peixes aclimatados para alta salinidade, para as análises histológicas e histoquímicas. Os peixes aclimatados a salinidade 11 foram usados como controle nas análises histológicas e a coleta de tecidos foi feita apenas no início do experimento.

As concentrações dos íons Na^+ , K^+ e Cl^- , medidas por fotometria de chama (Digimed NK-2004; Brasil), bem como as análises da atividade da enzima Na^+ , K^+ -ATPase nos filamentos branquiais foram realizadas segundo Sampaio e Bianchini (2002). Os resultados foram analisados estatisticamente através da Análise de Variância Unifatorial com nível de significância de 95%, seguido por Teste de Tukey (“Statistica for Windows” versão 6.0).

As análises histológicas das brânquias foram feitas seguindo as técnicas rotineiras de histologia. Os tecidos foram fixados em solução de Bouin durante 24h, lavadas com álcool 70% para retirar o excesso da solução de Bouin e mantidas em

álcool 70% até o início da preparação do material. Depois de desidratados e embebidos em parafina, os blocos foram cortados em seções de 7 μ m, e corados com hematoxilina-eosina, tricrômico de Mallory e *Periodic Acid-Schiff (P.A.S.) Reaction* para as análises histoquímicas. Depois de prontas, as lâminas foram analisadas em microscópio óptico.

3. Resultados

Na análise das brânquias não foi observada diferença entre os exemplares aclimatados as diferentes salinidades. Foi observado uma razoável quantidade de células caliciformes nos filamentos branquiais, com uma maior concentração destas na extremidade do filamento. Todos exemplares analisados apresentavam grande quantidade de sangue entre as lamelas, bem como, uma quantidade semelhante de células de cloreto, concentradas na base das lamelas. Várias regiões dos filamentos apresentaram diferentes graus de hiperplasia do epitélio branquial, com fusão das lamelas e perda do espaço interlamelar. As lamelas estavam extremamente disformes, muitas vezes com comprimento e largura diferentes dentro de um mesmo filamento branquial, aparecendo também telangectiases (aneurismas) lamelares em diferentes pontos (Fig. 1).

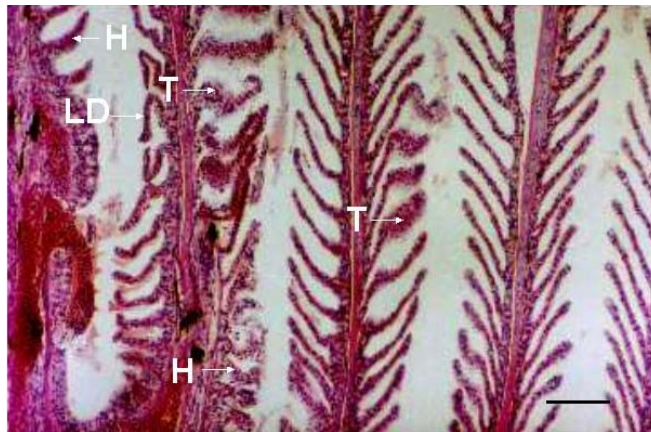


Fig. 1. Corte da brânquia do linguado *Paralichthys orbignyanus* aclimatado a salinidade 30 (Tempo: 72 horas). H, hiperplasia; T, telangectiases; LD, lamelas disformes. Hematoxilina-Eosina. Escala 100 μ m.

Da mesma maneira, no rim não foram registradas alterações morfológicas na estrutura dos corpúsculos de Malpighi, túbulos renais, vasos e tecido hemocitopoético. A distribuição, quantidade e morfologia dos centros melano-macrofágicos também permaneceu constante para as diferentes salinidades (Fig. 2). Na mucosa do esôfago, em especial o epitélio estratificado com células cúbicas, foi observada uma pequena variação individual na quantidade de células secretoras (em algumas regiões foi encontrado apenas células de revestimento não secretora no epitélio). Porém, também não houve alteração morfológica significativa na mucosa, assim como nas camadas submucosa, muscular e serosa entre as diferentes salinidades (Fig. 3).

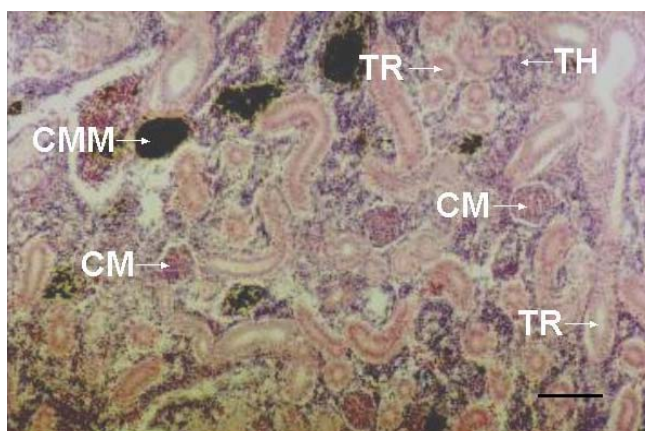


Fig. 2. Corte do rim do linguado Paralichthys orbignyanus aclimatado a salinidade 30 (Tempo: 72 horas). CMM, centro melano-macrofágico; CM, corpúsculo de Malpighi; TR, túbulos renais; TH tecido hemocitopoético. Hematoxilina-Eosina. Escala, 100 μ m.

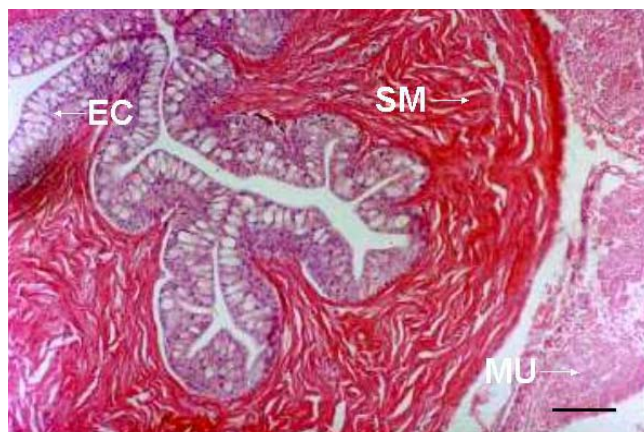


Fig. 3. Corte do esôfago do linguado Paralichthys orbignyanus aclimatado a salinidade 30 (Tempo: 72 horas). EC, epitélio cúbico; SM, camada submucosa; MU, camada mucosa. Hematoxilina-Eosina. Escala, 100 μ m.

Não foi observada diferença significativa ($p > 0,05$) na atividade da enzima Na^+ , K^+ -ATPase branquial ao longo do tempo, bem como entre as salinidades (Fig. 4). Na análise dos íons, ao longo da salinidade 11 não houve diferença estatística entre as concentrações, porém houve diferença estatística ao longo da salinidade 30. Na salinidade 30 o Cl^- (Fig. 5) apresentou um aumento na concentração do íon em 3 e 12 horas, enquanto o K^+ (Fig. 6) e Na^+ (Fig. 7) apresentaram um aumento significativo ($p < 0,05$) na concentração dos íons em 6 horas, com um decréscimo destes valores até o último dia do experimento.

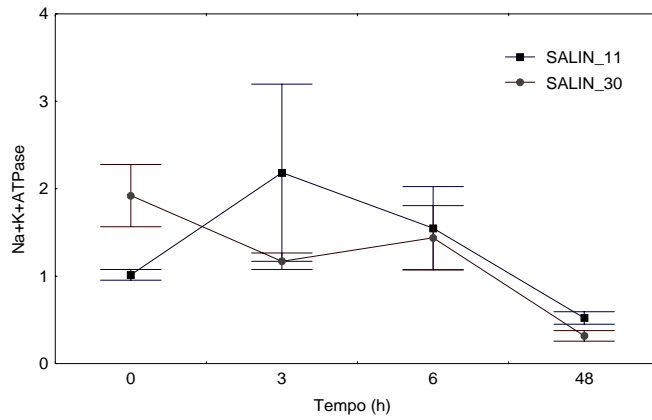


Fig. 4. Análise da atividade da enzima Na^+ , K^+ -ATPase ($\mu\text{mol Pi/mg Prot/h}$) ao longo do tempo, nas diferentes salinidades. Barras verticais indicam o erro padrão e o ponto representa a média ($n = 6$).

