Hermann Ludwig Maier

Regulação da proteína HSP70 em *Ucides cordatus* (Crustacea: Decapoda: Brachyura)
de áreas contaminadas por metais-traço.

São Paulo
2016

Hermann Ludwig Maier

Regulação da proteína HSP70 em *Ucides cordatus* (Crustacea: Decapoda: Brachyura)
de áreas contaminadas por metais-traço.

Dissertação apresentada ao
Instituto de Biociências da Universidade
de São Paulo, para a obtenção de Título
de Mestre em Fisiologia Animal, na Área
de Fisiologia Geral.
Orientador(a): Flávia Pinheiro Zanotto

São Paulo
2016

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todos os envolvidos direta e indiretamente no trabalho. A CAPES pela bolsa e ao IB-USP pelo apoio e estrutura. Aos meus companheiros de laboratório, que depois de tudo que passamos entre sorrisos e lágrimas posso tranquilamente chamar de amigos. Aos meus amigos de longa data que aguentaram assuntos que ninguém entendia e me entenderam quando chegava de mal humor no happy hour de sexta e era recebido com sabias palavras de conforto “Vamos tomar mais uma cerveja que segunda-feira vai dar certo”. Aos meus familiares por estarem lá por mim em todos os momentos. A minha orientadora pela paciência com minha desorganização com datas e prazos. E acima de tudo e sem categoria, para a pessoa que me puxou dos trilhos quando a luz no fim do túnel era na verdade um trem. Let it go!

In the spirit of science, there really is no such thing as a 'failed experiment.' Any test that yields valid data is a valid test”
Adam Savage

Resumo

Neste trabalho foi avaliado como caranguejos *Ucides cordatus*, provenientes de ambientes preservados e impactados pela ação antrópica, respondem a exposição ao cádmio através da regulação da expressão da HSP70 (Heat Shock Proteins). O caranguejo de manguezal *Ucides cordatus* é uma espécie típica de ambiente estuarino, amplamente utilizado como recurso pesqueiro pelas comunidades locais. Vários estudos já foram desenvolvidos, tratando a maioria deles da sua dinâmica populacional ou aspectos de manejo. Por isso, a avaliação do seu estado fisiológico se faz importante para a complementação destes estudos ecológicos bem como na identificação dos impactos causados à sobrevivência desses organismos pela ação antrópica. Para avaliar a influência dos poluentes foram escolhidas duas áreas para coleta no litoral de São Paulo. Uma área impactada, Cubatão, e outra bem preservada, Juréia. Os animais foram expostos a 5mg/L de cloreto de cádmio, diluído na água dos aquários por até 24 horas, em intervalos de tempo de 30 minutos, 1, 2, 6 e 12 horas. A expressão de HSP70 foi medida no hepatopâncreas e brânquias através de imunoenaios utilizando o método ELISA. Foi observado que a sobrevivência dos organismos é influenciada pela manutenção em laboratório durante aclimatização bem como pela exposição ao cádmio, entretanto, os organismos provenientes de áreas preservadas se mostram mais responsivos ao estresse. A regulação de HSP70 foi pouco alterada em ambos os grupos e nos diferentes órgãos, não sendo considerada como um bom biomarcador para este tipo de estresse no organismo modelo utilizado.

Palavras chave: HSP70, cádmio, Crustacea, *Ucides cordatus*

Abstract

This study evaluated how the crab *Ucides cordatus* from impacted and preserved environments responds to cadmium exposure through the expression of HSP70 (Heat Shock Proteins). The mangrove crab *Ucides cordatus* is an estuarine specimen, typically used as fishing resource by local communities. Several studies have been developed, most of them dealing with population dynamics and management aspects. Therefore, it is important to comprehend their physiological status to complement these ecological studies and to understand the impact caused by human action in the survival of these organisms. The species was collected in two different areas of São Paulo coast, polluted and conserved areas, Cubatão and Juréia, respectively. These two sites were chosen to evaluate the influence of pollutants in the organism physiology. At the laboratory the animals were exposed to 5mg/L of cadmium chloride, diluted directly in the water. After an interval of 30 minutes, 1, 2, 6 and 12 hours, HSP70 expression was measured in the hepatopancreas and gills using immunoassays through ELISA method. It was observed that the survival of the organisms was influenced by laboratory management as well as by exposure to cadmium, however, the organism from preserved areas were more responsive to stress. The regulation of HSP70 was little changed in both groups and in different organs, so maybe it should not be considered as a good biomarker for this type of stress.

