

Universidade do Algarve  
Faculdade de Ciências do Mar e do Ambiente

Tolerância à amónia e grau de ureotelia no  
Xarroco, *Halobatrachus didactylus* (**Bloch &  
Schneider, 1801**)

Vera Leal De Almeida Pereira Jordão

Mestrado em Biologia Marinha



Faro 2008

Universidade do Algarve  
Faculdade de Ciências do Mar e do Ambiente

Tolerância à amónia e grau de ureotelia no  
Xarroco, *Halobatrachus didactylus* (**Bloch &  
Schneider, 1801**)

Vera Leal De Almeida Pereira Jordão

Mestrado em Biologia Marinha

Orientadores: Professora Doutora Teresa Modesto  
Doutor Pedro Miguel Guerreiro

Faro 2008

**O trabalho apresentado é da exclusiva responsabilidade do autor,**

**Vera Leal De Almeida Pereira Jordão**

## **AGRADECIMENTOS**

**Os meus agradecimentos não poderiam deixar de ser para todos aqueles que me acompanharam e apoiaram ao longo destes meses, bem como ao longo destes anos e que fizeram com que a minha passagem pela Universidade do Algarve fosse sem dúvida alguma um marco importantíssimo na minha vida...**

### **A TODOS...UM MUITO OBRIGADO...**

Á Professora Doutora Teresa Modesto, agradeço toda a disponibilidade e paciência que teve desde a altura em que era minha professora até este momento. Obrigado pelas palavras sempre simpáticas que teve para comigo.

Ao Doutor Pedro Guerreiro, meu “querido” orientador. Se tivesse de agradecer tudo o que fizeste por mim, fazia uma outra tese. Obrigado por tudo o que me ensinaste. Obrigado por todos os conselhos, sempre bem vindos. Obrigado pela paciência (que foi muita) que tiveste ao longo destes meses. Obrigado pela boa disposição que sempre demonstras-te ao longo deste tempo. Obrigado pela companhia em todos os momentos de espera infundável. Obrigado pela amizade que nasceu entre nós.

**MUITO OBRIGADO POR TUDO!!!**

Ao João Sendão, pela ajuda dada nas montagens dos circuitos, bem como o facto de me teres perdoado todas as asneiras feitas no LEOA. Obrigado pelas palavras simpáticas e amigas em momentos de mais irritação... E o nosso jantar, vai ou não vai???

Ao Isidoro Costa e ao Grupo de investigação pesqueira, pela ajuda disponibilizada durante a captura dos exemplares.

Aos Dr. John Barimo, Prof. Patrick Walsh, Prof. Chris Wood por terem iniciado as experiencias com o xarroco que levaram a este projecto e por terem sido Co-responsáveis pelos dados preliminares.

Ao pessoal do laboratório 2.28, pelas ajudas que foram dando ao longo destes meses, em especial à Elsa e ao Peter. Obrigado Elsinha pela enorme paciência que tiveste comigo em tudo, desde a realização dos RIAs até às pequenas coisinhas das quais eu tinha sempre dúvidas. Obrigado Peter pela corecção do meu abstract.

Ao pessoal do Ramelhete por ter cuidado dos meus peixes.

**Aos meus grandes e bons amigos adquiridos ao longo destes cinco anos...com cada um de vocês aprendi muito...**

Obrigado a todas as pessoas que pertencem aquele ano, a que chamam Ano Fantástico de BMP!!! Passamos por muitos e bons momentos...Obrigado por todos eles...Foram todos especiais...

Ao Ricardo (Esbro), meu querido maninho... Obrigado por tudo o que fizeste por mim, não só neste momento complicado, mas também por tudo o que fizeste ao longo destes anos. Obrigado por seres o amigo que és, obrigado por me lembrares das minhas

responsabilidades sempre que foi necessário. Obrigado por essa amizade enorme que sempre demonstraste por mim...

Ao João (Ratão), meu querido amigo e companheiro de sempre...Obrigado por tudo o que me ensinaste ao longo destes anos. Obrigado pelas palavras sempre carinhosas em momentos mais difíceis...Obrigado por seres a pessoa que és... Obrigado por me teres ensinado que nem sempre a vida é tão fácil, como eu faço parecer... Obrigado por seres meu amigo...

Á Ângela (Titi), minha mais linda amiga...Não sei por onde começar a agradecer, já são tantos anos de uma amizade tão grande que me é impossível escrever aqui a gratidão que sinto por ti...Minha sempre amiga do coração...Obrigado por essa amizade que não tem limites...Obrigado por teres feito de mim uma pessoa melhor...

Á Débora, Debinha...minha amiga maluca e tão parecida comigo...Obrigado por todos os momentos que partilhamos juntas...Obrigado por todos os bons conselhos que me deste ao longo destes anos...Obrigado por todas as palavras sinceras que sempre tiveste para comigo...Obrigado por esse sorriso e alegria sempre presente...

Ao João (Samurai), por todos aqueles momentos de palhaçada, por todos os momentos em que precisei de ti...por estares sempre presente... Obrigado pela nossa amizade...

Ao Pedro (King), por todos os disparates que ele diz, que deixa qualquer pessoa bem disposta...Obrigado por essa alegria constante...Obrigado pelas palavras sempre queridas...Obrigado meu Reizinho...

Ao Rui (Pgem), por seres tão “gozão” e me divertires tanto...Pela amizade que temos...Por estares sempre preocupado comigo...Obrigado amigo que não dizes os L’s...

Á Xaninha, por todas as horas que despendeste por minha causa...Obrigado por toda a ajuda dada nestes meses...Obrigado por não deixares que eu fizesse mais estragos...Obrigado por tudo...

Á Pinta, Pintinha, Pintarolas, pela preocupação constante sobre o meu bem estar...Obrigado pelas palavras de ânimo (que bem precisei) que me deste ao longo deste tempo...Obrigado por todos os momentos passados ao longo destes anos...

Á Rita Catita, pela doçura que tens e que eu tanto adoro...Obrigado amiguinha por todos os bons momentos passados...

Á Di (Princesa Di), Mónica, Pipolândia (e seu princeso), por todas as horas passadas na casa mais acolhedora de Gambelas...Di, Obrigado pela tua sinceridade em relação a todos os assuntos...Mónica, Obrigado por me proporcionares grandes momentos de riso...Pipinha, maninha de sempre Obrigado por seres como és, Fantástica...

Á Mafalda e Salabert, por serem tão queridas...

Á Celine e Maria Albertina, por essa boa disposição e por conseguirem fazer mais asneiras que eu, principalmente tu Maria Alberta...Obrigado às duas...

Ao Paulo (Epá) obrigado pela ajuda dada ao longo destes meses no laboratório. Obrigado pelas muitas horas passadas juntos em dias de amostragem. Obrigado por toda a ajuda...

Á Florzinha, obrigado pela tua ajuda preciosa nestas horas finais...

Á Sandrina, obrigado pelas horas de riso que me proporcionas-te nestas últimas semanas... que bem me fizeram...

**Á minha família toda, um muito obrigado por tudo...**

Em especial...

Aos meus pais, por tudo o que fizeram por mim, sem vocês isto tinha sido impossível...Obrigado pelas palavras sempre carinhosas, obrigado pelo carinho, obrigado pelos sorrisos, obrigado pelas palavras de incentivo, obrigado pelas chamadas de atenção (que são muitas) mas sempre com razão, obrigado por tudo, vocês fizeram de mim o que sou hoje...Obrigado...Pai e mãe vocês são os melhores...MUITO OBRIGADO!

Á minha irmã, obrigado maninha por seres tão especial na minha vida...Obrigado por existires...

Um muito obrigado especial, á minha avó Celeste a ao meu avô Nuno, vocês são os melhores avós do mundo...Obrigado pelo carinho que sempre me deram...

Por último, mas não menos importante...Obrigado David, meu namorado, meu companheiro de todas as horas...Obrigado pela paciência gigante que tiveste comigo ao longo deste tempo...Meu alento em todas as horas difíceis e desesperantes... Obrigado meu querido...

## RESUMO

A amónia é o principal produto de excreção do metabolismo de nitrogénio, sendo a maioria dos peixes teleósteos pouco tolerantes a ambientes com elevadas concentrações de amónia. No entanto, alguns peixes apresentam uma elevada tolerância à amónia ambiental, como é o caso da maioria das espécies pertencente à família Batrachoididae.

Este estudo teve como principal objectivo, verificar qual o nível de tolerância à amónia e o respectivo grau de ureotelia em *Halobatrachus didactylus*. Para tal os animais foram expostos a concentrações crescentes de amónia ambiental. Foram determinadas taxas de sobrevivência em função do tempo de exposição e calculou-se a concentração letal (LC<sub>50</sub>) de amónia para esta espécie, que se situa em 3.28 mM. Foram também determinados os valores de amónia, ureia e cortisol plasmático, de modo a verificar o efeito da amónia sobre a fisiologia do peixe.

Os resultados obtidos neste estudo revelaram que *H. didactylus* apresenta alguma tolerância à amónia ambiental, no entanto mais baixa do que em outras espécies da mesma família e que os valores plasmáticos de compostos azotados, assim como a excreção parecem ser, pelo menos parcialmente, dependentes da amónia ambiental. Uma vez que não houve um padrão uniforme de excreção ao longo do tempo nesta espécie, podemos dizer que existe um certo grau de ureotelia facultativa. Observou-se também que, tal como noutros membros da família, a excreção de ureia pode ocorrer por pulsos em que grande quantidade de ureia é libertada para o meio, intercalados por períodos em que a excreção é baixa ou mesmo nula.

Os resultados revelaram ainda que o fígado parece ser o principal órgão onde o ciclo da ureia está maioritariamente activo, uma vez que é neste órgão que ocorre uma maior expressão das enzimas envolvidas no ciclo da ureia e que esta é afectada pelos níveis de amónia no meio. As enzimas do ciclo da ureia, tal como o transportador de ureia, apresentam grande conservação, não só entre *H. didactylus* e *Opsanus beta*, um dos membros mais próximos da família Batrachoididae, mas também entre a maioria dos teleósteos e outros vertebrados confirmando a grande importância e provável manutenção da função destas proteínas.

**Palavras-chave:** *Halobatrachus didactylus*, toxicidade de amónia, ureia, ureotelia, sintetase da glutamina, sintetase do carbamil fosfato, transportador de ureia

## ABSTRACT

Ammonia is the main excretion product resulting from nitrogen metabolism in fish. Whilst most teleosts have a low tolerance to elevated environmental ammonia, some species have a high ammonia tolerance. Such is the case of the majority of the species belonging to the family Batrachoididae.

The main objective of the current study was to assess the tolerance to environmental ammonia and degree of ureotely in the Lusitanian toadfish (*Halobatrachus didactylus*). Fish were exposed to increasing concentrations of environmental ammonia and survival rates were determined. The 50% lethal concentration (LC<sub>50</sub>) of ammonia for this species was estimated to be 3.28 mM. The plasma levels of ammonia, urea and cortisol were also measured to assess the effect of ammonia exposure on physiology.

*H. didactylus* presents some tolerance to environmental ammonia; however, to a lesser extent than other species from the same family. Plasma levels of nitrogenous compounds and their excretion rates seem to be, at least partially, dependent on the environmental ammonia concentration. The lack of a clear pattern of urea excretion over time suggests that ureotely is facultative in this species. Furthermore, urea excretion occurs in pulses, wherein large amounts of urea are released, interspersed by periods low or even zero excretion; this has previously been described in other members of the same family.

The liver seems to be the main organ of urea metabolism, showing high expression of enzymes involved in the urea cycle; these expression levels are affected by environmental ammonia levels.

The various proteins involved in the urea cycle, as well as the urea transporter, present high degree of homology, not only between *H. didactylus* and *Opsanus beta* (another member of the Batrachoididae), but also between the majority of teleosts and other vertebrates, which underlines the great importance and consequent evolutionary conservation of these proteins.

*Keywords:* *Halobatrachus didactylus*, ammonia toxicity, urea, ureotely, glutamine synthetase, carbamyl phosphate synthetase, urea transporter

## ÍNDICE

AGRADECIMENTOS .....	V
RESUMO .....	VIII
ABSTRACT .....	IX
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Ciclo da ureia (O-UC) .....	4
1.1.1. <i>Ciclo da ureia em peixes elasmobrânquios</i> .....	5
1.2. Mudança de amoniotelia para ureotelia em peixes teleósteos .....	6
1.2.1. <i>Teleósteos ureotélicos obrigatórios</i> .....	6
1.2.2. <i>Teleósteos ureotélicos facultativos</i> .....	9
1.3. A espécie <i>Halobatrachus didactylus</i> .....	13
1.4. Objectivo do trabalho .....	14
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	15
2.1. Animais.....	15
2.2. Estudos de tolerância à amónia ambiental e determinação da concentração letal (LC <sub>50</sub> ).....	15
2.2.1. <i>Ensaio I</i> .....	15
2.2.2. <i>Ensaio II</i> .....	16
2.2.3. <i>Determinação de LC<sub>50</sub> - 96h</i> .....	17
2.3. Determinação do padrão de excreção de compostos azotados (Amónia vs. Ureia) .....	17
2.3.1. <i>Ensaio I</i> .....	18
2.3.2. <i>Ensaio II</i> .....	18
2.4. Análises Bioquímicas .....	19
2.4.1. <i>Determinação de amónia na água e em plasma</i> .....	19
2.4.2. <i>Determinação de ureia na água e em plasma</i> .....	20
2.4.3. <i>Determinação de cortisol na água e em plasma</i> .....	20
2.5. Estudo da expressão genética de enzimas relacionadas com a síntese e transporte de ureia e eliminação de amónia.....	21
2.5.1. <i>Extracção de ARN total de H. didactylus</i> .....	21
2.5.2. <i>RT-PCR (Transcrição inversa - reacção de polimerização em cadeia)</i> .....	22
2.6. Clonagem e Sequenciação de produtos de PCR.....	24
2.6.1. <i>Purificação de moléculas de ADN de um gel de agarose</i> .....	25
2.6.2. <i>Ligação do produto de PCR purificado ao vector de clonagem pGEM-T Easy</i> .....	25

2.6.3. Transformação de células competentes.....	26
2.6.4. Extração de ADN plasmídico de uma cultura de bactérias (Miniprep).....	26
2.6.5. Digestão do ADN com enzimas de restrição.....	27
2.6.6. Sequenciação.....	27
2.7. Análise bioinformática.....	28
2.8. Análises estatísticas.....	29
3. RESULTADOS.....	30
3.1. Tolerância à amónia ambiental e determinação da concentração letal (LC <sub>50</sub> )....	30
3.1.1. Ensaio I.....	30
3.1.2. Ensaio II.....	35
3.2. Análise dos padrões de excreção.....	40
3.2.1. Ensaio I.....	40
3.2.2. Ensaio II.....	43
3.3. Expressão genética das enzimas relacionadas com a síntese e transporte ureia e eliminação de amónia.....	48
3.4. Análise das sequências de aminoácidos dos fragmentos obtidos por PCR.....	52
4. DISCUSSÃO.....	59
4.1. Tolerância à amónia ambiental.....	59
4.2. Padrões de excreção.....	62
4.3. Expressão genética de enzimas relacionadas com a síntese e transporte de ureia e eliminação de amónia.....	65
4.4. Análise das sequências de aminoácidos.....	67
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS.....	72
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	74
ANEXOS	

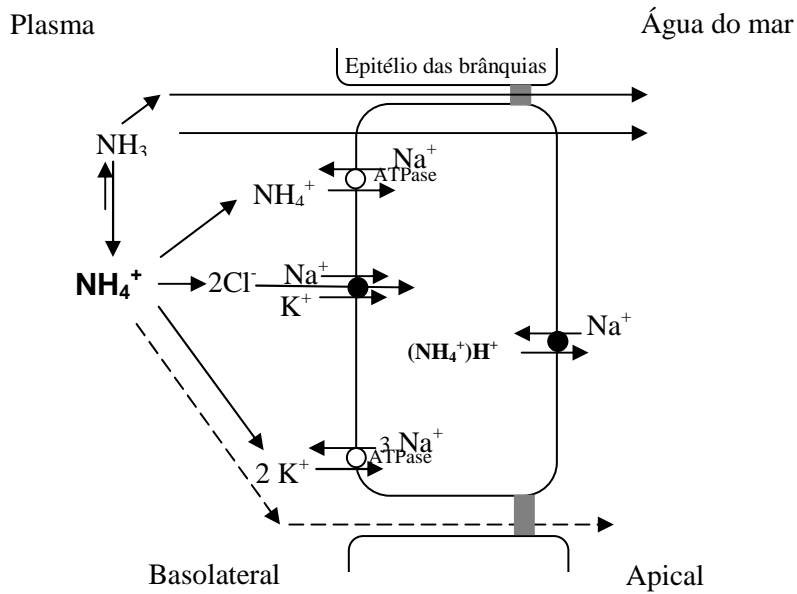
### 1. INTRODUÇÃO

Uma proporção significativa da produção energética nos peixes deriva do catabolismo e oxidação das proteínas e aminoácidos. Neste grupo de animais o principal produto resultante do metabolismo do nitrogénio é a amónia (Anderson 1995; Wang & Walsh 2000).

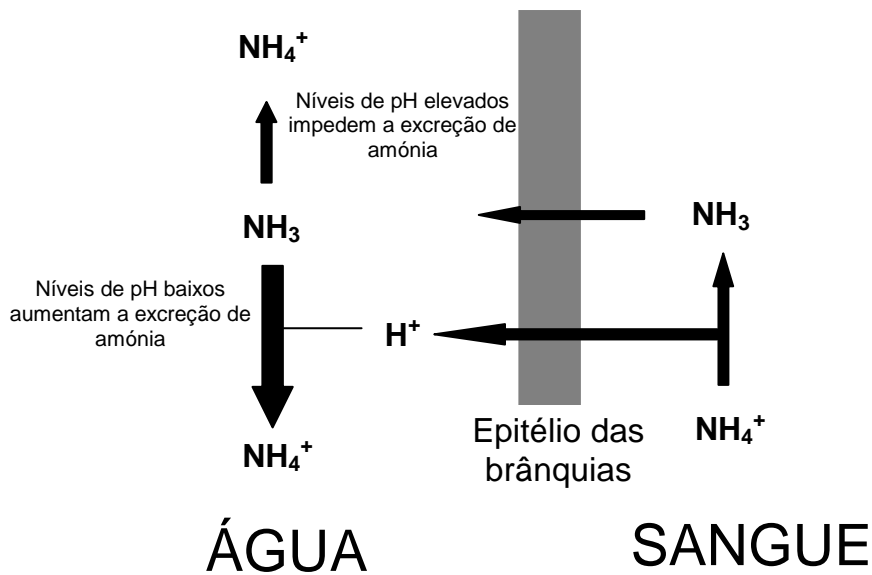
A amónia é extremamente tóxica para os seres vivos e são necessárias grandes quantidades de água (400ml de água para 1g de amónia) para diluir este produto a níveis baixos de toxicidade (Wright 1995; Withers 1998). Por esta razão, são maioritariamente os animais aquáticos, como os peixes, a utilizarem a amónia como produto de excreção (Withers 1998). Outros animais transformam a amónia em produtos menos tóxicos, o que envolve maiores gastos energéticos, como a ureia (animais ureotélicos, e.g. mamíferos) e o ácido úrico (animais uricotélicos, e.g. aves, répteis) (Randall *et al.* 1997; Purves *et al.* 2001;).

A amónia libertada pelos peixes teleósteos através das brânquias directamente para a água evita um gasto de energia adicional na sua transformação em produtos menos tóxicos (Anderson 1995). Em solução aquosa, a amónia encontra-se em equilíbrio entre a forma ionizada ( $\text{NH}_4^+$ ) e não ionizada ( $\text{NH}_3$ ) (Walsh & Mommsen, 2001). A amónia é formada no fígado, e transportada no sangue, sendo excretada através das brânquias sob a forma não ionizada ou sob a forma ionizada por difusão passiva (Anderson 1995). A difusão do  $\text{NH}_3$  e do  $\text{NH}_4^+$  para a água depende de um gradiente favorável entre o sangue e a água. A difusão do  $\text{NH}_4^+$ , pode também ocorrer através de transporte activo que permite o  $\text{NH}_4^+$  atravessar a membrana, através de canais especializados, bombas sódio-potássio, e de transportadores ( $\text{Na}^+/\text{2Cl}^-/\text{K}^+$ ) (figura 1) (Wilkie 2002).

Em águas com níveis de pH baixos, o  $\text{NH}_3$  é convertido em  $\text{NH}_4^+$ , levando a que o gradiente de  $\text{NH}_3$  através das brânquias se mantenha. A acidificação da água próximo das brânquias aumenta a excreção, não só devido aos níveis de pH, mas também devido à excreção associada de  $\text{H}^+$  e de dióxido de carbono. Por outro lado, em águas com níveis altos de pH, a conversão de  $\text{NH}_3$  em  $\text{NH}_4^+$  é inibida, levando a um impedimento de excreção de amónia (figura 2) (Ip *et al.* 2001).



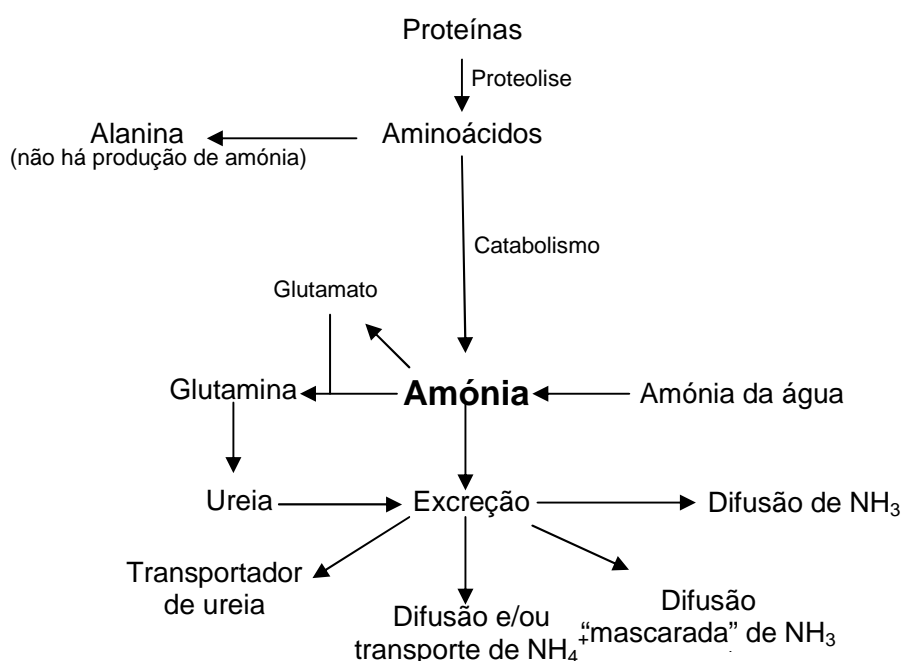
**Figura 1:** Modelo da excreção de amónia em peixes de água salgada, salientando-se as várias formas de transporte através do epitélio branquial (Adaptado de Wilkie 2002).



**Figura 2:** Modelo do efeito do pH ambiental na excreção de amónia através do epitélio das brânquias dos peixes (Adaptado de Ip *et al.* 2001).

Os animais aquáticos são mais tolerantes à amónia que outros vertebrados, e muitos mantêm os valores de amónia no plasma por volta dos 0.2 mM (Anderson 2001). Em contraste, na maioria dos mamíferos, valores elevados ( $>0,005\text{mM}$ ) de amónia no plasma são altamente tóxicos para o sistema nervoso (Wright 1995). A amónia exerce os seus efeitos tóxicos a diferentes níveis e actua no sistema nervoso de todos os vertebrados, incluindo nos peixes, podendo causar hiperventilação, coma, convulsões, levando em alguns casos à morte (Ip *et al.* 2001). Níveis elevados de amónia alteram as propriedades da barreira cérebro – sangue, interferem no transporte de aminoácidos, alteram o balanço ácido-base no sangue e levam a alterações no fluxo sanguíneo do cérebro (Wright 1995).

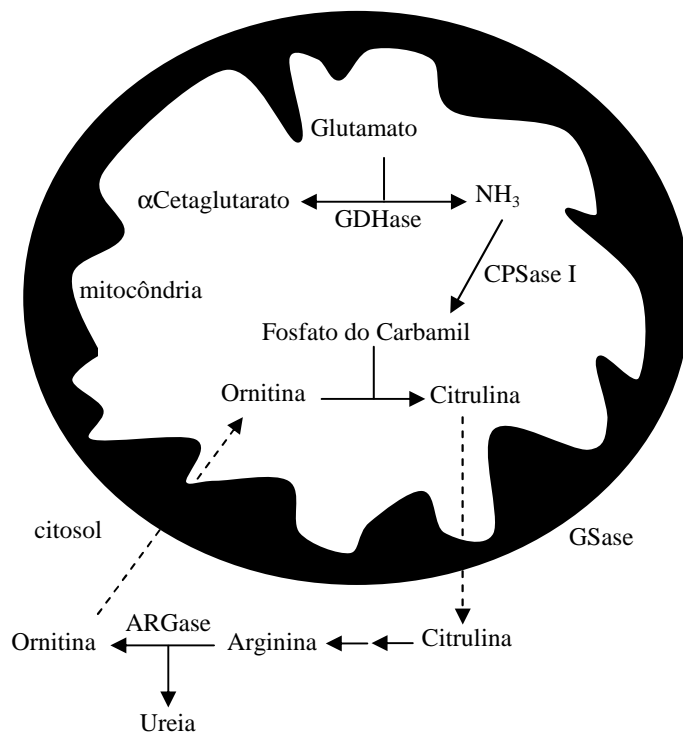
Peixes expostos a aerificação ou níveis de pH da água elevados têm alguma dificuldade em excretar amónia, o que leva a uma acumulação desta no corpo. Estes peixes tiveram de adoptar diferentes mecanismos para evitar efeitos tóxicos provocados pela amónia (figura 3) (Wright 1995; Ip *et al.* 2001). A toxicidade por amónia pode ser evitada, diminuindo a sua produção e acumulação no corpo, mantendo ou aumentando a sua excreção e convertendo a amónia num produto menos tóxico, como por exemplo a ureia, através do ciclo da ureia (O-UC) (Ip *et al.* 2001).



**Figura 3:** Sumário de algumas estratégias adoptadas pelos peixes para diminuir a toxicidade por amónia (Adaptado de Ip *et al.* 2001).

### 1.1. Ciclo da ureia (O-UC)

Os animais terrestres geralmente não excretam amónia, uma vez que, para além da sua toxicidade, a perda de água nestes pode tornar-se perigosa, convertendo então a amónia em ureia ou ácido úrico (Ip *et al.* 2001), compostos que podem ser concentrados nos fluidos corporais, sem conduzirem a efeitos tóxicos (Wright 1995). A ureia necessita de 10 vezes menos água que a amónia para poder ser excretada, enquanto que o ácido úrico, que é altamente insolúvel, necessita de 50 vezes menos de água para ser excretado (Wright 1995).



**Figura 4:** Representação esquemática do ciclo da ureia em animais terrestres. Estão representadas as enzimas desidrogenase do glutamato (GDHase), sintetase I da carbamil fosfato (CPSase I), sintetase da glutamina (GSase), arginase (ARGase). (Adaptado de Anderson 2001).

Os animais terrestres que excretam ureia convertem a amónia em ureia através do clássico ciclo da ureia (figura 4). Este processo realiza-se no fígado e consiste em cinco reacções, duas das quais ocorrem no interior da mitocôndria e três no citoplasma. O primeiro passo de fixação da amónia ocorre nas matrizes mitocôndriais do fígado, onde a sintetase I de carbamil fosfato (CPSase I) catalisa a reacção de incorporação de

amónia, de modo a formar carbamil fosfato (Mommensen & Walsh 1989; Anderson 2001). A enzima arginase (ARGase), encontra-se no citoplasma, e está presente em quantidades relativamente grandes nestes animais, catalisando a remoção de ureia a partir da arginina, regenerando a ornitina, um componente intermediário do ciclo da ureia (Anderson 1995). A sintetase da glutamina (GSase) também se encontra localizada no citoplasma, no entanto não desempenha um papel fundamental no metabolismo do nitrogénio.

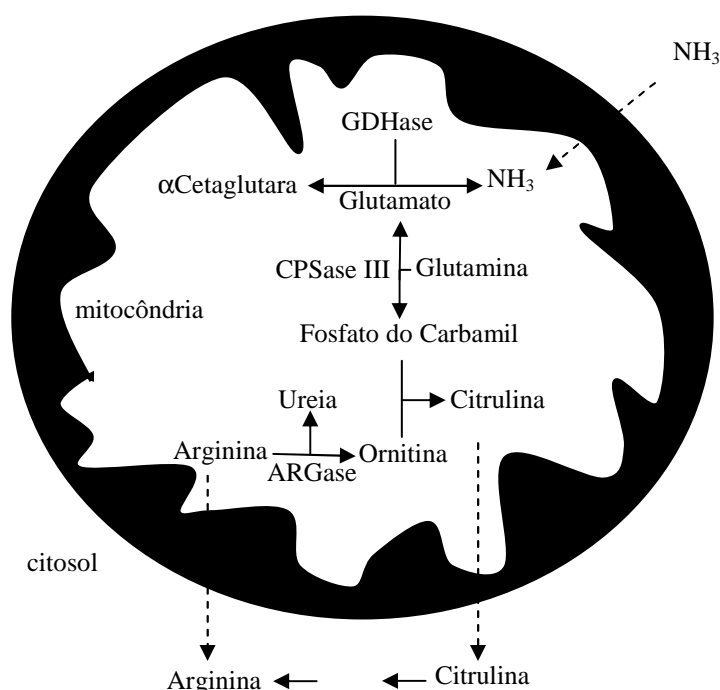
### *1.1.1. Ciclo da ureia em peixes elasmobrânquios*

Com excepção dos habitantes em água doce, todos os elasmobrânquios são ureotélicos. Estudos demonstram que aproximadamente 98% das excreções azotadas dos peixes elasmobrânquios são sob a forma de ureia mas também que na generalidade esta é preferencialmente reciclada e retida no sangue em elevadas concentrações (~400mM) de modo a que estes peixes se encontrem ligeiramente hipotónicos ou mesmo iso-osmóticos em relação ao meio (Wright & Land 1998). A síntese e excreção nestes animais reveste-se portanto de uma importância acrescida já que é utilizada para estabelecer um equilíbrio osmótico. Mais ainda, os processos de controlo do metabolismo de ureia são fundamentais para elasmobrânquios eurialinos, capazes de percorrer meios aquáticos de salinidade variável. Estes animais adoptaram uma estratégia de osmoregulação, em que não só os sais de sódio e cloro são sujeitos a variação mas também a ureia é retida ou eliminada do sangue, de modo a que os níveis de ureia no interior do corpo aumentem ou diminuam até que os indivíduos se tornem iso-osmóticos em relação ao meio, contribuindo para 25-50% da osmolaridade plasmática em ambientes de água doce ou água salgada, respectivamente (Hazon *et al.* 2003).

Os peixes elasmobrânquios possuem o ciclo da O-UC completamente activo (figura 5). Este ocorre sobretudo nas células do fígado, onde se dá a síntese de ureia, e em menor escala na brânquia. Já o controlo da excreção e retenção de ureia é feita com maior incidência na brânquia (figura 6), com uma contribuição menor, mas variável, do tecido renal (Smith & Wright 1999; Hazon *et al.* 2003).

Ao contrário do que acontece nos animais terrestres que excretam ureia, a sintetase da glutamina (GSase) desempenha um papel fundamental, sendo esta uma enzima central do metabolismo do nitrogénio e da eliminação de amónia. A GSase

catalisa a reacção de adição de amónia ao glutamato, de modo a formar glutamina, envolvendo gasto de ATP (Walsh *et al.* 1999). A glutamina, na presença da sintetase III da carbamil fosfato (CPSase III), origina carbamil fosfato. Este por sua vez reage com a ornitina originando citrulina. Estas reacções ocorrem na mitocôndria. A citrulina passa para o citoplasma e é convertida em arginina. A arginina por sua vez volta a entrar para dentro da mitocôndria e através da acção da enzima arginase, ocorre a formação de ornitina sendo libertado ureia. Os peixes elasmobrânquios geralmente são vistos como uma linha evolutiva paralela aos peixes teleósteos (Wood 2001), e por isso as propriedades do ciclo da ureia nestes peixes servem como ponto de partida para a investigação do ciclo de ureia nos teleósteos (Anderson 2001).



**Figura 5:** Representação esquemática do ciclo da ureia nos peixes elasmobrânquios (Adaptado de Anderson 2001). Estão representadas as enzimas desidrogenase do glutamato (GDHase), sintetase da glutamina (GSase), sintetase III do carbamil fosfato (CPSaseIII), arginase (ARGase).

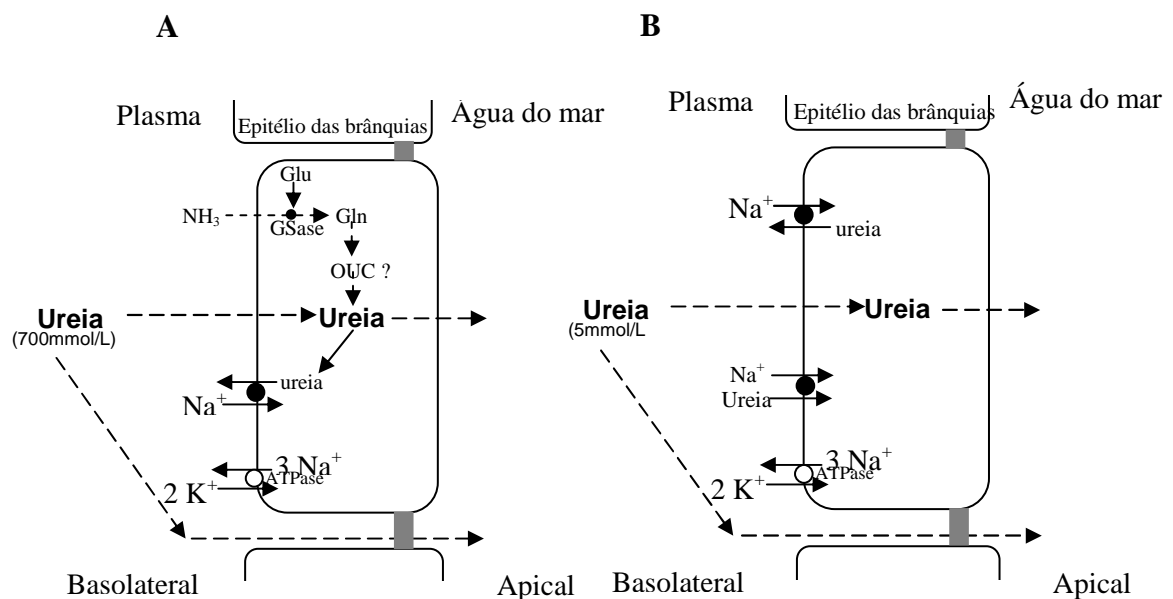
## 1.2. Mudança de amoniotelia para ureotelia em peixes teleósteos

### 1.2.1. Teleósteos ureotélicos obrigatórios

Apesar da maioria das espécies de peixes ser amoniotélica, muitos peixes excretam também ureia como produto final do metabolismo, podendo em algumas

espécies esta excreção ser predominante (Anderson 1995). Estes peixes são uma excepção em relação aos outros teleósteos e, tal como os animais terrestres e elasmobrânquios, têm as enzimas do ciclo O-UC completamente funcionais permitindo-lhes produzir grandes quantidades de ureia, utilizando a CPSaseIII (McDonald *et al.* 2006). Um exemplo deste tipo de peixes é a tilápia do Lago Magadi (*Alcolopia grahami*), que excreta ureia como produto final do seu metabolismo, em resposta à elevada alcalinidade (pH=10) do seu habitat (Barber & Walsh, 1993; Walsh *et al.* 2001b). Estas condições ambientais rapidamente provocariam a morte da maioria das espécies de peixes teleósteos, uma vez que estes são incapazes de excretar amónia sob estas condições (Walsh *et al.* 2001b). De maneira a evitar níveis tóxicos de amónia no sangue, esta espécie tornou-se ureotélica obrigatória (Walsh 1997).

Outro exemplo de peixes ureotélicos obrigatórios são os saltões-da-vasa (“mudskippers”), *Periophthalmodon schlosseri*, que além de excretarem ureia para evitar perdas de água durante os longos períodos de exposição aérea, conseguem sobreviver a concentrações bastante altas (100mM) de amónia ambiental (Ip *et al.* 2004).