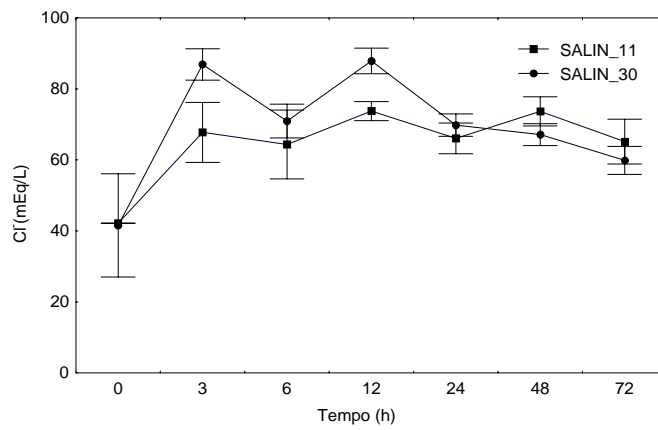


Fig. 5. Análise da concentração do íon Cl^- (mEq/L) ao longo do tempo, nas diferentes salinidades. Barras verticais indicam o erro padrão e o ponto representa a média ($n = 6$).

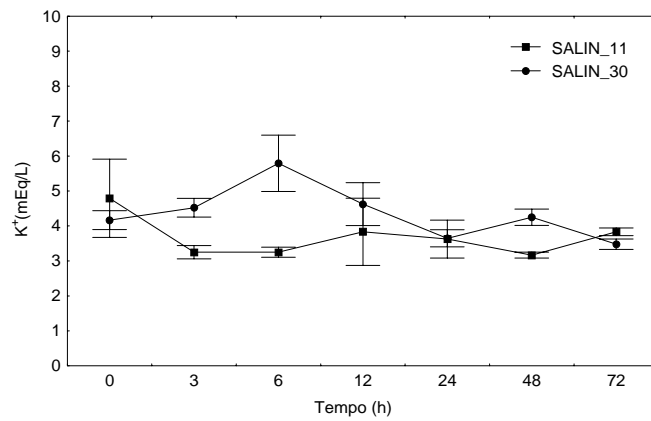


Fig. 6. Análise da concentração do íon K⁺ (mEq/L) ao longo do tempo, nas diferentes salinidades. Barras verticais indicam o erro padrão e o ponto representa a média ($n = 6$).

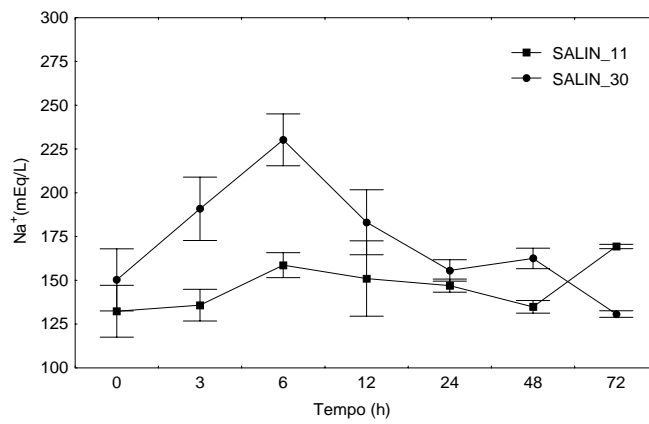


Fig. 7. Análise da concentração do íon Na⁺ (mEq/L) ao longo do tempo, nas diferentes salinidades. Barras verticais indicam o erro padrão e o ponto representa a média ($n = 6$).

4. Discussão

Alguns trabalhos evidenciaram alterações morfológicas no esôfago de peixes aclimatados para altas salinidades, com a substituição da camada mucosa estratificada típica de água doce por um epitélio simples colunar com células de transporte, responsáveis pelo transporte ativo e passivo de íons para a camada serosa (Cataldi *et al.*, 1995). Cataldi *et al.* (1995), num trabalho com a espécie eurialina *Acipenser naccarii*, aclimatada para alta salinidade não encontrou modificações na estrutura do esôfago, depois de 60 dias de aclimação. Outros trabalhos, com a espécie *Anguilla anguilla* evidenciaram mudanças consideráveis após 14 dias de aclimação (Laurent e Kirsch, 1975; Hirano e Mayer-Gostan, 1976) e com *Oreochromis mossambicus* (Cataldi *et al.*, 1988) após 7 dias. A maioria dos teleósteos eurialinos, dilui a água ingerida no estômago através de um fluxo osmótico de água vinda do sangue, com subsequente absorção da água e íons monovalentes no intestino (Forster e Goldstein, 1969), possivelmente o linguado *P. orbignyanus*, realize o mesmo processo, o que explicaria a ausência de alterações morfológicas em seu esôfago. Estudos mais aprofundados seriam necessários para elucidar o papel do esôfago na diluição da água salgada ingerida pelo *P. orbignyanus*, sendo que a ausência de alterações em suas estruturas pode ser um indício de que este órgão não esteja envolvido nos processos osmoregulatórios desta espécie ou então, o tempo de exposição não foi suficiente para que o peixe desenvolvesse alguma alteração.

Em água salgada os teleósteos costumam diminuir a quantidade de urina excretada, o que resulta num decréscimo no tamanho do glomérulo, como observado em indivíduos de *A. naccarii*, após 60 dias nos indivíduos aclimatados a salinidade 20 e 30, sendo que os indivíduos da salinidade 30 também apresentaram aspectos degenerativos nos rins (Cataldi *et al.*, 1995). Porém estas alterações não foram observadas no presente estudo, já que o aumento da salinidade não induziu alterações morfológicas no rim do *P. orbignyanus* após três dias de aclimação.

Um aumento no número e/ou tamanho das células interlamelares já foi descrito em teleósteos eurialinos aclimatados para a água salgada, porém no presente estudo não foram encontradas diferenças entre os indivíduos aclimatados para salinidade 11 e 30.

Cataldi *et al.* (1995) verificou que tanto os indivíduos aclimatados a salinidade 20, como os de 30 apresentaram variações no número de células de cloreto nas brânquias.

Da mesma maneira, Avella *et al.* (1993), num trabalho com espécies pouco eurialinas, encontrou um aumento no número de células de cloreto em Oreochromis aureus e O. niloticus após transferência para salinidades mais altas. Larvas de Epinephelus coioides com 40 dias de vida apresentaram um aumento na densidade das células de cloreto nas salinidades mais altas, enquanto larvas de 60 dias não apresentaram alterações entre as diferentes salinidades, provavelmente porque as larvas de 60 dias possuem uma tolerância maior a salinidade e apresentam seus mecanismos de osmoregulação já bem desenvolvidos (Camberoy e Quintio, 2000). Provavelmente o mesmo aconteça com o linguado, que não apresentou alterações morfológicas por possuir mecanismos já bem desenvolvidos para suportar diferentes condições de salinidades e mudanças bruscas da mesma. Possivelmente três dias não sejam suficientes para que o organismo apresente uma resposta histológica, e para um estudo futuro seria interessante aclimatar estes peixes por um período mais longo. Já as lesões encontradas nas brânquias podem estar relacionadas a doenças nutricionais, ação de poluentes e reações inflamatórias a presença de parasitas (Ferguson e Dukes, 1989) mas no presente estudo não foi possível identificar a causa destas alterações.

Após três dias de aclimação não houve diferença significativa entre as concentrações dos íons ao longo da salinidade 11 que corresponde ao ponto isosmótico desta espécie. Porém, ao longo da salinidade 30, houve diferença significativa, assim como entre os tratamentos, visto que as concentrações dos íons são proporcionais à salinidade ambiente (Sampaio, 1999). As concentrações plasmáticas dos íons de P. orbignyanus foram bastante similares aos valores relatados na literatura (Sampaio, 1999). Na salinidade 30 o Cl⁻ (Fig. 5) apresentou um aumento na concentração do íon em 3 e 12 horas, enquanto o K⁺ (Fig. 6) e Na⁺ (Fig. 7) apresentaram um aumento significativo ($p < 0,05$) na concentração dos íons em 6 horas, com um decréscimo destes valores até o último dia do experimento. Nestes picos de concentrações dos íons, os valores foram significativamente diferentes ($p < 0,05$) daqueles encontrados para salinidade 11. Howland *et al.* (2001) num estudo com Stenodus leucichthys, Cataldi *et al.* (1995) e Romão *et al.* (2001) num estudo com Notothenia neglecta, observaram que o aumento das concentrações dos íons está diretamente relacionado com o aumento da

salinidade. O resultado do presente trabalho indica que o P. orbignyanus apresenta uma rápida resposta à mudança de salinidade, e após 6 horas os processos osmoregulatórios já fazem efeito.

Quanto a atividade da enzima Na⁺, K⁺-ATPase dos linguados P. orbignyanus, não houve diferença significativa entre os indivíduos aclimatados a salinidade que corresponde ao seu ponto isosmótico (salinidade 11) e aqueles aclimatados a salinidade 30. Sampaio e Bianchini (2002), num trabalho com a mesma espécie, observaram um leve efeito na osmo- e iono-regulação, depois de expostos por 15 dias a salinidades extremas (0 e 40). Após 90 dias de aclimação, a atividade da Na⁺, K⁺-ATPase foi significativamente maior nos peixes aclimatados a água doce do que naqueles aclimatados a água salgada. Porém estudos com outra espécie de linguado, Plalichtys flesus, não apresentou diferença na atividade da Na⁺, K⁺-ATPase entre peixes aclimatados para água salgada e água doce (Stagg e Shuttleworth, 1982).