Key words: HSP70, Cadmium, Crustacea, *Ucides cordatus*

Sumário

Resumo	4
Abstract.....	5
INTRODUÇÃO	7
OBJETIVOS	14
Objetivos específicos	14
MATERIAL E MÉTODOS	14
Organismo modelo.....	14
Local de Coleta	15
Ensaio experimentais	17
RESULTADOS	20
DISCUSSÃO	27
CONCLUSÃO	29
REFERÊNCIAS	30

INTRODUÇÃO

A contaminação do ambiente aquático por metais vem aumentando a cada ano, e embora naturalmente presentes na natureza, têm sido excessivamente liberados em decorrência das ações antrópicas como consequência do aumento da urbanização, expansão da atividade industrial e exploração de recursos naturais (Majer *et al.*, 2002; Biney *et al.*, 1994). Também em ritmo de crescimento estão os estudos dos impactos sobre o ambiente (Kimbrough *et al.*, 2008).

Muitos metais desempenham um papel crucial na dinâmica dos organismos, sendo necessários para uma função fisiológica normal, quando estão em concentrações traço, como é o caso do cobre, ferro, zinco, manganês, cobalto, selênio e cromo (Gilford, 1993). Por exemplo, o pigmento respiratório hemocianina, presente em crustáceos, contém átomos de cobre. Por outro lado, existem os metais que não são requeridos em nenhuma atividade metabólica, chamados de metais-traço (Bowen, 1979; Clarck, 1997). O termo metais-traço refere-se aos metais pertencentes aos grupos 11 e 12 da tabela periódica. Entre estes elementos estão o cádmio, mercúrio e prata, para os quais não existe função biológica definida. Porém, até mesmo os metais-traço que são importantes para o organismo podem desencadear efeitos deletérios quando em excesso na célula (Viarengo & Nott, 1993).

Os metais-traço exibem seus maiores níveis de toxicidade quando presentes na água com baixo pH e muito carbono orgânico dissolvido. Expondo os organismos aquáticos a situações de maior estresse em relação aos animais terrestres expostos a mesma contaminação. Isto é explicado pela competição que se estabelece entre os íons Ca^{2+} e Mg^{2+} e os íons metálicos pelos sítios de ligação dentro do organismo. Corpos hídricos ácidos, com altas concentrações de íons hidrogênio, podem também competir com os cátions metálicos pelos sítios de ligação pelo mesmo processo descrito para os íons cálcio e magnésio em águas duras (Penttinen *et al.*, 1995). Os íons de hidrogênio podem deslocar os cátions metálicos complexados pela presença de carbono orgânico dissolvido e dos ácidos húmicos e fúlvicos, tornando-os biodisponíveis na coluna d'água. Agentes complexantes de metais como o carbono orgânico dissolvido e os ácidos húmicos e fúlvicos podem diminuir a toxicidade dos metais traço presentes na água pela redução

do número de íons metálicos livres disponíveis a interagir com os organismos (Nogami *et al.*, 2000)

O cádmio é um metal flexível, maleável, dúctil e de cor cinza prateada. Na natureza existe na forma de 7 isótopos estáveis e um radioativo. A maior parte do cádmio chega à natureza por meio da mineração, fundição, combustão do carvão e petróleo, e incineração de resíduos. É encontrado em minérios raros como aesfalerita e a greenockita (figura. 1). É relativamente imóvel, com concentrações no solo cerca de 80 vezes maiores do que na água intersticial (Joseph *et al.*, 2007, 2009).

FIGURA 1. Cristal de esfalerita e cristal de greenockita encravado em uma rocha. Fonte: Museu de Minerais e Rochas Heinz Ebert, 2012.

O cádmio (Cd), por não ser um metal essencial, pode causar inúmeros efeitos tóxicos aos organismos. Afeta a progressão do ciclo celular, a diferenciação, a replicação do DNA e os mecanismos de reparo, sendo capaz de produzir radicais livres (Sanders & Martin, 1993; Wirth *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2005; Ansaldo *et al.*, 2006). Também pode interagir com o mecanismo de transporte transmembrana através da competição com íons Ca^{2+} , alterações na sobrevivência, fecundidade e fertilidade, depleção energética, inibição do crescimento e diminuição da sobrevivência (Ravera, 1991; AbdAllah *et al.*, 1997, 2003; Piano *et al.*, 2004; Ansaldo *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2006; Ansaldo *et al.*, 2009, Ivanina *et al.*, 2009; Dong, *et al.*, 2001; Fang *et al.*, 2002; Yang, *et al.*, 2004).