**Figura 6:** (A) Modelo de controlo de amónia e ureia em peixes elasmobrânquios. (B) Modelo de controlo de ureia em peixes teleósteos (Adaptado de Wilkie 2002). Sintetase da glutamina (GSase), glutamina(Gln) e glutamato (Glu).

Tanto nos peixes elasmobrânquios como nos peixes teleósteos, a excreção de ureia, através da membrana basolateral é mínima, e envolve mecanismos de difusão

passiva e facilitada, ou transporte activo secundário por transportadores específicos. A ureia é libertada através da membrana basolateral e entra na célula. Daqui, com a entrada de  $\text{Na}^+$  na célula, a ureia por sua vez sai da célula através das bombas sódio-potássio. Nos elasmobrânquios este contra-transporte, leva a que estes peixes retenham níveis elevados de ureia no plasma. Nestes peixes, a presença da GSase no epitélio das brânquias pode minimizar a permeabilidade da membrana à amónia, convertendo esta em glutamina. A glutamina, pode ser exportada para o fígado, onde entra no ciclo da ureia ou então é retida como substrato para produção interna de ureia (figura 6), (Wilkie 2002).

Os transportadores da ureia (UTs) constituem uma família de proteínas conservadas ao longo da evolução (Bagnasco 2005; McDonald *et al.* 2006), apresentam grande afinidade para a ureia, e a sua função está relacionada com as vias metabólicas de difusão da ureia (Walsh *et al.* 2001a). Genericamente, o transportador de ureia é uma molécula de aproximadamente 500 aminoácidos, sendo que cerca de 3/5 se encontram ancorados na membrana celular, em 10 domínios transmembranares e correspondentes arcos. Até à data três tipos de transportadores foram identificados: UT-A, UT-B e UT-C, sendo que este último parece ser específico de peixes.

O UT-A parece ser o principal responsável pela reciclagem e excreção de ureia quer ao nível da brânquia quer ao nível do rim, e a sua conservação é razoável apesar poder existir sob várias formas. Em mamíferos estão já descritas inúmeras variantes renais de UT-A obtidas por *splicing* alternativo, nomeadamente em *R. norvegicus* (Mistry *et al.* 2001; Bagnasco 2005; McDonald *et al.* 2006) e estudos mais recentes, detectaram também a replicação deste transportador de ureia em elasmobrânquios ao nível do rim (Janech *et al.* 2008), mas as implicações de todas estas variantes são ainda pouco claras.

A forma UT-B está presente essencialmente em mamíferos, nomeadamente em eritrócitos (McDonald *et al.* 2006), e foi recentemente associada, tal como a forma UT-A, a uma possível excreção de ureia para o tracto intestinal onde seria convertida em amónia pela flora intestinal (Bagnasco 2005). Esta variante não foi ainda identificada em peixes. Pelo contrário a forma UT-C foi identificada apenas em peixes ósseos, encontrando-se em abundância no túbulo renal em enguias marinhas (Mistry *et al.* 2005), tendo sido sugerido que poderá ter como função a reabsorção de ureia do filtrado glomerular para que possa ser excretado na brânquia dada a baixa produção de urina em

água salgada. No entanto, a clonagem deste transportador em espécies de água doce parece contradizer esta hipótese.

### 1.2.2. *Teleósteos ureotélicos facultativos*

Apesar dos peixes teleósteos excretarem principalmente amónia, os restantes produtos de excreção (~10-30%) são sob a forma de ureia (Wright & Land 1998). No entanto, existem algumas espécies que podem excretar ureia, quando submetidas a condições adversas.

Alterações no meio podem provocar algumas adaptações fisiológicas, tal como se verifica nos peixes pulmonados (e.g. *Protopterus annectens*), onde a síntese e retenção de ureia terá sido uma importante adaptação para a invasão de ambientes terrestres (Wright & Land 1998). Esta espécie excreta amónia como principal produto de excreção, mas após longos períodos de estivação, começa a excretar ureia (Loong *et al.* 2008).

Recentemente foi descoberto que alguns teleósteos potencialmente amoniotélicos podem utilizar ureia como produto final de excreção, devido a alterações nos níveis de pH (alcalino) (Wang & Walsh 2000), elevadas concentrações de amónia na água (Wood *et al.* 2003) e também devido ao confinamento (Walsh *et al.* 2000). As espécies *Heteropneustes fossilis* e *Opsanus beta*, em condições vulgares são amoniotélicas. No entanto, quando expostas a condições de stress (elevadas concentrações de amónia no meio, extensos períodos fora de água, confinamento) a taxa de excreção de ureia aumenta, tornando-se ureotélicos (McDonald *et al.* 2006; McDonald & Walsh 2004; Hopkins *et al.* 1995). Estas variações no metabolismo dos compostos azotados reflectem-se nos valores circulantes de amónia e ureia, como pode ser observado na tabela I, que reúne dados referentes a peixes amoniotélicos e ureotélicos. Embora a amónia seja mantida, na maioria dos casos, entre limites relativamente estreitos, a ureia, menos tóxica, pode atingir valores bastante elevados.

Tabela I: Concentrações (mmol/L) dos níveis de amónia e ureia no plasma em algumas espécies.

Espécies	Amónia no plasma (mmol/L)	Ureia no plasma (mmol/L)	Referência
<i>Opsanus beta</i>	0.26	16.10	Walsh <i>et al.</i> (1990)
<i>Hoplias lacerdae</i>	2.90	0.31	Moraes & Polez (2004)
<i>Hoplias malabaricus</i>	0.74	0.81	Moraes & Polez (2004)
<i>Clarias batrachus</i>	0.47	1.22	Saha & Ratha (1989) in Wood 1993
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	0.68	4.24	Wood <i>et al.</i> (1989) in Wood 1993
<i>Oreochromis alcalicus grahami</i>	0.77	10.52	Wood <i>et al.</i> (1989) in Wood 1993
<i>Heteropneustes fossilis</i>	0.47	1.52	Saha & Ratha (1989) in Wood 1993
<i>Squalus acanthias</i>	0.17	675	Wood & Wright (dados não publicados) in Wood 1993
<i>Protopterus sp</i> (períodos de estivação)	#	406	Delaney <i>et al.</i> (1977) in Wood 1993

# Em períodos de estivação não se detectam quaisquer níveis de amónia no plasma

A espécie *Protopterus dolloi*, é outro exemplo de um teleósteo ureotélico facultativo. Esta espécie quando exposta a determinadas condições ambientais, como exposição aérea, converte os seus produtos de excreção em ureia (Wilkie *et al.* 2007). Esta espécie, à semelhança dos elasmobrânquios marinhos, possui uma CPSase III e GSase activas (Ip *et al.* 2005).

Walsh *et al.* (2004), demonstraram que a espécie *Allenbatrachus grunniens*, tem uma elevada tolerância a amónia. No entanto, quando sujeita a valores elevados de amónia ambiental (10mM) e a condições naturais (salinidade 2‰ e pH 7.0), os seus níveis de ureia plasmática aumentam, acabando mesmo por excretar ureia.

Um caso pouco comum de excreção de ureia acontece na espécie amoniotélica *Rivulus marmoratus*, que excreta ureia segundo um padrão diário ou ritmo circadiano (mais ureia excretada durante as horas de luz), enquanto que a amónia é excretada a um ritmo constante ao longo do dia (Rodela & Wright 2006).

Os peixes teleósteos amoniotélicos, apesar da falta de um O-UC funcional, retêm baixos níveis de ureia (1-2 mmol/l) (McDonald *et al.* 2006). A espécie *Porichthys notatus*, é um exemplo deste tipo de peixes. Mesmo quando sujeita a condições de

confinamento, esta espécie tem uma capacidade muito baixa de produzir ou excretar ureia (Wang & Walsh 2000).

Estudos realizados mostram que alguns membros da família Batrachoididae excretam uma importante fracção de ureia como produto final do metabolismo. Isto parece estar relacionado com o facto de estes peixes passarem muito tempo escondidos em abrigos relativamente confinados com um fluxo de água reduzido e também para impedir a intoxicação da prole quando esta está a ser guardada pelos machos nos ninhos. Outra hipótese sugerida é que estes indivíduos excretam ureia para evitar a detecção por parte de predadores, uma vez que a amónia é um estimulante olfactivo que denuncia a posição do indivíduo (Walsh 1997; Costa 2004). Walsh (1997), sugeriu que esta capacidade ureotélica poderia também estar associada à manutenção do equilíbrio osmótico em massas de água menos salinas ou ainda funcionar como um mecanismo de armazenamento de azoto, como resposta a períodos prolongados de ausência de alimento.

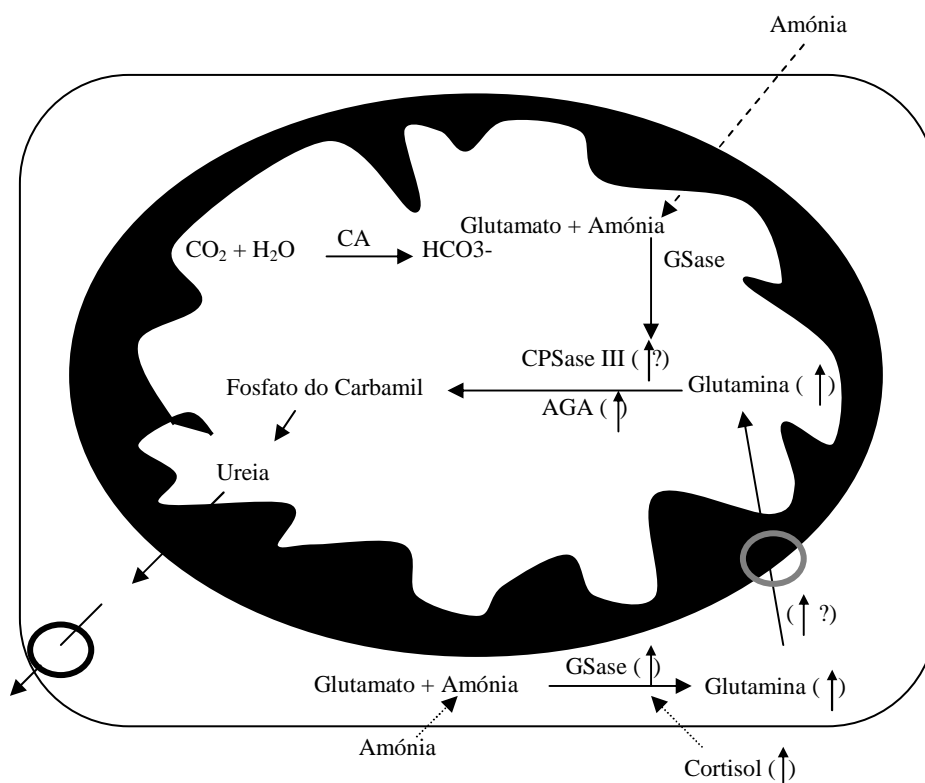
Wang & Walsh (2000) definiram três espécies da família Batrachoididae, tendo em conta o metabolismo e excreção de ureia, os ureotélicos facultativos, que ocasionalmente produzem e excretam ureia (*Opsanus beta*), os amoniotélicos, que produzem ou excretam amónia como produto final de excreção (*Porichthys notatus*) e sugeriram que a espécie *Opsanus tau* era moderadamente ureotélica comparando com as espécies *Opsanus beta* e *Porichthys notatus*. A espécie *Opsanus beta*, apresenta uma característica interessante, excreta ureia não de forma contínua, mas sim, por pulsos, tendo estes uma duração que pode variar entre 1 hora a 3 horas (Wang & Walsh 2000; Wood *et al.* 2001). Estudos indicam que estes ocorrem consoante os níveis de cortisol no plasma, havendo uma descida nos níveis de cortisol antes do pulso (Hopkins *et al.* 1995; Walsh *et al.* 2000). No período entre os pulsos, não há excreção de ureia, esta é armazenada internamente, levando a um aumento gradual da concentração de ureia no sangue (Wood & Shuttleworth 1995). Segundo Walsh *et al.* (2003), esta excreção poderá estar relacionada com um transportador específico de ureia (UT), que facilita a difusão nas brânquias.

Estas espécies apresentam uma elevada tolerância a elevados níveis de amónia ambiental, que é acompanhada por um aumento dos níveis plasmáticos de amónia e ureia (Wang & Walsh 2000). Outros autores sugeriram que o aumento da tolerância à amónia encontra-se também relacionado com a capacidade destes peixes converterem

amónia em ureia ou outros metabolitos, como por exemplo glutamina ou glutamato (Mommsen & Walsh 1991; Walsh 1998; Wright & Land 1998).

O mecanismo de produção de ureia está relacionado com alguns factores endócrinos, tais como, os níveis de cortisol no sangue, que aumentam drasticamente em condições de stress, ou o aumento de AVT (arginina vasotensina), a hormona análoga nos peixes para a AVP (arginina vasopressina ou hormona anti-diurética) dos humanos (Wood *et al.* 2001; McDonald *et al.* 2006;). O cortisol é o principal glucocorticóide produzido pelos peixes teleósteos, podendo ser um potencial indicador de stress (Roche & Bogé 1996). Segundo McDonald & Wood (2004), os níveis de cortisol plasmático aumentam quanto maior o stress no individuo, levando a um aumento de glucose na circulação, bem como na produção e excreção de amónia.

A mudança da amoniotelia para a ureotelia está associada a um aumento da actividade da GSase no fígado, bem como a uma redução da excreção de amónia, enquanto que os níveis de excreção de ureia se mantêm ou aumentam (Hopkins *et al.* 1995; Sloman *et al.* 2005). Ao contrário com o que acontece nos vertebrados terrestres e semelhante aos elasmobrânquios, a GSase desempenha um papel muito importante nos teleósteos. A GSase funciona associada a outras enzimas do ciclo da ureia, sendo o primeiro fixador de amónia. Alguns teleósteos e elasmobrânquios, que sintetizam ureia, utilizam a CPSase III como enzima iniciadora do ciclo da ureia. Em contraste com a CPSase I de vertebrados mais evoluídos, a CPSase III utiliza a glutamina como substrato. O eixo GS-CPase III parece ser um ponto de controlo na mudança de amoniotelia para ureotelia (figura 7) (Wood *et al.* 2003).



**Figura 7:** Representação esquemática das vias envolvidas na transformação de amónia e síntese de ureia em peixes teleosteos. Estão representadas as enzimas da sintetase da glutamina (GSase), sintetase III do carbamil fosfato (CPSaseIII), N-acetil-glutamato (AGA) e anidrase de carbono (Adaptado de Wood *et al.* 2003).

### 1.3. A espécie *Halobatrachus didactylus*

O xarroco (*Halobatrachus didactylus*) é um peixe teleosteo, pertencente à família Batrachoididae, que se distribui desde a Península Ibérica até à Costa do Gana, incluindo o Oeste do Mediterrâneo e Madeira e é o único representante conhecido deste género na Europa. Esta espécie é bentónica e relativamente sedentária. Vive normalmente em águas costeiras até aos 50 m de profundidade, embora possa ocorrer em zonas mais profundas (Costa 2004). Usualmente é associado a fundos predominantemente arenosos ou lodosos, podendo surgir em zonas rochosas e também em recifes de coral. Podem enterrar-se no sedimento ou esconder-se debaixo de pedras ou em cavidades naturais ou artificiais (Whitehead *et al.* 1986; Palazón-Fernandez *et al.* 2001). Apesar de ser considerada uma espécie tipicamente marinha, pode-se também encontrar em águas salobras ao longo da sua área de distribuição (Costa 2004).

O xarroco é um predador voraz e oportunista, apresentando um grande grau de adaptabilidade trófica, sobretudo os indivíduos mais jovens. A sua reprodução ocorre

entre Abril e Junho e são os machos que constroem ninhos e exibem cuidados parentais com os ovos, embriões, larvas e também com os juvenis. Embora esta espécie seja bastante abundante e amplamente distribuída, existe pouca informação acerca da ecologia da mesma. No entanto, possui um papel fundamental no controlo populacional das suas presas, sendo o seu desempenho importante na manutenção do equilíbrio ecológico nos ecossistemas em que se encontra (Costa 2004).

Os indivíduos desta espécie apresentam grande vitalidade, uma vez que conseguem sobreviver fora de água durante longos períodos de tempo. Isto poderá estar relacionado com a colonização das zonas intermareais, onde frequentemente os indivíduos ficam sujeitos a esta condição (Costa 2004).

Estudos preliminares indicam que a tolerância à amónia na espécie *Halobatrachus didactylus* (xarroco) é alta, quando comparada com os valores para outros teleósteos, no entanto, é mais baixa que em outros indivíduos da mesma família como *Opsanus beta*, *Opsanus tau* e *Porichthys notatus* (Barimo *et al.* 2007). Os mesmos autores sugerem ainda que *H. didactylus* possa ser uma espécie moderadamente ureotélica em condições ambientais onde os níveis de amónia são relativamente altos.

### 1.4. Objectivo do trabalho

O propósito deste trabalho é dar continuidade aos estudos iniciados por Barimo *et al.* (2007) de forma a contribuir para a caracterização da espécie *H. didactylus* no que respeita ao seu modo de excreção dos compostos azotados. O estudo de mais uma espécie da família Batrachoididae poderá assim permitir comparações entre espécies próximas e contribuir para melhor compreender o porquê da existência de ureotelismo facultativo nesta família de peixes.

Assim, é objectivo do presente trabalho: 1) determinar a tolerância desta espécie à amónia ambiental, utilizando para isso testes de toxicidade com diferentes concentrações de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ; 2) definir o seu grau de ureotelia analisando o padrão de excreção de compostos azotados (amónia e ureia). Adicionalmente pretendeu-se determinar a existência de enzimas envolvidas no ciclo da ureia e o seu padrão de expressão génica em função dos níveis de amónia ambiental.

### 2. MATERIAL E MÉTODOS

#### 2.1. Animais

Indivíduos da espécie *Halobatrachus didactylus*, de ambos os sexos, foram capturados por pesca com redes de arrasto de vara na Ria Formosa e no Rio Arade. Os peixes capturados foram transportados para tanques de fluxo contínuo instalados na Estação Marinha do Ramalhete ou tanques de circuito fechado no edifício do Laboratório Experimental de Organismos Aquáticos, da Universidade do Algarve-Centro de Ciências do Mar. Durante o período de aclimação (1-6 meses) que antecedeu as experiências os animais foram medidos e pesados e identificados individualmente com marcas metálicas numeradas (Chevillot, Presadom no.2) e expostos a condições naturais de fotoperíodo, temperatura e salinidade. Os peixes foram alimentados com tiras de lula ou pota e miolo de mexilhão congelados, a cada 48 horas, numa dosagem de aproximadamente 3% da carga, em massa, do tanque.

#### 2.2. Estudos de tolerância à amónia ambiental e determinação da concentração letal (LC<sub>50</sub>)

Para testar o nível de tolerância desta espécie à concentração de amónia na água, foram realizados dois ensaios nos quais se determinaram taxas de mortalidade e níveis de concentrações letais para várias condições.

##### 2.2.1. Ensaio I

Dividiram-se 40 peixes (40-100g), por oito tanques em circuito estático (n= 5 por tanque), com 12 litros de água do mar cada (salinidade 35‰). Por cada tanque a massa total dos indivíduos foi de 340.4±0.95g, com um peso médio de 68±13.4g por peixe. Os peixes foram submetidos a um período de aclimação durante cinco dias, com regime de renovação total de água a cada 12 horas. Nas 24h antecedentes à experiência e durante o decorrer desta, os peixes não foram alimentados. Em cada tanque foi colocada um volume calculado de NH<sub>4</sub>Cl a 2.8 M, de modo a obter as seguintes concentrações finais de NH<sub>4</sub><sup>+</sup>: 0 (tanque controlo), 0.5, 1, 2.5, 5, 7.5, 10 e 12.5 mM.

Os valores de  $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$  esperados foram calculados segundo a equação de Henderson-Hasselbalch (1), e de acordo o  $\text{pK}_{\text{Amm}}$  obtido por Cameron & Heisler (1983).

$$(1) \text{pH} = \text{pK}_{\text{Amm}} + \log \frac{[\text{NH}_3]}{[\text{NH}_4^+]}$$

Recolheram-se amostras de água (2.5-5ml) de cada tanque aos tempos 0, 2, 4, 6, 12, 24, 36, 48, 72 e 96 h para posteriores análises de amónia e ureia. A cada 12h, a água dos tanques foi substituída e foi adicionado  $\text{NH}_4\text{Cl}$  nas mesmas proporções que no início da experiência, de forma a garantir a qualidade da água e a manter níveis constantes de  $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ . A cada renovação foi recolhido 1L de água de cada tanque, congelada a  $-20^\circ\text{C}$ , para posteriores análises de cortisol. Foram efectuadas recolhas de sangue aos animais moribundos ou recém-falecidos durante o período experimental. No final da experiência os sobreviventes foram anestesiados com 2-fenoxietanol (1:5000, Sigma) e uma amostra de sangue foi recolhida, para posteriores análises bioquímicas.

### 2.2.2. Ensaio II

Para o segundo ensaio foram utilizados 60 peixes (10-40g), divididos por 5 tanques num sistema fechado, contendo cada um deles 12 animais em 30L de água do mar (salinidade 35‰) e com arejamento. Por cada tanque, o peso total dos espécimes era de  $197 \pm 7.14\text{g}$ , com uma média de  $19,4 \pm 6.44\text{g}$  por peixe. Os peixes foram submetidos a um período inicial de aclimação de uma semana, sendo alimentados a cada dois dias. Após este período, o volume de água foi diminuído para metade. A cada 12h a água foi renovada. Os indivíduos foram expostos a este processo durante as 72 horas que antecederam o início da experiência. Nas 24h antecedentes ao início da experiência e durante a mesma, os peixes não foram alimentados.

Em cada tanque foi colocada um volume calculado de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (2.8M), de modo a obter as seguintes concentrações finais de  $\text{NH}_4^+$ : 0 (tanque controlo), 1, 2, 3, 4 e 5mM. Os valores de  $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$  esperados foram calculados segundo a equação de Henderson-Hasselbalch (1), e de acordo o  $\text{pK}_{\text{Amm}}$  obtido por Cameron & Heisler (1983). Recolheram-se amostras de água aos tempos 0, 3, 6, 9, 12, 24, 36, 48, 72 e 96h, para posteriores análises de amónia e ureia. A água foi renovada a cada 12h e adicionado um volume adequado de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . No final da experiência os sobreviventes foram anestesiados com de 2-fenoxietanol (1:5000, Sigma). A todos foi recolhida uma amostra

de sangue, e 5 animais por grupo foram sacrificados por secção da medula espinal para recolha de tecidos (brânquias e fígado). O plasma sanguíneo foi separado da parte corpuscular por centrifugação (13000 rpm, 5 minutos), congelado imediatamente em nitrogénio líquido e transferido para -20°C até às respectivas análises bioquímicas. Os tecidos recolhidos foram também colocados em nitrogénio líquido e congelados a -80°C, para posterior análise do nível de expressão dos genes codantes para enzimas e transportadores envolvidas nos mecanismos de produção e excreção de ureia e amónia.

### *2.2.3. Determinação de LC<sub>50</sub> - 96h*

A determinação de concentração letal (LC) para 50% da população foi efectuada com base nos dados recolhidos nos ensaios descritos acima. Este método baseia-se no cálculo da concentração de um dado composto, que em 96h provoca 50% de mortalidade na população em estudo realizando-se posteriormente uma análise PROBIT, descrita por Litchfield e Wilcoxon (1949).

A mortalidade nos tanques expostos a diferentes concentrações foi registada a cada 3 horas até às primeiras 12 e depois a cada 12 até 96. Desta forma foi possível estabelecer curvas de mortalidade em função do tempo e dose e estimar os LC50 e respectivos intervalos de confiança para vários tempos de exposição, incluindo o valor para o convencional nível de toxicidade aguda (LC50 a 96 horas).

O termo “amónia”, refere-se doravante ao total da soma entre  $\text{NH}_4^+$  e  $\text{NH}_3$ , respectivamente amónia ionizada e não-ionizada.

### **2.3. Determinação do padrão de excreção de compostos azotados (Amónia vs. Ureia)**

Para a determinação individual do padrão de excreção de compostos azotados foram também efectuados dois ensaios, sendo os peixes isolados em tanques conforme a figura 5.



**Figura 5:** Peixes isolados em tanques individuais de 2L utilizados para a medição da excreção de amónia e ureia. Durante os ciclos de 24 horas a entrada e saída de água foi fechada.

### *2.3.1. Ensaio I*

Foram separados 12 peixes de vários tamanhos e pesos (45.1 e 49.1, 68 e 69.8, 95.7 e 98, 129 e 130, 156 e 160, 184 e 189g) de modo a formarem duplicados de peso, e colocados em tanques individuais de 2L num circuito recirculado, com arejamento. Os peixes foram mantidos nestas condições durante quatro dias antecedentes à experiência, com alimentação a cada dois dias. Após este período o fluxo de água ao tanque foi cortado e a renovação de água feita a cada 24 horas nos dois dias seguintes até ao início da experiência. Durante o decorrer da experiência (num total de cinco ciclos de 24 horas), foram recolhidas amostras de água (5ml) a cada 60min e imediatamente congeladas a  $-20^{\circ}\text{C}$ , para posteriores análises de amónia e ureia. Durante cada recolha, foram medidos o pH, níveis de saturação e concentração de oxigénio e temperatura da água. Ao fim de cada 24h de amostragem, renovou-se a água de cada tanque.

### *2.3.2. Ensaio II*

Foram colocados 12 peixes, de peso médio  $37.0 \pm 0.74\text{g}$ , em tanques individuais (A-N) de 1.5L em circuito recirculado com arejamento e alimentados a cada 48 horas. Os peixes foram mantidos nestas condições durante os 4 dias que antecederam o início da experiência.

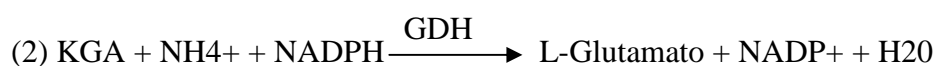
No início da experiência o fluxo de água foi fechado, e procedeu-se à recolha de amostras de água (2.5 ml) a cada 2h, durante 24h. No final destas 24h os espécimes foram manipulados, recolocados nos tanques e o fluxo de água foi aberto, por um novo período de 24 horas, após o qual se voltou a fechar o fluxo e se iniciou outro ciclo de recolhas de amostras de água, nas condições anteriormente descritas. Durante cada recolha, foram medidos o pH, níveis de saturação e concentração de oxigénio e temperatura da água. As amostras de água foram armazenadas a -20°C, para posteriores análises de amónia e ureia.

No final de ambos os ensaios, todos os peixes foram sacrificados com uma sobredosagem de 2-fenoxietanol (1:500), procedendo-se à recolha de sangue (com agulhas heparinizadas) de cada indivíduo. As amostras de sangue foram centrifugadas (13000 rpm, 5 minutos) e o plasma armazenado a -20°C, para posteriores análises de amónia, ureia e cortisol.

### 2.4. Análises Bioquímicas

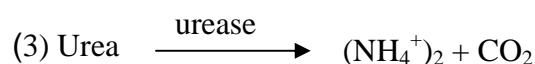
#### 2.4.1. Determinação de amónia na água e em plasma

A concentração de amónia nas amostras de água, foi determinada pelo método indofenol/azul descrito por Ivancic & Degobbis (1984) adaptado a microplacas (Walsh *et al.* 1990). Este método tem como princípio a reacção de transformação de amónia em indofenol. Esta reacção ocorre quando numa solução alcalina, os iões de amónia reagem com hipoclorito, formando monoclaramina, que na presença de fenol e nitroprussido, como catalizador, se torna azul formando um composto líquido chamado indofenol. A concentração de amónia nas amostras de plasma, foi medida com o auxílio de um kit de amónia (Sigma-Aldrich, AA0100), adaptado a microplacas. Esta técnica baseia-se na reacção da amónia com ácido  $\alpha$ -cetoglutárico (KGA) e redução do NADPH (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato), na presença de GDH (desidrogenase do L-glutamato) de modo a formar L-glutamato e oxidar  $\text{NADP}^+$ , como mostra a equação (2).



2.4.2. *Determinação de ureia na água e em plasma*

A concentração de ureia nas amostras de água e plasma, foi determinada pelo método colorimétrico e diacetil monoxime, descrito por Rahmatullah & Boyde (1980), Price & Harrison (1987) e adaptado a microplacas (Walsh *et al.* 1990). Este método baseia-se na reacção entre a ureia e o diacetil monoxime. Este condensa, ficando com uma cor amarelada. Esta reacção é fortalecida pela presença de tiosemicarbazido, que no final forma um composto líquido rosado. A concentração de ureia nas amostras de plasma, foi medida com o auxílio de um kit de ureia (Spinreact, 1001329), adaptado a microplacas. Este método baseia-se na catálise da ureia em amoníaco e dióxido de carbono, pela enzima urease (3).



Os iões amónia reagem com salicilato e hipoclorito de sódio (ClONa), na presença de um catalisador (nitroprussiato), formando um composto verde (4).



2.4.3. *Determinação de cortisol na água e em plasma*

A concentração de cortisol nas amostras de água e plasma foi analisada por Radioimunoensaio (RIA), utilizando um anticorpo específico (Guerreiro *et al.* 2006). A técnica de radioimunoensaio é caracterizada pela competição, entre um antigénio marcado radioactivamente e um antigénio não marcado, pela ligação a um anticorpo específico. Desta forma, ambos os antigénios vão competir pelo sítio de ligação ao anticorpo (Stites *et al.* 1997). À medida que a concentração do antigénio não marcado aumenta, o antigénio marcado é removido do centro de ligação do anticorpo. A diminuição da quantidade de antigénio marcado radioactivamente ligado ao anticorpo específico é medida, com o intuito de determinar a quantidade de antigénio presente na amostra alvo (Golsby *et al.* 2003). É muito importante quantificar qual a quantidade de anticorpo necessário para que se dê 50-70% de ligação ao antigénio marcado, num processo de titulação do anticorpo.

Para a determinação de cortisol no plasma este foi diluído em tampão fosfato e aquecido a 70°C por 30 minutos para a desnaturação de eventuais ligações a proteínas plasmáticas. As amostras foram depois incubadas em presença do anticorpo e antigénio marcado radioactivamente com trítio. Após 24 horas as fases ligadas e livres, respectivamente as fracções de antigénios associadas ou não ao anticorpo, foram separadas utilizando centrifugação e carvão activado como agente quelante da fase livre e a radioactividade presente na fase ligada determinada num contador Beckman LC6500, utilizando uma mistura de líquido cintilante.

A medida de cortisol excretado para a água dos tanques realizou-se de forma semelhante após um processo de recuperação e concentração do cortisol presente na água. A água foi filtrada de impurezas por um filtro de papel de Ø0.45 µm. Foi depois filtrada, com o auxílio de uma bomba de vácuo, através duma coluna de extracção de fase sólida (cartuchos Sep-Pak C18), de forma a reter os esteróides presentes na água. Esta coluna foi posteriormente eluída com metanol, e os esteróides concentrados em tubos apropriados. Por fim utilizou-se uma porção de amostra no RIA, conforme descrito em cima.

### **2.5. Estudo da expressão genética de enzimas relacionadas com a síntese e transporte de ureia e eliminação de amónia**

#### *2.5.1. Extracção de ARN total de *H. didactylus**

O ARN total foi extraído dos tecidos (brânquias e fígado) recolhidos nas várias experiências, utilizando-se o método e reagente TRI-Reagent, (Sigma-Aldrich, T9424), tendo-se seguido o protocolo fornecido pelo fabricante. Este método baseia-se essencialmente no uso de tiocianato de guanidina (um forte desnaturante proteico) e de um fenol, que em condições ácidas, e após fragmentação mecânica dos tecidos por homogeneização (ULTRA TURRAX T25, IKA) permite a separação das moléculas de ARN das proteínas e ADN. O ARN foi isolado (sobrenadante) após a adição de clorofórmio e um passo de centrifugação (12000g, 15min, 2-8°C) e purificação do precipitado com etanol a 75%. O ARN foi depois dissolvido em água tratada com dietilpirocarbonato.

Após a extracção, o ARN foi tratado com DNases (DNA-free<sup>TM</sup> – DNase Treatment and Removal Reagents, Applied Biosystems, AM1906) de modo a eliminar

os vestígios de ADN genómico. Este método de extracção baseia-se na degradação do ADN, utilizando uma DNase purificada de bovino. É utilizado um reagente inactivador de DNase, de modo a remover a DNase e os possíveis catiões bivalentes presentes na amostra. Estes iões (e.g.  $\text{Ca}_2^+$  e  $\text{Mg}_2^+$ ) originam-se após o aquecimento da amostra, podendo degradar o ARN. Este protocolo pretendeu remover todo o ADN até níveis inferiores ao do limite de detecção da reacção de polimerização em cadeia (PCR). A qualidade do ARN extraído e a sua quantidade foram aferidas por electroforese em gel de agarose (em TAE- Tris base- Ácido Acético EDTA) e por espectrofotometria (GeneQuant, PHARMACIA).

### 2.5.2. RT-PCR (*Transcrição inversa - reacção de polimerização em cadeia*)

A proporção de moléculas de ARN mensageiro (mARN) de um determinado gene presentes no extracto de ARN é indicativa do nível de expressão desse gene. Dado que o mARN é muito instável e tem tendência para formar estruturas secundárias, é necessário sintetizar moléculas de cADN que lhe são complementares. Assim, como primeiro passo da técnica de RT-PCR realizou-se uma reacção de transcrição inversa (RT). Esta reacção foi conduzida pela enzima transcriptase inversa, dNTPs e *primers* genéricos.

A pouca quantidade de ADN é muitas vezes um problema nos estudos na área da biologia molecular. A técnica desenvolvida por Kary Mullis (Mullis, 1990), em meados dos anos 80, designada por reacção de polimerização em cadeia (PCR) resolveu o problema da escassez de ADN através da produção *in vitro* de centenas de sequências de ADN sem ser necessário recorrer à clonagem (Watson *et al.* 1996). Este método utiliza uma ADN polimerase e um pequeno par de oligonucleótidos sintetizados *in vitro* que são complementares à extremidade da sequência de ADN a ser amplificada, servindo assim como *primers* para o alongamento da cadeia (Hartl & Jones 2006).

A partir do cADN obtido foram amplificados por PCR, os genes codantes para a sintetase do carbamil fosfato (CPSase), sintetase da glutamina do tipo braquial e hepático (GSaseG e GSaseL) e transportador de ureia (UT). Para esta reacção foram utilizados os *primers* descritos na tabela II, desenhados utilizando o programa PRIMER PREMIER 4.0 (PREMIER Biosoft International) com base na sequência homóloga para os respectivos genes em *Opsanus beta*, e disponíveis nas bases de dados do National Centre for Biotechnology Information (NCBI, com os respectivos códigos de acesso

## MATERIAL E MÉTODOS

indicados na tabela II). O volume final da reacção utilizado foi de 25µl, onde 23.5µl correspondiam à solução mix do PCR (17.4µl de H<sub>2</sub>O milliQ, 1µl de *primer* directo e reverso (25pmol/µl), 0.5µl de dNTPs (10mM), 1µl MgCl<sub>2</sub> (50mM) 2.5µl de Tampão de reacção (10x), 0.1µl de *Taq* polimerase (5unit/µl) (EuroTaq, Euroclone) e 1.5µl de cADN). O PCR foi executado num termociclador Multigene (Labnet International, Inc.), com os programas descritos na tabela III. O tipo de programa variou consoante o gene da enzima a estudar, nomeadamente na temperatura e tempo de alinhamento dos *primers*.