Espécies de pouca eurialinidade, como Oreochromis aureus e O. niloticus apresentaram um aumento na atividade da Na⁺, K⁺-ATPase quando transferidas para salinidade 30, com retorno aos níveis normais uma semana mais tarde. Entretanto a espécie eurialina, com preferência por água salgada, Fundulus heteroclitus, não apresentou diferenças na atividade da Na⁺, K⁺-ATPase entre indivíduos aclimatados, após três dias, para a água doce e salgada (Kaneko e Katoh, 2004).

Eliassen *et al.* (1998) estudando a capacidade osmoregulatória de duas linhagens de Salvelinus alpinus, observou que na linhagem denominada Hammerfest a osmolalidade plasmática, a concentração de eletrólitos no plasma e o conteúdo de água no músculo não foram significativamente diferentes entre os indivíduos mantidos em água doce e aqueles mantidos em água salgada. Porém depois da transferência para a água salgada houve um incremento na atividade da Na⁺, K⁺-ATPase, mas sem alterações no número de células de cloreto. Desta maneira, sugerem que esta linhagem tenha sua capacidade hipo-osmoregulatória bem adaptada para suportar a água salgada. Em contraste, a linhagem denominada Skjomen apresentou um incremento na osmolalidade plasmática e na concentração de eletrólitos no plasma, e baixo conteúdo de água no músculo, provavelmente devido a sua pobre capacidade hipo-osmoregulatória, visto que uma alta mortalidade foi verificada entre estes peixes após a transferência para a água salgada.

Camberoy e Quintio (2000) não encontraram diferenças na atividade da ATPase e nas células de cloreto em juvenis de Epinephelus coioides aclimatados para água salgada, provavelmente devido a uma ampla faixa de tolerância e por apresentarem mecanismos de secreção de sais e captação de íons bem desenvolvidos. No entanto, a maioria dos teleósteos examinados até hoje mostram um aumento na atividade da Na^+, K^+ -ATPase com aumento da salinidade (McCormick, 1995). Howland et al., 2001, num estudo com a espécie Stenodus leucichthys encontrou uma alta atividade da Na^+, K^+ -ATPase em resposta a transferência para alta salinidade e sugere que isto aconteça principalmente por esta espécie não possuir outros mecanismos de excreção de íons através de brânquias, rins e intestino, como consequência de sua baixa tolerância as variações de salinidade. Porém, existem algumas exceções, onde aumento da atividade desta enzima é maior quando estes são expostos a água doce. Isto normalmente acontece com peixes de origem marinha, como é o caso do P. orbignyanus, que segundo Sampaio e Bianchini (2002), apresenta maior atividade da enzima nos peixes aclimatados a água doce. A estratégia para a regulação da atividade da Na^+, K^+ -ATPase provavelmente reflete sua origem evolutiva, a frequência e magnitude das mudanças de salinidade e temperatura encontradas em seu ambiente natural.

Segundo Sampaio e Bianchini (2002), o linguado P. orbignyanus apresenta capacidade de osmoregulação bem desenvolvida, provavelmente devido às grandes flutuações de salinidade que estão sujeitos em seu ambiente natural. Embora esta espécie seja considerada eurihalina, a sua origem é marinha, fato que pode explicar sua grande tolerância às mudanças de salinidade acima do seu ponto isosmótico encontradas no presente trabalho. Isto ocorre, provavelmente, devido à presença de mecanismos bem desenvolvidos capazes de osmoregular sem grandes alterações morfológicas e enzimáticas. Além disto, considerando que as análises da atividade da Na^+, K^+ -ATPase são feitas in vitro, que esta desempenha um papel tanto na hipo- como na hiper-regulação (Kaneko e Katoh, 2004), e que seus mecanismos de transporte de íons são muito complexos, envolvendo vários transportadores (Romão et al., 2001), torna-se difícil obter uma relação direta entre a atividade da Na^+, K^+ -ATPase em brânquias e a salinidade a que o peixe está exposto. Por isto, o aumento da atividade da Na^+, K^+ -ATPase não significa necessariamente uma tolerância maior à altas salinidades.

5. Agradecimentos

Este trabalho foi realizado com auxílio da Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS, Proc. No. 01/1602.5) e FURG (Fundação Universidade Federal do Rio Grande, Brasil).

6. Referências

- Abaurrea-Equisoain, M.A., Ostos-Garrido, M.V., 1996. Cell types in the esophageal epithelium of Anguilla anguilla (Pisces, Teleostei). Cytochemical and ultrastructural characteristics. *Micron*. 27 (6), 419-429.
- Avella, M., Berhaut, J., Bornancin, M., 1993. Salinity tolerance of two tropical fishes, Oreochromis aureus e O. niloticus. 1. Biochemical and morphological changes in the gill epithelium. *J. Fish Biol.* 42, 243-254.
- Bianchini, A., Wasielesky, W.Jr., Miranda Filho, K., 1996. Toxicity of nitrogenous compounds to juveniles of flatfish Paralichthys orbignyanus. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 56, 453-459.
- Borski, R.I., Yoshikawa, T., Madsen, S.S., Nishioka, R.S., Zabetian, C., Bern, H.A., Grau, E.G., 1994. Effects of environmental salinity on pituitary growth hormone content and cell activity in the euryhaline tilapia, Oreochromis mossambicus. *Gen. Comp. Endocrinol.* 95, 483-495.
- Camberoy, N.B., Qunitio, G.F., 2000. Changes in Na⁺,K⁺ - ATPase activity and gill chloride cell morphology in the grouper Epinephelus coioides larvae and juveniles in response to salinity and temperature. *Fish Physiol. Bioch.* 23, 83-94.
- Cataldi, E.; Crosetti, D., Conte, G., D'Ovidio, D. e Cataudella, S., 1988. Morphological changes in the oesophageal epithelium during adaptation to salinities in Oreochromis mossambicus, O. niloticus and their hybrid. *J. Fish Biol.* 32, 191-196.
- 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.

- Cerqueira, V.R.; Mioso, R.; Macchiavello, J.A.G., Brügger, A.M., 1997. Ensaios de indução de desova do linguado Paralichthys orbignyanus Valenciennes, 1839. B. Inst. Pesca, 24 (especial), 247-254.
- Eliassen, R.A., Johnsen, H.K., Mayer, I., Jobling, M., 1998. Contrasts in osmoregulatory capacity of two Arctic charr, Salvelinus alpinus (L.), strains from northern Norway. Aquaculture 168, 255-269.
- Ferguson, H.W., Dukes, T.W., 1989. Systemic pathology of fish : a text and atlas of comparative tissue responses in diseases of teleosts. Iowa State University Press, USA, pp. 11-40 .
- Forster, R.P., Goldstein, L., 1969. Formation of Excretory Products. In: Fish Physiology. Edited by W.S. Hoar and D.J. Randall. Vol. I, Academic Press, New York.
- Hirano, T., Mayer-Gostan, N., 1976. Eel esophagus as an osmoregulatory organ. Proc. Nat. Acad. Sci. 73 (4), 1348-1350.
- Hoar, W.S., 1988. The physiology of smolting salmonids, pp. 275-343. In: Fish Physiology. Edited by W.S. Hoar and D.J. Randall. Vol. XIB, Academic Press, New York.
- Howland, K.L., Tonn, W.M., Goss, G., 2001. Contrasts in the hypo-osmoregulatory abilities of a freshwater and an anadromus population of inconnu. J. Fish Biol. 59, 916-927.
- Imsland, A.K., Gunnarsson, S., Foss, A., Stefansson, S.O., 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.
- Kaneko, T., Katoh, F., 2004. Functional morphology of chloride cells in killifish Fundulus heteroclitus, a euryhaline teleost with seawater preference. Fisheries Science 70, 723-733.
- Laurent, P., Kirsch, R., 1975. Modifications structurales de l'oesophage liées à l'osmorégulation chez l'Anguille. C. R. Acad. Sc. Paris 280 (Série D), 2227-2229.
- Mancera, J.M., McCormick, S.D. 1998. Osmoregulatory actions of the GH/IGF axis in non-salmonid teleosts. Comp. Biochem. Physiol. B 121, 43-48.
- McCormick, S.D. 1995. Hormonal control of gill Na⁺,K⁺ - ATPase and chloride cell function. Em: Fish physiology. Hoar, W.S., Randall, D.J. e Farrel, A.P. (eds.). Academic Press, San Diego, Vol. 14, pp. 285-315.