Joseph (2009), em sua revisão dos mecanismos carcinogênicos do cádmio, relata que vários genes têm sua expressão influenciada pela exposição a cádmio, como, por exemplo, o aumento da expressão dos genes responsáveis pela síntese de proteínas, como

metalotioneínas, que combatem o estresse induzido pela exposição ao cádmio e as proteínas de estresse, que evitam danos ao material genético (Fulda *et al.*, 2010).

Os sistemas biológicos são considerados ferramentas sensíveis e promissoras para o monitoramento de estresses ambientais. O monitoramento do impacto do ambiente sobre o organismo vivo é de grande importância para prever e evitar os efeitos prejudiciais à manutenção da espécie, e pode ser baseado em mudanças medidas em vários níveis de complexidade nos seres vivos (NAS/NRC, 1989; Amorim *et al.*, 2003; Gonzalez *et al.*, 2009).

FIGURA 2. Hierarquia dos níveis de complexidade dos sistemas vivos que sofrem influência do ambiente (adaptado de Gonzalez *et al.*, 2009).

Como demonstrado na figura 2, o nível do dano e a manifestação da resposta também devem ser levados em consideração nos estudos com biomarcadores. Por exemplo, lesões no DNA nem sempre implicam em distúrbios funcionais, podendo ocorrer a recuperação do efeito lesivo antes que seja transcrito o produto final. Desta

forma, a investigação dos prejuízos decorrentes da contaminação ambiental, se realizada em moléculas diretamente envolvidas nas funções bioquímicas do organismo, pode ser mais efetiva para determinar a ocorrência de danos fisiológicos (Azevedo & Chasin, 2003; Ribeiro *et al.*, 2003). Antes da morte ou de quadros patológicos, organismos podem responder ao estresse, através de alterações moleculares ou celulares (Monserrat *et al.* 2003). Por isso, os biomarcadores podem ser usados de forma preditiva, permitindo que sejam tomadas ações antes que ocorram grandes danos ambientais (Cajaraville *et al.* 2000).

Quando submetido a condições de estresse, os organismos adotam estratégias para se defender, como por exemplo, o aumento de enzimas detoxificantes e alterações comportamentais, que nem sempre são suficientes para reverter os prejuízos decorrentes do estímulo negativo. Essa capacidade que os seres vivos possuem para iniciar um grande número de respostas adaptativas ao estresse é altamente conservada entre os diversos táxons, e desempenha um papel central e obrigatório na resposta aos danos ambientais (Rittschof & McClellan-Green, 2005; Gupta *et al.*, 2010; Schreck, 2010).

É possível estimar quando um organismo está sob condições de estresse, observando as tentativas de reverter a agressão por meio de alterações biológicas e comportamentais. Dessas alterações, surgiu o termo biomarcador, definido por McCarty & Munkittrick (1996) como sendo medidas da função biológica em níveis sub-orgânico, fisiológico e comportamental, expressas após exposição do organismo a agentes estressores. Os biomarcadores podem ser utilizados na prevenção, detecção precoce e tratamento dos danos.

As proteínas de choque térmico (*Heat Shock Proteins* - HSP) estão envolvidas na preservação do equilíbrio protéico do organismo, reestruturando proteínas desnaturadas ou encaminhando as proteínas com danos irreversíveis para serem eliminadas (Meyer & Silva, 1999; Piano *et al.*, 2004; Farcy *et al.*, 2007). Sendo inicialmente identificadas como proteínas induzidas pelo estresse térmico (Ritossa, 1962), em um estudo com cromossomos politênicos de glândula salivar de *Drosophila busckii* que foram ativados após exposição ao calor de 37 °C, por isso o nome de proteínas de choque térmico. Conhecidas como sendo da classe das chaperonas, proteínas que asseguram a correta conformação de outros polipeptídeos *in vivo*, à medida que eles emergem do ribossomo, mas que não são componentes dessas estruturas formadas (Borém & Vieira, 2005). Bem

conservadas filogeneticamente, o que já oferece um indicativo do seu importante papel nos processos fundamentais para a célula cujas funções incluem: desenovelar proteínas com acomodação inadequada, possibilitando novo enovelamento, conectar peptídeos, renaturar peptídeos lesados, solubilizar agregados protéicos, síntese, montagem, dobramento e degradação de proteínas, preservação e sobrevivência celular sob condições ambientais adversas (Gupta *et al.*, 2007, Meyer & Silva, 1999; Bierkens, 2000; Kregel, 2002; David *et al.*, 2005). Por tais características, os estudos sugerem a aplicação dessas moléculas como marcadores de contaminação ambiental (Sanders, 1993; Sanders & Martin, 1993; Mukhopadhyay *et al.*, 2003).