**Tabela II:** Sequência dos vários *primers* utilizados para a realização do PCR.

Nome	Sequência dos <i>Primers</i>	Genes a amplificar	Cód. acesso NCBI	Tamanho (pb)
CPSaseFwd1	5' GTTACTGCGTCCCTCTTATGTT 3'	CPSase	AF169248	590
CPSaseRev1	5' GTCGCTTCCCTGAGTCGTG 3'			
GSaseGFwd1	5' GGTGCCAACAATGCTTACGG 3'	GSaseG (Brânquias)	AF532312	595
GSaseGRev1	5' CAGTGCTGAGAATACAGGTGCTT 3'			
GSaseLFwd1	5' ACAGTGGGAGTTTCAGGTAGG 3'	GSaseL (Fígado)	AF118103	332
GSaseLRev1	5' CGTGGATGTTTGAGGTTTCG 3'			
UTFwd1	5' TGCTCCCAACACTTTC 3'	UT	AF165893	537
UTRev1	5' TGGCAGAGCCGAGAT 3'			
UTFwd2	5' ATCTGCCAGTGTTCACTTTGC 3'	UT	AF165893	558
UTRev2	5' TTTGGGTTTCCGTGGTAATG 3'			
RT18SFw	5' TCAAGAACGAAAGTCGGAGG 3'	ARN ribossomal 18S	Não disponível	495
RT18SRv	5' GGACATCTAAGGGCATCACA 3'			

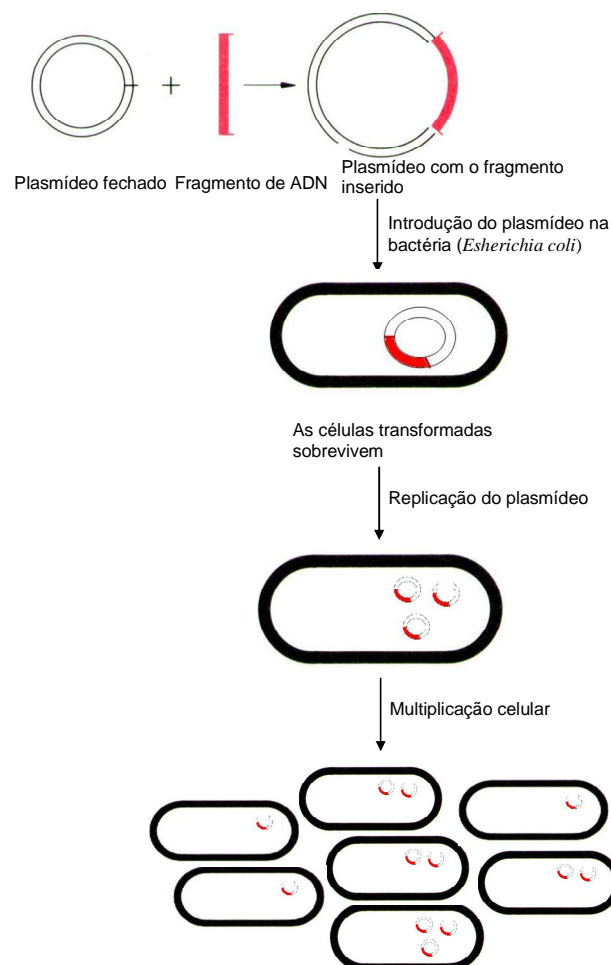
**Tabela III:** Programas do PCR utilizados para amplificar os genes CPSase, GSaseG, GSaseL, UT e 18S.

	Desnaturação Inicial		Desnaturação		Emparelhamento		Extensão		Extensão Final	
	°C	min	°C	seg	°C	seg	°C	seg	°C	min
CPSase	95	2	95	45	54.5	30	72	45	72	7
GSaseG	95	2	95	45	57.1	30	72	45	72	7
GsaseL	95	2	95	45	55.3	30	72	45	72	7
UT	95	2	95	45	57.7	30	72	45	72	7
18S	95	2	95	45	59.0	30	72	45	72	7

Os resultados dos produtos de PCR foram visualizados em gel de agarose a 1.5%, em TBE-Tris base- Ácido Bórico EDTA. Uma imagem representativa dos resultados pode ser observada na figura 29.

### 2.6. Clonagem e Sequenciação de produtos de PCR

Para se proceder à determinação da identidade dos fragmentos de ADN obtidos por RT-PCR foi necessário um processo inicial de clonagem. A clonagem de um fragmento de ADN consiste na sua ligação a um vector, capaz de se replicar para produzir numerosas cópias de ADN externo. A replicação tem lugar quando o vector contendo o fragmento é introduzido num hospedeiro (bactéria) e o aparelho de síntese de ADN do hospedeiro é usado para multiplicar o ADN inserido na célula hospedeira (figura 6).



**Figura 6:** Representação do processo de clonagem (Adaptado de Lodish *et al.* 2005).

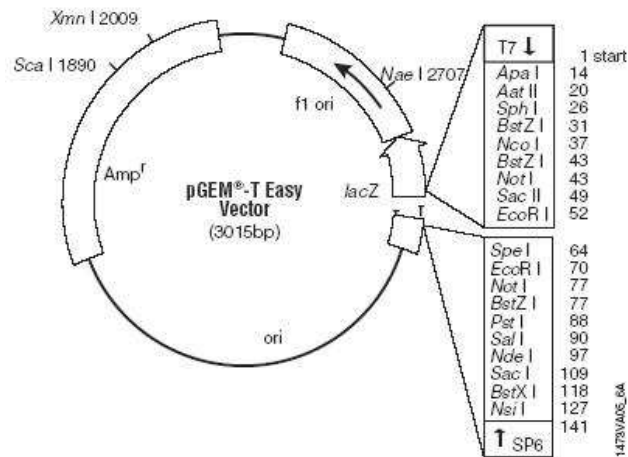
### *2.6.1. Purificação de moléculas de ADN de um gel de agarose*

Para a purificação de moléculas de ADN foi utilizado o kit de extracção (GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit). Os produtos de PCR (utilizou-se o ADN dos PCRs descritos em 2.5.2) foram separados por electroforese em gel de agarose. Após as bandas claramente isoladas, o gel foi seccionado e a fatia de agarose contendo o ADN colocada em tampão de homogenização a 60°C. O DNA foi depois separado da agarose e recuperado numa coluna de afinidade e finalmente eluído em água e guardado a -20 °C ou imediatamente utilizado no processo de ligação.

### *2.6.2. Ligação do produto de PCR purificado ao vector de clonagem pGEM-T Easy*

Nesta experiência utilizou-se como vector o plasmídeo pGEM-T Easy (Promega) (figura 7). Este plasmídeo confere resistência ao antibiótico ampicilina, permitindo fazer uma selecção de clones, uma vez que as células não transformadas, não crescem em meio de cultura que contenha ampicilina. Permite também distinguir as células contendo o plasmídeo com inserto das sem inserto, usando a selecção branco-azul. Uma vez que o ADN de interesse é introduzido no meio do gene codificando para a enzima  $\beta$ -galactosidase, só as células contendo um plasmídeo em que não foi inserido o inserto poderão produzir essa proteína, pelo que estas células poderão degradar o X-Gal no meio e produzir uma coloração azul. Nas células com plasmídeo contendo o inserto a enzima  $\beta$ -galactosidase não é produzida e as células apresentam coloração branca num meio de cultura contendo X-Gal.

Para o processo de ligação foi utilizada uma enzima T4 ligase que junta as extremidades dos fragmentos de ADN (inserto) com as extremidades do vector, aberto no local de clonagem.



**Figura 7:** Representação esquemática do plasmídeo pGEM – T Easy

### 2.6.3. Transformação de células competentes

Após a inserção do ADN de interesse num vector, é necessário introduzi-lo em bactérias competentes (bactérias capazes de incorporar ADN exógeno) que o replicam. O vector foi incubado em meio com bactérias de forma a permear as membranas celulares e inserir-se no seu interior. As células bacterianas usadas nesta experiência, *Escherichia coli* (estirpe XL-1), foram previamente tornadas competentes por tratamento com cloreto de cálcio. Após esta incubação procedeu-se a um choque térmico a 42°C para impermeabilizar as membranas celulares.

Posteriormente as bactérias são plaqueadas em meio de cultivo LB Agar (Sigma) com ampicilina (antibiótico), de modo a evitar o crescimento de bactérias sem o plasmídeo, deixando a crescer na estufa a 37°C durante a noite. Este meio de cultivo possui também X-GAL, o substrato da  $\beta$ -galactosidase, e IPTG que é o composto responsável pela indução deste gene, facilitando a distinção entre clones positivos e negativos (clones negativos possuem o gene da  $\beta$ -galactosidase activo e portanto são capazes de degradar o X-GAL, formando um composto de cor azul). Posteriormente foi feita uma selecção das colónias com fragmento, repicando-se as bactérias para meio LB líquido e ampicilina, deixando-se a incubar por 2 horas a 37°C.

### 2.6.4. Extracção de ADN plasmídico de uma cultura de bactérias (Miniprep)

Este método baseia-se na lise de bactérias pela disrupção da membrana celular, usando uma solução alcalina de pH elevado. O ADN é então libertado e precipitado do restante material celular pela adição de álcool. Este método envolve o uso de três

soluções (P1,P2 e P3). A solução P1 contém Tris, glucose e EDTA. A função dos dois primeiros é manter o pH, enquanto que o EDTA é usado para impedir os iões bivalentes ( $Mg_2^+$  e  $Ca_2^+$ ) de activarem as DNase. A solução P2, contém NaOH (base forte) que degrada os componentes da parede da membrana celular. As proteínas sofrem uma desnaturação e o SDS (detergente) liga-se a elas. O ADN da bactéria não se separa das proteínas semi-desnaturadas e é alvo de precipitação pela acção da solução P3 (KAc) que contém iões potássio, que formam agregados com as proteínas. O SDS precipita de imediato, arrastando o ADN bacteriano e deixando o plasmídeo no sobrenadante. Este sobrenadante foi posteriormente recuperado e o plasmídeo precipitado por centrifugação em presença de isopropanol, purificado com etanol absoluto e ressuspendido em água estéril.

### 2.6.5. Digestão do ADN com enzimas de restrição

A confirmação da clonagem foi obtida através da digestão do ADN por enzimas de restrição (tabela IV), permitindo determinar o tamanho do fragmento de DNA clonado num plasmídeo. A enzima utilizada foi EcoRI, para a qual existem locais de corte de ambos os lados do ponto de inserção do vector, pelo que o inserto é imediatamente libertado. A presença deste fragmento foi observada em gel de agarose a 1.5%.

**Tabela IV:** Digestão com enzimas de restrição

Reagentes	Volume
ADN plasmídico	1,5 $\mu$ l
Buffer <sup>(1)</sup>	0,5 $\mu$ l
Enzima <sup>(2)</sup>	2 $\mu$ l
Água estéril	6 $\mu$ l
Volume final	10 $\mu$ l

(1) O buffer utilizado foi One-Phor-All

(2) A enzima utilizada foi a EcoRI para pGem-T Easy

### 2.6.6. Sequenciação

O método utilizado foi o proposto por Sanger no final dos anos 70 e baseia-se no facto da cadeia de ADN necessitar que um nucleótido tenha determinadas características químicas que permitam a incorporação do seguinte. Numa determinada cadeia em crescimento, a síntese de ADN ocorre pela formação de uma ligação fosfodiéster entre o

grupo livre 5' fosfato de um nucleótido e o grupo 3'OH do outro. Os didesoxinucleótidos (ddNTPs) não possuem um grupo 3'OH livre, mas sim um 3'H. Desta forma, na presença de um didesoxinucleótido, a cadeia em crescimento pára porque não se pode formar a ligação difosfato, produzindo-se apenas fragmentos de ADN e não a totalidade da molécula. A cadeia em crescimento termina e a última base na extremidade 3' da cadeia designa-se por terminador didesoxi (Kreuzer & Massey 2001; Sambrook & Russell 2001). As reacções de síntese são preparadas isoladamente com cada um dos quatro terminadores didesoxi de forma a formar cadeias que terminem, com tamanhos diferentes, num dos quatro didesoxinucleótidos e estas cadeias são identificadas pela incorporação de um didesoxinucleótido marcado. A sequenciação automatizada utiliza didesoxinucleótidos marcados com diferentes fluoróforos, permitindo a detecção simultânea de todos os nucleótidos. O processo de sequenciação foi realizado pelos serviços do Centro de Ciências do Mar, utilizando o sequenciador Genetic Analyser 3130xl (Applied Biosystems).

### 2.7. Análise bioinformática

Após a leitura da sequência dos fragmentos clonados, estas foram comparadas com as sequências disponíveis nas bases de dados de moléculas de cADN, utilizando-se o programa BLAST, disponível na página do NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)), de forma a confirmar a sua identidade. As sequências de ADN obtidas foram depois convertidas em aminoácidos, através do programa BIOEDIT (Hall 1999) e alinhadas com as sequências de proteínas semelhantes disponíveis nas bases de dados públicas, como a descrita acima, utilizando o programa CLUSTALX (Thompson *et al.* 1997). Estes alinhamentos foram posteriormente analisados com o programa GENEDOC (Nicholas *et al.* 1997) de forma a recolher os dados de percentagem de identidade e conservação entre as várias proteínas da mesma família. Para a construção de árvores filogenéticas com base na divergência entre sequências utilizaram-se os programas CLUSTALX e MEGA 3.1 (Kumar *et al.* 2004). As sequências utilizadas e os respectivos códigos de acesso estão indicados nas legendas das figuras dos resultados.

### 2.8. Análises estatísticas

Os dados encontram-se apresentados como médias  $\pm$  erro padrão. As diferenças entre grupos foram consideradas estatisticamente significativas sempre que  $p < 0.05$ .

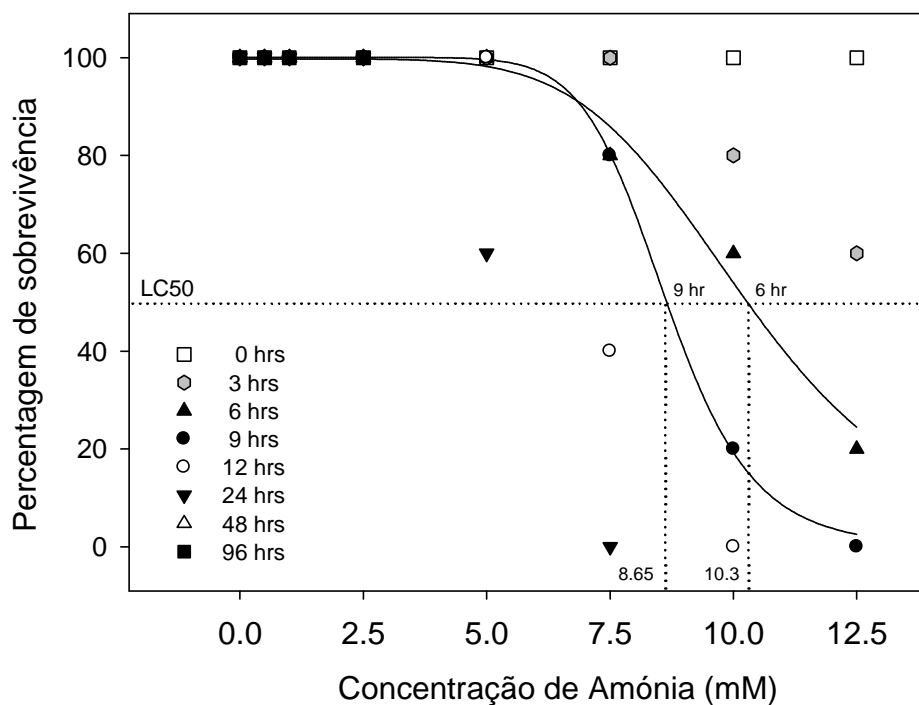
Para se determinar a concentração letal (LC), efectuou-se uma análise PROBIT, descrita por Litchfield & Wilcoxon (1949), para as 6, 9, 24, 48, 96 e 120h. As curvas foram obtidas utilizando um modelo de “best fit” com o programa SigmaPlot 9.0 (Systat Software, Inc.) De modo a verificar se existem diferenças nos níveis de amónia plasmática, ureia plasmática e cortisol plasmático entre o grupo de controlo e entre grupos expostos a diferentes concentrações de amónia ambiental, efectuaram-se análises de ANOVA de uma entrada (One-way Anova), seguido de um teste de comparação múltipla (Student-Newman-Keuls or Dunn). O intervalo de confiança utilizado foi de 95% ( $\alpha = 0.05$ ). Entre dois grupos individuais utilizou-se o teste *t-student*. As correlações entre parâmetros foram efectuadas pelo método de Pearson. Para todos os testes estatísticos, foi utilizado o software Sigma Stat 3.1 (Systat Software, Inc.).

3. RESULTADOS

3.1. Tolerância à amónia ambiental e determinação da concentração letal (LC<sub>50</sub>)

3.1.1. Ensaio I

A tolerância de *H. didactylus* a níveis de amónia no meio pode ser avaliada pela percentagem de sobrevivência em animais expostos a diferentes concentrações e em função do tempo de duração dessa exposição. As percentagens de sobrevivência de face às diferentes concentrações de amónia utilizadas está representada na figura 11. Desta pode-se verificar que nas dosagens mais elevadas, nomeadamente 7.5, 10 e 12.5 mM a sobrevivência não ultrapassou as 24 horas. De modo a determinar a concentração letal (LC<sub>50</sub>), efectuou-se uma análise PROBIT, para as 6 e 9 horas. Obtiveram-se LC<sub>50</sub> de 10.3 e 8.65mM de amónia, respectivamente.



**Figura 11:** Percentagem de sobrevivência em função de diferentes concentrações de amónia. (n=5 peixes por tanque).

Na tabela V pode observar-se os principais parâmetros físico-químicos da água durante a experiência referente à determinação do LC<sub>50</sub>. Não houve alterações

## RESULTADOS

relevantes dos parâmetros físico-químicos da água. A temperatura média da água foi de  $21.3 \pm 1.78^\circ\text{C}$ , com um pH de  $8.0 \pm 0.12$ . A mortalidade nos tanques expostos a concentrações de amónia de 5, 7.5, 10 e 12.5mM foi de 100% às 96h. Nos tanques expostos a concentrações de amónia de 0, 0.5, 1 e 2.5mM registou-se 100% de sobrevivência.

**Tabela V:** Valores ambientais obtidos durante o  $\text{LC}_{50}$ , ao fim das 96h.

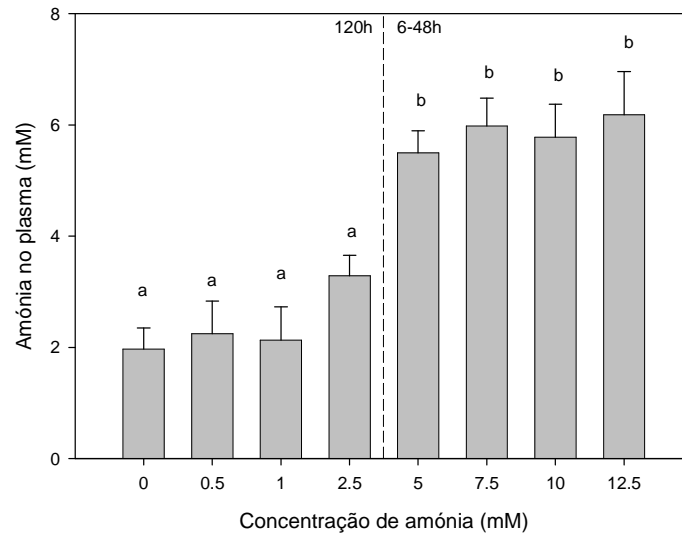
Tanque	$[\text{NH}_4^+]^a$	$[\text{NH}_4^+]^b$	$[\text{NH}_3]^a$	$[\text{NH}_3]^b$	pH <sup>c</sup>	Temperatura <sup>d</sup>	Mortalidade
1	0	$0.2 \pm 0.75$	0,0	0,0	$8.02 \pm 0.07$	$20,96 \pm 0,60$	0%
2	0.5	$0.4 \pm 0.19$	0,01	0,01	$8.04 \pm 0.08$	$21,52 \pm 0,31$	0%
3	1	$1.2 \pm 0.25$	0,02	0,03	$7.98 \pm 0.10$	$21,51 \pm 0,61$	0%
4	2.5	$2.9 \pm 1.21$	0,06	0,07	$7.98 \pm 0.06$	$20,83 \pm 0,42$	0%
5	5	$6 \pm 0.93$	0,11	0,13	$7.96 \pm 0.07$	$21,18 \pm 0,59$	100%
6	7.5	$7.8 \pm 1.37$	0,17	0,18	$7.97 \pm 0.11$	$21,02 \pm 0,84$	100%
7	10	$9.9 \pm 1.61$	0,23	0,23	$7.97 \pm 0.15$	$20,88 \pm 0,71$	100%
8	12.5	$10.4 \pm 3.32$	0,26	0,22	$7.94 \pm 0.18$	$22,3 \pm 1,00$	100%

(a) Valores esperados de concentração de amónia ionizada ( $\text{NH}_4^+$ ) e amónia não ionizada ( $\text{NH}_3$ ) em mmol/l. (b) Valores médios obtidos para as concentrações de  $\text{NH}_4^+$  ( $\pm$  desvio padrão) e  $\text{NH}_3$  em mmol/l. (c) Valores médios medidos de pH  $\pm$  desvio padrão (d) Valores de temperatura médios medidos  $\pm$  desvio padrão, em  $^\circ\text{C}$ .

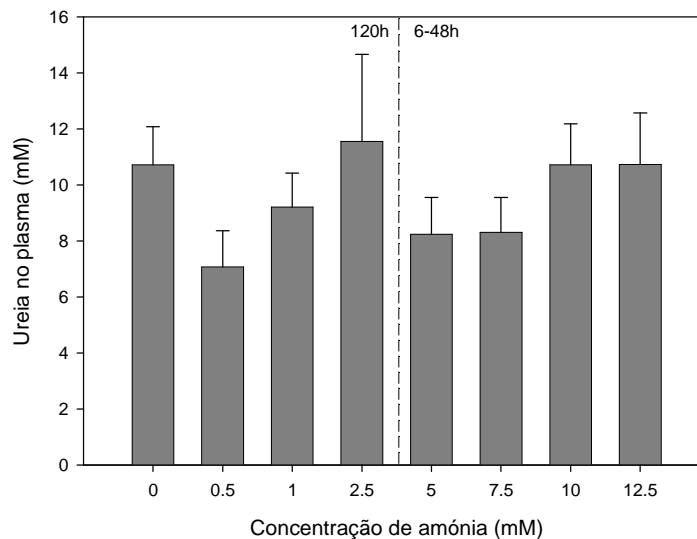
Quando os indivíduos foram expostos a diferentes concentrações de amónia, ocorreram alterações no comportamento, tais como uma menor actividade e reacções a estímulos, bem como convulsões e hiperventilação quando os indivíduos se encontravam moribundos. Nas concentrações de amónia mais elevadas, a pele dos animais tendeu a escurecer, e momentos antes destes morrerem ficou com uma cor esbranquiçada, voltando a ficar escura após a sua morte. Os indivíduos que foram sujeitos a concentrações de amónia mais baixas, quando colocadas em água sem amónia, voltaram a ter a sua cor natural.

A partir do plasma sanguíneo obtido dos peixes utilizados durante as experiências, analisaram-se os níveis de amónia, ureia e cortisol. Os valores de amónia no plasma em função da concentração de amónia ambiental, pode ser observado na figura 12. Verifica-se que os níveis de amónia no plasma aumentam com o aumento da concentração de amónia ambiental. Verificou-se que os grupos que foram expostos a concentrações de amónia inferiores ou iguais a 2.5mM são significativamente diferentes dos grupos que foram expostos a concentrações de amónia iguais ou superiores a 5mM. Ao contrário do que acontece com a concentração de amónia, os níveis de ureia no plasma mantêm-se constantes à medida que aumenta a concentração de amónia

ambiental (figura 13). Entre os diferentes tratamentos e o grupo de controlo, não se verificam grandes diferenças, em relação à ureia em circulação no plasma, com valores médios de  $10.01 \pm 1.32 \text{mM}$  (figura 10).



**Figura 12:** Níveis de amónia plasmática (mM) em função dos valores de amónia ambiental (mM). Os valores representados são as médias de cada grupo  $\pm$  erro padrão. Nas concentrações 5, 7.5, 10 e 12.5mM de  $\text{NH}_4^+$ , os indivíduos encontravam-se mortos ou moribundos. (n=5 peixes por tanque). As amostras de plasma dos grupos expostos a concentrações de 0, 0.5, 1 e 2.5 mM de amónia foram recolhidas ao final de 120h. As amostras dos grupos expostos a concentrações de 5, 7.5, 10 e 12.5 mM de amónia foram recolhidas entre as 6 e 48 horas.

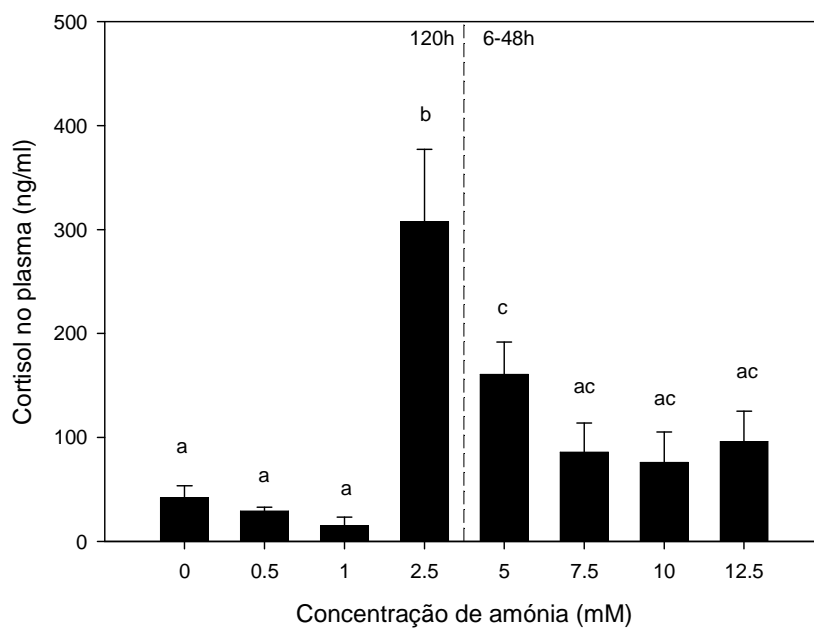


**Figura 13:** Níveis de ureia plasmática (mM) em função dos valores de amónia ambiental (mM). Os valores representados são as médias de cada grupo  $\pm$  erro padrão. Nas concentrações 5, 7.5, 10 e 12.5 mM de  $\text{NH}_4^+$ , os indivíduos encontravam-se mortos ou moribundos. (n=5 peixes por tanque). As amostras de plasma dos grupos expostos a concentrações de 0, 0.5, 1 e 2.5 mM de amónia foram recolhidas ao final de 120h. As amostras dos grupos expostos a concentrações de 5, 7.5, 10 e 12.5 mM de amónia foram recolhidas entre as 6 e 48 horas.

## RESULTADOS

Os níveis de cortisol no plasma foram também avaliados nos animais expostos. Na figura 14, pode-se observar os valores de cortisol plasmático em função da concentração de amónia ambiental. O valor médio de cortisol nos indivíduos do grupo controlo foi de  $42.3 \pm 11.4$  ng/ml, tendo-se obtido valores semelhantes nos grupos expostos a concentrações de amónia de 0.5 e 1 mM. As médias dos grupos expostos a concentrações de amónia iguais ou superiores a 2.5 mM foram significativamente diferentes das dos grupos expostos a concentrações inferiores.

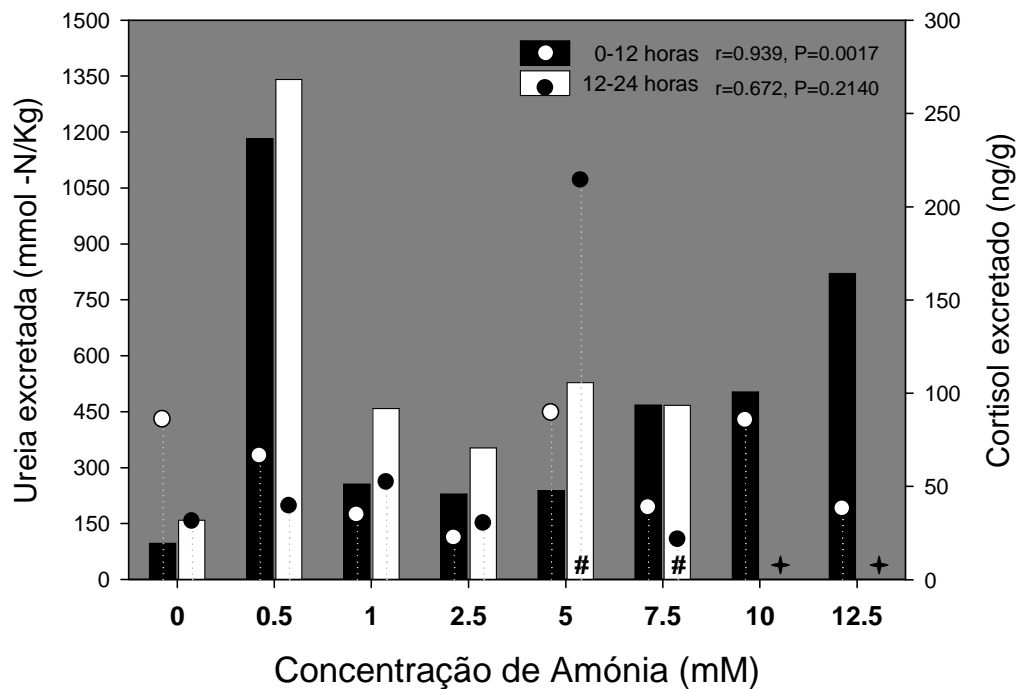
Pode-se também observar que os grupos expostos a concentrações de amónia de 2.5 e 5 mM são significativamente diferentes entre eles e entre o grupo de controlo e os grupos 0.5 e 1 mM. Os grupos expostos a concentrações de amónia de 7.5, 10 e 12.5 mM são significativamente diferentes do grupo exposto a concentrações de amónia de 2.5 mM, mas significativamente iguais aos restantes grupos.



**Figura 14:** Níveis de cortisol no plasma e na água (mM) em função da concentração de amónia ambiental (mM). Os valores representados são as médias de cada grupo  $\pm$  erro padrão. (n=5 peixes por tanque); a, b, c representam grupos estatisticamente diferentes ( $p < 0.05$ ), ac representam grupos estatisticamente iguais ( $p > 0.05$ ); As amostras de plasma dos grupos expostos a concentrações de 0, 0.5, 1 e 2.5 mM de amónia foram recolhidas ao final de 120h. As amostras dos grupos expostos a concentrações de 5, 7.5, 10 e 12.5 mM de amónia foram recolhidas entre as 6 e 48 horas.

A análise da ureia presente nas amostras de água recolhidas a cada 2 horas permite fazer uma avaliação da quantidade deste composto excretado em cada tanque e por unidade de peso do tomando a massa do conjunto de peixes por tanque. Verifica-se

que entre as 0 e 12 horas, os níveis de ureia excretada aumentam com o aumento da concentração de amónia ambiental e os níveis de cortisol excretado, nos grupos expostos até 2.5mM de amónia, diminuem, enquanto que nos grupos expostos a concentrações de amónia superiores a 5mM parece haver algumas oscilações. Entre as 12 e 24h, observa-se que os níveis de ureia excretada mantêm-se constantes, com a excepção do grupo exposto a uma concentração de amónia a 0.5mM (figura 15).

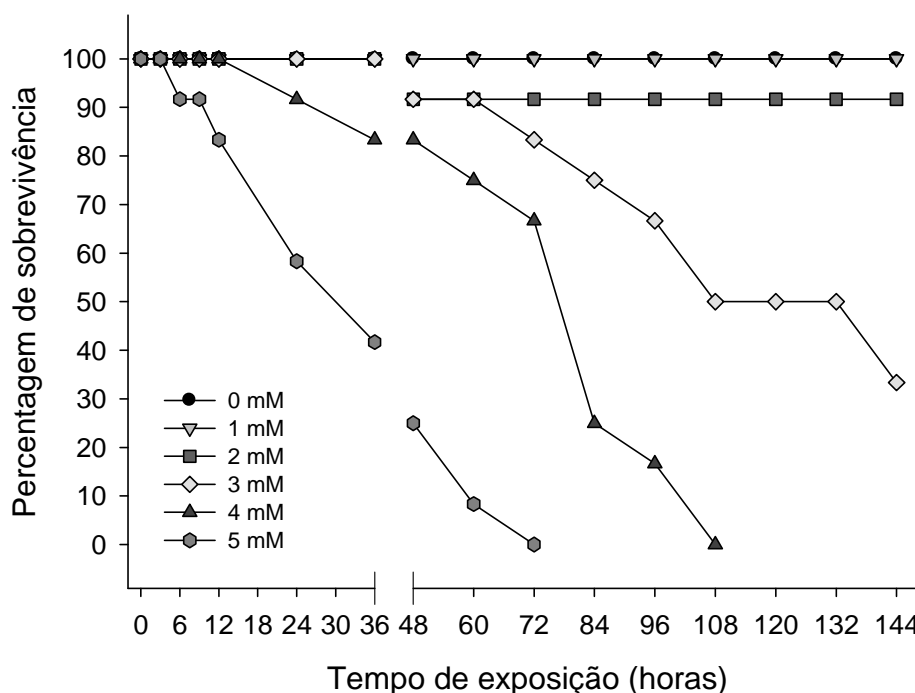


**Figura 15:** Valores médios de ureia excretada (mmol-NKg) e cortisol excretado (ng/g) em função da concentração de amónia ambiental (mM). As barras a preto representam os valores médios de ureia excretada entre as 0-12 horas e as barras a branco os valores entre as 12-24 horas. Os círculos a branco representam os valores médios de cortisol entre as 0-12 horas e os círculos a preto os valores entre as 12-24 horas. (+) Representa os tanques que no final das 24h não tinham peixes. (#) representa os valores de ureia e cortisol excretados recalculados para o peso dos peixes nos tanques dado que houve alguma mortalidade.

Através das análises efectuadas, verificou-se que não existe correlação entre a ureia excretada e o cortisol excretado existente na água. Verificou-se também que não existe uma correlação entre a amónia ambiental e o cortisol excretado, nem entre a amónia ambiental e a ureia excretada. No entanto se considerarmos eliminar o grupo exposto a 0.5mM de amónia verifica-se que há uma correlação entre a amónia ambiental e a ureia excretada entre as 0 e 12 horas, mas que tal não acontece para o período que medeia entre as 12 e as 24 horas.

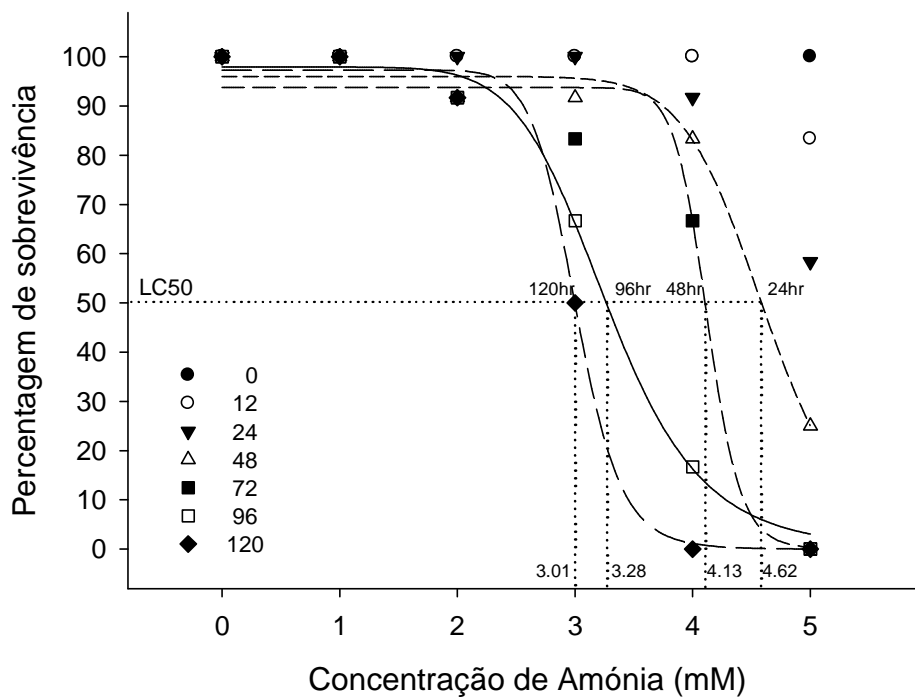
3.1.2. Ensaio II

A percentagem de sobrevivência em função de diferentes concentrações de amónia, está representada na figura 16. A percentagem de sobrevivência dos indivíduos em função do tempo de exposição à amónia ambiental foi de 100% nos grupos de indivíduos que foram expostos a concentrações de amónia de 0 e 1mM.