- Nielsen, C., Madsen, S.S., Björnsson, B.Th., 1999. Changes in branchial and intestinal osmoregulatory mechanisms and growth hormone levels during smolting in hatchery-reared and wild brown trout. *J. Fish Biol.* 54, 799-818.
- Pelis, R.M., McCormick, S.D., 2001. Effects of growth hormone and cortisol on Na^+ , K^+ - 2Cl^- cotransporter localization and abundance in the gills of Atlantic Salmon. *Gen.Comp. Endocrinol.* 124, 134-143.
- Robaldo, R.B., 2003. Estudo comparativo da reprodução do linguado *Paralichthys orbignyanus* Valenciennes, 1839 no ambiente e em cativeiro. Tese de Doutorado, Fundação Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 200p.
- Romão, S., Freire, C.A., Fanta, E., 2001. Ionic regulation and Na^+ , K^+ -ATPase activity in gills and kidney of the Antarctic aglomerular cod icefish exposed to dilute sea water. *J. Fish Biol.* 59, 463-468.
- Sakamoto, T., Shepherd, B.S., Madsen, S.S., Nishioka, R.S., Siharath, K., Richman III, N.H., Bern, H.A., Grau, E.G., 1997. Osmoregulatory actions of growth hormone and prolactin in an advanced teleost. *Gen. Comp. Endocrinol.* 106, 95-101.
- Sampaio, L.A., 1999. Cultivo do linguado *Paralichthys orbignyanus* (Paralichthyidae) em diferentes salinidades. Tese de doutorado, FURG, Rio Grande – RS, 149 pp.
- Sampaio, L.A., Bianchini, A., Cerqueira, V.R., 2001. Growth of juvenile brazilian flounder, *Paralichthys orbignyanus*, cultered at different salinities. *J. Appl. Aquacult.* 11(1/2), 67-75.
- Sampaio, L.A., Bianchini, A., 2002. Salinity effects on osmoregulation and growth of the euryaline flounder, *Paralichthys orbignyanus*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 269, 187-196.
- Seidelin, M., Madsen, S.S., Byrialsen, A., Kristiansen, K., 1999. Effects of insulin-like growth factor-I and cortisol on Na^+ , K^+ - ATPase expression in osmoregulatory tissues of brown trout (*Salmo trutta*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 113, 331-342.
- Stagg, R.M., Shuttleworth, T.J., 1982. Na^+ , K^+ - ATPase, ouabain binding and ouabain-sensitive O_2 consumption in gills from *Plalichthys flesus* adapted to seawater and freshwater. *J. Comp. Physiol.* 147, 93-99.
- StatSoft, Inc. (1998). STATISTICA for Windows [Computer program manual]. Tulsa, OK: StatSoft, Inc., 2300 East 14th Street, Tulsa, OK 74104, phone: (918) 749-

1119, fax: (918) 749-2217, email: info@statsoft.com, WEB:
<http://www.statsoft.com>

- Uchida, K., Kaneko, T., Tagawa, M., Hirano, T., 1998. Localization of cortisol receptor in branchial chloride cells in chum salmon fry. *Gen. Comp. Endocrinol.* 109, 175-185.
- Yamauchi, K., Nishioka, R.S., Young, G., Ogasawara, T., Hirano, T., Bern, H.A., 1991. Osmoregulation and circulating growth hormone and prolactin levels in hypophysectomized coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) after transfer to fresh water and seawater. *Aquaculture* 92, 33-42.
- Wasielesky, W.Jr., Miranda Filho, K., Bianchini, A., 1995. Tolerância do linguado *Paralichthys orbignyanus* à salinidade. *Arq. Biol. Tecnol.* 38(2), 385-395.
- Wasielesky, W.Jr., Bianchini, A., Miranda Filho, K., 1997. Tolerancia a la temperatura de juveniles de linguado *Paralichthys orbignyanus*. *Frente Marit.* 17A, 55-60.

Capítulo II

Isolamento, caracterização e expressão dos genes do hormônio do crescimento (GH) e do seu receptor (GHR) no linguado *Paralichthys orbignyanus* submetido ao choque hiperosmótico

Co-autores: Luís A. Sampaio, Michel T. Kamimura, Jomar Laurino, Luis F. Marins

Segundo normas da revista "Aquaculture"

Isolamento, caracterização e expressão dos genes do hormônio do crescimento (GH) e do seu receptor (GHR) no linguado Paralichthys orbignyanus submetido ao choque hiperosmótico

Karina M. Meier^{b,e}, , Luís A. Sampaio^c, , Michel T. Kamimura^{a,e}, Jomar Laurino^d, Luis F. Marins^{a,b,*}

^aFundação Universidade Federal do Rio Grande, Departamento de Ciências Fisiológicas, Rio Grande, RS - Brasil

^bFundação Universidade Federal do Rio Grande, Departamento de Química, Laboratório de Bioquímica Marinha, Rio Grande, RS - Brasil

^cFundação Universidade Federal do Rio Grande, Departamento de Oceanografia, Rio Grande, RS - Brasil

^dPontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Faculdade de Biociências, Centro de Biologia Genômica e Molecular, Porto Alegre, RS - Brasil

^eFundação Universidade Federal do Rio Grande, Programa de Pós-Graduação em Aqüicultura, Rio Grande, RS - Brasil

* Autor para correspondência: Fax: 55 53 2336850. Endereço eletrônico: dqmluf@furg.br

Resumo

O linguado Paralichthys orbignyanus ocorre em águas costeiras e estuarinas, desde o estado do Rio de Janeiro (Brasil) até Mar del Plata, na Argentina. É um importante recurso pesqueiro no Brasil, sendo explorado pela pesca artesanal e comercial. Possui grande potencial para a aquacultura por apresentar grande tolerância a fatores ambientais e um alto valor comercial. Embora os estuários sejam regiões consideradas próprias para a aquacultura eles apresentam amplas variações de salinidade, por isto, a capacidade dos peixes estuarinos em lidar com estas variações constitui um importante fator na tentativa de maximizar o crescimento e reprodução em cativeiro. Em peixes, muitos hormônios envolvidos no controle e regulação do crescimento, estão também ativos nos processos osmoregulatórios. Uma espécie eurialina como o linguado Paralichthys orbignyanus apresenta-se como um modelo adequado para o estudo de expressão gênica do hormônio do crescimento (GH) e seu receptor (GHR). Com isto, o objetivo deste trabalho foi verificar a ação do hormônio do crescimento na aclimação para água salgada, analisando a expressão do seu gene em diferentes salinidades. Exemplares de P. orbignyanus foram aclimatados a salinidade 11, que corresponde ao seu ponto isomótico, e depois transferidos para salinidade 35. O cDNA do hormônio do crescimento e parte da sequência do cDNA do receptor do hormônio foram isolados e seqüenciados a partir de tecidos coletados dos peixes aclimatados. A expressão do GH e do GHR foi analisada através da Transcrição Reversa – Reação em Cadeia da Polimerase (RT-PCR). Foi identificado a presença do GHR nas brânquias do linguado, e o GH apresentou uma maior expressão nos exemplares aclimatados para salinidade 30. Estes resultados parecem indicar que este hormônio possui um papel importante na osmoregulação de P. orbignyanus.

Palavras-chaves: osmoregulação; hormônio do crescimento; receptor do hormônio do crescimento, cDNA, PCR.

1. Introdução

O linguado Paralichthys orbignyanus Valenciennes, 1839 ocorre em águas costeiras e estuarinas, desde o estado do Rio de Janeiro (Brasil) até Mar del Plata, na Argentina (Figueiredo e Menezes, 2000). É um importante recurso pesqueiro no Brasil, sendo explorado tanto pela pesca artesanal como comercial e possui grande potencial para a aquacultura por apresentar um alto valor comercial e grande tolerância a fatores ambientais (Sampaio et al., 2001), tais como salinidade (Wasielesky et al., 1995), compostos nitrogenados (Bianchini et al., 1996) e estresse ácido (Wasielesky et al., 1997).

Regiões consideradas próprias para a aquacultura como os estuários, por serem ambientes fechados e protegidos (Wu e Woo, 1983), apresentam aspectos não desejáveis num cultivo como, por exemplo, as amplas variações de salinidade que podem ocasionar um estresse osmoregulatório nos peixes. A energia gasta nos processos osmoregulatórios não pode ser utilizada no crescimento e/ou reprodução, por isto, a capacidade dos peixes estuarinos lidarem com flutuações de salinidade constitui um importante fator na tentativa de maximizar o crescimento e reprodução em cativeiro (Sampaio e Bianchini, 2002). Sampaio et al. (2001) observaram que o crescimento de juvenis de P. orbignyanus foi maior no grupo aclimatado para a salinidade 30 e 11 quando comparado com o grupo mantido na salinidade 2. Num estudo posterior, Sampaio e Bianchini (2002) observaram que a sobrevivência de P. orbignyanus depois de 90 dias, não foi afetada nas salinidades de 0 e 30, porém a osmo- e ionoregulação foi significativamente afetada na água doce, sendo que os linguados mantidos neste meio apresentaram um crescimento menor quando comparados aqueles mantidos em água salgada.