A classe das HSPs é dividida em famílias, de acordo com suas seqüências de aminoácidos e pesos moleculares, que podem variar desde proteínas grandes com mais de 100 kDa, até proteínas pequenas como a ubiquitina de 8 kDa (Moseley, 2000; Kregel, 2002; Gupta *et al.*, 2010; Al-Whaibi, 2011; Morimoto *et al.*, 1990). Entre as diversas famílias, a família das HSPs de 70 kDa é considerada a mais conservada entre os diversos filos, e o primeiro a ser induzido em resposta a diversos fatores estressantes (Mukhopadhyay *et al.*, 2003). Com mais de 50% de homologia entre organismos tão diferentes quanto o homem, a drosófila, o camundongo, a levedura e as bactérias (Lindquist, 1986); também é a mais abundante e bem caracterizada, e, está envolvida nos processos gerais de dobramento das proteínas celulares (Sanders, 1993; Meyer & Silva, 1999; Lacoste *et al.*, 2001; Gupta *et al.*, 2010). Sob condições de estresse, as HSPs da família 70 se associam a complexos e organelas sensíveis a mudanças no ambiente celular e desse modo permite aos tecidos críticos se recuperar de danos induzidos pelo ambiente (Sanders, 1993; Gupta *et al.*, 2010).

O aumento da concentração de proteínas de estresse, especialmente do grupo com peso molecular 70 kDa (HSP70), em reação a agentes estressores externos foi amplamente demonstrado em *Gallus gallus* por Favatier (1997) e em diversos grupos por Nover (1991). Revelando um robusto indicador molecular que pode ser usado para avaliar a presença de estressores externos. Conceito que foi bem explorado por Ryan e Hightower (1996), Varo *et al.* (2002), Washburn *et al.* (2002) e Mukhopadhyay *et al.* (2003) entre diversas outras equipes, todos direcionados em avaliar o meio ambiente através de proteínas de estresse. Graças a sua capacidade, assim como a de muitos outros biomarcadores moleculares, estes podem ser aplicados a uma ampla variedade de

organismos vivos (Lam & Gray 2003). Quando os danos na proteína são tão intensos que a HSP70 não consegue restaurá-la à sua conformação nativa, esta proteína danificada é carregada até os lisossomos onde será digerida, sendo que a HSP70 funciona, também, como transportadora da molécula comprometida (Powers & Workman, 2007).

Por tais características, os estudos sugerem a aplicação dessas moléculas como marcadores de contaminação ambiental (Sanders, 1993; Sanders & Martin, 1993; Mukhopadhyay *et al.*, 2003). E diversos outros artigos estudam a aplicabilidade das HSPs como biomarcadores. Lacoste *et al.* (2001) analisaram o efeito da sinalização neuroendócrina na indução dos genes promotores da HSP70 em hemócitos de ostras *Crassostrea gigas*. Tomanek e Sanford (2003) analisaram o efeito das condições do habitat na produção de HSP70 em moluscos do mesmo gênero. Lee *et al.* (2006) observaram que a proteína HSP70 foi induzida por uma vasta gama de estímulos agressores em larvas de *Chironomus tentans*. Tanto estímulos químicos: metais traço (cádmio, chumbo e cromo), inseticidas (organoclorado e organofosforado), polímeros, herbicida, estrógeno sintético e hidrocarboneto policíclico aromático. Submetendo espécimes habitantes de regiões de submaré à realocação para áreas de maré mais alta. Cellura *et al.* (2006) constataram indução no gene HSP70 de *Mytilus galloprovincialis* expostos a aumento de temperatura. Brun *et al.* (2008) examinaram o efeito do estresse térmico na indução da HSPs em moluscos estuarinos *Argopecten irradians* e oceânicos *Placopecten magellanicus*. Ratificando os resultados de outros autores de que as HSPs são induzidas sob estímulos tanto de aquecimento quanto de redução da temperatura (Bradley & Ward, 1989; Farcy *et al.*, 2007). Também já se observou que a exposição ao cádmio induziu a expressão da HSP70 em brânquia e glândula digestiva de ostras *O. edulis* (Piano *et al.*, 2004) e *Crassostrea virginica* (Ivanina *et al.*, 2009).