**Figura 16:** Percentagem de sobrevivência em função de diferentes concentrações de amónia e da duração da exposição (n=12 peixes por tanque).

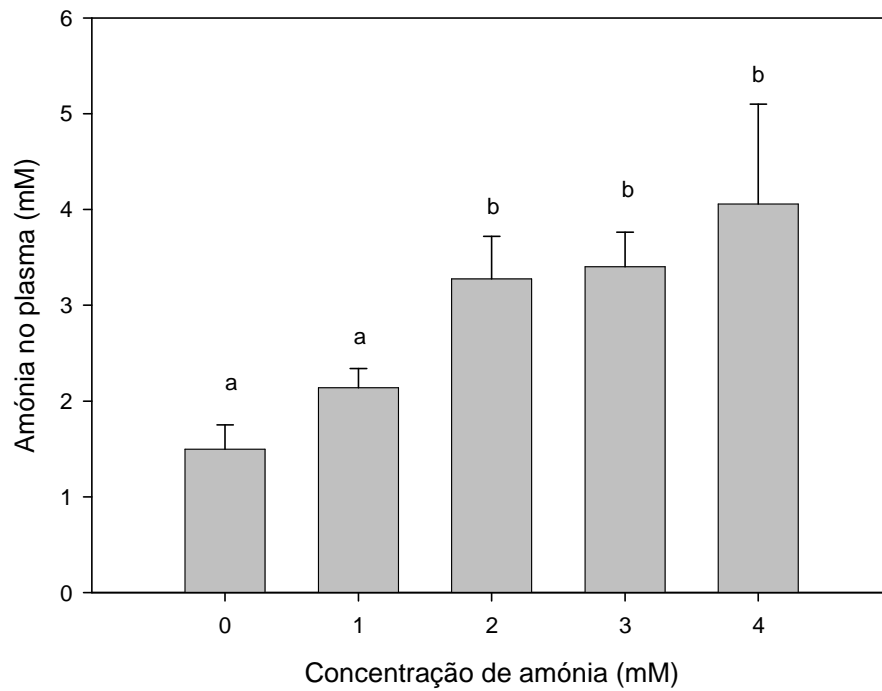
Estes valores podem ser recalculados de forma a permitir o estabelecimento de curvas de concentração letal a vários pontos de sobrevivência e tempo de exposição. Através da análise PROBIT do LC<sub>50</sub> para as 24, 48, 96 e 120h, obteve-se 4.62, 4.13, 3.28 e 3.01mM de amónia, respectivamente, e conforme indicado na figura 17.



**Figura 17:** Percentagem de sobrevivência em função tempo de exposição à amónia ambiental e determinação de concentrações letais para 50% dos indivíduos a diferentes tempos de exposição (n=12 peixes por tanque).

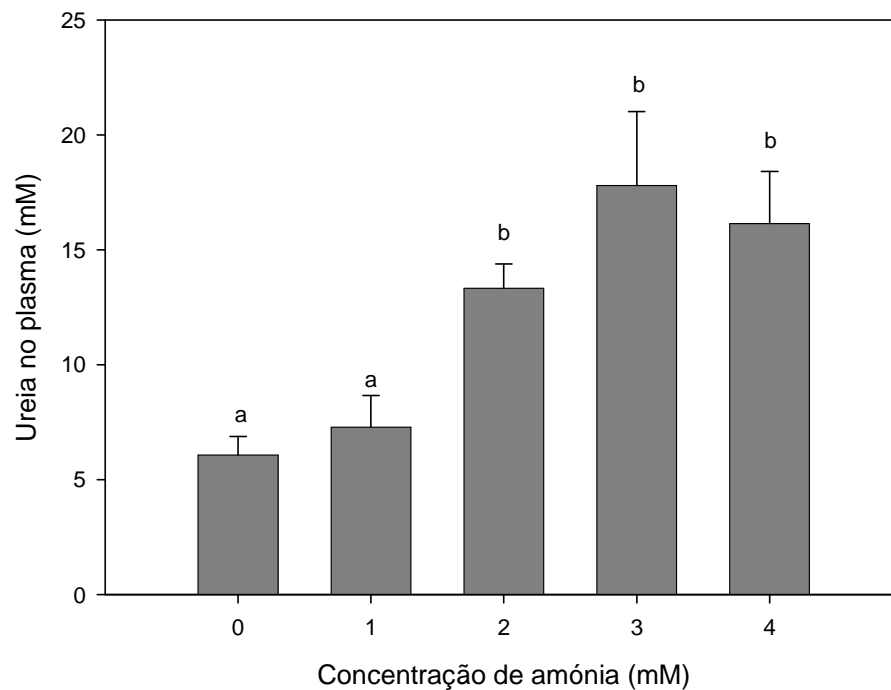
À semelhança com o que ocorreu no primeiro ensaio, os indivíduos expostos a concentrações mais elevadas de amónia, sofreram convulsões e hiperventilação, bem como diminuíram a sua actividade e reacção a estímulos. Nas concentrações de amónia mais elevadas, a pele dos animais também escureceu, e momentos antes destes morrerem ficou com uma cor esbranquiçada.

Os níveis de amónia plasmática aumentam com o aumento da concentração de amónia ambiental (figura 18). Os grupos expostos a menores concentrações de amónia são significativamente diferentes dos grupos expostos a maiores concentrações de amónia.



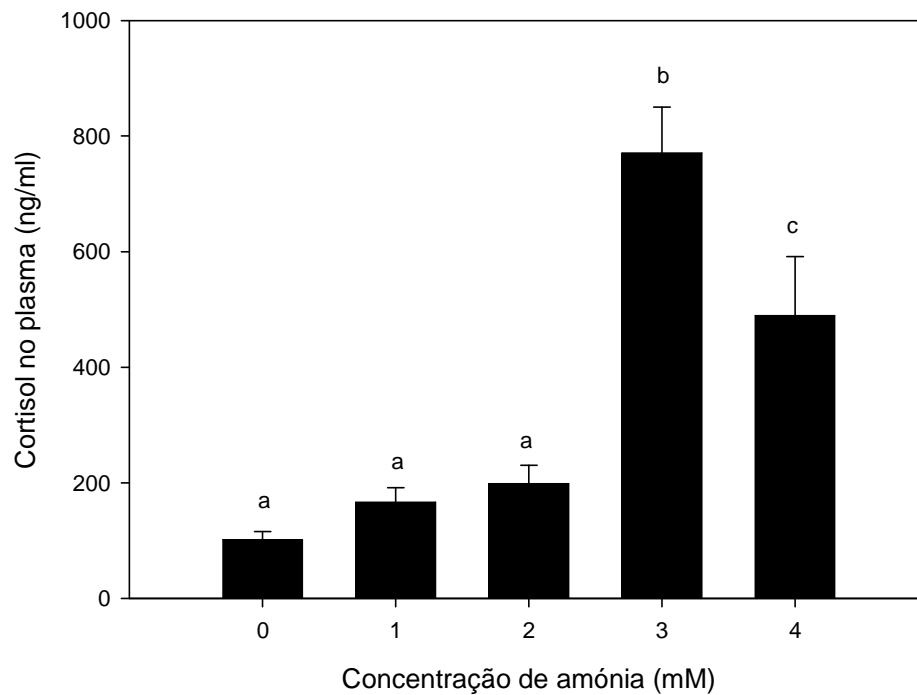
**Figura 18:** Níveis de amónia plasmática (mM) em função dos valores de amónia ambiental (mM). Os valores representados são as médias de cada grupo  $\pm$  erro padrão ao fim de 120 horas de exposição. (n=12 peixes por tanque); a e b representam grupos estatisticamente diferentes ( $p < 0.05$ ).

Verifica-se que os níveis de ureia plasmática aumentam com o aumento da concentração de amónia ambiental (figura 19). O grupo controlo e o grupo exposto a concentração de amónia de 1 mM, são significativamente diferentes dos grupos expostos a concentrações de amónia de 2, 3 e 4mM. O valor médio de ureia plasmática nos indivíduos do grupo de controlo foi de  $6.07 \pm 0.81$  mM, tendo-se obtido valores semelhantes no grupo exposto a concentrações de amónia de 1mM.



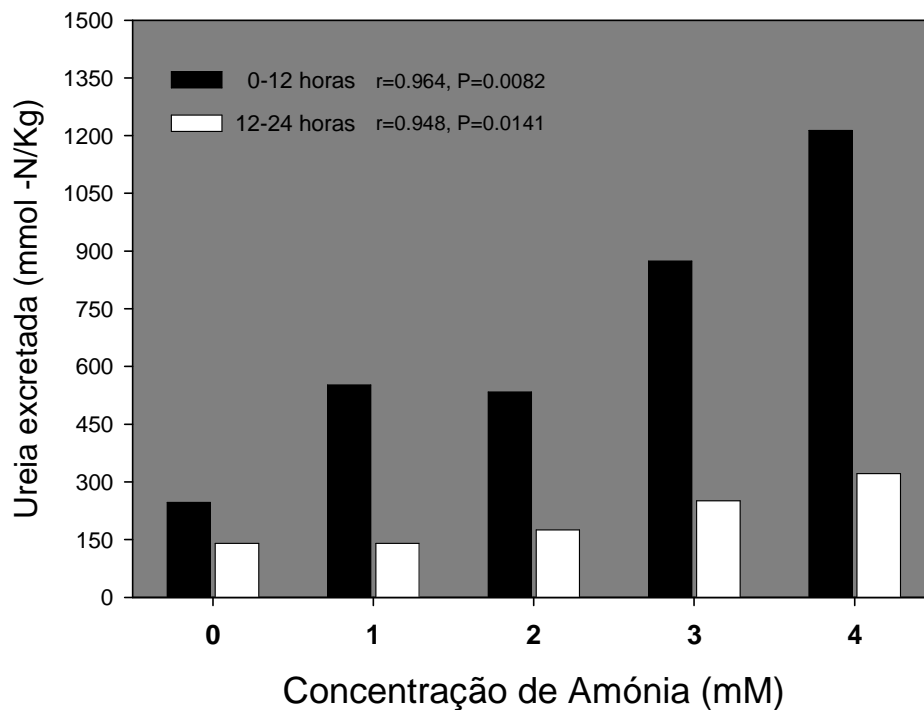
**Figura 19:** Níveis de ureia plasmática (mM) em função dos valores de amónia ambiental (mM). Os valores representados são médias de cada grupo  $\pm$  erro padrão ao fim de 120 horas de exposição. (n=12 peixes por tanque); a e b representam grupos estatisticamente diferentes ( $p < 0.05$ ).

Na figura 20, pode-se observar os valores de cortisol plasmático em função da concentração de amónia colocada nos tanques. O valor médio de cortisol nos indivíduos do grupo de controlo foi de  $101.85 \pm 13.98$  ng/ml, tendo-se obtido valores semelhantes nos grupos expostos a concentrações de amónia de 1 e 2mM. O mesmo não acontece em relação aos grupos expostos a concentrações de amónia de 3 e 4mM, pois para além de serem estatisticamente diferentes dos grupos expostos a concentrações de amónia inferiores a 2.5mM, são também estatisticamente diferentes entre si.



**Figura 20:** Níveis de cortisol plasmático (mM) em função da concentração de amônia ambiental (mM). Os valores apresentados são as médias de cada grupo  $\pm$  erro padrão ao fim de 120 horas de exposição. (n=12 peixes por tanque) a, b e c representam grupos estatisticamente diferentes  $p < 0.05$ .

A análise da quantidade de ureia nas amostras de água recolhidas a cada 2 horas durante os ciclos de 24 horas no ensaio 2 mostrou que os níveis de excreção de ureia foram semelhantes aos observados no ensaio 1. Verifica-se que os níveis de ureia excretada, tanto entre as 0 e 12 horas como entre as 12 e as 24 horas parecem depender da concentração de amônia ambiental, conforme dado pelo coeficiente e valor P do teste de correlação de Pearson. No entanto, as quantidades absolutas foram muito mais elevadas entre as 0 e 12 horas do que entre as 12 e 24 horas (figura 21).



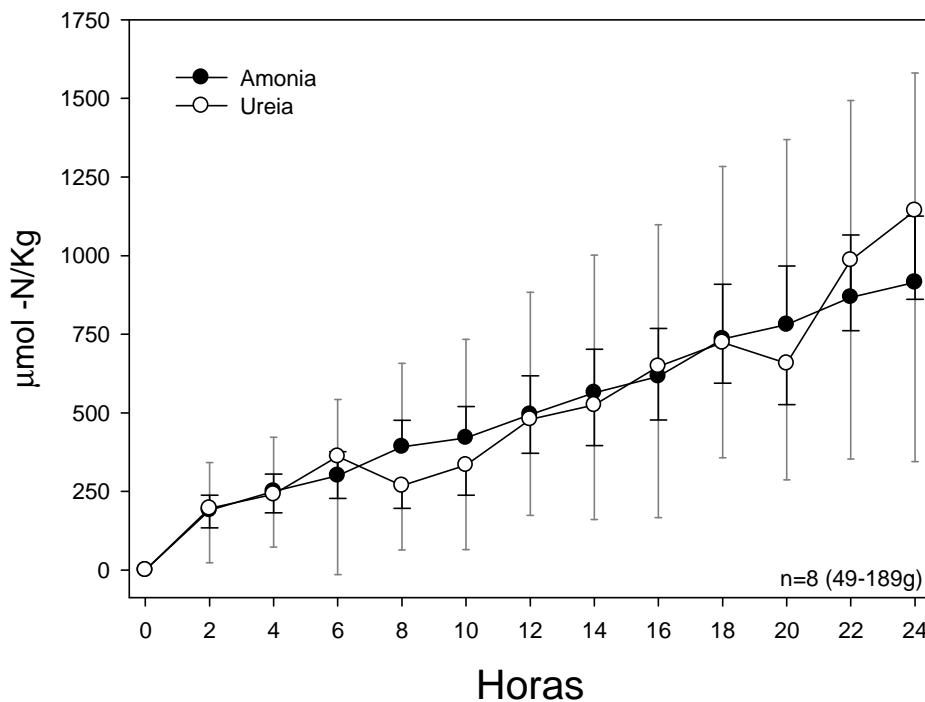
**Figura 21:** Valores de ureia excretada (mmol-NKg) em função da concentração de amónia ambiental (mM). As barras a preto representam os valores de ureia excretada entre as 0-12 horas. As barras a branco representam os valores de ureia excretada entre as 12-24 horas.

### 3.2. Análise dos padrões de excreção

Durante o decorrer da experiência registaram-se valores médios de pH de  $8.0 \pm 0.05$ , com temperaturas médias de  $17.8 \pm 0.70^\circ\text{C}$  e valores de  $\text{O}_2$  de  $7.6 \pm 0.13\text{mg/L}$  com uma saturação de  $98 \pm 1.0\%$ . A partir da água recolhida a cada 60min, pôde-se analisar os níveis de amónia e ureia na água.

#### 3.2.1. Ensaio I

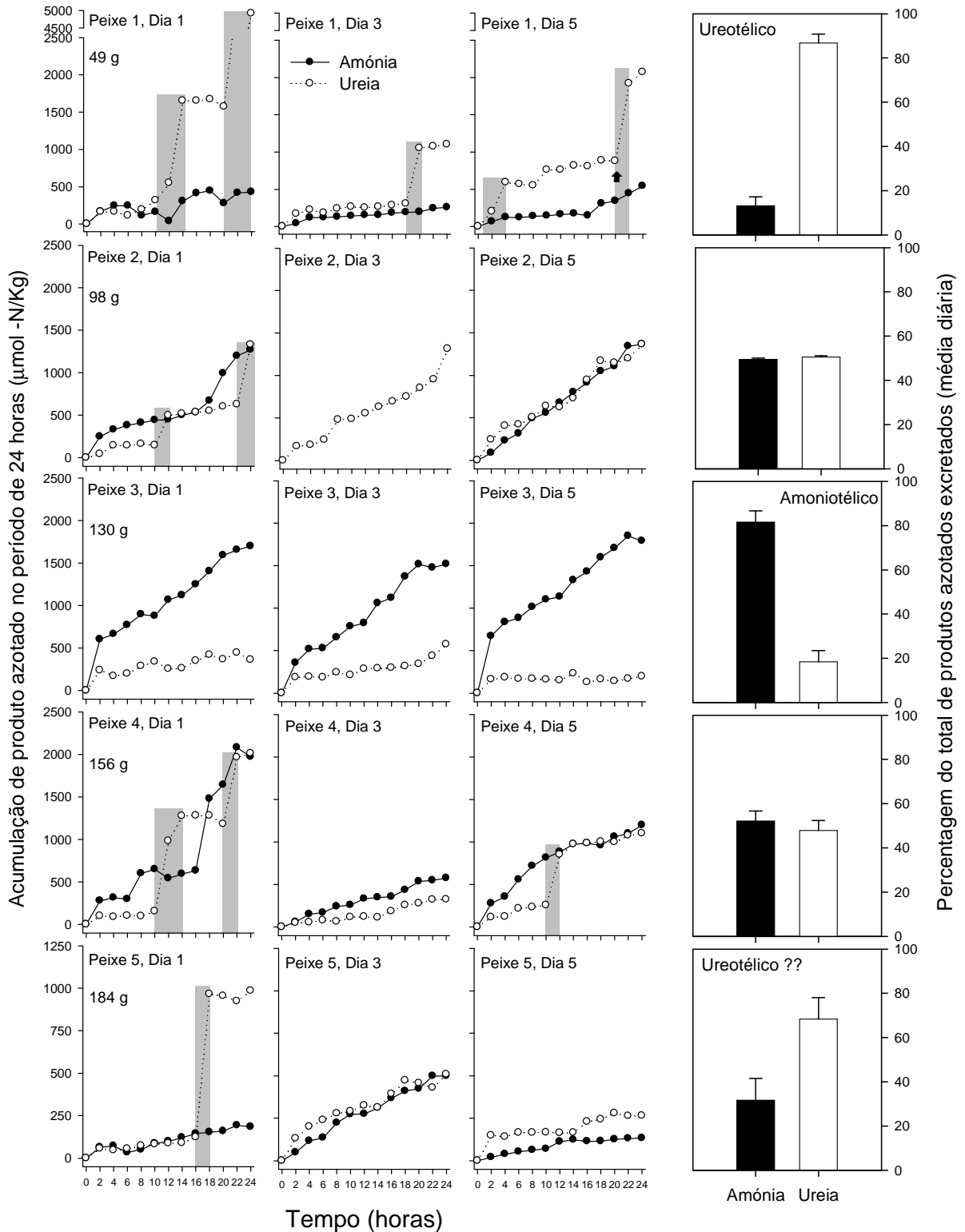
Na figura 22, observa-se a média dos valores, de 12 peixes durante os cinco dias da experiência, dos compostos azotados em função do tempo. A excreção de ambos os compostos foi semelhante, em que a percentagem de amónia foi de 50.68% e a de ureia foi de 49.32%. Pela análise das barras de erro, que indicam desvio e erro padrão, é possível observar o elevado grau de variabilidade entre os peixes.



**Figura 22:** Padrão de excreção de todos os peixes durante cinco dias dos compostos azotados (amônia e ureia) em função do tempo. As barras a cinzento representam o desvio padrão. As barras a preto representam o erro padrão. (n=12 peixes);

Através da análise dos gráficos (figura 23), pode observar-se a variação da excreção dos compostos azotados em cinco peixes em três dias e a média de ureia e amônia excretada durante esses três dias. Verifica-se que, em alguns dias a excreção de ureia se dá por pulsos, enquanto que nos restantes dias é contínua ao longo do tempo. A partir desta análise, conseguiu-se determinar a percentagem de ureia e amônia excretada em cinco peixes durante os três dias. Verifica-se que no peixe 1 (87%) e no peixe 5 (68%), as excreções sob forma de ureia são muito superiores às excreções sob a forma de amônia. Nos peixes 2 (51%) e 4 (48%), as excreções de ambos os compostos são muito semelhantes, verificando-se em ambos os casos a ocorrência de pulsos. Apenas no peixe 3, é que se verifica que as excreções sob a forma de amônia (82%) são muito superiores às excreções sob a forma de ureia (18%). Através do gráfico pode-se ainda observar que no peixe 1 ocorreram pulsos de ureia nos três dias, em oposição ao que se observa no peixe 3.

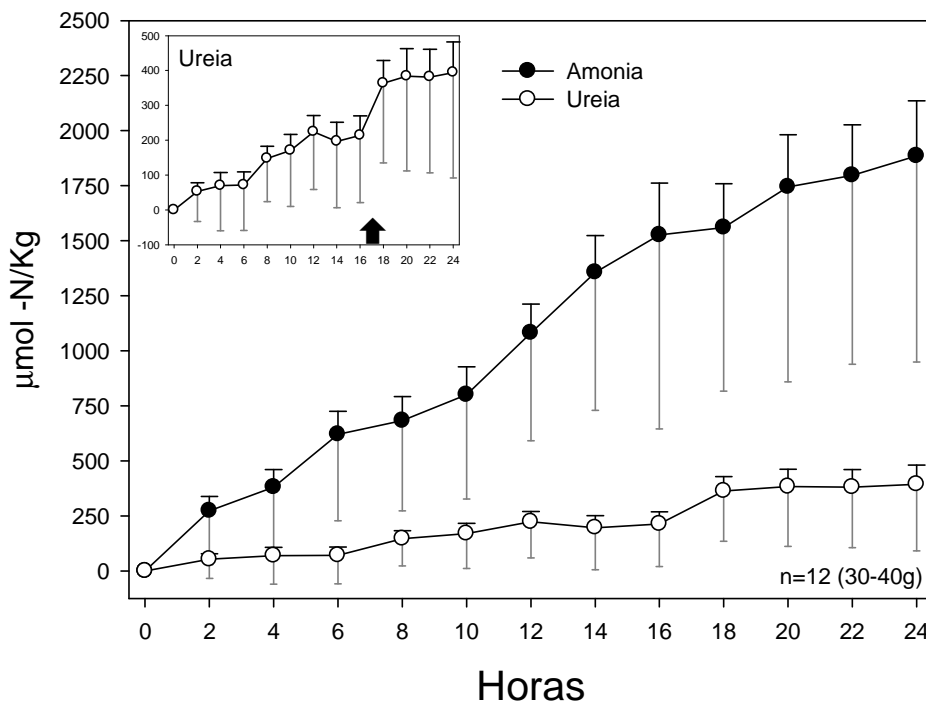
## RESULTADOS



**Figura 23:** Variação da excreção dos compostos azotados (amônia e ureia) em cinco peixes em três dias e a média de amônia e ureia excretadas durante esses três dias. As barras a cinzento representam pulsos de ureia.

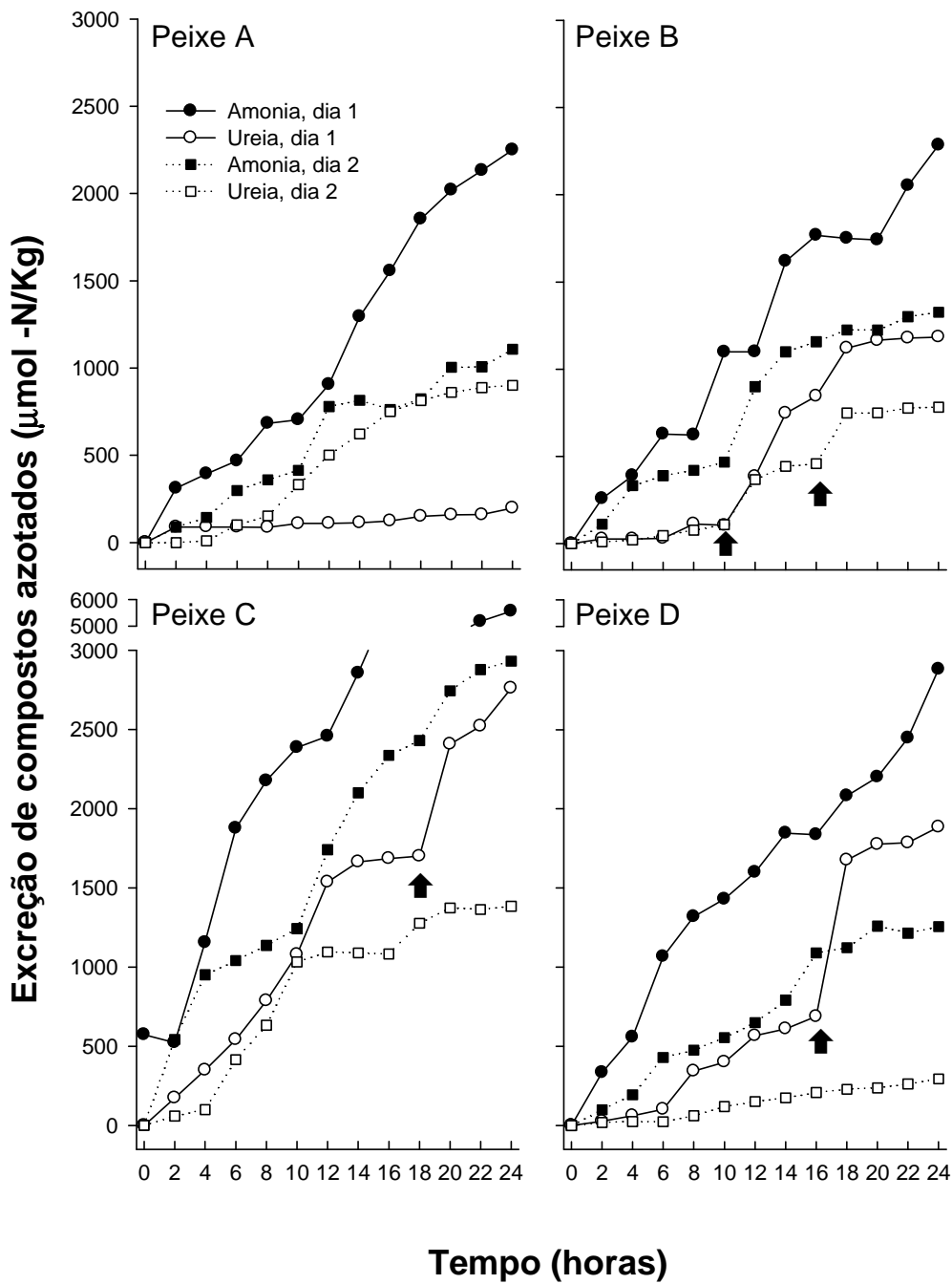
3.2.2. Ensaio II

Na figura 24, observa-se a média dos valores, de 12 peixes durante os dois dias da experiencia, dos compostos azotados em função do tempo. Verifica-se que a excreção sob a forma de amónia (78%) foi muito superior do que a excreção sob a forma de ureia (22%). Verifica-se também que existe uma grande variabilidade entre peixes.



**Figura 24:** Padrão de excreção de todos os peixes durante dois dias dos compostos azotados (amónia e ureia) em função do tempo. As barras a cinzento representam o desvio padrão. As barras a preto representam o erro padrão. A imagem no canto superior esquerdo representa a variação de ureia durante os três dias em todos os peixes. (n=12 peixes);

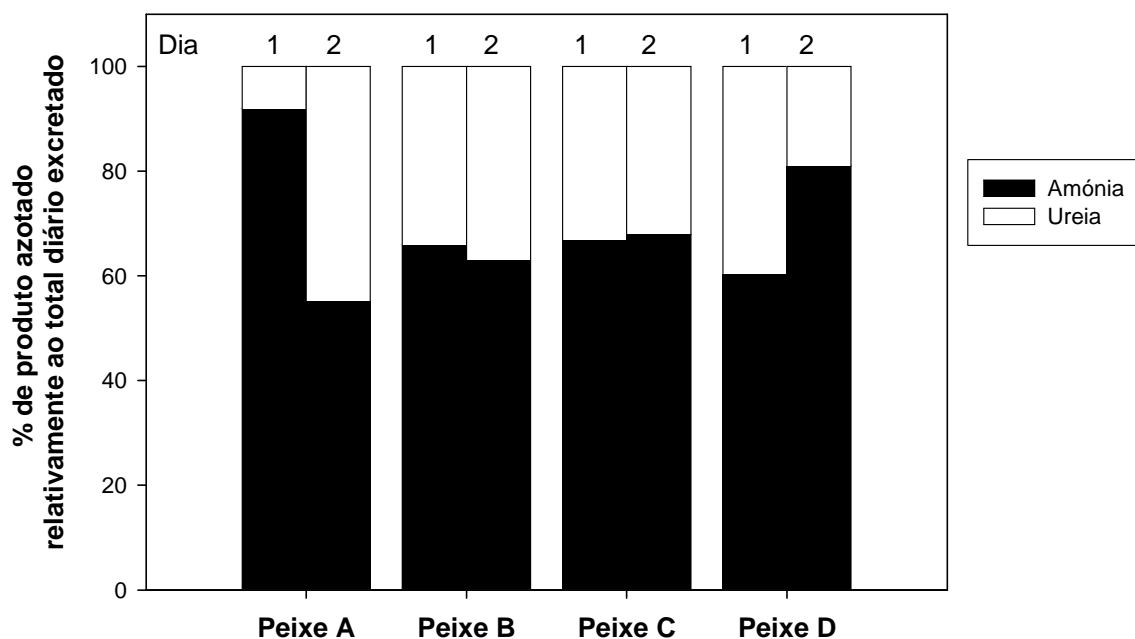
Na figura 25, pode observar-se a variação da excreção dos compostos azotados em quatro peixes durante dois dias. Verifica-se que em todos os peixes nos dois dias a excreção de amónia é sempre superior à excreção de ureia. Verifica-se ainda que em todos os peixes, com excepção do peixe A, ocorreram pulsos de ureia entre as 16 e 18h.



**Figura 25:** Variação da excreção dos compostos azotados em quatro peixes durante dois dias. As setas a preto representam possíveis pulsos de ureia.

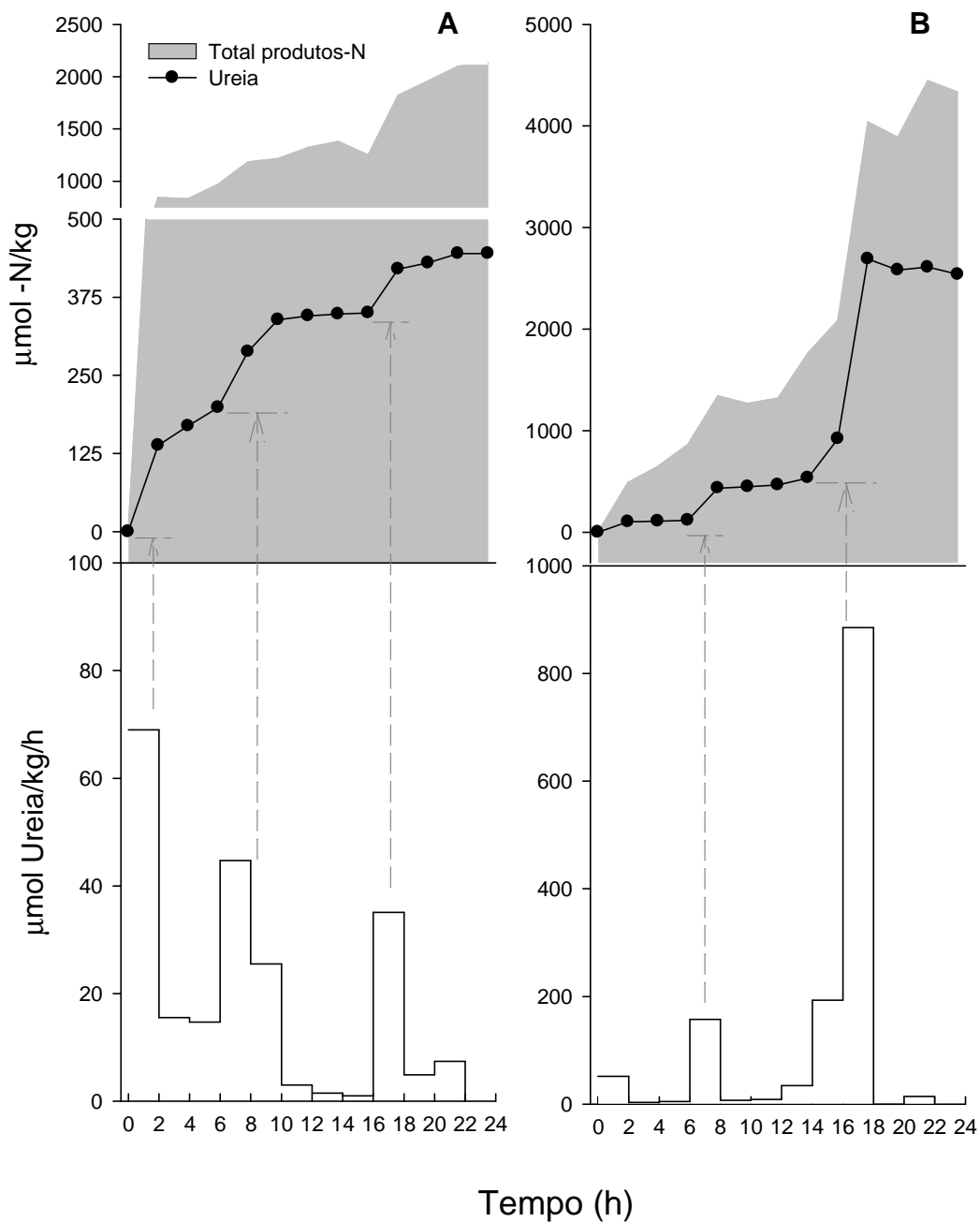
Através da figura 26, pode-se observar os valores médios excretados nos quatro peixes durante os dois dias. Verifica-se que em ambos os dias a excreção de amónia em todos os peixes é muito superior à excreção de ureia. No peixe A, observa-se que no primeiro dia, os níveis de amónia (92%) são muito superiores aos níveis de ureia (8%). No entanto, no segundo dia verifica-se que a percentagem de excreção dos compostos

azotados é muito semelhante (amónia-55% e ureia-45%). No peixe D, observa-se o contrário, em que no primeiro dia a excreção de amónia (60%) e ureia (40%) são semelhantes, enquanto que no segundo dia, observa-se que a percentagem de amónia excretada é muito superior (81%) à ureia excretada (19%). No peixe B e C, verifica-se que a excreção de amónia e ureia azotados não difere muito entre os dois dias. No entanto, no geral, a excreção total de produtos azotados é maior no primeiro que no segundo dia, sendo que houve um dia de intervalo entre eles no qual os fluxos não foram medidos.