Em peixes teleósteos o crescimento, desenvolvimento e a maneira como estes processo são influenciados por fatores ambientais varia entre as espécies. Como muitas delas adaptam a ingestão dos alimentos à salinidade do meio, há um indício de que esta esteja relacionada com o crescimento. Além disto, muitos hormônios (da tireóide, TH; do crescimento, GH; fator de crescimento tipo-insulina I, IGF-I, entre outros) que estão claramente envolvidos no controle e regulação do crescimento, estão também ativos nos processos osmoregulatórios (Boeuf e Payan, 2001).

O hormônio do crescimento envolvido no controle do crescimento, afeta o metabolismo de gorduras, proteínas e carboidratos; e exerce suas funções tanto diretamente sobre os órgãos alvo quanto pela estimulação da produção do fator de crescimento tipo-insulina I (IGF-I). Estudos com diferentes espécies de peixes demonstraram que o GH atua nos processos osmoregulatórios para a água salgada estimulando o aumento da atividade da enzima $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ em brânquias, aumentando desta maneira a tolerância a salinidade (Bolton *et al.*, 1987; Richman e Zaugg, 1987; Sakamoto *et al.*, 1993, 1997; Auperin *et al.*, 1995).

A nível tissular, as ações pleiotrópicas do GH resultam da interação do hormônio com seus receptores específicos (GHR “*growth hormone receptor*”) presentes na superfície das células alvo. O GHR é uma proteína de membrana que se liga ao GH com alta afinidade e especificidade, sendo que a partir desta ligação um sistema de sinalização pós-receptor é acionado, culminando com as ações biológicas características deste hormônio.

Moléculas de mRNAs do GHR têm sido encontrados em uma série de tecidos em diferentes grupos de organismos, incluindo fígado, músculo, rim, pulmão, glândula mamária, placenta e tecido adiposo. Entretanto, a expressão do GHR é específica em relação ao tipo de tecido e ao estágio de desenvolvimento em que o animal se encontra. Os fatores que controlam a expressão do GHR ainda não são bem conhecidos, mas muito dos seus efeitos são manifestados provavelmente de acordo com o nível de transcrição do gene, a qual tem um papel crítico em numerosos processos fisiológicos e patológicos (Menon *et al.*, 1995).

No entanto, o aumento na produção e liberação do GH durante os processos de aclimação de espécies eurialinas a salinidades altas, provavelmente produz um aumento na expressão dos genes de seus receptores, em tecidos relacionados à atividade osmoregulatória do animal. Embora os peixes mantidos em salinidades próximas a seu ponto isosmótico possam apresentar um maior crescimento devido ao decréscimo da energia gasta com a osmoregulação, a atuação do hormônio do crescimento na aclimação para a água salgada pode contribuir para um maior crescimento em salinidades altas devido ao aumento dos níveis deste hormônio. Em vista disto, uma espécie eurialina como o linguado *P. orbignyanus*, apresenta-se como um modelo adequado para o estudo de expressão gênica do GH e seu receptor. Desta forma, o

objetivo do presente estudo foi avaliar os níveis de expressão do GH em diferentes salinidades no linguado, P. orbignyanus.

2. Material e Métodos

Os exemplares de P. orbignyanus, de tamanho entre 18 e 26 cm, oriundos de desova ocorrida na Estação Marinha de Aquicultura - FURG no ano de 2003, foram aclimatados durante uma semana a salinidade 11, que corresponde ao ponto isosmótico desta espécie (Sampaio e Bianchini, 2002). Depois disto, vinte e quatro peixes foram transferidos para um tanque com salinidade 35 e outros vinte e quatro foram mantidos no tanque de salinidade 11. Estes tanques foram mantidos com temperatura de 24°C ($\pm 2^\circ\text{C}$), fotoperíodo 12 horas claro/12 horas escuro, com renovação diária de 100% da água e aeração constante. Durante todo o experimento foram alimentados com pedaços de peixes ad libitum, uma vez por dia. Três exemplares de cada salinidade foram coletado 3 horas, 72 horas e 7 dias após a transferência e anestesiados (benzocáína 50 ppm) para a coleta das brânquias e hipófises.

O RNA total foi extraído imediatamente após a coleta dos tecidos, com o reagente TRIzol (Invitrogen, Brasil) segundo protocolo sugerido pelo fabricante. No caso das hipófises, foram agrupados 3 indivíduos em cada tempo, nos dois tratamentos. A síntese do cDNA foi realizada através da Transcrição Reversa – Reação em Cadeia da Polimerase (RT-PCR) utilizando a enzima SuperScript™ III (Invitrogen) segundo protocolo sugerido pelo fabricante. Para o isolamento do cDNA do hormônio do crescimento e seu receptor foram desenhados *primers* degenerados (Tabela I) sobre regiões conservadas destes genes, encontradas a partir do alinhamento de seqüências do GH e do GHR de outras espécies de peixes disponíveis no *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Para isolamento do GHR foi realizada uma primeira PCR com o *primer* específico GHR₁₂-FOR (*sense*) contra o *primer* UP (*anti-sense*) desenhado sobre a região 3' do gene, utilizando como molde o cDNA obtido de uma das brânquias coletadas. O produto desta primeira PCR foi utilizado como molde para uma segunda PCR, utilizando novamente o *primer* GHR₁₂-FOR contra um *primer* específico *anti-sense* mais interno, o GHR₁₃-REV. As condições da PCR foram as seguintes: um ciclo de desnaturação de 3 minutos a 94° C, seguido por 35 ciclos de

desnaturação por 1 minuto a 94° C, hibridização por 1 minuto e 30 segundos a 50° C, extensão por 2 minutos a 72° C e finalmente um ciclo de extensão final de 72° C por 15 minutos.

Para isolamento do cDNA do hormônio do crescimento foi utilizado o *primer* EXO1 (*sense*) e o *primer* UP. O *primer* específico EXO1 foi desenhado com base no alinhamento de seqüências de GH de *Acanthopterygii* disponíveis no *GenBank*. O programa utilizado para amplificar a molécula foi o seguinte: um ciclo de desnaturação de 1 minuto a 94° C, seguido por 30 ciclos de desnaturação de 30 segundos a 94° C, hibridização por 1 minuto e 30 segundos a 50° C, extensão por 1 minuto a 72° C e finalmente um ciclo de extensão final de 72° C por 5 minutos.

Os produtos da PCR foram observados em gel de agarose 1% e as bandas de tamanho apropriado foram extraídas com o CONCERT™ Rapid Gel Extraction Systems (Invitrogen, Brasil), e clonadas com o kit TOPO® TA Cloning (Invitrogen, Brasil), segundo protocolo fornecido pelo fabricante. Para extração do plasmídeo foi utilizado um kit da Invitrogen: CONCERT™ Rapid Plasmid Purification Systems (Brasil), com o protocolo sugerido pelo fabricante. O fragmento de cDNA ligado ao pCR®4 – TOPO foi sequenciado em um seqüenciador capilar automático (MegaBace 1000, Amersham Pharmacia) do Centro de Biologia Genômica e Molecular da Pontifícia Universidade Católica (PUC - Porto Alegre, RS).

A análise de expressão do GH foi realizada através do método RT-PCR semi-quantitativa e as condições para amplificação foram as mesmas utilizadas para o isolamento do gene. Estudos iniciais usando diferentes números de ciclos indicaram que 22 ciclos seriam suficientes para a amplificação do GH, de forma que esta permanecesse dentro do limite linear da quantidade de produto gerada na PCR. O gene da β -actina foi utilizado como controle interno para normalização dos dados (Chelly *et al.*, 1988). Para que a amplificação da β -actina permanecesse dentro do limite linear de amplificação da PCR foram realizados estudos prévios que determinaram as seguintes condições: um ciclo de desnaturação de 1 minuto a 94° C, seguido por 35 ciclos de desnaturação por 30 segundos a 94° C, hibridização por 30 segundos a 50° C, extensão por 1 minuto a 72° C e finalmente um ciclo de extensão final de 72° C por 5 minutos; utilizando os primers BAC-FOR e BAC-REV (Tabela 1). Para evitar interferentes, o cDNA da β -actina foi diluído cinco vezes.

Os produtos das PCRs foram analisados em gel de agarose 1,5% e corados com Brometo de Etídeo. Os géis foram fotografados, suas imagens capturadas e analisadas através do programa UVIDoc Version 98.01 for Windows. Depois de sequenciadas, as sequencias foram alinhadas usando o programa CLUSTAL X (Thompson *et al.*, 1997).

Tabela 1. Sequência dos *primers* utilizados para o isolamento dos cDNAs do hormônio do crescimento e seu receptor.