Xuan *et al.* (2011) analisaram os efeitos da exposição do cádmio sobre caranguejos *Sinopotamon yangtsekiense*. Os resultados mostraram alterações nos parâmetros medidos, com aumento na mobilização de proteínas e carboidratos. Os efeitos deletérios foram expressos após uma exposição longa (21 dias) às concentrações mais altas do metal (2,9 ppm). Os autores observaram decréscimo nos níveis de glicogênio, com transição do mecanismo aeróbico do ciclo de Krebs para o mecanismo anaeróbico de glicólise, necessário para o caranguejo reforçar a demanda energética durante a intoxicação pelo cádmio, manifestada pela inibição na síntese de ATP e ineficiência no

metabolismo oxidativo mitocondrial. A deficiência na eliminação do lactato foi presumida como um dos efeitos tóxicos do cádmio no caranguejo. Com o passar do tempo, no entanto, a síntese de proteínas detoxificadoras foi maior que a quebra de proteínas no hepatopâncreas.

Como podemos observar pelas citações prévias, embora o tema seja bastante estudado, os crustáceos têm sido pouco utilizados como organismos modelo. Trata-se de um grupo interessante uma vez que possui espécimes comuns em áreas sensíveis a influência antrópica. Os crustáceos tendem a absorver e acumular metais traço, essenciais ou não, todos potencialmente tóxicos, dependendo da concentração. No taxa existe uma enorme variedade de mecanismos fisiológicos. Portanto, quando se estuda a acumulação de metais traço nos tecidos e nos órgãos é necessário levar essas diferenças em consideração e evitar generalizações (Eisler, 1981; Rainbow, 2002, 1993; Carparis, 1994). Segundo Amiard (2006), é necessário analisar o estado em que metais traço estão. Somente uma análise quantitativa de metais traço não é suficiente para analisar sua toxicidade, uma vez que este pode estar acumulado em vacúolos ou proteínas de estresse. Estas estruturas são responsáveis pela neutralização de agentes estressores, seja pelo acúmulo e eliminação como fazem os vacúolos ou por afinidade e ativação de vias autofágicas como as HSP70 (Rossner *et al.* 2007; Roma *et al.* 2005).

OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi avaliar como caranguejos *U. cordatus* provenientes de ambientes contaminado e não contaminado por metais-traço respondem a exposição ao cádmio através da regulação da expressão de HSP70.

Objetivos específicos

1. Comparar a respostas dos organismos de ambientes impactados e não impactados
2. Quantificar a expressão de HSP70 no hepatopâncreas e brânquias
3. Comparar a expressão de HSP70 nas brânquias anteriores e posteriores

MATERIAL E MÉTODOS

Organismo modelo

O caranguejo de manguezal *Ucides cordatus* é uma espécie típica de ambiente estuarino. Endêmico da costa Atlântica do continente americano, é encontrado do sul da Florida, nos Estados Unidos, até o extremo sul do Brasil (Melo, 1996). Além de sua ampla distribuição, possui grande importância comercial na pesca (Ivo & Gesteira, 1999) e diversas funções, como processamento da serrapilheira (Nordhaus *et al.*, 2006), fluxo energético (Conde *et al.*, 2000), ciclagem de matéria orgânica (Guest *et al.*, 2006) e bioturbação do sedimento (Amouroux & Tavares, 2005).

A sobrepesca, a devastação e a contaminação dos manguezais vêm reduzindo drasticamente a biomassa deste caranguejo nos ecossistemas ao longo da costa brasileira (Abrunhosa *et al.*, 2002). Vários estudos já foram desenvolvidos com a espécie *Ucides cordatus*, tratando a maioria deles da dinâmica populacional (Branco, 1993; Ivo *et al.*, 1999; Ivo & Gesteira, 1999; Alves & Nishida, 2004; Monteiro & Coelho-Filho, 2004; Diele *et al.*, 2005; Andrade *et al.*, 2007; Fernandes & Carvalho, 2007; Araújo & Calado, 2008; Wunderlich *et al.*, 2008) e também de aspectos da reprodução, como período

reprodutivo (Dalabona & Silva, 2005; Wunderlich *et al.*, 2008; Goes *et al.*, 2010), desenvolvimento gonadal (Leite *et al.*, 2006), desenvolvimento embrionário (Pinheiro & Hattori, 2003), fecundidade/fertilidade e assentamento larval (Ventura *et al.*, 2008). Apesar de sua importância, a espécie carece de estudos sobre a sua fisiologia básica e a influência dos avanços antrópicos.