**Figura 26:** Percentagem média do total excretado por dia relativamente ao total de compostos azotados excretados.

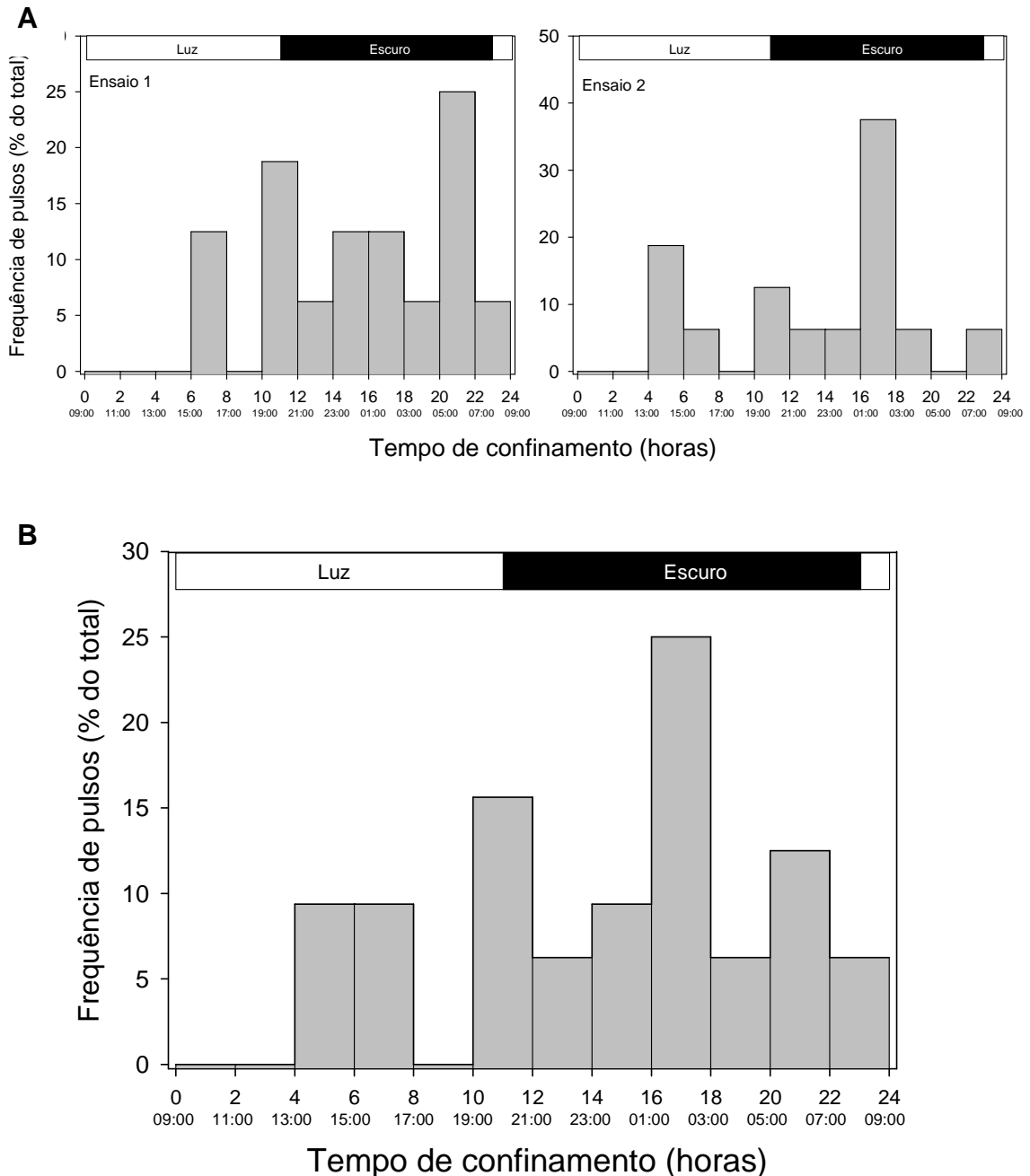
A eliminação de produtos azotados ao longo de um ciclo de 24h é cumulativa, levando a um aumento da quantidade do total dos produtos azotados ao longo do tempo. Na figura 27 B são demonstradas as taxas de excreção (em  $\mu\text{mol/kg/h}$ ) em intervalos de 2 horas e como isso se traduz na curva cumulativa, em 27 A e como esta contribui de forma mais ou menos significativa para a acumulação total de produtos azotados na água. Verificou-se a ocorrência de pulsos entre as 0h-2h, 6h-8h e 16h-18h de amostragem, traduzindo-se por exemplo em aumentos de aproximadamente 20 a  $50\mu\text{mol/kg/h}$  ou de 0 a  $40\mu\text{mol/kg/h}$  no peixe A ou de 0 a  $180\mu\text{mol/kg/h}$  ou mesmo de 200 a  $900\mu\text{mol/kg/h}$ , no peixe B.



**Figura 27:** Total de ureia (cumulativa) excretada ao longo do tempo e taxa total dos produtos azotados excretados ao longo do tempo num peixe do ensaio 1 e outro do ensaio 2. As setas a cinzento indicam a ocorrência de pulsos. Notar a diferença de escala entre os dois animais.

Em ambos os ensaios realizados, verifica-se que a frequência de pulsos ocorre mais vezes no período escuro do que no período de luz, tendo os pulsos duração semelhante (figura 28 A). Numa análise total de ambos os ensaios, verifica-se que os pulsos ocorrem maioritariamente no período escuro, evidenciando-se no entanto um período diurno (entre a 13h-17h) e sobretudo um pico entre as 19h-21h (que abrange o

ponto de corte da luz artificial, às 20:00h) e um máximo entre a 1h-3h onde a excreção total de ureia foi cerca de 16% e 25% respectivamente (figura 28 B), assim como um outro pico entre as 5 e as 7 (antes do acender das luzes, às 8:00h).



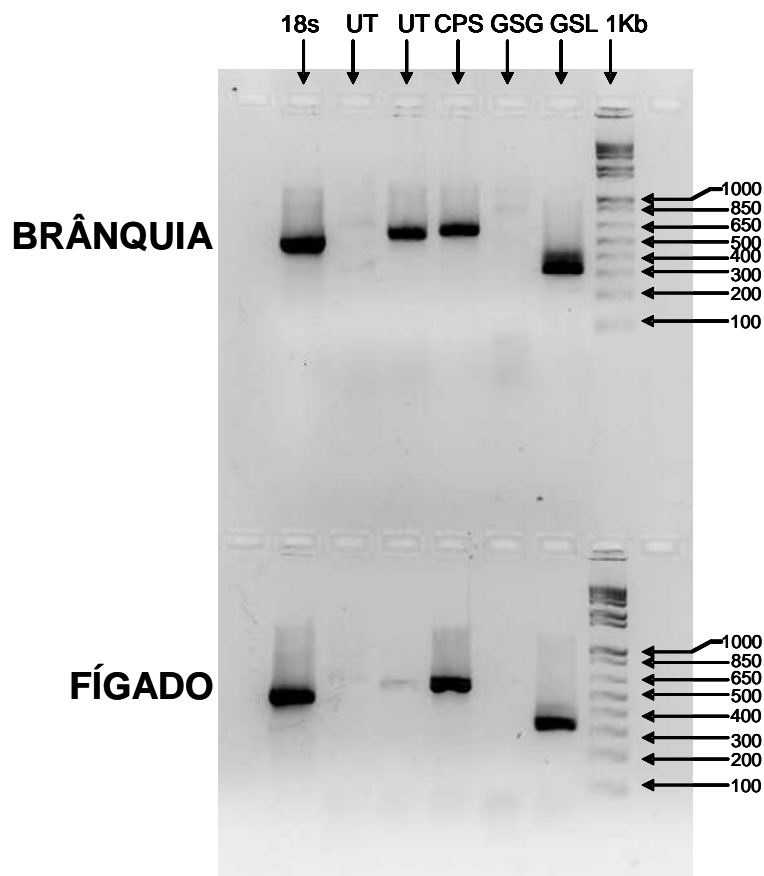
**Figura 28:** (A) Ocorrência de pulsos em função do tempo a que os indivíduos se encontram confinados, nos dois ensaios realizados. (B) Total, dos dois ensaios realizados, da ocorrência de pulsos em função do tempo a que os indivíduos se encontram confinados.

Em ambos os ensaios de fluxos, foram retiradas amostras de sangue para posteriores análises de amônia, ureia e cortisol. No entanto não foi possível estabelecer

relações significativas e importantes entre os níveis plasmáticos e o padrão de fluxo ou os níveis totais de amônia ou ureia excretados (ver tabelas em anexo I).

### 3.3. Expressão genética das enzimas relacionadas com a síntese e transporte ureia e eliminação de amônia

A partir dos tecidos recolhidos dos peixes (brânquias e fígado), foi extraído ARN total, sendo sintetizado posteriormente em moléculas de cDNA. A partir do cADN obtido foram amplificados por PCR, os genes codantes para: a sintetase do carbamil fosfato (CPSase), sintetase da glutamina (GSaseG e GSaseL) e transportador de ureia (UT). O transportador de ureia e a sintetase da glutamina encontram-se mais presentes nas brânquias que no fígado. Pode-se ainda observar que se obteve a expressão dos genes nos tamanhos esperados (figura 29).



**Figura 29:** Expressão dos genes do 18S, do UT (par 1 e par 2 de *primers*), da CPS, da GSG e da GSL nas brânquias e no fígado.

Através da figura 30 A, pode observar-se a expressão dos genes da GSase, CPSase e 18S. O 18S foi usado como padrão, não se verificando diferenças neste gene. Na figura 30 B e 30 C, pode-se observar a variação da expressão dos genes da sintetase da glutamina e da sintetase do carbamil fosfato no fígado em função da concentração de amónia colocada nos tanques.

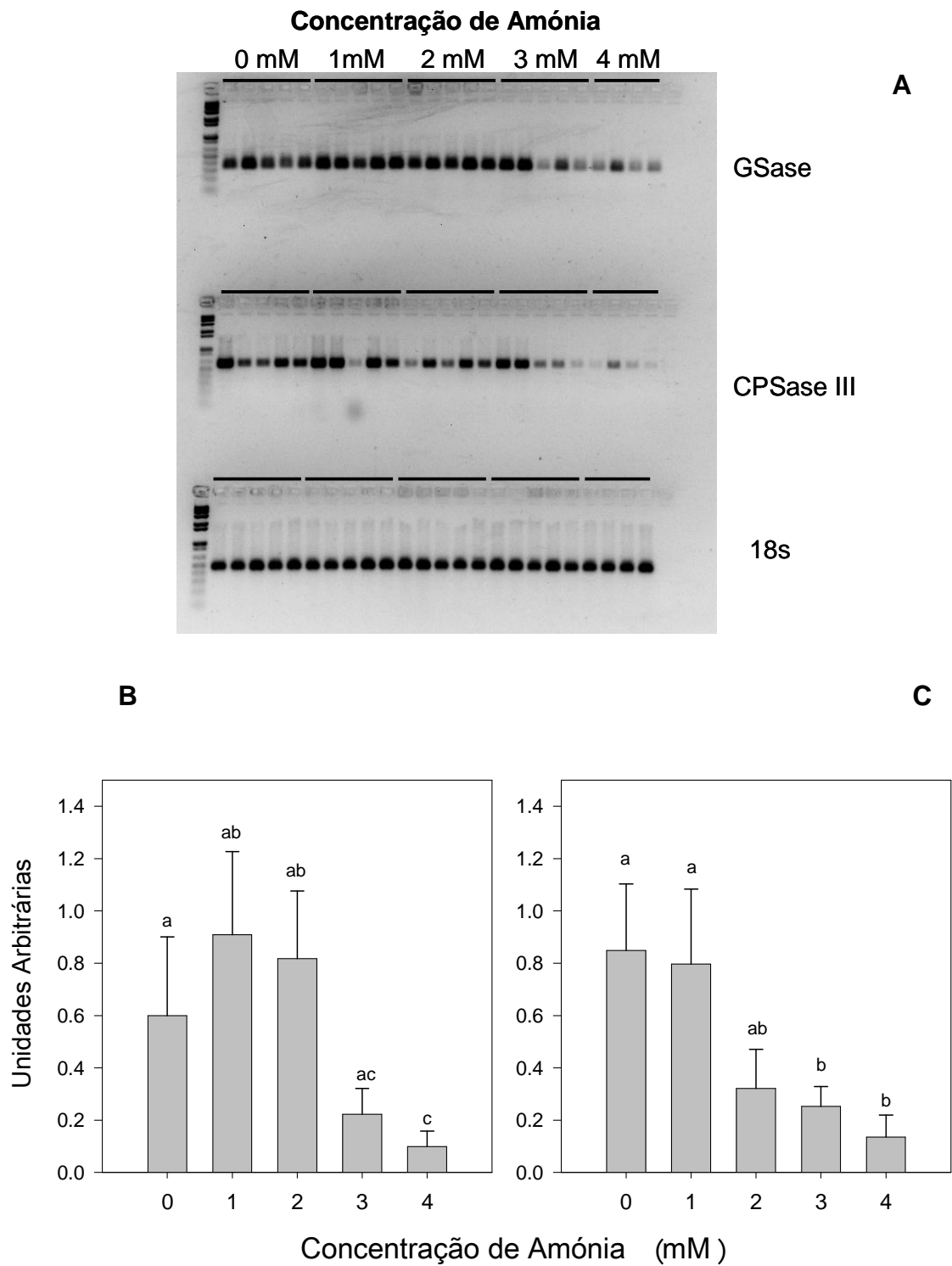
Verifica-se que com o aumento da concentração de amónia ambiental, a expressão do gene da GSase diminui. A expressão do gene da GSase no fígado é mais elevada ( $1.57 \pm 0.47$ ) no grupo onde foi colocado 1 mM de amónia. Este grupo e o grupo que foi exposto a uma concentração de amónia de 2 mM são estatisticamente iguais ao grupo de controlo. Verifica-se que o grupo de controlo (0 mM) e o grupo que foi exposto a 4 mM de amónia são estatisticamente diferentes entre si. Entre os grupos expostos a diferentes concentrações de amónia e o grupo controlo, não se verificam diferenças relevantes, em relação à ureia em circulação no plasma, com valores médios de  $10.01 \pm 1.32$  mM.

A expressão do gene da CPSase III no fígado diminui à medida que aumenta a concentração de amónia, sendo o valor mais elevado ( $1.25 \pm 0.51$ ) no grupo exposto a 1 mM de amónia e o valor de expressão mais baixo ( $0.03 \pm 0.03$ ) para o grupo onde foi colocado maior concentração de amónia (4 mM).

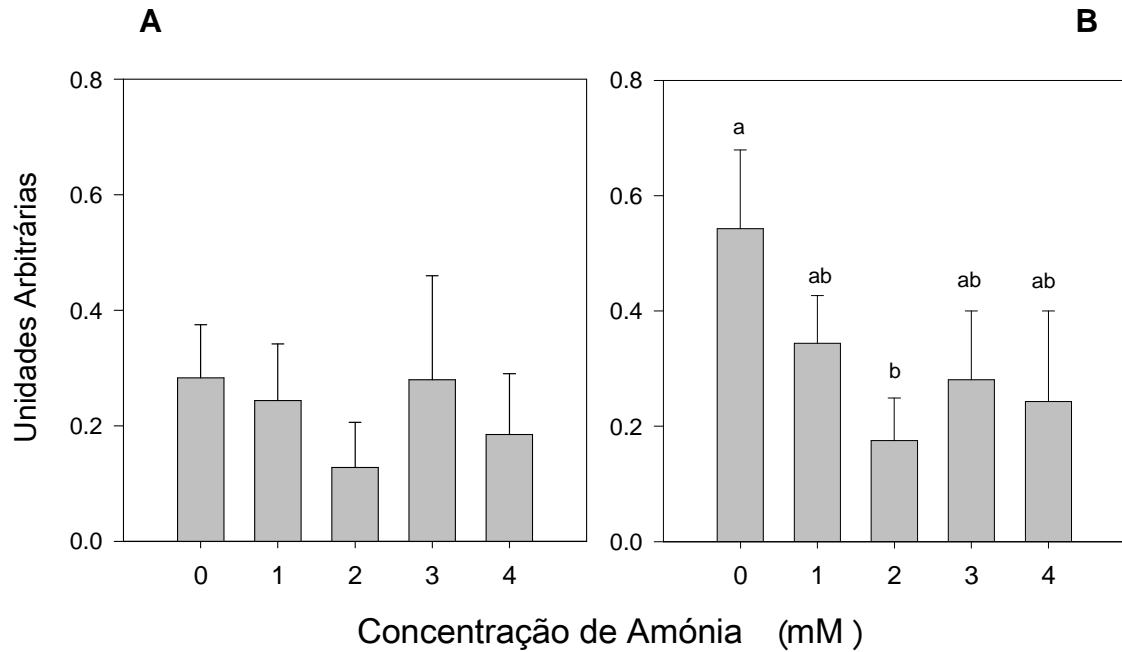
Na figura 31, observa-se a variação da expressão do gene da sintetase da glutamina e da sintetase III do carbamil fosfato nas brânquias em função da concentração de amónia colocada nos tanques.

A expressão do gene da GSase nas brânquias, de um modo geral mantém-se constante à medida que aumenta a concentração de amónia no tanque, sendo o valor mais elevado ( $0.28 \pm 0.09$ ) para o grupo de controlo (0 mM) e o valor de expressão mais baixo ( $0.13 \pm 0.08$ ) para o grupo exposto a uma concentração de amónia de 2 mM. Obtiveram-se valores semelhantes entre o grupo de controlo e o grupo que foi exposto a concentrações de amónia de 3 mM ( $0.28 \pm 0.18$ ), (figura 31 A).

Na expressão do gene da CPSase, verifica-se que o grupo de controlo e o grupo exposto a uma concentração de amónia de 2 mM, são estatisticamente diferentes entre si e que os grupos expostos a concentrações de amónia de 1, 3 e 4 mM são estatisticamente iguais tanto ao grupo de controlo como ao grupo exposto a 2 mM de amónia (figura 31 B).

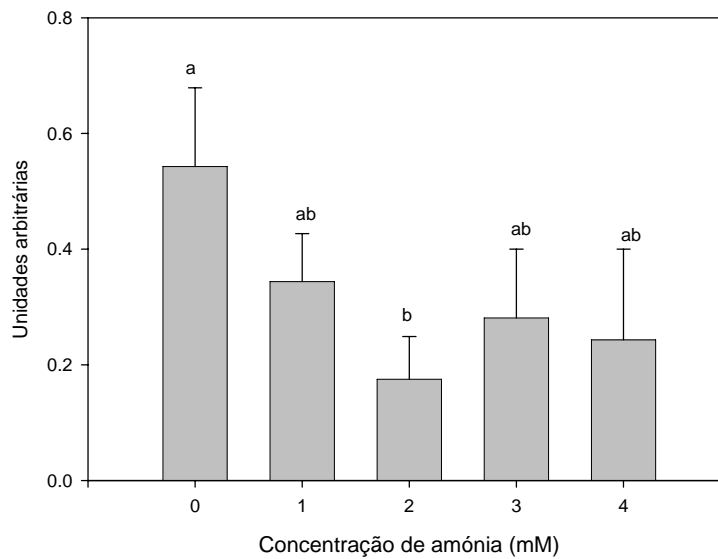


**Figura 30:** Expressão dos genes da GSase, CPSase e 18S no fígado (A). Variação da expressão do gene da sintetase da glutamina no fígado (B) e da sintetase III do carbamil fosfato no fígado (C) para as diferentes concentrações de amónia ambiental (mM). Os valores apresentados são as médias de cada grupo  $\pm$  erro padrão (n=5 peixes por tanque). a, b representam grupos estatisticamente diferentes ( $p < 0.05$ ) e ab, ac representam grupos estatisticamente iguais ( $p > 0.05$ ).



**Figura 31:** Variação da expressão do gene da sintetase da glutamina (A) e da sintetase do carbamil fosfato (B) nas brânquias para as diferentes concentrações de amónia (mM). Os valores apresentados são as médias de cada grupo  $\pm$  erro padrão (n=5 peixes por tanque). a, b representam grupos estatisticamente diferentes ( $p < 0.05$ ) e ab representa grupos estatisticamente iguais ( $p > 0.05$ ).

Verifica-se que a expressão do transportador de ureia tem tendência a diminuir com o aumento da concentração de amónia ambiental (figura 32). Estatisticamente, os grupos expostos a concentrações de amónia de 1, 3 e 4 mM são diferentes do grupo controlo, mas estatisticamente iguais ao grupo exposto a 2 mM.



**Figura 32:** Variação da expressão da proteína do transportador de ureia nas brânquias para as diferentes concentrações de amónia (mM). Os valores apresentados são as médias de cada grupo  $\pm$  erro padrão. (n=5 peixes por tanque); a, b representam grupos estatisticamente diferentes ( $p < 0.05$ ), ab representa grupos estatisticamente iguais ( $p > 0.05$ ).

### 3.4. Análise das sequências de aminoácidos dos fragmentos obtidos por PCR

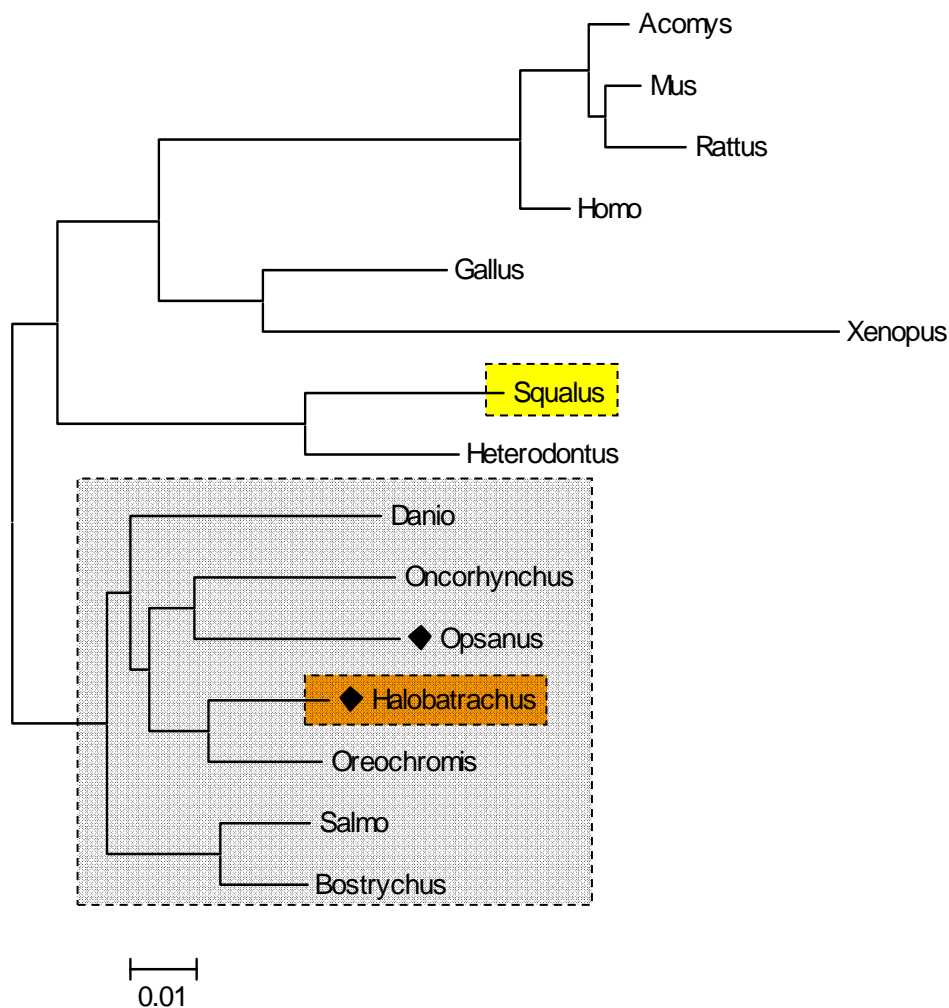
Na figura 33 pode-se observar o resultado do alinhamento entre a sequência parcial da GSase obtida após a sequenciação do fragmento de cDNA, e as sequências da GSase nas brânquias e fígado em *O. beta* obtidas nas bases de dados bioinformáticas. Verificou-se um elevado grau de identidade para ambas as formas (fígado - 96.4%, brânquias – 80,1%) entre estas duas espécies da família Batrachoididae.

<b>Halobatrachus</b>	: QWEFQVGPCEGINMGDHLWVARFILHRVCEDFGVVASFDP	: 40
FFig. <i>Opsanus</i>	: QWEFQVGPCEGINMGDFWAAARFILHRVCEDLGVVASFDP	: 263
FBra. <i>Opsanus</i>	: QWEFQIGPCEGIEMGDHLWVARFLLHRVCEDFGIATMDP	: 242
<b>Halobatrachus</b>	: KLIPGNWNGAGCHTNFSTKEMREDGGLKAIEDSIEKLGKR	: 80
FFig. <i>Opsanus</i>	: KPIPGNWNAGCHTNFSTKEMREDGGLKAIEDAIEKLGKR	: 303
FBra. <i>Opsanus</i>	: KPMKGNWNGAGCHTNVSTKEMREEGGLQYIIEQAIEKLSKN	: 282
<b>Halobatrachus</b>	: HHYHIRAYDPKGGLDNARRLTGRHETSNIHE	: 111
FFig. <i>Opsanus</i>	: HHYHIRAYDPKGGLDNARRLTGHHETSNIHE	: 334
FBra. <i>Opsanus</i>	: HAEHICMYDPHKGQDNIRRLTGIHETSSIHD	: 313

**Figura 33:** Alinhamento da sequência parcial de aminoácidos do fígado e brânquias da GSase da espécie *Opsanus beta* e da espécie *Halobatrachus dadactylus*. A cinzento estão representados aminoácidos idênticos. Nota: Alinhamento total das sequências de aminoácidos em anexo II. As espécies representadas e os respectivos números de acesso são: *Halobatrachus*, *Halobatrachus didactylus*, *Opsanus*, *Opsanus beta* (FFig.Fígado; AAD34720), *Opsanus*, *Opsanus beta* (FBra. Brânquias; AAN77155).

A figura 34 evidencia uma árvore filogenética e respectivos graus de divergência evolutiva para a GSase, em algumas espécies. Pode observar-se a existência de dois grandes *clusters*, um que engloba os peixes ósseos, e outro que representa as outras classes de vertebrados incluindo a dos peixes cartilagíneos.

Entre todas as espécies, verifica-se um nível de conservação elevado. O grau de similaridade entre os peixes é de cerca de 96%, enquanto que, entre os teleósteos (*cluster* a azul) é de 97% (anexo III).



**Figura 34:** Árvore filogenética representativa de algumas espécies, mostrando a divergência filogenética da proteína GSase, na região do fragmento obtido por PCR. A cor-de-laranja está representada a espécie em estudo. A amarelo está representado um peixe elasmobranquio. A azul está representado o grupo dos peixes teleósteos. Os pontos a preto representam espécies da mesma família. As espécies representadas e os números de acesso são: *Acomys*, *Acomys cahirinus* (AAF14691), *Mus*, *Mus musculus* (NP\_032157), *Rattus*, *Rattus norvegicus* (AAA65096), *Homo*, *Homo sapiens* (NP\_001028228), *Gallus*, *Gallus gallus* (NP\_990824), *Squalus*, *Squalus acanthias* (AAA61871), *Heterodontus*, *Heterodontus francisci* (AAD34721), *Oncorhynchus*, *Oncorhynchus mykiss* (NP\_001117785), *Salmo*, *Salmo salar* (ACI68482), *Halobatrachus*, *Halobatrachus didactylus*, *Opsanus*, *Opsanus beta* (AAD34720), *Oreochromis*,

## RESULTADOS

*Oreochromis niloticus* (AAM28589), *Bostrychus*, *Bostrychus sinensis* (AAL62448), *Danio*, *Danio rerio* (NP\_878286), *Xenopus*, *Xenopus laevis* (NP\_001082548).

Foi feito o alinhamento entre a sequência parcial da CPSase de *H. didactylus*, obtida após a sequenciação do fragmento de cDNA, e a sequência da CPSase em *O. beta* obtida nas bases de dados bioinformáticas. O grau de identidade da sequência de aminoácidos entre estas duas espécies foi de 95,9%, numa zona que corresponde ao domínio responsável pela função de síntese da enzima (figura 35).

```
Halobatrachus : CLLRPSYVLSGSAMNVAYGEDEMKRFLLEEAATQVSQEHPVV : 40
Opsanus       : CLLRPSYVLSGSAMNVAYGEEEMKRFLLEEAATQVSQEHPVV : 1175

Halobatrachus : ITKFITGAREVEMDAVAKNGKVLCHAITEHVEDAGVHSGD : 80
Opsanus       : ITKFICGAREVEMDAVAKNGKVLCHAITEHVEDAGVHSGD : 1215

Halobatrachus : ATLMMLPTQSIISQGALEKVKIATRKHAEALEISGPFNTQFL : 120
Opsanus       : ATLMMLPTQTIISQGALEKVKIATRKHAALEISGPFNTQFL : 1255

Halobatrachus : VKGNDVMVIECNLRASRSFPFVSKTIGVDFIRVATKVMGTG : 160
Opsanus       : VKGNDVMVIECNLRASRSFPFVSKTIGVDFIKVATKVMGTG : 1295

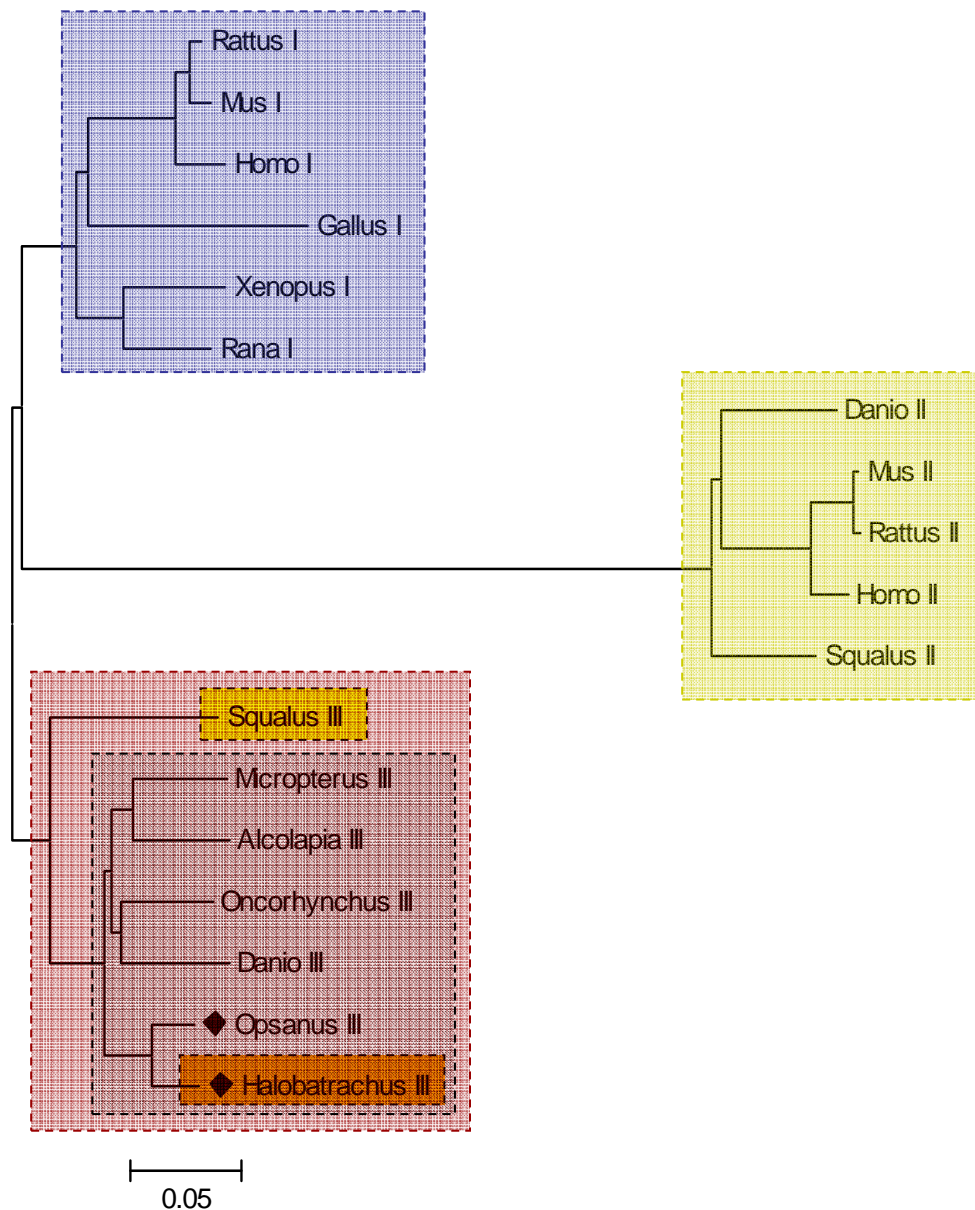
Halobatrachus : EPLDESNLPSLEKPIIPVDYVGIKAPMFSWPRLREAD : 197
Opsanus       : EPLDESSLPSLENPPIIPVDYVGIKAPMFSWPRLREAD : 1332
```

**Figura 35:** Alinhamento da sequência de aminoácidos da CPSase da espécie *Opsanus beta* e da espécie *Halobatrachus didactylus*. A cinzento estão representados aminoácidos idênticos. NOTA: Alinhamento total das sequências de aminoácidos ver em anexo IV. As espécies representadas e os respectivos números de acesso são: *Halobatrachus* III, *Halobatrachus didactylus*, *Opsanus*\_III, *Opsanus beta* (AAD51318).

A figura 36 demonstra a filogenia e respectivos graus de divergência evolutiva para as diferentes formas de CPSase, em algumas espécies. Observa-se essencialmente três *clusters* que correspondem às três formas desta enzima, CPSase I, CPSase II e CPSase III.

Verifica-se que o nível de conservação entre as três formas de CPSase I, II e III, são respectivamente 96%, 93% e 95%. O *cluster* correspondente à CPSase III demonstra que esta forma da enzima apenas está presente nos peixes. Contudo, alguns peixes também apresentam a forma CPSase II. Através do *cluster* correspondente à CPSase I, pode observar-se que esta forma da enzima não se encontra presente nos peixes (figura 36).

Pode-se ainda verificar que o grau de identidade entre a CPSase I e a CPSase II é de 73%, entre a CPSase I e a CPSase III é de 91% e entre a CPSase II e a CPSase III é de 72%. (V).



**Figura 36:** Árvore filogenética representativa de algumas espécies, mostrando a divergência filogenética da proteína CPSase, na região do fragmento obtido por PCR, entre três grupos. Os indivíduos do grupo a azul possuem a CPSase I, os indivíduos do grupo amarelo possuem a CPSase II e os indivíduos do grupo a cor-de-rosa possuem a CPSase III. A cor-de-laranja está representada a espécie em estudo. A amarelo está representado um peixe elasmobranquio. Os pontos a preto representam espécies da mesma família. As espécies representadas e os números de acesso são: Alcolapia III, *Alcolapia grahami* (AAD43968), Danio\_II e Danio\_III, *Danio rerio* (AAW80263 e CAQ15092), Gallus\_I, *Gallus gallus* (BAD86828), Halobatrachus III, *Halobatrachus didactylus*, (Homo\_I e Homo\_II, *Homo sapiens* (CAA75785 e BAA11423), Micropterus\_III, *Micropterus salmoides* (AAB62566), Mus\_I e Mus\_II, *Mus musculus* (Q8C196 e AAH60717), Oncorhynchus\_III, *Oncorhynchus mykiss* (AAC60207), Opsanus\_III, *Opsanus beta* (AAD51318), Rana\_I, *Rana catesbeiana* (AAA19016), Rattus\_I e Rattus\_II,

*Rattus norvegicus* (NP\_058768 e EDM02937), *Squalus\_II* e *Squalus\_III*, *Squalus acanthias* (AAA74569 e AAA96435). *Xenopus\_I*, *Xenopus laevis* (ABA01549).