Primers	Seqüência
GHR ₁₂ -FOR	5' – CGA CGA CTC CTG GGT TGA RTT YGT HGA – 3'
GHR ₁₃ -REV	5' – TGT CGG ACA CCT GGG CRT ARA ART C – 3'
UP-REV	5' – CUA CUA CUA CUA GGC CAC GCG TCG ACT AGT – 3'
EXO1	5' - CCC AGA CCA GCC ATG GAC AGA - 3'
BAC-FOR	5' - ACH AAC TGG GAY GAY ATG G - 3'
BAC-REV	5' - TAG ATG GGB ACD GTG TGG G - 3'

3. Resultados

O cDNA do GH (Figura 1) apresentou uma região codificante de 573 nucleotídeos, sendo a região 3' não traduzida (3' UTR) formada por 147 nucleotídeos que contém um sítio de poliadenilação (AATAAA). O peptídeo sinal apresenta 17 aminoácidos e a forma madura do hormônio apresenta 173, num total de 190 aminoácidos. Os primeiros 17 aminoácidos da região N-terminal do hormônio são altamente hidrofóbicos e também têm um alto grau de homologia com o peptídeo sinal de outros GHs de peixes. Desta forma, foi assumido que esta região efetivamente representa o peptídeo sinal do GH não maduro de *P. orbignyanus*, o qual é clivado enzimaticamente após a secreção do hormônio.

O hormônio apresenta aspectos típicos do GH, tais como quatro cisteínas em posições conservadas que formam duas pontes dissulfeto, que contribuem para formação da estrutura terciária da molécula, um único triptofano e seqüências de aminoácidos altamente conservados em todos GHs conhecidos. Apresenta somente um sítio potencial de glicosilação na Asn¹⁸⁶, formado pela seqüência Asn-Cys-Thr. A forma madura do hormônio inicia com uma glutamina (Q) (Marins, 2001). A similaridade da seqüência de aminoácidos de *P. orbignyanus* comparada com aquelas de outros GHs

maturas de peixes está relacionada na Tabela 2. Podemos observar no alinhamento do GH do P. orbignyanus com GHs de outros peixes (Fig. 3) que as espécies do gênero Paralichthys apresentam uma deleção que parece ser típica do grupo, não aparecendo nas outras espécies analisadas. A seqüência parcial do receptor do GH pode ser observada na Fig. 2, sua similaridade com outras seqüências na Tabela 3 e o alinhamento destas seqüências na Fig. 4.

```

1 atggacagagtcacacctcctgctgtcagtcagtcagtggtggtggcgctgcctctcagccaatc
  M D R V I L L L S V M C V G V S S ↑ Q P I 20
61 acagagtaccagcgcctgttctcgatcgctggtgagtcagttcagtatcttcacctgggtt
  T E Y Q R L F S I A V G R V Q Y L H L V 40
121 gctaagaaactcttcagtgactttgagaactctctacagttggaggatcaacgtcaactc
  A K K L F S D F E N S L Q L E D Q R Q L 60
181 aacaaaatcttttaaaagatTTTTgtcattcagattatttcttgagtccaatcgacaaa
  N K I F L K D F (C) H S D Y F L S P I D K 80
241 cacgagacacaacgcagctcagttcagaagctttatcgatctcttatcgattgattgag
  H E T Q R S S V Q K L L S I S Y R L I E 100
301 tcctgggagttttccagtcgctttctggctgcaagttttgctgtgaggaccaaggttaca
  S W E F S S R F L V A S F A V R T K V T 120
361 tctaaactgtcagaactgaagacgggtctcatgaagctgatagaggccaatcaggacgga
  S K L S E L K T G L M K L I E A N Q D G 140
421 gcaggtggattctctgagagttcgggtgctccagctcacgccgtacggaaactacgaactg
  A G G F S E S S V L Q L T P Y G N Y E L 160
481 ttgcctgctttaagaagatgacacaaggtggagacgtacctgacctggcctaaatgc
  F A (C) F K K D M H K V E T Y L T V A K (C) 180
541 cgactctttccagaagtaactgcaccctgtaacctcgctctccgcccagaaaaatgca
  R L F P E A (N (C) T) L * 190
601 ttctgtagcgggacccctgtggttgccgagtcctgttaactagcattaatgtagcatctg
661 ttggttctagattccaactaatgatgtcattgtgatgtcactgtcagcaaataaagag
721 ttcattcagtcaaaaaaaaaaaaaaaaaa

```

Fig. 1. Seqüência nucleotídica do cDNA do GH de Paralichthys orbignyanus e a seqüência de aminoácidos deduzida. Os nucleotídeos estão numerados no lado esquerdo, e os aminoácidos no lado direito. A seta indica o possível sítio de clivagem para o peptídeo sinal; os círculos indicam as cisteínas do hormônio maturo; o asterisco indica o códon de terminação; o retângulo indica o sítio de glicosilação em potencial e o sublinhado indica o sinal de poliadenilação.

5' -cgactcctggggttgaattcgtagaggtggatgccgaggacgcaggtgccgatgacaaaga
D S W V E F V E V D A E D A G A D D K D
cgaccaagaggcgtccgacacccagaggcttctcagtctgcccccaaccaggcagccgcca
D Q E A S D T Q R L L S L P Q P G S R Q
gatgagcaccagatgttcaaatgccatcagcttcctgatgacgactcaggcagggcgag
M S T R C S N A I S F P D D D S G R A S
ctgttacgaccagatgtcctggatcatgacgctctcgtgctgacggccacgctgctgcc
C Y D P D V L D H D A L A A T A T L L P
aggtcagcccgagaacagacacgcacatcctttgatactgaagatggagccccaccctgtc
G Q P E N R H A S F D T E D G A P T L S
caacctcgtccaaacccaaagtccgggacccccacacttgggtcaacacggacttctacgc
N L V Q T Q S P G P H T W V N T D F Y A
ccaggtgtccgaca-3'
Q V S D

Fig. 2. Seqüência nucleotídica parcial do cDNA do receptor do hormônio do crescimento (GHR) de Paralichthys orbignyanus e a seqüência parcial de aminoácidos deduzida.

Tabela 2. Similaridades observadas entre o hormônio do crescimento (GH) maturo de Paralichthys orbignyanus e GHs de outros peixes.

Espécie	Similaridade
<u>Paralichthys olivaceus</u>	92%
<u>Hippoglossus hippoglossus</u>	85%
<u>Verasper variegatus</u>	85%
<u>Sparus aurata</u>	71%


```

P.olivaceus      QPITENQRLFSIAVGRVQYLHLVAKKLFSDFENSLQLEDQRLNKLASKEFCHSDNFLSP
P.orbigyanus    QPITEYQRLFSIAVGRVQYLHLVAKKLFSDFENSLQLEDQRLNKLIFLQDFCHSDYFLSP
H.hippoglossus QPITENQRLFSIAVGRVQYLHLVAKKLFSEFENS-QLEDQHPLNKIFLQDFCHSDYFLSP
V.variegatus    QPITENQRLFSIAVGRVQYLHLVAKKLFSEFENS-QLEDQHPLNKIFLQDFCHSDYFLSP
S.aurata        QPITDQRLFSIAVSRVQHLHLAQLRFLSDFESSLQTEDQRLNKLIFLQDFCNSDYIISP
*****.****:***:***:***:***:***.* * ***: **** :***:** :***

P.olivaceus      IDKHETQGSVQKLLSVSYRLIESWEFFSRFLVASFVARTQVTSKLSSELMGLLKLIEAN
P.orbigyanus    IDKHETQRSSVQKLLSISYRLIESWEFFSRFLVASFVARTKVTSKLSSELTGLMKLIEAN
H.hippoglossus IDKHETQRSSVLKLLSISYRLIESWEFFSRFLVAGFAERAQVTSKLSSELTGLMKLIEAN
V.variegatus    IDKHETQRSSVLKLLSISYRLIECWEFFSRFLVAGFAERAQVTSKLSSELTGLMKLIEAN
S.aurata        IDKHETQRSSVLKLLSISYRLVESWEFFSRSLSGGSAPRNQISPKLSELTGIHLLIRAN
***** ** * ***:***:*.* ** * * . . * * :.:***** *: **.*

P.olivaceus      QDGAGGFSESSVLQLTPYG-----NSELFACFKKDMHKVETYLTVAKCRLF
P.orbigyanus    QDGAGGFSESSVLQLTPYG-----NYELFACFKKDMHKVETYLTVAKCRLF
H.hippoglossus QDGAGGFSESSVIQLTPYGNYYQSVGVDSEFRRNLYELFACFKKDMHKVETYLTVAKCRLS
V.variegatus    QDGAGGFSESSVIQLTPYGNYYQSVGVDSEFRNLNYELFACFKKDMHKVETYLTVAKCRLS
S.aurata        EDGAEIFPDSSALQLAPYGNYYQSLGTDSELRRTYELLACFKKDMHKVETYLTVAKCRLS
:*** *.:***.:***:*** . **:******

P.olivaceus      PEANCTL
P.orbigyanus    PEANCTL
H.hippoglossus PEANCTL
V.variegatus    PEANCTL
S.aurata        PEANCTL
*****

```

Fig. 3. Alinhamento da sequência do hormônio do crescimento (GH) maduro do linguado *Paralichthys orbigyanus* com outras seqüências de GHs de peixes obtidas no GenBank: *Paralichthys olivaceus* (AAB27625), *Hippoglossus hippoglossus* (BAC07253), *Verasper variegatus* (AAC36716) e *Sparus aurata* (AAK71496).

Tabela 3. Similaridades observadas entre a seqüência parcial do receptor do hormônio do crescimento (GHR) de *Paralichthys orbigyanus* e GHRs de outros peixes.

Espécie	Similaridade
<i>Scophthalmus maximus</i>	59%
<i>Paralichthys olivaceus</i>	53%
<i>Sparus aurata</i>	57%

```

S.maximus      DEPWFVEFIELDTEDADSGEKEDNQGSQTQRLRLALSQPVSHHMNIGCSNAISFPDDDSGRA
P.olivaceus    DEPWFVEFIDVNAEDADAGEKEDNQGSQTQRLRLGLPQHVSHHMNSGCSNTIGFPDDDSGRA
S.aurata       DEPWFVEFIEVDAEDADAAEKEENQGSQTQRLRLDPPQPVSHHMNTGCANAVSFPDDDSGRA
P.orbigyanus   DSWVEFVEVDAEDAGADKDDQEASDTQRLRLSLPQPGSRQMSTRCSNAISFPDDDSGRA
               :.*****:***.: :*****. * *:*.* *:*:*****

S.maximus      SCYDPDLLDQETLMLMATLLPGQPEGGEASLDVEEGASASER---SKRALIQQTAGFQ
P.olivaceus    SCYDPDVLHDHTLMMATLLPGQPEDEEASLAVEEDSLAVEEGVSTERTLIQTQTGFQ
S.aurata       SCYDPDLHDQDTLMLMATLLPGQPEDGEDSFDVVERAPVIER---SERPLVQTQTGGFQ
P.orbigyanus   SCYDPDVLHDHALAATATLLPGQPENRHASFDTEGAPTLSN-----LVQTQSPGFH
               *****: *:*.* *****. . *:. : . . . *:*:* **

S.maximus      TWVNTDFYAQVSN
P.olivaceus    TWVNTDFYAQVSN
S.aurata       TWLNTDFYAQVSN
P.orbigyanus   TWVNTDFYAQVSD
               **:*****:

```

Fig. 4. Alinhamento da seqüência parcial do receptor do hormônio do crescimento (GHR) de Paralichthys orbigyanus com outras seqüências de GHRs de peixes obtidas no GenBank: Scophthalmus maximus (AAK72952), Paralichthys olivaceus (BAD02483), e Sparus aurata (AAM00431).

A análise de expressão do GH apresentou um aumento na expressão de 14% nos indivíduos expostos a salinidade 30 após 3 horas da transferência. No sétimo dia os indivíduos da salinidade 30 ainda apresentavam uma indução, porém de apenas 6% (Fig. 5).

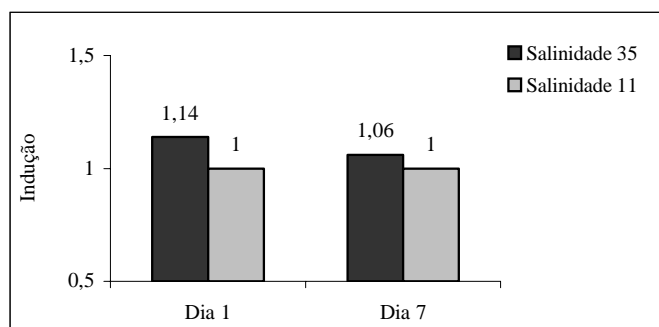


Fig. 5. Expressão do gene do hormônio do crescimento (GH) em hipófises de Paralichthys orbigyanus aclimatados em diferentes salinidades.

4. Discussão

O presente trabalho sugere uma ação osmoregulatória do hormônio do crescimento no linguado P. orbignyana devido ao aumento na expressão gênica do hormônio nos indivíduos aclimatados para alta salinidade, quando comparados com os indivíduos mantidos na salinidade correspondente ao seu ponto isosmótico. Outro indício da atuação do GH na osmoregulação desta espécie é a presença comprovada do mRNA do receptor do hormônio do crescimento nas brânquias deste linguado, visto que a brânquia é um dos principais sítios de troca de íons na osmoregulação (Hoar, 1988). Com resultados semelhantes, Pelis e McCormick (2001), estudando a abundância do cotransportador $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$, que atua junto com a Na^+ , $\text{K}^+\text{-ATPase}$ no transporte dos íons, demonstraram que o GH, junto com o cortisol, aumenta os níveis deste cotransportador durante a aclimação para a água salgada do salmão atlântico Salmo salar.

Estudos morfológicos com a tilápia Oreochromis mossambicus indicaram uma maior atividade nas células de GH na hipófise dos juvenis de tilápias aclimatados a água salgada, quando comparados com os juvenis aclimatados para a água doce. No mesmo estudo foi comprovado a habilidade do GH exógeno de estimular a atividade da Na^+ , $\text{K}^+\text{-ATPase}$, sugerindo que o GH desempenha um importante papel na aclimação para água salgada nesta espécie (Borski et al., 1994). Porém não foram encontradas diferenças significativas entre os níveis de expressão do GH em indivíduos desta mesma espécie aclimatados a diferentes condições de salinidade (Mancera e McCormick, 1998). Sakamoto et al. (1997) observaram que o GH diminui a osmolalidade do plasma através da estimulação da atividade da Na^+ , $\text{K}^+\text{-ATPase}$ nas brânquias após transferência de O. mossambicus para água salgada. Corroborando com estes resultados, estudos têm indicado que o eixo GH/IGF-I, através de suas ações somatotrópicas, facilita a aclimação à água salgada em salmonídeos e em outros teleósteos, comprovado através de um visível aumento na expressão do IGF-I nos órgãos osmoregulatórios durante aclimação para a água salgada (Sakamoto e Hirano, 1993; Inoue et al., 2003).

Imsland et al. (2003) num estudo da habilidade osmoregulatória do linguado Scophthalmus maximus observaram que na salinidade 15 havia uma menor atividade da

Na⁺, K⁺-ATPase, menor concentração do íon Cl⁻ e menor osmolalidade, e que esta salinidade correspondia ao maior crescimento e maior eficiência na taxa de conversão alimentar. Seus resultados corroboram a hipótese de que em salinidade média e temperatura ótima, a redução da atividade da Na⁺, K⁺-ATPase reduz a energia gasta com a osmoregulação permitindo que esta seja deslocada para o crescimento. Embora tenha se observado uma relação entre um maior crescimento e uma menor atividade da enzima em salinidades médias, não é possível quantificar o quão direta é a relação entre estes dois parâmetros.

Possivelmente o envolvimento do GH na osmoregulação do linguado P. orbignyana justifique os resultados encontrados por Sampaio *et al.* (2001) e Sampaio e Bianchini (2002) onde o crescimento de juvenis de P. orbignyana foi o maior nos grupos aclimatados para a salinidade 30 e salinidade 11, em relação ao grupo mantido na salinidade 2. Isto porque, além de atuar na osmoregulação, o GH pode estar estimulando o crescimento e o metabolismo dos indivíduos aclimatados a alta salinidade, da mesma maneira que Yada *et al.* (2001) verificou que salmonídeos aclimatados a alta salinidade apresentavam um aumento das funções imunes, outra ação típica do GH.

5. Agradecimentos

Os autores são gratos a Cladinara Roberts Sarturi (Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul) pela assistência técnica no sequenciamento dos cDNAs. Este trabalho foi realizado com auxílio da Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS, Proc. No. 01/1602.5) e FURG (Fundação Universidade Federal do Rio Grande, Brasil).

6. Referências

Auperin, B., Leguem, I., Rentier-Delrue, F., Smal, J., Prunet, P., 1995. Absence of a tiGH effect on adaptability to brackish water in tilapia (*Oreochromis niloticus*). Gen. Comp. Endocrinol. 97, 145-159.