Na figura 37 pode-se observar o resultado do alinhamento entre a sequência parcial do UT, obtida após a sequenciação do fragmento de cDNA e as sequências da UT de *O. beta* obtidas nas bases de dados bioinformáticas. Verificou-se um elevado grau de identidade (96,9%) entre as estas duas espécies (figura 38). A sequência obtida encontra-se entre os domínios transmembranares 5 e 10, conforme pode ser visto no alinhamento entre as várias espécies de peixes ósseos (anexo VI)

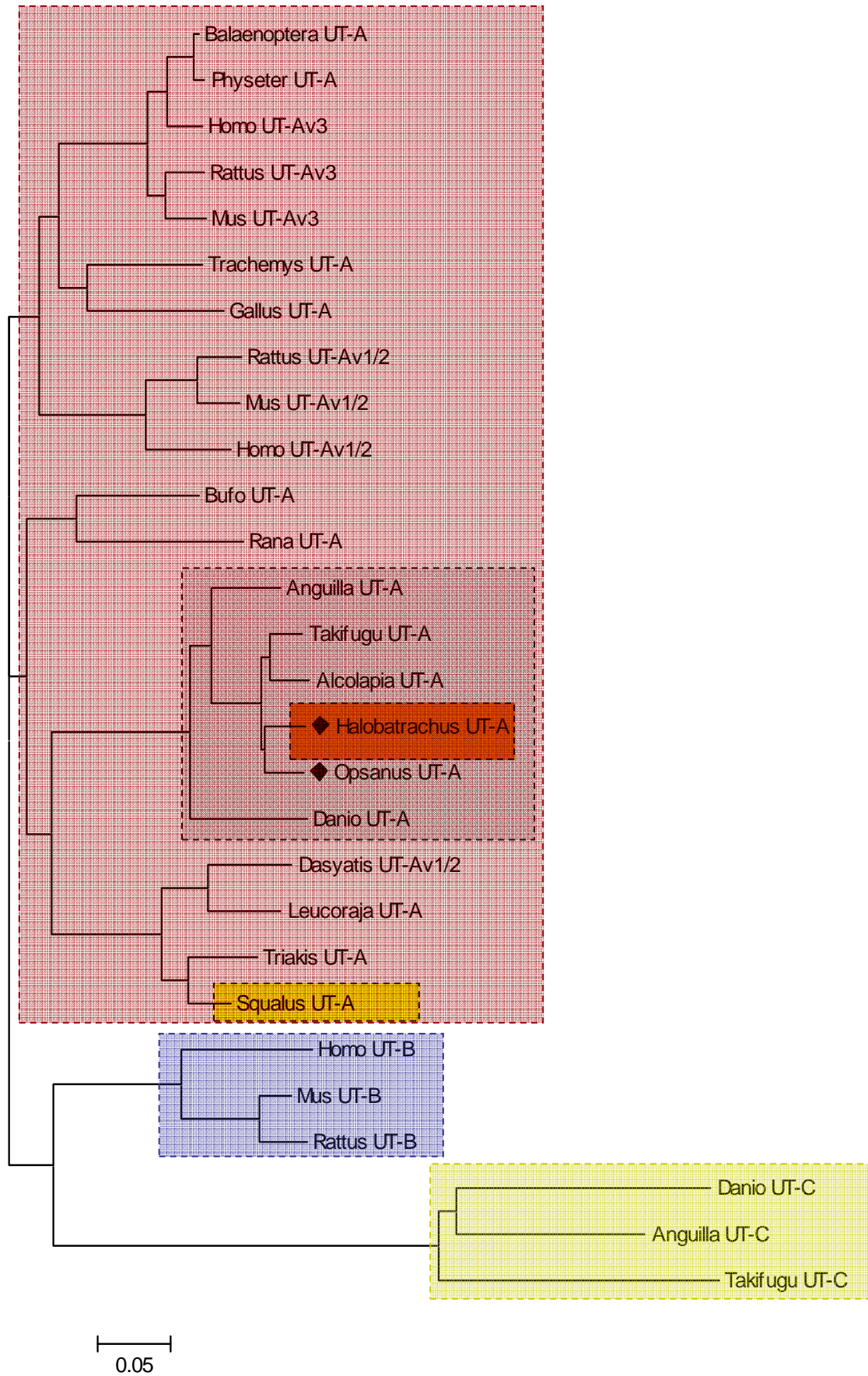
<i>Halobatrachus</i>	:	LPVFTLPFNILVCLHVMATGHYNNHFPQVLFQPRSELPNI	:	40
<i>Opsanus</i>	:	LPVFTLPFNILVCLHVMATGHYNNHFPQVLIQPRSELPNI	:	216
<i>Halobatrachus</i>	:	TWAEIDVPKLFMSVPVGVGQVYGCNDNPWTGGIFIISLFIS	:	80
<i>Opsanus</i>	:	TWSEIDLPKLFMSIPVGIGQVYGCNDNPWTGGIFIISLFIS	:	256
<i>Halobatrachus</i>	:	SPITCAHAVLGSAVGMVSGLALAAPFGDIYFGLWGYNCVL	:	120
<i>Opsanus</i>	:	SPITCIHAVLGSAAGMVSGLALAAPFGDIYFGLWGYNCVL	:	296
<i>Halobatrachus</i>	:	ACIAIGGMFYALTWQVHLLAITCAFFCAYLGSAIANIMST	:	160
<i>Opsanus</i>	:	ACIAIGGMFYALTWQVHLLALTCAFFCAYLGSAIANVMST	:	336
<i>Halobatrachus</i>	:	FGLPACTWPFCLSALTFLITETQK	:	186
<i>Opsanus</i>	:	FGLPACTWPFCLSALTFLITETQK	:	362

**Figura 37:** Alinhamento da sequência parcial da proteína do transportador de ureia na espécie *Opsanus beta* e na espécie *H. dadactylus*. A cinzento estão representados aminoácidos idênticos. NOTA: Alinhamento total das sequencias de aminoácidos ver em anexo VI. As espécies representadas e os respectivos números de acesso são: *Halobatrachus\_UT-A*, *Halobatrachus didactylus*, (*UT-A*, *Opsanus beta* (AAD53268)).

A figura 38 evidencia a filogenia e respectivos graus de divergência evolutiva para as diferentes formas do UT, em algumas espécies. Através da figura 38 é possível visualizar essencialmente três *clusters*, que correspondem às três formas desta proteína, UT-A, UT-B e, UT-C. Verifica-se que o nível de conservação entre as três formas de UT-A, UT-B e UT-C, é respectivamente 84%, 93% e 69%.

Enquanto que a forma UT-A parece estar distribuída por todas as classes de vertebrados incluindo os peixes, a forma UT-B, característica dos glóbulos vermelhos, aparenta estar presente essencialmente em mamíferos. Por outro lado, a forma UT-C apenas foi descrita em peixes ósseos.

O grau de identidade entre o UT-A e o UT-B é de 82%, entre o UT-A e UT-C é de 60% e entre o UT-B e o UT-C é de 61%. (anexo VII).



**Figura 38:** Árvore filogenética representativa de algumas espécies, mostrando a divergência filogenética da proteína do transportador de ureia, na região do fragmento obtido por PCR, entre quatro grupos. Os indivíduos do grupo a cor-de-rosa possuem o UT-A, os indivíduos do grupo a azul possuem o UT-B e os indivíduos do grupo a amarelo possuem o UT-C. A cor-de-laranja está representada a espécie em estudo. A amarelo está representado um peixe elasmobranquio. Os pontos a preto representam espécies da mesma família. As espécies representadas e os números de acesso são: *Alcolapia*\_UT-A, *Alcolapia grahami* (AAG49891), *Anguilla*\_UT-A e *Anguilla*\_UT-C, *Anguilla japonica* (BAC53976 e BAD66672), *Balaenoptera*\_UT-A, *Balaenoptera acutorostrata* (BAF46914), *Bufo*\_UT-A, *Bufo marinus* (BAE16706), *Danio*\_UT-A e *Danio*\_UT-C, *Danio rerio* (AAX16119 e XP\_001921059), *Dasyatis*\_UT-A1/2, *Dasyatis sabina* (AAM46683 / AAQ07592), *Gallus*\_UT-A, *Gallus gallus* (026725), *Halobatrachus*\_UT-A, *Halobatrachus didactylus*, *Homo*\_UT-A1/2 e *Homo*\_UT-A3, *Homo*\_UT-B, *Homo sapiens* (AAI10447 / Q15849 e CAA65657, CAB60834), *Leucoraja*\_UT-A, *Leucoraja ocellata* (AAL12243), *Mus*\_UT-A1/2 e *Mus*\_UT-A3, *Mus*\_UT-B, *Mus musculus* (AAI50681 / AAM00357 e AAM21206, CAD12807), *Opsanus*\_UT-A, *Opsanus beta* (Gulf toadfish; AAD53268), *Physeter*\_UT-A, *Physeter catodon* (BAF46918), *Rana*\_UT-A, *Rana esculenta* (CAA73322), *Rattus*\_UT-A1/2 e *Rattus*\_UT-A3, *Rattus norvegicus* (NP\_062220 / NP\_808877 e NP\_001103740), *Squalus*\_UT-A, *Squalus acanthias* (AAF66072), *Takifugu*\_UT-A e *Takifugu*\_UT-C, *Takifugu rubripes* (BAD66674 e BAD66673), *Trachemys*\_UT-A, *Trachemys scripta elegans* (BAF76798), *Triakis*\_UT-A, *Triakis scyllium* (BAC75980).

## 4. DISCUSSÃO

### 4.1. Tolerância à amónia ambiental

A maioria dos peixes teleósteos são amoniotélicos, sendo a amónia o principal produto de excreção do metabolismo de nitrogénio (Rasmussen & Korsgaard 1998). Estes peixes são em geral pouco tolerantes a ambientes com elevadas concentrações de amónia, tendo pouca capacidade de sobreviver por períodos mais ou menos prolongados a níveis superiores a 0.1mM (Wang & Walsh 2000). No entanto, algumas espécies de teleósteos, apresentam uma elevada tolerância à amónia ambiental, como é o caso de alguns membros da família Batrachoididae, nomeadamente as espécies *Opsanus beta*, *Opsanus tau* e *Porichtys notatus*, capazes de tolerar valores superiores a 5mM. Apesar da óbvia vantagem, não é no entanto claro que tipo de pressão evolutiva proporcionou a selecção desta capacidade.

No nosso caso de estudo, a espécie *Halobatrachus didactylus*, também pertencente à família Batrachoididae, a tolerância à amónia parece situar-se a níveis intermédios entre aquela da maioria dos teleósteos e a dos membros da família descritos acima, exibindo em condições de elevada toxicidade comportamentos provavelmente relacionados com alterações neurológicas ou com desequilíbrios no balanço ácido-base, como sejam alteração de cor, espasmos e perda de capacidade respiratória, como anteriormente descritos (Randall & Tsui 2002, Eddy 2005; Smart 1976). A mortalidade devido a toxicidade crónica por amónia está geralmente associada a modificações da morfologia e estrutura dos tecidos (Wajsbrodt *et al.* 1993; Cardoso *et al.* 1996). No entanto, apesar de neste estudo não termos tentado observar histologicamente tais modificações, parece-nos que, dada a celeridade destas reacções, se possa sugerir um efeito sobretudo bioquímico, ao nível do metabolismo da energia no cérebro (Smart 1976).

Numa primeira fase não foi possível determinar o LC<sub>50</sub> para as 96h como inicialmente previsto, isto devido à elevada mortalidade ocorrida nos tanques onde foi colocada maiores concentrações de amónia (5, 7.5, 10 e 12.5mM), que chegou a 100% ao fim de 48h. Estudos realizados por Ruyet & Quemener (1995) indicaram que vários factores ambientais, como a temperatura, o pH e o O<sub>2</sub> influenciam a acção tóxica da amónia, e conseqüentemente afectam a sensibilidade dos peixes a este composto. No entanto, a análise da tabela V leva a crer que esta elevada mortalidade está relacionada

com as diferentes concentrações de amónia colocada nos tanques, pois o único parâmetro físico-químico da água que se alterou significativamente entre tanques foi o de amónia ambiental.

Através de uma análise PROBIT, foi possível determinar o  $LC_{50}$  para as 6 e 9h, apresentando valores de 10.3 e 8.65mM, respectivamente, mas matematicamente impossível de calcular valores para 24, 48 ou 96 horas. As concentrações utilizadas foram escolhidas tendo em conta os valores de  $LC_{50}$  determinados para outros Batrachoididae (Wang & Walsh 2000) mas a gama revelou-se excessiva para *H. didactylus* nas nossas condições experimentais. Por outro lado, para além da total mortalidade nas 4 concentrações mais altas (5, 7.5, 10 e 12.5mM), não houve qualquer mortalidade nas 4 concentrações mais baixas (0, 0.5, 1.0 e 2.5mM), o que parece indicativo de um limite crítico entre 2.5 e 5mM. Assim, tendo em conta a mortalidade ocorrida no primeiro ensaio, optou-se por se fazer uma abordagem diferente no segundo ensaio, em que os indivíduos estariam expostos a concentrações de amónia no máximo até 5mM, obtendo-se curvas de mortalidade graduais, em função da concentração e do tempo de exposição (figura 16). Deste modo, foi possível determinar o  $LC_{50}$  para as 96h, e através de uma análise PROBIT, obteve-se 3.28 mM de amónia. Este valor encontra-se de acordo com os resultados preliminares obtidos por Barimo *et al.* (2007), que calcularam um  $LC_{50}$  para as 96h de 3.2 mM para a mesma espécie. Pode-se então concluir que a tolerância à amónia ambiental na espécie em estudo é baixa, quando comparada com os resultados obtidos para outras espécies da mesma família (*O. beta* (9.75 mM), *O. tau* (19.72 mM) e *P. notatus* (6 mM)). Segundo Barimo (2005) a tolerância destas espécies à amónia poderá estar relacionada com o facto de apresentarem um ciclo da ureia completamente funcional, em que a sintetase da glutamina (GSase) ao actuar nos tecidos, converte a amónia num produto menos tóxico, reduzindo a excreção de amónia e aumentando a síntese de ureia. Se o mesmo é válido para *H. didactylus* não é, neste ponto, completamente claro, mas os níveis de amónia e ureia plasmáticos e a taxa de excreção de ureia são consideravelmente altos, sugerindo que possa existir um processo semelhante.

Na maioria dos teleósteos os valores de amónia plasmática variam entre 0.2 - 0.3 mM. Os níveis de amónia no plasma aumentam com o aumento da concentração de amónia ambiental. Este fenómeno verificou-se em algumas espécies, tais como, na truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) e no salmão do Atlântico (*Salmo salar*) (Rasmussen & Korsgaard 1998). O mesmo se verificou com o *H. didactylus*, onde se encontraram

maiores concentrações de amónia, observando-se que há uma tendência dos níveis de amónia plasmática aumentarem em função dos valores ambientais (figura 12 e 18). Em ambos os ensaios os valores apresentados pelos grupos expostos a maiores concentrações de amónia foram significativamente diferentes dos grupos expostos a menores concentrações. Estes resultados podem estar relacionados com a inibição da excreção de amónia devido a existirem níveis elevados de desta no meio, anulando o efeito de gradiente responsável pela difusão passiva.

Na espécie em estudo, observou-se também que há uma tendência para os níveis de ureia no plasma aumentarem com o aumento da concentração de amónia ambiental, nomeadamente no ensaio 2 (figura 19). Este aumento pode dever-se ao facto destes animais converterem a amónia em ureia, uma vez que se encontram num ambiente confinado, podendo este ser um factor stressante que induziu a excreção de ureia, conforme anteriormente descrito por Hopkins *et al.* (1995). Inicialmente a taxa de excreção de ureia parece estar directamente relacionada com a exposição à amónia (figura 15 e 21). No entanto, verifica-se que a partir das 12h de amostragem os níveis de ureia excretada diminuem (podendo até ser independentes da amónia ambiental no ensaio 1, apesar destes dados deverem ser tomados com cautela dado o estado fisiológico dos peixes nos grupos de dose mais elevada) o que por um lado pode indicar que as estratégias adoptadas por este animal para diminuir a toxicidade de amónia ficaram comprometidas pela exposição à amónia ambiental.

Os dados obtidos parecem portanto sugerir que a amónia ambiental condiciona os níveis plasmáticos de amónia e que esta poderá estar a ser transformada em ureia e excretada sob esta forma para o meio, a uma taxa que é função da amónia ambiental.

Segundo McDonald & Wood (2004), o aumento dos níveis plasmáticos de cortisol, está relacionado com um aumento na produção de ureia, podendo-se então aferir que o cortisol, poderá ser um factor endócrino que pode levar à conversão de amónia em ureia, e conseqüentemente à excreção da última.

Roche & Bogé (1996) e Wendelaar Bonga (1997) entre outros, descreveram o cortisol e outros corticosteróides como possíveis indicadores de stress face a qualquer distúrbio ambiental. Segundo McDonald & Wood (2004), os níveis de cortisol plasmático aumentam quanto maior o stress no indivíduo (confinamento ou exposição a elevados níveis de amónia na água), bem como a produção e excreção de amónia. Este aumento dos níveis de cortisol parece estar de acordo com os resultados obtidos no segundo ensaio, uma vez que nos grupos expostos a concentrações de amónia até 4mM,

os valores de cortisol plasmático são mais elevados (figura 20), e os níveis de amónia plasmática também aumentam.

Seria de esperar que os níveis de cortisol plasmático nos indivíduos, aumentassem consoante o aumento da concentração de amónia ambiental. No entanto, no caso do ensaio I isso não aconteceu (figura 14), pois verificou-se que nos grupos expostos a concentrações de amónia mais elevadas, os níveis de cortisol plasmáticos são menores, podendo ter ocorrido uma inibição ao nível do eixo endócrino. Pickering & Pottinger (1987) indicaram que a baixa qualidade da água pode ter um efeito inibidor na resposta do cortisol a eventos stressantes como manipulação e confinamento. Esta inibição pode ter acontecido devido aos peixes terem entrado em colapso fisiológico nas concentrações mais elevadas de amónia (5, 7.5, 10 e 12.5mM). Porém, nos grupos que foram expostos em concentrações de amónia de 2.5 e 5mM, os níveis de cortisol plasmático foram mais elevados, sendo que, estes dois grupos são significativamente diferentes do grupo controlo. Isto poderá estar relacionado, com o facto de existir uma grande variabilidade individual nestes grupos, ou então, poderá indicar que a tolerância de níveis altos de amónia neste peixe, têm custos prejudiciais ao nível do eixo endócrino. O facto de as recolhas de plasma terem sido feitas quando os indivíduos já se encontravam mortos ou moribundos, podendo o animal estar comprometido fisiologicamente, aumentando assim a variabilidade individual, pode também constituir uma hipótese para responder aos resultados obtidos.

### 4.2. Padrões de excreção

A espécie *O. beta* quando sujeita a condições de confinamento excreta 80% dos produtos azotados sob a forma de ureia (Sloman *et al.* 2005). Na espécie em estudo, verificou-se que isso não acontece, pois determinou-se, no conjunto dos dois ensaios, que as excreções dos produtos azotados ocorrem de igual forma sob a forma de amónia ou ureia ou, sobretudo no caso do segundo ensaio, maioritariamente sob a forma de amónia (figura 22 e 24).

No ensaio I, a excreção dos produtos azotados é idêntico, em que a excreção sob a forma de ureia foi cerca de 49% e a excreção de amónia cerca de 51%, o que poderá estar relacionado com a transformação contínua de um produto no outro. Por outro lado, no ensaio II, verificou-se que a excreção dos produtos azotados sob a forma de amónia foi de 78%, enquanto que, sob a forma de ureia foi de 22%. No entanto, os nossos

resultados encontram-se em concordância com os obtidos por Barimo *et al* (2007), onde indivíduos da espécie *H. didactylus* foram isolados durante 5 dias ao longo das 24h, registando-se que apenas 20% da excreção dos produtos azotados foi sob a forma de ureia. De qualquer forma é necessário salientar que estes valores médios são pouco representativos dada a extrema variabilidade observada (e demonstrada pelas barras de erro nas figuras 22 e 24), quer entre indivíduos quer no mesmo indivíduo entre dias diferentes (figura 23 e 25) e entre os dois ensaios. De referir no entanto que as taxas de excreção, por peso, quer de amónia quer de ureia, parecem ser mais elevadas no ensaio 2, cuja média e variabilidade de tamanhos era menor, que no ensaio I, com peixes de tamanho mais variável e peso médio mais elevado.

A observação dos padrões individuais de excreção permite no entanto identificar momentos em que a taxa de excreção aumenta significativamente entre pontos de amostragem (figura 23 e 25), levando a deduzir que também em *H. didactylus* a excreção de ureia se pode fazer quer de forma contínua quer por pulsos, como já descrito para outras espécies da família, nomeadamente para *O. Beta* (Barimo 2005).

Os mecanismos fisiológicos em *O. beta* estão relativamente bem estudados, havendo fortes evidências que a excreção de ureia por pulsos pode estar relacionada com o controlo hormonal (Sloman *et al.* 2005). Assim, e como descrito acima, estudos realizados por Wood *et al.* (2001); Wood *et al.* (2003), mostraram que geralmente, antes de um pulso de ureia, há uma diminuição dos níveis de cortisol plasmático, aumentando imediatamente após o fim do mesmo. A maioria da ureia produzida em *O. beta* é excretada por pulsos, através das brânquias, uma ou duas vezes por dia, e parece estar dependente de um transportador de ureia, que facilita a difusão desta para a água (Barimo 2005). Uma vez que a ureia não é excretada continuamente, mas sim por pulsos, foi sugerido por McDonald *et al.* (2007), que o transportador de ureia (UT) só se encontra activo quando ocorrem pulsos.

No presente trabalho, em ambos os ensaios, não foi possível determinar-se a produção e excreção de ureia por pulsos na espécie *H. didactylus* está relacionada com os níveis de cortisol plasmático, e se está dependente de um transportador de ureia. Para tal seria necessário o seguimento em simultâneo da excreção e dos valores sanguíneos. No entanto, nas análises realizadas ao sangue, no final da experiência, para determinar se haveria relação entre os níveis de cortisol plasmático e os níveis de ureia plasmática, verificou-se que a correlação entre estes dois produtos é baixa ( $P < 0.05$ ), (anexo I). No

entanto, verificou-se que em ambos os ensaios, tanto os níveis de cortisol como os de ureia no plasma são elevados (anexo I).

Estudos realizados em espécies da família Batrachoididae, sugerem que esta passagem de amoniotelia para ureotelia em ambiente natural, poderá estar relacionada com: (1) estes animais excretarem ureia de modo a evitar a detecção por parte de predadores (Walsh 1997), (2) para impedir a intoxicação da prole quando esta está a ser guardada pelos machos nos ninhos (Costa 2004), (3) para evitarem níveis de toxicidade no seu meio interno (Barimo 2005), ou, (4) com o facto destes animais passarem muito tempo escondidos em ambientes confinados (Walsh 1997).

Tendo em conta, os resultados apresentados, verifica-se que não houve um padrão uniforme de excreção ao longo do tempo, podendo os indivíduos serem mais ureotélicos num dia e menos ureotélicos noutra, apresentando valores de ureia e amónia muito semelhantes nos peixes 2 e 4 (ensaio 1) e nos peixes B e C, ao contrário do que se verifica nos peixes 1, 3 e 5 (ensaio 1) e nos peixes A e D (ensaio 2) (figura 23 e 26) Dado o padrão, ou melhor, a falta dele, poderemos dizer que existe um certo grau de ureotelia e que esta é facultativa, apesar se não se ter identificado causas óbvias para este fenómeno.

No entanto, pode-se considerar a hipótese que os indivíduos excretam ureia por pulsos, de modo a evitar níveis de toxicidade interna. A outra hipótese que poderá ser considerada, está relacionada com o tamanho dos indivíduos pois quanto maior o indivíduo, maior seria o stress destes e assim os níveis plasmáticos de cortisol também seriam mais elevados, levando a que a excreção de ureia aumentasse, devido a estes se encontrarem num ambiente confinado. Contudo, os nossos resultados demonstraram que parece não haver uma relação entre o tamanho do peixe, o cortisol plasmático e a ureia que é excretada por pulsos (anexo I), parecendo existir uma correlação entre o cortisol e a ureia do plasma (anexo I), em que um induz o outro.

A eliminação de produtos azotados ao longo de um ciclo de 24h foi cumulativa esperando-se portanto, um aumento da quantidade do total dos produtos azotados, levando à ocorrência de pulsos. Segundo os resultados obtidos (figura 27), verificou-se que os pulsos de um modo geral, ocorreram com mais frequência em alguns intervalos horários (13h-17h, 19h-21h e entre a 1h-3h) e com o mesmo tempo de duração (entre 1 a 4h), podendo ocorrer uma ou duas vezes por dia. Seria de esperar que nas primeiras horas do dia a frequência dos pulsos fosse maior, uma vez que os tanques eram manuseados a cada 24h, podendo causar algum stress nos peixes, levando a que os

níveis de cortisol plasmático aumentassem e consequentemente a excreção de ureia fosse mais elevada.

No entanto, verificou-se que a frequência dos pulsos é maior nos períodos escuros do que nos períodos claros, o que leva a crer que este fenómeno poderá estar relacionado com o facto destes peixes no decorrer das horas, aumentarem a produção e excreção de amónia, transformando-a em ureia, de modo a evitar que os níveis de amónia ambiental aumentem, podendo provocar níveis tóxicos internos. Estes resultados parecem estar de acordo com o descrito para o peixe-gato indiano, que para um fotoperíodo de 12h luz:12h escuro, excreta mais ureia no período escuro do que no período de luz, o que pode estar relacionado com a actividade locomotora ser predominantemente nocturna (Kajimura *et al.* 2002). No entanto, o mesmo não acontece com a espécie *Rivulus marmoratus*, onde se verifica que a excreção de ureia é sempre maior durante as horas de luz, enquanto que, a amónia é excretada a um ritmo constante ao longo do dia, (Rodela & Wright 2006a). Segundo estes autores, estas diferenças na frequência da ocorrência dos pulsos, podem estar relacionadas com a alimentação, onde se verifica que quando estes indivíduos estão privados de comida, excretam mais ureia nas horas de luz, ou então com o consumo de oxigénio, onde se verifica que o consumo de oxigénio é maior nas horas de luz, o que leva a que a excreção de ureia também seja maior neste período.

#### **4.3. Expressão genética de enzimas relacionadas com a síntese e transporte de ureia e eliminação de amónia**

Anderson (2001), sugeriu que a mudança de amoniotelia para ureotelia está associada a uma activação das enzimas do ciclo de ureia. Um aumento da circulação de cortisol plasmático, leva ao aumento da actividade da GSase (Hopkins *et al.* 1995) e no caso dos teleósteos a importância desta enzima é acrescida dado ser o principal fornecedor do substrato inicial para o primeiro passo do ciclo OUC catalizado pela CPSase III (Kong *et al.* 2000) Ao contrário do que era esperado, nos resultados obtidos (figuras 30 e 31) verificou-se que a expressão do gene da GSase no fígado e nas brânquias diminui com o aumento da amónia ambiental. Isto poderá estar relacionado com o facto dos indivíduos dos grupos expostos a maiores concentrações de amónia terem entrado em colapso fisiológico, não havendo portanto transcrição dos genes. Verificou-se também, que a expressão do gene da GSase no fígado diminui com o

aumento dos níveis de cortisol plasmático (figuras 30B e 20). No entanto, é necessário ter em conta, que em outros estudos realizados anteriormente, o cortisol plasmático foi medido a curto prazo, enquanto que, neste estudo o cortisol plasmático foi medido ao fim de 120h, podendo então a actividade fisiológica do animal se encontrar comprometida (McDonald & Wood 2004; Wood *et al.* 2001).

A actividade da GSase e da CPSase III no fígado e nas brânquias de um modo geral é semelhante, quando uma diminui a outra também diminui e vice-versa. Isto poderá estar relacionado com o facto da GSase ter uma função de regulação idêntica à da CPSase III, em que a glutamina serve como substrato à CPSase III, possuindo um papel importante na produção de N-acetil glutamato. De um modo geral, verificou-se uma alteração nos padrões da expressão dos genes da GSase e da CPSase III no fígado e nas brânquias. Por exemplo, quando ocorre um aumento da expressão dos genes destas enzimas no fígado, vai haver uma diminuição da expressão destes genes ao nível das brânquias. Isto poderá indicar que, apesar de ocorrer o ciclo da ureia nas brânquias, o fígado parece ser o principal órgão onde o ciclo da ureia se encontra activo, e por essa razão ser o órgão com maior expressão dos genes destas enzimas (figura 30 e 31)

Nos grupos expostos a concentrações de amónia de 3 e 4 mM, a expressão dos genes destas enzimas no fígado não se encontrou tão expressa como para os outros grupos, podendo ter ocorrido uma exaustão fisiológica por parte dos indivíduos, e a transcrição destes genes ter sido inibida.

Infelizmente no presente estudo não foi possível medir a actividade enzimática da GSase como da CPSase III nos tecidos recolhidos. Este dado poderia clarificar se a diminuição observada na transcrição teve implicações directas na capacidade de resposta dos animais, já que o facto da expressão do gene ser menor não implica necessariamente que a enzima já produzida não aumente de actividade com o aumento de amónia ambiental. Por outro lado, devido aos condicionamentos logísticos da experiência, estas medições foram realizadas em amostras recolhidas após um período de 96-120 horas de expressão, e podemos presumir que a maior parte da resposta deveria ser dada nas 24-48 horas iniciais conforme descrito noutros estudos (McDonald & Wood 2004)

A membrana lipídica do epitélio das brânquias é menos permeável à ureia do que à amónia pelo que a passagem deste composto ser facilitada pela presença de um transportador de ureia nas brânquias conforme descrito noutras espécies como por

exemplo em *O. mykiss* e em *O. beta* (Rodela & Wright 2006b). Esta presença foi verificada por RT-PCR também em *H. didactylus*. Nos resultados obtidos observou-se que o UT está mais expresso nas brânquias do que no fígado (figura 32). No entanto, tal como para a expressão dos genes de GSase e CPSase III, também parece ocorrer uma diminuição da transcrição do gene do UT em condições de maior concentração de amónia no ambiente. Assim também esta observação implica alguma estranheza dado que foi registado um aumento da excreção de ureia para a água, nas primeiras horas de exposição, o que poderia significar um aumento dos transportadores disponíveis, mas que pareceu diminuir nas horas posteriores. Por outro lado, o facto de existir mais ureia no plasma no final da experiência pode não só estar relacionado com um acréscimo de produção mas também com alguma retenção devido a um decréscimo da expressão do gene do UT, por perda de capacidade fisiológica devido à toxicidade do meio. No entanto, mais estudos deveriam ser feitos de modo a verificar o comportamento deste transportador ao longo do tempo de exposição.

#### 4.4. Análise das sequências de aminoácidos

A GSase é uma enzima importante no ciclo de ureia e que apresenta um grau de conservação elevado ao longo da evolução (Kumada *et al.* 1993; Walsh *et al.* 1999). No fígado dos mamíferos, a GSase possui um papel secundário relativamente à desintoxicação da amónia, não desempenhando um papel fundamental no metabolismo do nitrogénio, ao contrário do que acontece nos peixes. Estudos realizados por Anderson (2001), demonstrou haver grandes níveis de expressão da GSase no fígado em peixes elasmobrânquios, e em alguns peixes teleósteos ureotélicos.

Dois tipos de GSase foram identificados em teleósteos, nomeadamente em *O. beta*, sendo classificados como GSase do fígado, mas que existe na maior parte dos tecidos, e GSase da brânquia, sendo esta específica deste tecido (Walsh *et al.* 1999; Walsh *et al.* 2003). Apesar de inicialmente se ter obtido ambas por PCR, optou-se posteriormente por sequenciar e analisar a mais comum, por forma a poder fazer uma análise mais abrangente.

Desta forma verifica-se que o grau de conservação da forma hepática entre peixes teleósteos é de 92% para a totalidade da proteína (anexo II) e de 97% para a região do fragmento isolado, enquanto que entre todas as espécies analisadas a conservação deste fragmento se situa nos 95%, justificando a pouca divergência patente

na árvore filogenética (figura 34). No entanto, é importante salientar que apenas uma porção da sequência de aminoácidos é que foi sequenciada e não toda, pelo que estudos posteriores seriam necessários para validar os nossos resultados, nomeadamente, estudos na região onde se encontra o sítio activo da GSase.

A existência desta enzima em várias espécies de peixes, amoniotélicas ou ureotélicas, poderá levar a crer que estes peixes, apesar da forma de excreção utilizada, apresentam pelo menos a capacidade de transformar amónia em glutamina como forma de reduzir a sua toxicidade. Tal deverá acontecer pelo menos em fases iniciais do desenvolvimento em que a energia provem do catabolismo da proteína e aminoácido do saco vitelino resultando numa elevada taxa de produção de amónia (Essex-Fraser *et al.* 2005). De facto larvas e alevins exibem maior tolerância a amónia que os adultos (Barimo & Walsh 2005) e aparentemente em várias espécies o ciclo da ureia é apenas funcional nos estádios iniciais da vida (McDonald *et al.* 2006 e referencias citadas).

Os diferentes tipos de CPSase (I, II e III) têm vindo a ser identificados em muitos organismos eucarióticos, baseando-se na importância fisiológica do substrato utilizado (amónia ou glutamina), e na importância da ligação do cofactor alostérico L-acetil-glutamato, que influencia a sua actividade (Anderson 2001).

A CPSase I encontra-se localizada na matriz do fígado de anfíbios ureotélicos, vertebrados terrestres, e catalisa a incorporação de amónia ao carbomil fosfato, como primeiro passo do ciclo da ureia. Esta CPSase utiliza a amónia como substrato, e necessita da presença do L-acetil-glutamato para que haja actividade. A CPSase I é a única CPSase que não pode utilizar a glutamina como substrato. Por outro lado, a CPSase II utiliza a glutamina em vez da amónia como substrato e não necessita da presença do L-acetil-glutamato para que ocorra actividade. A CPSase II, está localizada no citosol da maioria das células dos eucariotas (Anderson 2001). Finalmente a CPSase III é encontrada em invertebrados e peixes, e utiliza a glutamina como substrato, mas ao contrário da CPSase II, necessita da presença do L-acetil-glutamato para que ocorra actividade.

As propriedades, estrutura, localização celular, e função da CPSase III presente em peixes é muito semelhante àquelas da CPSase I de mamíferos. Esta evidência está patente na conservação da semelhança entre as duas formas, com 91% de conservação entre CPSase I e III no caso da região correspondente ao fragmento de CPSase III isolado em *H. didactylus*. Este foi confirmado como CPSase III pela sua elevada identificação com a mesma enzima em *O. beta* (figura 36), numa zona correspondente

ao domínio responsável pela função de síntese (anexo V). Por outro lado, já o grau de conservação entre CPSase I e III e a CPSase II é de apenas 72-73% nesta região, o que poderá explicar as diferenças existentes de função e o grau de divergência entre as diferentes formas desta enzima. A conservação deste fragmento em cada uma das formas dentro do conjunto de espécies estudadas, representado na figura 36 situa-se entre 93% e 96%, sendo que a conservação da enzima CPSase III de peixes, no seu comprimento total, é de 90% (anexo IV). Estas elevadas semelhanças indicam uma conservação também das funções da enzima entre espécies, o que é obviamente sugestivo de um importante papel fisiológico e parece indicar que todas as espécies têm capacidade de produzir o primeiro passo do ciclo da ureia.

A função da CPSase III nos peixes está claramente relacionada com o ciclo da ureia (McDonald *et al.* 2006). Tanto os peixes teleósteos como os peixes elasmobrânquios sintetizam ureia, utilizando enzimas semelhantes, como por exemplo a CPSase III e a arginase (. Nos peixes elasmobrânquios, a conversão de amónia em carbamil fosfato, para a síntese de ureia, envolve obrigatoriamente a formação da glutamina, catalisada pela acção da GSase e da CPSase III (Walsh *et al.* 2001a), o que está de acordo com os resultados obtidos, uma vez que nestes animais, os produtos de excreção encontram-se sob a forma de ureia, havendo portanto uma necessidade de terem uma CPSase III muito activa.

Verificou-se que o grau de identidade entre *H. didactylus* e *O. beta* é de 95.9%. Estudos realizados demonstram que, o grau de identidade entre as três formas de CPSase é muito elevado (Anderson 2001). Comparando a CPSase I de mamíferos com a CPSase III de peixes verificou-se, que o grau de identidade é elevado (91%), o que está de acordo com os estudos realizados por Anderson (2001). Segundo este autor, isto poderá estar relacionado com o facto da CPSase I poder ser uma CPSase III que ao longo da evolução tenha perdido a necessidade de, utilizar a glutamina como substrato. No entanto, não se deve assumir que todas as CPSases tenham as mesmas propriedades, pois estudos indicam que a tilápia do Lago Magadi possui menos afinidade para a glutamina como substrato do que para a amónia (Lindley *et al.* 1999). Outro tipo de exemplo, é a espécie *Heteropneustes fossilis*, que para além de utilizar a amónia como substrato, utiliza também para a sua actividade a glutamina como complemento adicional (Saha *et al.* 1997). Foi sugerido que estes peixes possuem genes para ambas as CPSases (III e I), o que pode ser interessante, dando uma visão que a CPSase I evoluiu a

partir da CPSase III, devido a uma necessidade de adaptação, em vez de uma duplicação do gene da CPSase III (Anderson 2001).

Nos teleósteos, a maioria da excreção de compostos azotados acontece pelas brânquias (Sayer & Davenport 1987; Wilkie 2002). No entanto, enquanto a amônia parece poder atravessar o epitélio branquial por difusão, dependente de um gradiente, o transporte de ureia é facilitado por proteínas transportadoras, denominadas transportadores de ureia (UT). Neste trabalho foi possível isolar e clonar um fragmento de uma destas proteínas transportadoras, verificando-se a sua existência na brânquia e, em menor quantidade, também no fígado. A análise da sua sequência permitiu classificar esta proteína como pertencente à família UT-A.

O primeiro UT-A clonado em peixes provém do rim de um elasmobrânquio, *Squalus achantias* (Smith & Wright 1999), mas os primeiros estudos genéticos para caracterizar os UT-As em peixes teleósteos foram realizados nas brânquias por Walsh *et al.* (2000) em *O. beta* e *A. grahami* (Walsh *et al.* 2001b) e Mistry *et al.* (2001) em *A. japonicus*. Estes autores verificaram que existe uma grande homologia entre as várias classes de vertebrados incluindo os mamíferos, nomeadamente a sub-família UT-A. Os resultados deste trabalho suportam esta observação. A análise das várias sequências de vários UT-A em peixes mostra uma conservação média de 72% (anexo VI). Este valor sobe para 84% se considerarmos apenas a região correspondente ao fragmento clonado para *H. didactylus* e todos os UT-As considerados, resultando na relativa proximidade entre os ramos da árvore filogenética na figura 38. A região obtida de *H. didactylus* corresponde à secção de inserção na membrana entre os domínios transmembranares 5 e 10, como pode ser visto no alinhamento em anexo, apresentando 97% de identidade com a mesma região em *O. beta*.