- Bianchini, A., Wasielesky, W.Jr., Miranda Filho, K., 1996. Toxicity of nitrogenous compounds to juveniles of flatfish Paralichthys orbignyanus. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 56, 453-459.
- Boeuf, G., Payan, P., 2001. How should salinity influence fish growth? Comp. Biochem. Physiol. C 130, 411-423.
- Bolton, J.P., Collie, N.L., Kawachi, H., Hirano, T., 1987. Osmoregulatory actions of growth hormone in rainbow trout (Salmo gairdneri). J. Endocrinol. 112, 63-68.
- Borski, R.I., Yoshikawa, T., Madsen, S.S., Nishioka, R.S., Zabetian, C., Bern.,H.A., Grau, E.G., 1994. Effects of environmental salinity on pituitary growth hormone content and cell activity in the euryhaline tilapia Oreochromis mossambicus. Gen. Comp. Endocrinol. 95, 483-495.
- Chelly, J., Kaplan, J.C., Maire, P., Gautron, S., Kahn, A., 1988. Transcription of the dystrophin gene in human muscle and nonmuscle tissue. Nature 333, 858-860.
- Figueiredo, J.L., Menezes, N.A., 2000. Manual de peixes marinhos do sudeste do Brasil Universidade de São Paulo, São Paulo, Volume VI.
- Hoar, W.S., 1988. The physiology of smolting salmonids, pp. 275-343. In: Fish Physiology. Edited by W.S. Hoar and D.J. Randall. Vol. XIB, Academic Press, New York.
- Imslund, A.K., Gunnarsson, S., Foss, A., Stefansson, S.O., 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.
- Inoue, K., Iwatani, H. Takei, Y., 2003. Growth hormone and insulin-like growth factor I of a euryhaline fish Cottus kazika: cDNA cloning and expression after seawater acclimation. Gen. Comp. Endocrinol. 131, 77-84.
- Mancera, J.M., McCormick, S.D., 1998. Osmoregulatory actions of the GH/IGF axis in non-salmonid teleosts. Comp. Biochem. Physiol. B 121, 43-48.
- Marins, L.F., 2001. Estudos sobre o gene do hormônio do crescimento do peixe-rei marinho, Odontesthes argentinensis (Atheriniformes, Atherinopsidae): isolamento, caracterização, análise comparativa e avaliação funcional através da técnica de transferência de genes. Tese de Doutorado, FURG, Rio Grande – RS, 153 pp.
- Menon, R.K., Stephan, D.A., Singh, M., Morris, S.M., Jr., Zou, L., 1995. Cloning of the promoter-regulatory region of the murine growth hormone receptor gene.

- Identification of a developmentally regulated enhancer element. *J. Biol. Chem.* 270, 8851-8859.
- Pelis, R.M., McCormick, S.D., 2001. Effects of growth hormone and cortisol on Na⁺, K⁺-2Cl⁻ cotransporter localization and abundance in the gills of Atlantic Salmon. *Gen. Comp. Endocrinol.* 124, 134-143.
- Richman, N.H., Zaugg, W.S., 1987. Effects of cortisol and growth hormone on osmoregulation in pre- and desmoltified coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 65, 189-198.
- Sakamoto, T., Hirano, T., 1993. Expression of insulin-like growth factor I gene in osmoregulatory organs during seawater adaptation of the salmonid fish: Possible mode of osmoregulatory action of growth hormone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 1912-1916.
- Sakamoto, T., McCormick, S.D., Hirano, T., 1993. Osmoregulatory actions of growth hormone and its mode of action in salmonids: a review. *Fish Physiol. Biochem.* 11, 155-164.
- Sakamoto, T., Shepherd, B.S., Madsen, S.S., Nishioka, R.S., Siharath, K., Richman III, N.H., Bern, H.A., Grau, E.G., 1997. Osmoregulatory actions of growth hormone and prolactin in an advanced teleost. *Gen. Comp. Endocrinol.* 106, 95-101.
- Sampaio, L.A., Bianchini, A., Cerqueira, V.R., 2001. Growth of juvenile brazilian flounder, *Paralichthys orbignyanus*, cultered at different salinities. *J. Appl. Aquacult.* 11(1/2), 67-75.
- Sampaio, L.A., Bianchini, A., 2002. Salinity effects on osmoregulation and growth of the euryaline flounder *Paralichthys orbignyanus*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 269, 187-196.
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., Higgins, D.G., 1997. The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 24, 4876-4882.
- Wasielesky, W.Jr., Bianchini, A., Miranda Filho, K., 1997. Tolerancia a la temperatura de juveniles de linguado *Paralichthys orbignyanus*. *Frente Marit.* 17A, 55-60.
- Wasielesky, W.Jr., Miranda Filho, K. e Bianchini, A., 1995. Tolerância do linguado *Paralichthys orbignyanus* à salinidade. *Arq. Biol. Tecnol.* 38(2), 385-395.

- 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.
- Yada, T., Azuma, T., Takagi, Y., 2001. Stimulation of non-specific immune functions in seawater-acclimated rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, with reference to the role of growth hormone. *Comp. Biochem. Physiol. B* 129, 695-701.

Discussão Geral

A maioria dos teleósteos examinados até hoje mostram um aumento na atividade da Na^+, K^+ -ATPase com aumento da salinidade (McCormick, 1995). Porém, existem algumas exceções, onde aumento da atividade desta enzima é maior quando estes são expostos a água doce. Isto normalmente acontece com peixes de origem marinha, como é o caso do *P. orbignyanus*, que segundo Sampaio e Bianchini (2002), apresenta maior atividade da enzima nos peixes aclimatados a água doce. A estratégia para a regulação da atividade da Na^+, K^+ -ATPase provavelmente reflete sua origem evolutiva, a frequência e magnitude das mudanças de salinidade e temperatura encontradas em seu ambiente natural. Considerando que as análises da atividade da Na^+, K^+ -ATPase são feitas *in vitro*, que esta desempenha um papel tanto na hipo- como na hiper-regulação (Kaneko e Katoh, 2004), e que seus mecanismos de transporte de íons são muito complexos, envolvendo vários transportadores (Romão et al., 2001), torna-se difícil obter uma relação direta entre a atividade da Na^+, K^+ -ATPase em brânquias e a salinidade a que o peixe está exposto.

Possivelmente a origem marinha do *P. orbignyanus* explique sua grande tolerância às mudanças de salinidade acima do seu ponto isosmótico, por possuir mecanismos já bem desenvolvidos capazes de osmoregular sem grandes alterações morfológicas e enzimáticas. O presente trabalho sugere uma ação osmoregulatória do hormônio do crescimento no linguado *P. orbignyanus* devido ao aumento na expressão gênica do hormônio nos indivíduos aclimatados para alta salinidade, quando comparados com os indivíduos mantidos na salinidade correspondente ao seu ponto isosmótico. Outro indício da atuação do GH na osmoregulação desta espécie é a presença comprovada do mRNA do receptor do hormônio do crescimento nas brânquias deste linguado, visto que a brânquia é um dos principais sítios de troca de íons na osmoregulação (Hoar, 1988). Porém os mecanismos de atuação do GH podem não estar relacionados com o aumento da atividade da ATPase, visto que esta se mantém praticamente constantes quando esta espécie é transferida para altas salinidades. Provavelmente o GH aumente a tolerância destes peixes à água salgada através de outros co-transportadores ou de outros mecanismos não discutidos no presente estudo.

Referências

- Hoar, W.S., 1988. The physiology of smolting salmonids, pp. 275-343. In: Fish Physiology. Edited by W.S. Hoar and D.J. Randall. Vol. XIB, Academic Press, New York.
- Kaneko, T., Katoh, F., 2004. Functional morphology of chloride cells in killifish *Fundulus heteroclitus*, a euryhaline teleost with seawater preference. Fisheries Science 70, 723-733.
- McCormick, S.D. 1995. Hormonal control of gill Na⁺,K⁺ - ATPase and chloride cell function. Em: Fish physiology. Hoar, W.S., Randall, D.J. e Farrel, A.P. (eds.). Academic Press, San Diego, Vol. 14, pp. 285-315.
- Romão, S., Freire, C.A., Fanta, E., 2001. Ionic regulation and Na⁺, K⁺-ATPase activity in gills and kidney of the Antarctic aglomerular cod icefish exposed to dilute sea water. J. Fish Biol. 59, 463-468.
- Sampaio, L.A., Bianchini, A., 2002. Salinity effects on osmoregulation and growth of the euryhaline flounder, *Paralichthys orbignyanus*. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 269, 187-196.

Conclusões

Considerando os exemplares de *P. orbignyana* aclimatados a diferentes salinidades:

- Não houve alterações nos tecidos relacionados a osmoregulação após o choque salino.
- Não houve alterações na atividade da Na^+ , K^+ -ATPase das brânquias, nos diferentes tratamentos.
- Houve um aumento na expressão do gene do hormônio do crescimento nos indivíduos aclimatados para alta salinidade, fato que comprova o envolvimento deste hormônio nos processos osmoregulatórios de *P. orbignyana*.
- Comprovou-se a presença de mRNA do receptor do hormônio do crescimento nas brânquias de *P. orbignyana*, o que indica a possível presença do receptor na membrana das células branquiais, corroborando a hipótese de que o hormônio tem atuação neste tecido.