Neste estudo comparativo incluímos também a análise das sequências de UT-B de mamíferos e UT-C de peixes. Presume-se que tanto UT-B como UT-C possam ter evoluído a partir da UT-A, especificando-se cada uma destas formas em organismos diferentes (Bagnasco 2005; McDonald *et al.* 2006), mas com divergência considerável sendo que entre a UT-A e UT-C de peixes apenas existe 47% de conservação enquanto que entre UT-A e UT-B em mamíferos este valor ronda os 80% (ver anexo).

A manutenção do UT-A não só em peixes ureotélicos mas também em teleósteos amoniotélicos é intrigante (Mathai 2005). Inicialmente parece indicar que mesmo estes

últimos têm necessidade de excretar ureia (até 10% da excreção de nitrogénio, segundo McDonald *et al.* 2006; Walsh *et al.* 2001b) ou então a retenção de UT em adultos pode ser provavelmente uma reminescência do seu estado larvar, quando a transformação de amónia em ureia é possível e necessária para evitar a toxicidade provocada pelo catabolismo das proteínas vitelinas. Outra possibilidade a considerar será a importância da ureia como osmólito, e de facto um aumento de expressão de UT-A e UT-C foi observado em enguias quando expostas a água salgada (Mistry *et al.* 2001, 2005).

### 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

A mudança de amoneotelia para ureotelia já se encontra documentada em algumas espécies de peixes. Apesar da maioria das espécies ser amoniotelica, muitos peixes tem a capacidade de excretar ureia como produto final do metabolismo. Verificar a capacidade de tolerância à amónia e o grau de ureotelia em *H. didactylus*, e determinar a existência das enzimas envolvidas no ciclo da ureia e o seu padrão de expressão genética foi o principal objectivo deste trabalho.

Este estudo permitiu concluir que a espécie *H. didactylus* apresenta alguma tolerância à amónia ambiental, apesar desta tolerância ser menor do que em outras espécies da mesma família.

Em relação à mudança de amoneotelia para ureotelia, uma vez que não se verificou um padrão uniforme de excreção de amónia e ureia ao longo do tempo, pode-se dizer que os indivíduos desta espécie são provavelmente ureotélicos facultativos, em que excretam mais ureia numas alturas que noutras, não se sabendo quais os mecanismos relacionados com este fenómeno.

Apesar de não ter sido possível determinar se a excreção de ureia por pulsos em *H. didactylus* se encontra relacionada com os níveis de cortisol plasmático, pensa-se que o cortisol poderá estar relacionado com esta excreção por pulsos, uma vez que se verificou que os níveis de ureia plasmática aumentam com o aumento dos níveis de cortisol plasmático.

Apesar do ciclo da ureia estar activo nas brânquias, o fígado parece ser o principal órgão onde o ciclo da ureia está maioritariamente activo. Em condições de exposição de amónia ambiental elevada, as enzimas do ciclo da ureia não se encontraram tão expressas como para condições de amónia ambiental menos elevadas, o que poderá indicar que os peixes entram em colapso fisiológico, sendo a transcrição destes genes inibida. Deste modo, deveriam ser realizadas análises bioquímicas e histológicas no fígado e brânquias, de modo a se verificar se concentrações elevadas de amónia criam alterações que levam a degradação destes. Dever-se-ia também efectuar análises ao nível do rim, músculos e cérebro, de modo a verificar-se qual o padrão da expressão e actividade das enzimas e se estas se encontram relacionados com a funcionalidade do ciclo da ureia.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

Em estudos futuros, seria interessante fazer comparações ao nível de ureia excretada entre machos e fêmeas desta espécie, de modo a verificar se os machos excretam mais ureia do que as fêmeas, uma vez que está documentado (Barimo 2005) em outras espécies da mesma família que são os machos que guardam os ninhos, podendo estes excretar maiores quantidades de ureia, de modo a evitarem intoxicar a prole.

Outro estudo interessante, seria verificar qual a diferença no comportamento entre indivíduos territoriais e entre indivíduos submissos nesta espécie. Estudos realizados em outras espécies de peixes, indicam que os indivíduos submissos, possuem elevados níveis de cortisol no plasma (Sloman *et al.* 2005), devido ao stress provocado por encontros sociais com indivíduos mais agressivos, levando à excreção de ureia por pulsos.

Seria então importante, numa perspectiva evolutiva, verificar quais as condições e factores que levam os peixes teleósteos a excretar ureia, num ambiente que à partida não induziria a este produto de excreção, o que provavelmente, serviria para uma melhor compreensão da importância ecológica desta adaptação.

### 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Anderson PM (1995) Urea Cycle in Fish: Molecular and Mitochondrial Studies. In: *Cellular and Molecular Approaches to Fish Ionic Regulation* (eds. Wood CM, Shuttleworth TJ), pp. 57-77. Academic Press.

Anderson PM (2001) Urea and Glutamine Synthesis: Environmental Influences on Nitrogen Excretion. In: *Nitrogen Excretion* (eds. Wright PA, Anderson PM), pp. 239-270. Academic Press.

Bagnasco SM (2005) Role and regulation of urea transporters. *European Journal of Physiology* **450**, 217-226.

Barber LM, Walsh PJ (1993) Interactions of acid-base status and nitrogen excretion and metabolism in the ureogenic teleost *Opsanus beta*. *Journal of Experimental Biology* **185**, 87-105.

Barimo J, Modesto T, Soares S, Guerreiro PM, Wood CM, Walsh PJ (2007) Ammonia tolerance and ureotelicity in the Lusitanian toadfish, *Halobatrachus didactylus*. *Comparative Biochemistry and Physiology A-Molecular & Integrative Physiology* **148**, S46-S49.

Barimo JF (2005) *The adaptive significance of ureotelism in the Gulf Toadfish, Opsanus beta*, PhD thesis, University of Miami.

Barimo JF, Walsh PJ (2005) The effects of acute and chronic ammonia exposure during early life stages of the gulf toadfish, *Opsanus beta*. *Aquatic Toxicology* **75**, 225-237.

Cameron J, Heisler N (1983) Studies of ammonia in the Rainbow trout: physico-chemical parameters, acid-base behaviour and respiratory clearance. *The Journal of Experimental Biology* **105**, 107-125.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Cardoso EL, Chiarini-Garcia H, Ferreir RMA (1996) Morphological changes in the gills of *Lophiosilurus alexandri* exposed to un-ionized ammonia. *Journal of Fish Biology* **49**, 778-787.

Costa JL (2004) *A biologia do xarroco, Halobatrachus didactylus (Bloch & Schneider, 1801), e o seu papel na estruturação e funcionamento das comunidades em que se insere; referência especial à população do estuário do Mira*, Tese de Doutoramento, Universidade de Lisboa.

Eddy FB (2005) Ammonia in estuaries and effects on fish. *Journal of Fish Biology* **67**, 1495-1513.

Essex-Fraser PA, Steele SL, Bernier NJ, Murray BW, Stevens ED, Wright PA (2005) Expression of four glutamine synthetase genes in the early stages of development of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in relation to nitrogen metabolism. *Journal of Biological Chemistry* **280**, 20268-20273.

Goldsby RA, Kindt TJ, Osborne BA, Kuby J (2003) *Immunology*, Freeman and Company, W. H. New York.

Guerreiro PM, Rotllant J, Fuentes J, Power DM, A.V.M. C (2006) Cortisol and parathyroid hormone-related peptide are reciprocally modulated by negative feedback. *General and Comparative Endocrinology* **148**, 227-235.

Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids. Symp. Ser.* 41:95-98.

Hartl DL, Jones EW (2006) *Essential Genetics: A Genomics Perspective*, 4<sup>th</sup> edn. Jones and Bartlett Publishers, Inc, United States of America.

Hazon N, Wellsa A, Pillansb RD, Gooda JP, Andersona WG, Franklinc CE (2003) Urea based osmoregulation and endocrine control in elasmobranch fish with special reference to euryhalinity. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* **136** 685-700.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Hopkins TE, Wood CM, Walsh PJ (1995) Interactions of Cortisol and Nitrogen-Metabolism in the Ureogenic Gulf Toadfish *Opsanus-Beta*. *Journal of Experimental Biology* **198**, 2229-2235.

Ip YK, Chew SF, Randall DJ (2001) Ammonia Toxicity, Tolerance, and Excretion. In: *Nitrogen Excretion* (eds. Wright PA, Anderson PM), pp. 109-140. Academic Press.

Ip YK, Law IY, Wong WP, Lee SML, Chew SF (2005) The African sharptooth catfish *Clarias gariepinus* can tolerate high levels of ammonia in its tissue and organ during four days of aerial exposure. *Physiological and Biochemical Zoology* **78**, 630-640.

Ip YK, Randall DJ, Kok TKT, Barzaghi C, Wright PA, Ballantyne JS, Wilson JM, Chew SF (2004) The giant mudskipper *Periophthalmodon schlosseri* facilitates active  $\text{NH}_4^+$  excretion by increasing acid excretion and decreasing  $\text{NH}_3$  permeability in the skin. *The Journal of Experimental Biology* **207**, 787-801.

Ivancic I, Degobbi D (1984) An optimal manual procedure for ammonia analysis in natural waters by the indophenol blue method. *Water Research* **18**, 1143-1147.

Janech MG, Gefroh HA, Cwengros EE, Sulikowski JA, Ploth DW, Fitzgibbon WR (2008) Cloning of urea transporters from the kidneys of two batoid elasmobranchs: evidence for a common elasmobranch urea transporter isoform. *Marine Biology* **153**, 1173-1179.

Kajimura M, Iwata K, Numata H (2002) Diurnal nitrogen excretion rhythm of the functionally ureogenic gobiid fish *Mugilogobius abei*. *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology* **131**, 227-239.

Kong H, Kahatapitiya N, Kingsley K, Salo WL, Anderson PM, Wang YS, Walsh PJ (2000) Induction of carbamoyl phosphate synthetase III and glutamine synthetase mRNA during confinement stress in Gulf Toadfish (*Opsanus beta*). *The Journal of Experimental Biology* **203**, 311-320.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Kreuzer H, Massey A (2001) *Recombinant DNA and Biotechnology: A Guide for Students*. American Society for Microbiology Press, Washington.

Kumada Y, Bensont DR, Hillemannt D, Hostedt TJ, Rochefortt DA, Thompson CJ, Wohllebent W, Tatenovii AY (1993) Evolution of the glutamine synthetase gene, one of the oldest existing and functioning genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **90**, 3009-3013.

Kumar S, Tamura K, Nei M (2004) MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics* **5**, 150-163.

Lindley TE, Anderson PM (1999) Sequence of carbamoyl-phosphate synthetase I (CPSase I) cDNA and effect of exposure to air on expression of CPSase I activity and mRNA in *Xenopus laevis*. *Faseb Journal* **12**, A1414-A1414.

Litchfield JT, Wilcoxon F (1949) A simplified method for evaluating dose-effect experiments. *Journal Pharmacol Experimental* **96**, 99-113.

Lodish H, Berk A, Matsudaira P, Kaiser CA, Krieger M, Scott MP (2005) *Biologia Celular e Molecular*, 5<sup>th</sup> end, Artmed.

Loong AM, Pang CYM, Hiong KC, Wong WP, Chew SF, Ip YK (2008) Increased urea synthesis and/or suppressed ammonia production in the African lungfish, *Protopterus annectens*, during aestivation in air or mud. *Journal of Comparative Physiology B-Biochemical Systemic and Environmental Physiology* **178**, 351-363.

Mathai JC (2005) Ammonotelic teleosts and urea transporters. *American Journal of Physiology* **288**, 453-454.

McDonald AD, Gilmour KA, Barimo JF, Frezza PE, Walsh PJ, Perry SF (2007) Is urea pulsing in toadfish related to environmental O<sub>2</sub> or CO<sub>2</sub> levels? *Comparative Biochemistry and Physiology a-Molecular & Integrative Physiology* **146**, 366-374.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

McDonald MD, Smith CP, Walsh PJ (2006) The physiology and evolution of urea transport in fishes. *Journal of Membrane Biology* **212**, 93-107.

McDonald MD, Walsh PJ (2004) Dogmas and controversies in the handling of nitrogenous wastes: 5-HT<sub>2</sub>-like receptors are involved in triggering pulsatile urea excretion in the gulf toadfish, *Opsanus beta*. *The Journal of Experimental Biology* **207**, 2003-2010.

McDonald MD, Wood CM (2004) The effect of chronic cortisol elevation on urea metabolism and excretion in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Comparative Physiology B-Biochemical Systemic and Environmental Physiology* **174**, 71-81.

Mistry AC, Chen G, Kato A, Nag K, Sands JM, Hirose S (2005) A novel type of urea transporter, UT-C, is highly expressed in proximal tubule of seawater eel kidney. *American Journal of Physiology* **288**, 455-465.

Mistry AC, Honda S, Hirose S (2001) Structure, properties and enhanced expression of galactose-binding C-type lectins in mucous cells of gills from freshwater Japanese eels (*Anguilla japonica*). *Biochemical Journal* **360**, 107-115.

Mommsen TP, Walsh PJ (1989) Evolution of Urea Synthesis in Vertebrates: The Piscine Connection. *Science* **243**, 72-75.

Mommsen TP, Walsh PJ (1991) Metabolic and Enzymatic Heterogeneity in the Liver of the Ureogenic Teleost *Opsanus beta*. *Journal of Experimental Biology* **156**, 407-418.

Mullis KB (1990) The Unusual Origin of the Polymerase Chain Reaction. *Scientific American*.

Nicholas KB, Nicholas HBJr, Deerfield DW II (1997) GeneDoc: Analysis and Visualization of Genetic Variation, EMBNEW.NEWS 4:14

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Pickering AD, Pottinger TG (1987) Poor water quality suppresses the cortisol response of salmonid fish to handling and confinement. *Journal of Fish Biology* **30**, 363-374.

Palazón-Fernandez JL, Arias AM, Sarasquete C (2001) Aspects of the reproductive biology of the toadfish *Halobatrachus didactylus* (Schneider, 1801) (Pisces: Batrachoididae) *Scientia Marina*.

Price NM, Harrison PJ (1987) A comparison of methods for the measurement of dissolved urea concentrations in seawater. *Marine Biology* **94**, 307-319.

Purves WK, Sadava D, Orians GH, Heller HC (2001) *Life- The Science of Biology*, 6<sup>th</sup> edn, W. H. Freeman and Company, U.S.A.

Randall D, Burggren W, French K, Fernald R (1997) *Eckert – Animal Physiology – Mechanisms and Adaptations*, 4<sup>th</sup> edn, W. H. Freeman and Company, New York.

Randall DJ, Tsui TKN (2002) Ammonia toxicity in fish. *Marine Pollution Bulletin* **45**, 17-23.

Rahmahtullah M, Boyde TR (1980) Improvements in the determination of urea using diacetyl monoxime; methods with and without deproteinization. *Clinica Chimica Acta* **107**, 3-9.

Rasmussen RS, Korsgaard B (1998) Ammonia and urea in plasma of juvenile turbot (*Scophthalmus maximus L.*) in response to external ammonia. *Comparative Biochemistry and Physiology A-Molecular and Integrative Physiology* **120**, 163-168.

Roche H, Bogé G (1996) Fish Blood Parameters as a Potential Tool for Identification of Stress Caused by the Environmental Factors and Chemical Intoxication. *Marine Environmental Research* **41**, 27-43.

Rodela TM, Wright PA (2006a) Characterization of diurnal urea excretion in the mangrove killifish, *Rivulus marmoratus*. *Journal of Experimental Biology* **209**, 2696-2703.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Rodela TM, Wright PA (2006b) Metabolic and neuroendocrine effects on diurnal urea excretion in the mangrove killifish *Rivulus marmoratus*. *Journal of Experimental Biology* **209**, 2704-2712.

Ruyet P-LJ, Chartois H, Quemener L (1995) Comparative acute ammonia toxicity in marine fish and plasma ammonia response. *Aquaculture* **136**, 181-194.

Sambrook J, Russell DW (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3<sup>th</sup> edn, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Smith CP, Wright PA (1999) Molecular characterization of an elasmobranch urea transporter. *American Journal of Physiology* **276**, 622-666.

Sayer MDJ, Davenport J (1987) The relative importance of the gills to ammonia and urea excretion in five seawater and one freshwater teleost species. *Journal of Fish Biology* **31**.

Sloman KA, McDonald MD, Barimo JF, Lepage O, Winberg S, Wood CM, Walsh PJ (2005) Does pulsatile urea excretion serve as a social signal in the gulf toadfish *Opsanus beta*? *Physiological and Biochemical Zoology* **78**, 724-735.

Smart G (1976) The effect of ammonia exposure on gill structure of the rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Journal of Fish Biology* **8**, 471-475.

Stites DP, Rodgers RPC, Folds JS, J. (1997) *Clinical laboratory methods for detection of antigens and antibodies in Medical Immunology*, 9<sup>th</sup> edn. Appleton & Longe, U.S.A

Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F., Higgins DG (1997) The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* **25**:4876-4882.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Wajsbrodt N, Gasith A, Dimont A, Popper DM (1993) Chronic toxicity of ammonia to juvenile gilthead seabream *Spaurus aurata* and related histopathological effects. *Journal of Fish Biology* **42**, 321-328.

Walsh PJ (1997) Evolution and regulation of urea synthesis and ureotely in (Batrachoidid) fishes. *Annual Review of Physiology* **59**, 299-323.

Walsh PJ (1998) Nitrogen Excretion and Metabolism. In: *The Physiology of fishes* (eds. Evans DH), pp. 199-214. CRC Press.

Walsh PJ, Danulat E, Mommsen TP (1990) Variation in Urea Excretion in the Gulf Toadfish *Opsanus beta*. *Marine Biology* **106**, 323-328.

Walsh PJ, Grosell M, Goss GG, Bergman HL, Bergman AN, Wilson P, Laurent P, Alper SL, Smith CP, Kamunde C, Wood CM (2001b) Physiological and molecular characterization of urea transport by the gills of the Lake Magadi tilapia (*Alcolapia grahami*). *Journal of Experimental Biology* **204**, 509-520.

Walsh PJ, Handel-Fernandez ME, Vincek V (1999) Characterization and sequencing of glutamine synthetase cDNA from liver of the ureotelic gulf toadfish (*Opsanus beta*). *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology* **124**, 251-259.

Walsh PJ, Heitz MJ, Campbell CE, Cooper GJ, Medina M, Wang YXS, Goss GG, Vincek V, Wood CM, Smith CP (2000) Molecular characterization of a urea transporter in the gill of the gulf toadfish (*Opsanus beta*). *Journal of Experimental Biology* **203**, 2357-2364.

Walsh PJ, Mayer GD, Medina M, Bernstein ML, Barimo JF, Mommsen TP (2003) A second glutamine synthetase gene with expression in the gills of the gulf toadfish (*Opsanus beta*). *Journal of Experimental Biology* **206**, 1523-1533.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Walsh PJ, Mommsen TP (2001) Evolutionary Considerations of Nitrogen Metabolism and Excretion. In: *Nitrogen Excretion* (eds. Wright PA, Anderson PM), pp. 1-26. Academic Press.

Walsh PJ, Wang Y, Campbell CE, De Boeck G, Wood CM (2001a) Patterns of nitrogenous waste excretion and gill urea transporter mRNA expression in several species of marine fish. *Marine Biology* **139**, 839-844.

Walsh PJ, Wei Z, Wood CM, Loong AM, Hiong KC, Lee SML, Wong WP, Chew SF, Ip YK (2004) Nitrogen metabolism and excretion in *Allenbatrachus grunniens* (L): effects of variable salinity, confinement, high pH and ammonia loading. *Journal of Fish Biology* **65**, 1392-1411.

Wang YS, Walsh PJ (2000a) High ammonia tolerance in fishes of the family Batrachoididae (Toadfish and Midshipmen). *Aquatic Toxicology* **50**, 205-219.

Watson JD, Gilman M, Witkowski J, Zoller M (1996) *Recombinant DNA*, 2<sup>th</sup> edn, Scientific American Books, New York.

Wendelaar Bonga SE (1997) The stress response in fish. *Physiological Reviews* **77**.

Whitehead PJP, Bauchot ML, Hureau JC, Nielsen J, Tortonese E (1986) *Fishes of the Northeastern Atlantic and the Mediterranean*.

Wilkie MP, Morgan TP, Galvez F, Smith RW, Kajimura M, Ip YK, Wood CM (2007) The African Lungfish (*Protopterus dolloi*): Ionoregulation and Osmoregulation in a fish out of Water. *Physiological and Biochemical Zoology* **80**, 99-112.

Wilkie MP (2002) Ammonia excretion and urea handling by fish gills: Present understanding and future research challenges. *Journal of Experimental Zoology* **293**, 284-301.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Withers PC (1998) Urea: Diverse functions of a 'waste' product. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* **25**, 722-727.

Wood CM (2001) Influence of Feeding, Exercise, and Temperature on Nitrogen Metabolism and Excretion. In: *Nitrogen Excretion* (eds. Hoar WS, Randall DJ, Farrell AP), pp. 201-216. Academic Press.

Wood CM, McDonald MD, Sundin L, Laurent P, Walsh PJ (2003) Pulsatile urea excretion in the gulf toadfish: mechanisms and controls. *Comparative Biochemistry and Physiology B Biochem Mol Biol* **136**, 667-684.

Wood CM, Shuttleworth TJ (1995) Urea Cycle in Fish: Molecular and Mitochondrial Studies. In: *Cellular and Molecular Approaches to Fish Ionic Regulation* (eds. Hoar WS, Randall DJ, Farrell AP), pp. 57-77. Academic Press.

Wood CM, Warne JM, Wang YX, McDonald MD, Balment RJ, Laurent P, Walsh PJ (2001) Do circulating plasma AVT and/or cortisol levels control pulsatile urea excretion in the gulf toadfish (*Opsanus beta*)? *Comparative Biochemistry and Physiology A-Molecular and Integrative Physiology* **129**, 859-872.

Wright PA (1995) Nitrogen excretion: three end products, many physiological roles. *Journal of Experimental Biology* **198**, 273-281.

Wright PA, Land MD (1998) Urea Production and Transport in Teleost Fishes. *Comparative Biochemistry and Physiology A Biochem Mol Biol* **119**, 47-58.

## **ANEXOS**

## ANEXO I

**Tabela I:** Parâmetros da correlação de Pearson entre os vários factores

	Amónia (mmol/l)	Ureia (mmol/l)	Cortisol (ng/ml)	Peso medio (g)	N
Ensaio 1	3.1±0.27	6.0±1.02	36.2±9.64	114.5±14.70	12
Ensaio 2	2.3±0.29	10.0±1.21	42.0±9.41	37.1±0.80	10

**Tabela II:** Parâmetros da correlação de Pearson entre os vários factores

ENSAIO 1	Ureia excretada (umol/kg/dia)	Amonia plasma (mmol/l)	Ureia plasma (mmol/l)	Cortisol plasma (ng/ml)	Peso (g)
Amónia excretada (umol/kg/dia)	-0.293 0.482 8	-0.216 0.549 10	-0.428 0.217 10	-0.321 0.366 10	-0.107 0.768 10
Ureia excretada (umol/kg/dia)		-0.372 0.365 8	-0.313 0.451 8	-0.377 0.358 8	-0.107 0.768 10
Amonia plasma (mmol/l)			0.457 0.136 12	0.0225 0.945 12	0.557 0.0602 12
Ureia plasma (mmol/l)				0.532 0.0753 12	0.543 0.0682 12
Cortisol plasma (ng/ml)		Cc P N			0.607 0.0365* 12

Em cada célula, os valores indicam, de cima para baixo, os parâmetros da correlação de Pearson: (Cc) Coeficiente de correlação, (P) Valor P e (N) Número de amostras. \* indica significância com  $p < 0.05$ .

**Tabela III:** Parâmetros da correlação de Pearson entre os vários factores

ENSAIO 2	Ureia excretada (umol/kg/dia)	Amonia plasma (mmol/l)	Ureia plasma (mmol/l)	Cortisol plasma (ng/ml)	Peso (g)
Amónia excretada (umol/kg/dia)	0.342	-0.120	0.198	-0.324	0.0213
	0.231	0.725	0.559	0.479	0.950
	14	11	11	7	11
Ureia excretada (umol/kg/dia)		0.294	0.255	0.154	0.317
		0.381	0.449	0.742	0.342
		11	11	7	11
Amonia plasma (mmol/l)			-0.384	-0.0919	0.536
			0.244	0.863	0.0893
			11	6	11
Ureia plasma (mmol/l)				0.884	0.0808
				0.0194*	0.813
				6	11
Cortisol plasma (ng/ml)	Cc				0.303
	P				0.559
	N				6

Em cada célula, os valores indicam, de cima para baixo, os parâmetros da correlação de Pearson: (Cc) Coeficiente de correlação, (P) Valor P e (N) Número de amostras. \* indica significância com  $p < 0.05$

## ANEXO II

Alinhamento entre as sequências disponíveis para peixes e aquela obtida através da sequenciação do fragmento de cADN com os primers específicos para GSase.

	*	20	*	40	*	60	*	80	*	↓ ↓ ↓	100	
<b>Halobatrachus</b> :	-----MATSASASLSKAVKQYMLPQDQKVOAMYIWDGTGEGLRCKTRTLTLDSEPKSIEDLPEWNFDSSTYQAE											: -
Li_Opsanus :	-----MRVVRVGRFLFLQLPRLSRCVTAAR											: 94
Gi_Opsanus :	-----MASSVSVSSRLNKAVLQRYLSLPOQCKTIVTYIWDGTGEGLRCKTRTLTLDSEPKSIEDLPEWNFDSSTYQAE											: 73
Oreochromis :	-----MATSASASLSKAVKQYMLPQDQKVOAMYIWDGTGEGLRCKTRTLTLDSEPKSIEDLPEWNFDSSTYQSE											: 71
Oncorhynchus :	-----MATSEASLSKAVKQYMLPQDQKVOAMYIWDGTGEGLRCKTRTLTLDSEPKSIEDLPEWNFDSSTYQSE											: 71
Salmo :	-----MATSSASLSKAVKQYMLPQDQKVOAMYIWDGTGEGLRCKTRTLTLDSEPKSIEDLPEWNFDSSTYQSE											: 71
Bostrychus :	-----MATSASASLSKAVKQYMLPQDQKVOAMYIWDGTGEGLRCKTRTLTLDSEPKSIEDLPEWNFDSSTYQAE											: 71
Danio :	-----MATSASSQLSKVVKQYMLPQDQKVOAMYIWDGTGEGLRCKTRTLTLDSEPKSIEDLPEWNFDSSTYQAE											: 71
Squalus :	MRICRSFLFLVKKCGNITPTIWRNQHTYR											: 100
	*	120	*	140	*	160	*	180	*	↓	200	
<b>Halobatrachus</b> :	-----GSNSDMYLVEAAMFRDPPFRKDPNKLVLCEVLKYNRKESESNLRLNCKVMNVMKDDCHWPFMGMEQYTYLGTGHPFGWPSNGFPQGPQYPCGVGADKAY											: -
Li_Opsanus :	-----GSNSDMYLVEAAMFRDPPFRKDPNKLVLCEVLKYNRKESESNLRLNCKVMNVMKDDCHWPFMGMEQYTYLGTGHPFGWPSNGFPQGPQYPCGVGADKAY											: 194
Gi_Opsanus :	-----GSNSDMYLVEAAMFRDPPFRKDPNKLVLCEVLKYNRKESESNLRLNCKVMNVMKDDCHWPFMGMEQYTYLGTGHPFGWPSNGFPQGPQYPCGVGADKAY											: 173
Oreochromis :	-----GSNSDMYLVEAAMFRDPPFRKDPNKLVLCEVLKYNRKESESNLRLNCKVMNVMKDDCHWPFMGMEQYTYLGTGHPFGWPSNGFPQGPQYPCGVGADKAY											: 171
Oncorhynchus :	-----GSNSDMYLVEAAMFRDPPFRKDPNKLVLCEVLKYNRKESESNLRLNCKVMNVMKDDCHWPFMGMEQYTYLGTGHPFGWPSNGFPQGPQYPCGVGADKAY											: 171
Salmo :	-----GSNSDMYLVEAAMFRDPPFRKDPNKLVLCEVLKYNRKESESNLRLNCKVMNVMKDDCHWPFMGMEQYTYLGTGHPFGWPSNGFPQGPQYPCGVGADKAY											: 171
Bostrychus :	-----GSNSDMYLVEAAMFRDPPFRKDPNKLVLCEVLKYNRKESESNLRLNCKVMNVMKDDCHWPFMGMEQYTYLGTGHPFGWPSNGFPQGPQYPCGVGADKAY											: 171
Danio :	-----GSNSDMYLVEAAMFRDPPFRKDPNKLVLCEVLKYNRKESESNLRLNCKVMNVMKDDCHWPFMGMEQYTYLGTGHPFGWPSNGFPQGPQYPCGVGADKAY											: 171
Squalus :	-----GSNSDMYLVEAAMFRDPPFRKDPNKLVLCEVLKYNRKESESNLRLNCKVMNVMKDDCHWPFMGMEQYTYLGTGHPFGWPSNGFPQGPQYPCGVGADKAY											: 200
	*	220	*	240	*	260	*	280	*	↓ ↓ ↓	300	
<b>Halobatrachus</b> :	-----GRDIVEAHYRACLYAGVQICGTAENVMPAQWVFQVGCCEGIMDGHLLWVWARFILHRVCEDFGVVASFDPKPIPGNWNAGAGCHTNFSTKEMREDDGGLKAIIE											: 71
Li_Opsanus :	-----GRDIVEAHYRACLYAGVQICGTAENVMPAQWVFQVGCCEGIMDGHLLWVWARFILHRVCEDFGVVASFDPKPIPGNWNAGAGCHTNFSTKEMREDDGGLKAIIE											: 294
Gi_Opsanus :	-----GRDVVECHYKACLYAGIKIYGTNAENVMPAQWVFQVGCCEGIMDGHLLWVWARFILHRVCEDFGIATMDPKPKIGNWNAGAGCHTNFSTKEMREDDGGLKAIIE											: 273
Oreochromis :	-----GRDVEAHYRACLYAGVQICGTAENVMPAQWVFQVGCCEGIMDGHLLWVWARFILHRVCEDFGVVASFDPKPIPGNWNAGAGCHTNFSTKEMREDDGGLKAIIE											: 271
Oncorhynchus :	-----GRDIVEAHYRACLYAGVQICGTAENVMPAQWVFQVGCCEGIMDGHLLWVWARFILHRVCEDFGVVASFDPKPIPGNWNAGAGCHTNFSTKEMREDDGGLKAIIE											: 271
Salmo :	-----GRDIVEAHYRACLYAGVQICGTAENVMPAQWVFQVGCCEGIMDGHLLWVWARFILHRVCEDFGVVASFDPKPIPGNWNAGAGCHTNFSTKEMREDDGGLKAIIE											: 271
Bostrychus :	-----GRDIVEAHYRACLYAGVQICGTAENVMPAQWVFQVGCCEGIMDGHLLWVWARFILHRVCEDFGVVASFDPKPIPGNWNAGAGCHTNFSTKEMREDDGGLKAIIE											: 271
Danio :	-----GRDIVEAHYRACLYAGVQICGTAENVMPAQWVFQVGCCEGIMDGHLLWVWARFILHRVCEDFGVVASFDPKPIPGNWNAGAGCHTNFSTKEMREDDGGLKAIIE											: 271
Squalus :	-----GRDIVEAHYRACLYAGVQICGTAENVMPAQWVFQVGCCEGIMDGHLLWVWARFILHRVCEDFGIASFPDKPIPGNWNAGAGCHTNFSTKEMREDDGGLKAIIE											: 300
	*	320	*	340	*	360	*	380	*	↓ ↓ ↓	400	
<b>Halobatrachus</b> :	-----DSIEKLGKRHHYHIRAYDPKGGLDNARRLTGHHETSNIHEFSAGVANRGASIRIPRSVGQEKKGYPEDRRPSANCDPYAVTEALIRTCLLISEEGDEBLAM											: 111
Li_Opsanus :	-----DAIEKLGKRHHYHIRAYDPKGGLDNARRLTGHHETSNIHEFSAGVANRGASIRIPRSVGQEKKGYPEDRRPSANCDPYAVTEALIRTCLLISEEGDEBLAM											: 394
Gi_Opsanus :	-----QAIIEKLSKNHAEHICMVDHKKQDNIIRRLTGHHETSNIHEFSAGVANRGASIRIPRSVGQEKKGYPEDRRPSANCDPYAVTEALIRTCLLISEEGDEBLAM											: 373
Oreochromis :	-----DSIEKLGKRHHYHIRAYDPKGGLDNARRLTGHHETSNIHEFSAGVANRGASIRIPRSVGQEKKGYPEDRRPSANCDPYAVTEALIRTCLLISEEGDEBLAM											: 371
Oncorhynchus :	-----DSIEKLGKRHHYHIRAYDPKGGLDNARRLTGHHETSNIHEFSAGVANRGASIRIPRSVGQEKKGYPEDRRPSANCDPYAVTEALIRTCLLISEEGDEBLAM											: 371
Salmo :	-----ESIIEKLGKRHHYHIRAYDPKGGLDNARRLTGHHETSNIHEFSAGVANRGASIRIPRSVGQEKKGYPEDRRPSANCDPYAVTEALIRTCLLISEEGDEBLAM											: 371
Bostrychus :	-----ESIIEKLGKRHHYHIRAYDPKGGLDNARRLTGHHETSNIHEFSAGVANRGASIRIPRSVGQEKKGYPEDRRPSANCDPYAVTEALIRTCLLISEEGDEBLAM											: 371
Danio :	-----ECIEKLGKRHHYHIRAYDPKGGLDNARRLTGHHETSNIHEFSAGVANRGASIRIPRSVGQEKKGYPEDRRPSANCDPYAVTEALIRTCLLISEEGDEBLAM											: 371
Squalus :	-----DSIEKLGKRHHYHIRAYDPKGGLDNARRLTGHHETSNIHEFSAGVANRGASIRIPRSVGQEKKGYPEDRRPSANCDPYAVTEALIRTCLLISEEGDEBLAM											: 400
<b>Halobatrachus</b> :	---											: -
Li_Opsanus :	---											: -
Gi_Opsanus :	---											: -
Oreochromis :	---											: -
Oncorhynchus :	SK- :											: 373
Salmo :	---											: -
Bostrychus :	---											: -
Danio :	---											: -
Squalus :	NKN :											: 403

↓ - Resíduos que contribuem para o local de ligação ao glutamato

**Halobatrachus**, *Halobatrachus didactylus* (Lusitanian toadfish), **Li\_Opsanus**, *Opsanus beta* liver form (Gulf toadfish ; AAD34720), **Gi\_Opsanus**, *Opsanus beta* gill form (Gulf toadfish ; AAN77155), **Oreochromis**, *Oreochromis niloticus* (Nile tilapia ; AAM28589), **Oncorhynchus**, *Oncorhynchus mykiss* (rainbow trout ; NP\_001117785), **Salmo**, *Salmo salar* (Atlantic salmon ; ACI68482), **Bostrychus**, *Bostrychus sinensis* (four-eyed sleeper ; AAL62448), **Danio**, *Danio rerio* (zebrafish ; NP\_878286), **Squalus**, *Squalus acanthias* (spiny dogfish ; AAA61871)

**Tabela IV:** Tabela referente ao alinhamento total das seqüências de aminoácidos. Representação das percentagens de conservação média na sequencia completa da GSase nos peixes. Estas percentagens são referentes a toda a seqüência obtida através da sequenciação do fragmento de cDNA.

	Halobatrachus	Fígado Opsanus	Branquias Opsanus	Oreochromis	Oncorhynchus	Salmo	Bostrychus	Danio
Halobatrachus	—							
Fígado Opsanus	27%	—						
Branquias Opsanus	24%	79%	—					
Oreochromis	29%	91%	85%	—				
Oncorhynchus	28%	90%	82%	96%	—			
Salmo	28%	91%	84%	96%	96%	—		
Bostrychus	28%	91%	83%	97%	96%	97%	—	
Danio	28%	88%	83%	95%	93%	95%	94%	—
Squalus	26%	88%	76%	87%	86%	85%	86%	85%

### ANEXO III

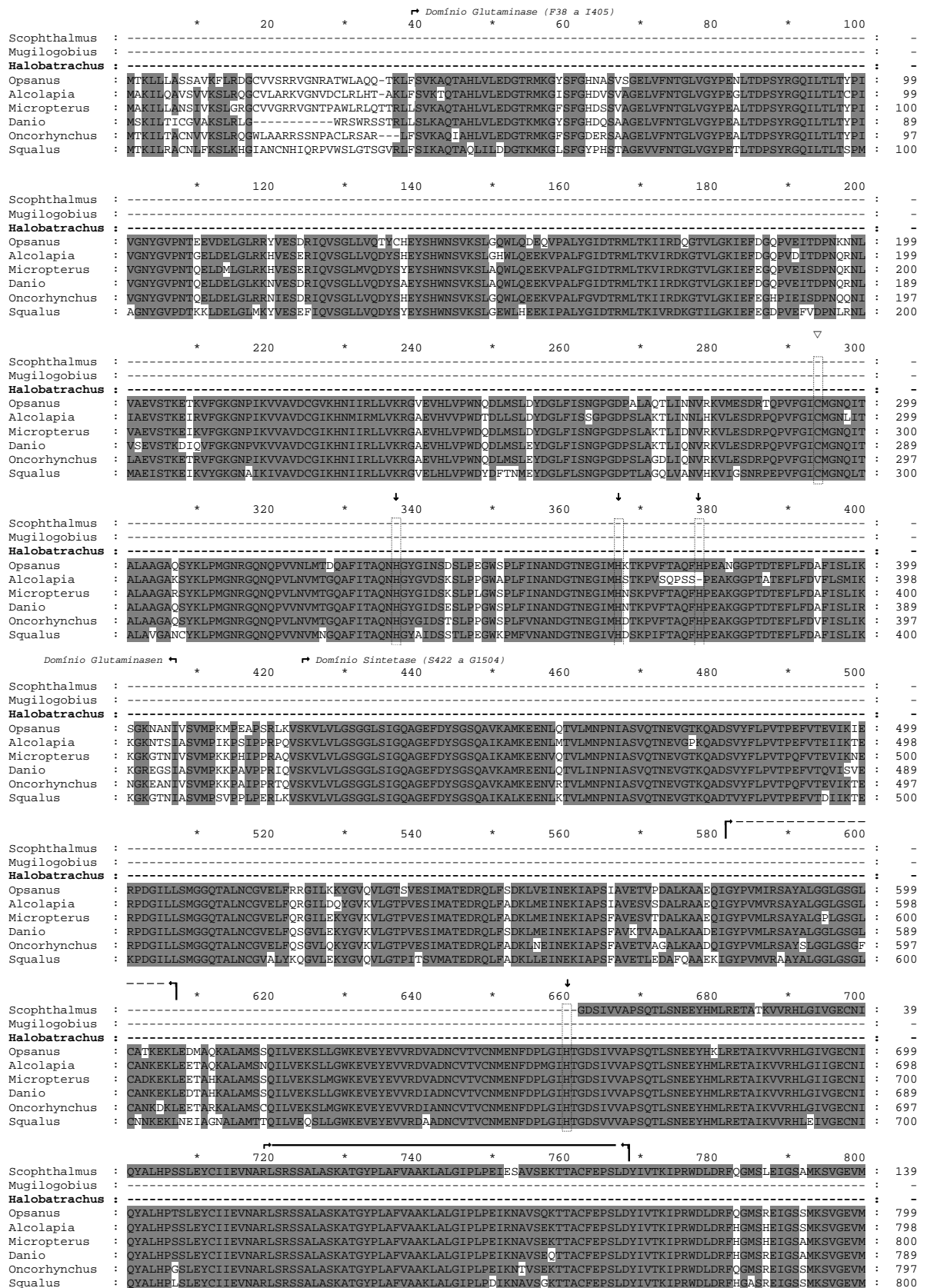
**Tabela V:** Percentagens de homologia entre diferentes espécies. Estas percentagens são referentes à sequência obtida através da sequenciação do fragmento de cDNA com os *primers* específicos para a GSase.

	<b>Mus</b>	<b>Rattus</b>	<b>Acomys</b>	<b>Homo</b>	<b>Oncorhynchus</b>	<b>Opsanus</b>	<b>Halobatrachus</b>	<b>Oreochromis</b>
<b>Mus</b>	—							
<b>Rattus</b>	100%	—						
<b>Acomys</b>	99%	99%	—					
<b>Homo</b>	98%	98%	99%	—				
<b>Oncorhynchus</b>	93%	93%	93%	94%	—			
<b>Opsanus</b>	93%	93%	93%	94%	98%	—		
<b>Halobatrachus</b>	93%	93%	93%	94%	95%	97%	—	
<b>Oreochromis</b>	93%	93%	93%	93%	96%	97%	98%	—

	<b>Danio</b>	<b>Salmo</b>	<b>Bostrychus</b>	<b>Squalus</b>	<b>Heterod.</b>	<b>Gallus</b>
<b>Danio</b>	—					
<b>Salmo</b>	95%	—				
<b>Bostrychus</b>	95%	99%	—			
<b>Squalus</b>	93%	94%	95%	—		
<b>Heterodontus</b>	94%	95%	96%	99%	—	
<b>Gallus</b>	92%	92%	93%	95%	97%	—
<b>Xenopus</b>	90%	89%	90%	91%	92%	96%

# ANEXO IV

Alinhamento as sequências disponíveis para peixes e aquela obtida através da sequenciação do fragmento de cADN com os primers específicos para CPSase.



Alinhamento entre as sequências disponíveis para peixes e aquela obtida através da sequenciação do fragmento de cADN com os primers específicos para CPSase (continuação).

Scophthalmus	:	-----*	820	-----*	840	-----*	860	-----*	880	-----*	900	:	211
Mugilogobius	:	-----		-----		-----		-----		-----		:	97
<b>Halobatrachus</b>	:	-----		-----		-----		-----		-----		:	-
Opsanus	:	-----		-----		-----		-----		-----		:	898
Alcolapia	:	-----		-----		-----		-----		-----		:	898
Micropterus	:	-----		-----		-----		-----		-----		:	899
Danio	:	-----		-----		-----		-----		-----		:	888
Oncorhynchus	:	-----		-----		-----		-----		-----		:	896
Squalus	:	-----		-----		-----		-----		-----		:	899
Scophthalmus	:	-----*	920	-----*	940	-----*	960	-----*	980	-----*	1000	:	-
Mugilogobius	:	-----		-----		-----		-----		-----		:	181
<b>Halobatrachus</b>	:	-----		-----		-----		-----		-----		:	-
Opsanus	:	-----		-----		-----		-----		-----		:	998
Alcolapia	:	-----		-----		-----		-----		-----		:	998
Micropterus	:	-----		-----		-----		-----		-----		:	999
Danio	:	-----		-----		-----		-----		-----		:	988
Oncorhynchus	:	-----		-----		-----		-----		-----		:	996
Squalus	:	-----		-----		-----		-----		-----		:	999
Scophthalmus	:	-----*	1020	-----*	1040	-----*	1060	-----*	1080	-----*	1100	:	-
Mugilogobius	:	-----		-----		-----		-----		-----		:	-
<b>Halobatrachus</b>	:	-----		-----		-----		-----		-----		:	-
Opsanus	:	-----		-----		-----		-----		-----		:	1098
Alcolapia	:	-----		-----		-----		-----		-----		:	1098
Micropterus	:	-----		-----		-----		-----		-----		:	1099
Danio	:	-----		-----		-----		-----		-----		:	1088
Oncorhynchus	:	-----		-----		-----		-----		-----		:	1096
Squalus	:	-----		-----		-----		-----		-----		:	1099
Scophthalmus	:	-----*	1120	-----*	1140	-----*	1160	-----*	1180	-----*	1200	:	-
Mugilogobius	:	-----		-----		-----		-----		-----		:	-
<b>Halobatrachus</b>	:	-----		-----		-----		-----		-----		:	73
Opsanus	:	-----		-----		-----		-----		-----		:	1198
Alcolapia	:	-----		-----		-----		-----		-----		:	1198
Micropterus	:	-----		-----		-----		-----		-----		:	1199
Danio	:	-----		-----		-----		-----		-----		:	1188
Oncorhynchus	:	-----		-----		-----		-----		-----		:	1196
Squalus	:	-----		-----		-----		-----		-----		:	1199
Scophthalmus	:	-----*	1220	-----*	1240	-----*	1260	-----*	1280	-----*	1300	:	-
Mugilogobius	:	-----		-----		-----		-----		-----		:	-
<b>Halobatrachus</b>	:	-----		-----		-----		-----		-----		:	173
Opsanus	:	-----		-----		-----		-----		-----		:	1298
Alcolapia	:	-----		-----		-----		-----		-----		:	1298
Micropterus	:	-----		-----		-----		-----		-----		:	1299
Danio	:	-----		-----		-----		-----		-----		:	1299
Oncorhynchus	:	-----		-----		-----		-----		-----		:	1296
Squalus	:	-----		-----		-----		-----		-----		:	1299
Scophthalmus	:	-----*	1320	-----*	1340	-----*	1360	-----*	1380	-----*	1400	:	-
Mugilogobius	:	-----		-----		-----		-----		-----		:	-
<b>Halobatrachus</b>	:	-----		-----		-----		-----		-----		:	198
Opsanus	:	-----		-----		-----		-----		-----		:	1398
Alcolapia	:	-----		-----		-----		-----		-----		:	1398
Micropterus	:	-----		-----		-----		-----		-----		:	1399
Danio	:	-----		-----		-----		-----		-----		:	1388
Oncorhynchus	:	-----		-----		-----		-----		-----		:	1396
Squalus	:	-----		-----		-----		-----		-----		:	1399
Scophthalmus	:	-----*	1420	-----*	1440	-----*	1460	-----*	1480	-----*	1500	:	-
Mugilogobius	:	-----		-----		-----		-----		-----		:	-
<b>Halobatrachus</b>	:	-----		-----		-----		-----		-----		:	-
Opsanus	:	-----		-----		-----		-----		-----		:	1497
Alcolapia	:	-----		-----		-----		-----		-----		:	1498
Micropterus	:	-----		-----		-----		-----		-----		:	1499
Danio	:	-----		-----		-----		-----		-----		:	1488
Oncorhynchus	:	-----		-----		-----		-----		-----		:	1496
Squalus	:	-----		-----		-----		-----		-----		:	1499

*Domínio Sintetase*

Scophthalmus	:	-----*	1520	-----*										
Mugilogobius	:	-----		-----		-----		-----		-----		-----		-----
<b>Halobatrachus</b>	:	-----		-----		-----		-----		-----		-----		-----
Opsanus	:	-----		-----		-----		-----		-----		-----		1504
Micropterus	:	-----		-----		-----		-----		-----		-----		1506
Alcolapia	:	-----		-----		-----		-----		-----		-----		1505
Danio	:	-----		-----		-----		-----		-----		-----		1524
Oncorhynchus	:	-----		-----		-----		-----		-----		-----		1518
Squalus	:	-----		-----		-----		-----		-----		-----		1502

- ↔ - possível local de ligação ao ATP
- - elos ricos em glicina
- ▼ - cisteínas conservadas
- - ácido glutâmicos conservados
- ▽ - cisteína para actividade dependente da glutamina

Scophthalmus, *Psetta maxima* (turbot; CAD99252), Mugilogobius, *Mugilogobius abel* (BAA92820), Halobatrachus, *Halobatrachus didactylus* (Lusitanian toadfish), Opsanus, *Opsanus beta* (Gulf toadfish; AAD51318), Alcolapia, *Alcolapia grahmi* (Lake Magadi tilapia; RA043968), Micropterus, *Micropterus salmoides* (largemouth bass; AAB62566), Danio, *Danio rerio* (zebrafish; CAQ15092), Oncorhynchus, *Oncorhynchus mykiss* (rainbow trout; AAC60207), Squalus, *Squalus acanthias* (spiny dogfish; AAA96435).

**Tabela VI:** Tabela referente ao alinhamento total das sequências de aminoácidos. Representação das percentagens de conservação média na sequencia completa da CPSase nos peixes. Percentagem da conservação média na sequência completa de todos os peixes é de 90%. Estas percentagens são referentes a toda a sequência obtida através da sequenciação do fragmento de cDNA.

	<b>Scophthalmus</b>	<b>Mugilogobius</b>	<b>Halobatrachus</b>	<b>Opsanus</b>	<b>Alcolapia</b>	<b>Micropterus</b>	<b>Danio</b>	<b>Oncorhynchus</b>
<b>Scophthalmus</b>	—							
<b>Mugilogobius</b>	20%	—						
<b>Halobatrachus</b>	0%	0%	—					
<b>Opsanus</b>	13%	10%	12%	—				
<b>Alcolapia</b>	13%	10%	12%	91%	—			
<b>Micropterus</b>	13%	10%	12%	93%	94%	—		
<b>Danio</b>	13%	10%	12%	89%	90%	91%	—	
<b>Oncorhynchus</b>	13%	10%	12%	91%	91%	92%	92%	—
<b>Squalus</b>	13%	9%	12%	88%	87%	88%	87%	87%

## ANEXO V

**Tabela VII:** Percentagem de homologia entre diferentes espécies. Estas percentagens são referentes à sequência obtida através da sequenciação do fragmento de cDNA com os *primers* específicos para a CPSase.

	Rattus_I	Mus_I	Homo_I	Gallus_I	Xenopus_I	Rana_I	Micropterus_III	Alcolapia_III	Oncorhynchus_III
Rattus_I	—								
Mus_I	99%	—							
Homo_I	100%	99%	—						
Gallus_I	92%	92%	92%	—					
Xenopus_I	91%	91%	91%	91%	—				
Rana_I	94%	94%	94%	92%	96%	—			
Micropterus_III	93%	93%	93%	91%	91%	93%	—		
Alcolapia_III	90%	90%	90%	89%	89%	90%	96%	—	
Oncorhynchus_III	90%	90%	91%	90%	90%	91%	96%	94%	—
Danio_III	93%	93%	93%	92%	92%	93%	97%	94%	96%
Opsanus_III	90%	90%	91%	90%	92%	91%	95%	95%	95%
Halobatrachus_III	92%	91%	92%	89%	92%	92%	96%	94%	95%
Squalus_III	91%	91%	91%	90%	92%	92%	91%	91%	91%
Mus_II	73%	73%	73%	73%	72%	73%	72%	73%	72%
Rattus_II	73%	73%	73%	73%	72%	73%	72%	73%	72%
Homo_II	73%	73%	73%	73%	72%	73%	72%	73%	72%
Danio_II	73%	73%	74%	73%	73%	74%	73%	74%	73%
Squalus_II	72%	72%	72%	72%	71%	72%	71%	71%	71%

**Tabela VII:** Percentagem de homologia entre diferentes espécies. Estas percentagens são referentes à sequência obtida através da sequenciação do fragmento de cDNA com os *primers* específicos para a CPSase (continuação).

	Danio_III	Opsanus_III	Halobatrachus_III	Squalus_III	Mus_II	Rattus_II	Homo_II	Danio_II
Danio_III	—							
Opsanus_III	94%	—						
Halobatrachus_III	94%	97%	—					
Squalus_III	92%	93%	93%	—				
Mus_II	74%	73%	72%	74%	—			
Rattus_II	74%	73%	72%	74%	99%	—		
Homo_II	73%	73%	72%	74%	98%	97%	—	
Danio_II	74%	74%	74%	75%	95%	95%	94%	—
Squalus_II	73%	71%	72%	73%	95%	95%	95%	95%

# ANEXO VI

Alinhamento entre as sequências disponíveis para UT-A e UT-C em peixes e aquela obtida através da sequenciação do fragmento de cADN com os primers específicos para UT.

	*	20	*	40	*	60	*	80	*	100			
<b>Halobatrachus_UT</b> :	-----											:	-
Opsanus_UT	-----MAH-----PDEHENQADGKENVVQVQAGPTRLQKARACFLKGMVFSGDMKAFGKWKMKRC											:	57
Alcolapia_UT	-----MAHPDLPSQNGNSQEDGQEDR-VQPGGATALQKARASFLKGMVFSGDMVDFGKWKMKQF											:	59
Takifugu_UT-a	-----MKSELPTEQEDKPEEGSGGPAQTQSRARFRKFLSIFAGDMAPFGKWKMERQF											:	51
Takifugu_UT-c	-----MRLDNVPEEAGSRTQTSLLCCRVLSKLLCTGTEKQLDVMYMEGLK											:	45
Anguilla_UT-a	-----MQTCFLDTFMPDShLAEELQTLMESPVASATDTNKQSVQNEHQPEGSCGLEKTKKLFKRWVFSGDMVDFGKWKMKQF											:	81
Anguilla_UT-c	-----MWSVDKAPPDGGGRRRVLRALLCTGDMAQLRKSMDKQP											:	42
Danio_UT-a	-----MPGTHLTKKSDPLNVTHTLCKTSTSTQYSSAQNTKELQPLMANPVHKITDEKKQQGLEKINSQRKFLKGMVFSGDMVDFGKWKMKQF											:	91
Danio_UT-c	-----MRISEKNTF-EQSEGLKQRVISALLKCSGEMQQLHSHMKQDKP											:	41
Protopterus_UT	-----											:	-
Squalus_UT	-----MEQKKAIVVEIISTLNPNLTKETFFKGLGSLGDMSEFGYVNLKQON											:	46
	*	120	*	140	*	160	*	180	*	200			
<b>Halobatrachus_UT</b> :	-----											:	-
Opsanus_UT	ILQLLDVLRGAAQVMFVNNPLSGLIFLACGLLQNYWVWALNGFVGTLLAATVSAIIRQNRGATAAGLYGYNGLVGLLMAVFSNAGNW-YWVLLLENTF											:	156
Alcolapia_UT	FLRLLDVLRGAAQVMFVNNPLSGLIFLACGLLQNYWVWALNGFVGTLLAATVSAIIRQNRGATAAGLYGYNGLVGLLMAVFSNAGNW-YWVLLLENTF											:	158
Takifugu_UT-a	ILKLLDVLVLRGAAQVMFVNNPLSGLIFLACGLLQNYWVWALNGFVGTLLAATVSAIIRQNRGATAAGLYGYNGLVGLLMAVFSNAGNW-YWVLLLENTF											:	150
Takifugu_UT-c	FGLQLVWVLRGAVGILANNPLSGVLLASVFWTSPVQAILLCTGLTISTLTAIIMGQDRADYTRGEHGNGMLVALLMGAIVSSAGDW-YWVLLLENTF											:	144
Anguilla_UT-a	ILQLLDVLRGAAQVMFVNNPLSGLIFLACGLLQNYWVWALNGFVGTLLAATVSAIIRQNRGATAAGLYGYNGLVGLLMAVFSNAGNW-YWVLLLENTF											:	180
Anguilla_UT-c	FLQLVWVLRGAVGILANNPLSGVLLASVFWTSPVQAILLCTGLTISTLTAIIMGQDRADYTRGEHGNGMLVALLMGAIVSSAGDW-YWVLLLENTF											:	141
Danio_UT-a	ILQLLDVLRGAAQVMFVNNPLSGLIFLACGLLQNYWVWALNGFVGTLLAATVSAIIRQNRGATAAGLYGYNGLVGLLMAVFSNAGNW-YWVLLLENTF											:	190
Danio_UT-c	YPLQLAEVCLRGISRVLLNNPLSGVLLASVFWTSPVQAILLCTGLTISTLTAIIMGQDRADYTRGEHGNGMLVALLMGAIVSSAGDW-YWVLLLENTF											:	140
Protopterus_UT	-----GTAVSTLVALLSQDRSATAAGLYGYNGLVGLLMAVFSNAGNW-YWVLLLENTF											:	55
Squalus_UT	IFQFIDVLRGAAQVMFVNNPLSGLIFLACGLLQNYWVWALNGFVGTLLAATVSAIIRQNRGATAAGLYGYNGLVGLLMAVFSNAGNW-YWVLLLENTF											:	145
			TM1			TM2		TM3					
	*	220	*	240	*	260	*	280	*	300			
<b>Halobatrachus_UT</b> :	-----LPVFTLPPNIVLCLHMVATGCHYHHPQVLLQPRSELPNITWAEIDVPKLFMSVPGVGVQVYVGDNDPWTGGIFIIISLFTS											:	80
Opsanus_UT	MSMCPVSSALASINSRWLDLPVFTLPPNIVLCLHMVATGCHYHHPQVLLQPRSELPNITWAEIDVPKLFMSVPGVGVQVYVGDNDPWTGGIFIIISLFTS											:	256
Alcolapia_UT	MSMCPVSSALASINSRWLDLPVFTLPPNIVLCLHMVATGCHYHHPQVLLQPRSELPNITWAEIDVPKLFMSVPGVGVQVYVGDNDPWTGGIFIIISLFTS											:	258
Takifugu_UT-a	MSMCPVSSALASINSRWLDLPVFTLPPNIVLCLHMVATGCHYHHPQVLLQPRSELPNITWAEIDVPKLFMSVPGVGVQVYVGDNDPWTGGIFIIISLFTS											:	250
Takifugu_UT-c	GSVAVFFHSGLSFLDGGCVBASVFPNIVTVLYLLCTGPNPYPHYRMAPPWETE-PNGTCLAAVEVTHGILGVGQIYVGGDLPGLSLLIGAVLAIY											:	243
Anguilla_UT-a	MSMCPVSSALASINSRWLDLPVFTLPPNIVLCLHMVATGCHYHHPQVLLQPRSELPNITWAEIDVPKLFMSVPGVGVQVYVGDNDPWTGGIFIIISLFTS											:	280
Anguilla_UT-c	TGATCTFLFSGLSALDRWDLVSVFVFNAAHLIYLACTGPTNPFYPHPHATPPGALQDTNAT-LHPQLQGVVLGVGQIYVGGDLPGLSLLIGAVLAIY											:	240
Danio_UT-a	MSMCPVSSALASINSRWLDLPVFTLPPNIVLCLHMVATGCHYHHPQVLLQPRSELPNITWAEIDVPKLFMSVPGVGVQVYVGDNDPWTGGIFIIISLFTS											:	290
Danio_UT-c	GGAATFFSSSLAPILLDHNDLPVSVFPNTVIVLYLACTGPTNPFYPHPHATPPGALQDTNAT-LHPQLQGVVLGVGQIYVGGDLPGLSLLIGAVLAIY											:	240
Protopterus_UT	MSAVCPILTSGLASINSRWLDLPVFTLPPNIVLCLHMVATGCHYHHPQVLLQPRSELPNITWAEIDVPKLFMSVPGVGVQVYVGDNDPWTGGIFIIISLFTS											:	146
Squalus_UT	MSMCPVSSALASINSRWLDLPVFTLPPNIVLCLHMVATGCHYHHPQVLLQPRSELPNITWAEIDVPKLFMSVPGVGVQVYVGDNDPWTGGIFIIISLFTS											:	245
			TM4		TM5		▲		TM6				
	*	320	*	340	*	360	*	380	*	400			
<b>Halobatrachus_UT</b> :	SPITCAHAVLGSAGVMSGLALAAPFGDIYFGLWGNVCLACIAIGGMFYALTWQVHLLAITCAFFCAYLGSALANIMSTFGLPACTWFPCLSAITFLLI											:	180
Opsanus_UT	SPITCAHAVLGSAGVMSGLALAAPFGDIYFGLWGNVCLACIAIGGMFYALTWQVHLLAITCAFFCAYLGSALANIMSTFGLPACTWFPCLSAITFLLI											:	356
Alcolapia_UT	SPITCAHAVLGSAGVMSGLALAAPFGDIYFGLWGNVCLACIAIGGMFYALTWQVHLLAITCAFFCAYLGSALANIMSTFGLPACTWFPCLSAITFLLI											:	358
Takifugu_UT-a	SPITCAHAVLGSAGVMSGLALAAPFGDIYFGLWGNVCLACIAIGGMFYALTWQVHLLAITCAFFCAYLGSALANIMSTFGLPACTWFPCLSAITFLLI											:	350
Takifugu_UT-c	SPILTFHALLGSAIGLTLGAGLSAVVHDFLYTGLSCFNAGLGNVIGLGNFTFSWKTHLYAVATAFLSAYVDIALSNLLGTIISLPALSWAATLTSTLMLLI											:	343
Anguilla_UT-a	SPITFAHATIGSAGVMSGLALAAPFGDIYFGLWGNVCLACIAIGGMFYALTWQVHLLAITCAFFCAYLGSALANIMSTFGLPACTWFPCLSAITFLLI											:	380
Anguilla_UT-c	SPILLCVHALLGSAIGLTLGAGLSAVVHDFLYTGLSCFNAGLGNVIGLGNFTFSWKTHLYAVATAFLSAYVDIALSNLLGTIISLPALSWAATLTSTLMLLI											:	340
Danio_UT-a	SPITFAHATIGSAGVMSGLALAAPFGDIYFGLWGNVCLACIAIGGMFYALTWQVHLLAITCAFFCAYLGSALANIMSTFGLPACTWFPCLSAITFLLI											:	390
Danio_UT-c	SPILAINALLGSVMTMAGLSMSVQHGFLYSGLSCFNAGLGNVIGLGNFTFSWKTHLYAVATAFLSAYVDIALSNLLGTIISLPALSWAATLTSTLMLLI											:	339
Protopterus_UT	-----											:	-
Squalus_UT	SPIICLHAIIGSCVGLIAGLSAIPKQIKYDGLSIVNCLACIAIGGMFYALTWQVHLLAITCAFFCAYLGSALANIMSTFGLPACTWFPCLSAITFLLI											:	345
			TM7		TM8		TM9		TM10				
	*	420	*	440	*	460	*	480	*	500			
<b>Halobatrachus_UT</b> :	TTETQK-----KADKLLKKECEEAQRALEEEIILNAEQQLRLALHRMBEGKMMNGQADVKNEEKETEHNVPDRVQA											:	186
Opsanus_UT	TTETQKIFKPLPLAKVITYPEKNLKCYVWKLKQKQEKADKLLKKECEEAQRALEEEIILNAEQQLRLALHRMBEGKMMNGQADVKNEEKETEHNVPDRVQA											:	456
Alcolapia_UT	TTGTKRIFKPLPLAKVITYPEKNLRFVWKLKQKQEKAEKERKEREEQQRAVEEVEIILNEKQLKVELERMEQGTENEAEVQSD--STEVEVQTAEGP											:	456
Takifugu_UT-a	TTETNKIFKPLPLAKVITYPEKNLGFYWKMKRQ--EKAEKERLE-KEKQRIVDEENVNEKEQLRLLELMBEQGVQNKAAECKNELSCITESKVEKQD--											:	444
Takifugu_UT-c	NG-NLAKYRVBADOVMSPEHNLSWSQREAKNASPTVNAVV--											:	383
Anguilla_UT-a	TTETKTIKPLPLAKVITYPEKNLKCYVWKLKQKQEKADKLLKKECEEAQRALEEEIILNAEQQLRLALHRMBEGKMMNGQADVKNEEKETEHNVPDRVQA											:	471
Anguilla_UT-c	TAQNLSYRIPMCRVITYPEKNLRTGHWTGG-TTSTDV--EASIKIFVMEHEHDQSDQSENSEAGDLENTCYEGASEQ											:	378
Danio_UT-a	TTETKTIKPLPLAKVITYPEKNLKCYVWKLKQKQEKADKLLKKECEEAQRALEEEIILNAEQQLRLALHRMBEGKMMNGQADVKNEEKETEHNVPDRVQA											:	465
Danio_UT-c	TGKNLKEHRIITGVITYPEKNLRSKHSWAT-NTTADV--											:	377
Protopterus_UT	-----											:	-
Squalus_UT	TTNNKAIYKIVLCEVITYPEKNLRIYQEMKMM--EQSK--											:	380

<b>Halobatrachus_UT</b> :	-----	:	-
Opsanus_UT	TEDETRQDNPTFVTDGNHV	:	475
Alcolapia_UT	REERNTELDLEVTLDYV	:	475
Takifugu_UT-a	SEKAGNNDGEMSVAGERD	:	462
Takifugu_UT-c	SENDLTEVKILNNAE	:	486
Anguilla_UT-a	-----	:	-
Anguilla_UT-c	-----	:	-
Danio_UT-a	-----	:	-
Danio_UT-c	-----	:	-
Protopterus_UT	-----	:	-
Squalus_UT	-----	:	-

- Domínios Transmembranares
- ▲ Local de Glicosilação ligado ao ácido aspártico
- Possível ponto de fosforilação da cinase CK2

**Halobatrachus\_UT**, *Halobatrachus didactylus* (Lusitanian toadfish), **Opsanus\_UT**, *Opsanus beta* (Gulf toadfish; AAD53268), **Alcolapia\_UT**, *Alcolapia grahami* (Lake Magadi tilapia; AAG49891), **Takifugu\_UT-a** e **Takifugu\_UT-c**, *Takifugu rubripes* (Fugu rubripes; BAD66674 e BAD66673), **Anguilla\_UT-a** e **Anguilla\_UT-c**, *Anguilla japonica* (Japanese eel; BAC53976 e BAD66672), **Danio\_UT-a** e **Danio\_UT-c**, *Danio rerio* (zebrafish; AAX16119 e XP\_001921059), **Protopterus\_UT**, *Protopterus dolloi* (Slender lungfish; ACH73009), **Squalus\_UT-A**, *Squalus acanthias* (spiny dogfish; AAF66072).

**Tabela VIII:** Tabela referente ao alinhamento total das sequências de aminoácidos. Representação das percentagens de conservação média na sequência completa do UT nos peixes. Estas percentagens são referentes a toda a sequência obtida através da sequenciação do fragmento de cDNA.

	Halobatrachus	Opsanus	Alcolapia	Takifugu -A	Takifugu-C	Anguilla-A	Anguilla-C	Danio-A	Danio-C	Protopterus_UT
<b>Halobatrachus</b>	—									
<b>Opsanus_UT</b>	38%	—								
<b>Alcolapia_UT</b>	38%	88%	—							
<b>Takifugu_UT-A</b>	39%	83%	85%	—						
<b>Takifugu_UT-C</b>	27%	46%	46%	45%	—					
<b>Anguilla_UT-A</b>	36%	73%	76%	74%	44%	—				
<b>Anguilla_UT-C</b>	30%	50%	49%	49%	71%	49%	—			
<b>Danio_UT-A</b>	36%	68%	70%	69%	47%	74%	50%	—		
<b>Danio_UT-C</b>	28%	46%	46%	45%	71%	45%	79%	47%	—	
<b>Protopterus_UT</b>	23%	25%	26%	26%	20%	25%	24%	25%	24%	—
<b>Squalus_UT</b>	40%	63%	63%	64%	53%	62%	60%	66%	57%	32%

## ANEXO VII

**Tabela IX:** Percentagem de homologia entre diferentes espécies. Estas percentagens são referentes à sequência obtida através da sequenciação do fragmento de cDNA com os *primers* específicos para o UT.

	Mus_UT-B	Rattus_UT-B	Homo_UT-B	Balaenoptera_UT-A	Physeter_UT-A	Homo_UT-Av3	Rattus_UT-Av3	Mus_UT-Av3	Trachemys_UT-A	Gallus_UT-A	Rattus_UT-Av1/2	Mus_UT-Av1/2	Homo_UT-Av1/2	Bufo_UT-A
<b>Mus_UT-B</b>	—													
<b>Rattus_UT-B</b>	95%	—												
<b>Homo_UT-B</b>	93%	90%	—											
<b>Balaenoptera_UT-A</b>	86%	82%	83%	—										
<b>Physeter_UT-A</b>	86%	82%	83%	100%	—									
<b>Homo_UT-Av3</b>	85%	81%	81%	98%	98%	—								
<b>Rattus_UT-Av3</b>	85%	81%	82%	97%	97%	96%	—							
<b>Mus_UT-Av3</b>	85%	81%	82%	97%	97%	97%	96%	—						
<b>Trachemys_UT-A</b>	84%	81%	83%	91%	91%	91%	89%	90%	—					
<b>Gallus_UT-A</b>	83%	81%	82%	90%	90%	90%	89%	89%	91%	—				
<b>Rattus_UT-Av1/2</b>	83%	81%	81%	90%	90%	90%	90%	89%	88%	89%	—			
<b>Mus_UT-Av1/2</b>	83%	81%	83%	89%	89%	89%	88%	88%	91%	89%	96%	—		
<b>Homo_UT-Av1/2</b>	85%	83%	82%	90%	90%	90%	89%	90%	90%	91%	95%	94%	—	
<b>Bufo_UT-A</b>	85%	83%	82%	89%	89%	88%	88%	87%	89%	87%	84%	86%	87%	—
<b>Rana_UT-A</b>	84%	81%	80%	87%	87%	85%	84%	87%	84%	83%	83%	84%	84%	87%
<b>Takifugu_UT-A</b>	80%	78%	80%	81%	82%	81%	80%	81%	83%	80%	79%	80%	80%	82%
<b>Alcolapia_UT-A</b>	79%	77%	79%	81%	82%	81%	80%	81%	82%	79%	79%	80%	80%	83%
<b>Halobatrachus_UT-A</b>	80%	79%	79%	82%	82%	81%	81%	81%	82%	80%	79%	80%	80%	83%

**Tabela IX:** Percentagem de homologia entre diferentes espécies. Estas percentagens são referentes à sequência obtida através da sequenciação do fragmento de cDNA com os *primers* específicos para o UT (continuação).

	Mus_-B	Rattus-B	Homo-B	Balaenoptera-A	Physeter-A	Homo-Av3	Rattus-Av3	Mus-Av3	Trachemys-A	Gallus-A	Rattus-Av1/2	Mus-Av1/2	Homo-Av1/2	Bufo-A
Opsanus_UT-A	80%	78%	79%	82%	82%	81%	81%	81%	83%	80%	79%	81%	81%	84%
Anguilla_UT-A	81%	80%	80%	84%	84%	83%	83%	84%	84%	82%	80%	81%	82%	85%
Danio_UT-A	80%	80%	79%	82%	82%	81%	80%	82%	82%	80%	79%	80%	80%	84%
Dasyatis_UT-Av1/2	81%	79%	81%	82%	82%	81%	82%	81%	82%	82%	82%	83%	84%	85%
Leucoraja_UT-A	81%	80%	82%	83%	83%	82%	82%	82%	83%	83%	83%	84%	86%	86%
Triakis_UT-A	82%	80%	82%	82%	82%	81%	81%	82%	84%	84%	84%	85%	87%	84%
Squalus_UT-A	83%	81%	83%	83%	83%	83%	83%	83%	86%	86%	86%	87%	88%	86%
Danio_UT-C	60%	61%	61%	59%	59%	59%	59%	58%	58%	58%	60%	59%	59%	58%
Anguilla_UT-C	66%	65%	64%	66%	66%	65%	63%	64%	65%	66%	63%	63%	64%	66%
Takifugu_UT-C	58%	58%	60%	56%	56%	56%	56%	56%	58%	56%	56%	56%	58%	56%

	Rana-A	Takifugu-A	Alcolapia-A	Halobatrachus-A	Opsanus-A	Anguilla-A	Danio-A	Dasyatis-Av1/2	Leucoraja-A	Triakis-A	Squalus-A	Danio-C	Anguilla-C
Rana_UT-A	—												
Takifugu_UT-A	82%	—											
Alcolapia_UT-A	82%	97%	—										
Halobatrachus_UT-A	82%	98%	97%	—									
Opsanus_UT-A	81%	97%	97%	98%	—								
Anguilla_UT-A	84%	94%	93%	94%	93%	—							
Danio_UT-A	83%	91%	90%	90%	89%	95%	—						
Dasyatis_UT-Av1/2	81%	81%	81%	82%	82%	83%	82%	—					
Leucoraja_UT-A	81%	80%	80%	80%	81%	81%	80%	94%	—				
Triakis_UT-A	82%	80%	79%	80%	80%	82%	81%	91%	92%	—			
Squalus_UT-A	82%	81%	80%	81%	81%	83%	82%	95%	95%	96%	—		
Danio_UT-C	61%	57%	55%	57%	58%	58%	56%	57%	58%	58%	58%	—	
Anguilla_UT-C	68%	62%	61%	62%	63%	64%	62%	61%	63%	63%	63%	81%	—
Takifugu_UT-C	60%	58%	56%	56%	57%	58%	56%	56%	58%	58%	57%	77%	76%