Local de Coleta

Foram escolhidas duas áreas para coleta de *U. cordatus*, uma no ecossistema de manguezais dentro do estuário de Cubatão e o outro dentro da Estação Ecológica de Juréia-Itatins (EEJI), localizados no litoral de São Paulo.

O estuário de Cubatão sofre grande influência das águas poluídas provenientes de fontes antrópicas, como um parque industrial com mais de cem fábricas, esgoto doméstico, ocupação ilegal, despejo irregular de contaminantes e resíduos sólidos (PINHEIRO *et al.*, 2012). Estando os metais traço entre os contaminantes de maior relevância (Cetesb 2001; Mazzoni-Viveiros & Trufem, 2004) para a área em questão. As concentrações de cádmio oscilam entre $<0,05\mu\text{g.g}^{-1}$ a $1,7\mu\text{g.g}^{-1}$ no rio Piaçaguera, que banha o local escolhido como ponto para as coletas (figura3).

O local tem influência direta do canal de escoamento da Cosipa, empresa siderúrgica responsável por um grande aporte de cádmio no ambiente. O rio Piaçaguera, possui diversos efluentes e águas de drenagem contaminadas de indústrias de fertilizantes, observaram-se concentrações de arsênio, cádmio, níquel e cobre (Cetesb, 2001).

FIGURA 3: Mapa da baixada santista com destaque nas principais fontes poluidoras. O ponto de coleta está indicado pela seta. Adaptado de CETESB (2001)

O segundo local de coleta foi no estuário do Rio Una, localizado no litoral sul do estado de São Paulo e pertencente à área da Estação Ecológica de Juréia-Itatins. Esta comunidade encontra-se a aproximadamente 30 km do centro do município de Peruíbe, e é o ponto de encontro do Rio Una do Prelado com o mar. A estação ecológica situa-se aproximadamente entre as coordenadas 24°18'42"S e 47°00'03"W. Possui uma área de aproximadamente 80.000 hectares, abrangendo terras pertencentes aos municípios de Itariri, Miracatu, Pedro de Toledo, Iguape e Peruíbe (Oliveira, 1993). É uma das Unidades de Conservação mais restritivas, pois se destina à conservação de áreas representativas de ecossistemas naturais onde são realizadas pesquisas básicas e aplicadas de ecologia. Na área da unidade de conservação existem moradores que já viviam na região antes da criação da reserva e atualmente estão isolados, praticando com restrições suas atividades de pesca artesanal e pequena agricultura familiar, sendo pouco ou não contaminada para a maioria dos metais tóxicos (Marques & Duleba, 2004).

Os caranguejos foram coletados durante os meses de dezembro e janeiro de 2014, por um catador experiente, usando a técnica de “braceamento”. O catador coloca o braço na toca até sentir o animal, que é, então, capturado pela região dorsal.

Após a coleta foram transportados até o laboratório no IB-USP, em sacos de rafia. Onde foram lavados para retirada do lodo e acondicionados em tanques (Figura 4) com água do mar artificial com salinidade 20. Durante o período em laboratório, foram alimentados com folhas de *Rhizophora mangle*, *ad libitum*, retiradas no próprio local de coleta. Nessas condições os animais foram mantidos por sete dias, para aclimação. Os animais foram selecionados de acordo com o gênero e tamanho da carapaça. Somente machos adultos, carapaça maior que 6 cm, foram capturados.

FIGURA 4: Projeto de um armário desenvolvido para verticalizar os tanques usados na aclimação dos animais. Tanque usado para aclimatizar até 10 animais, possui filtro de microfibras com carvão ativado.

Ensaio experimentais

Para verificar os efeitos da contaminação por cádmio e da manutenção em aquários, os animais foram separados em setenta aquários com 4 litros, um aerador e um indivíduo. Em 35 aquários foram adicionados 5mg/L de cloreto de cádmio diluído diretamente na água. A partir do início dos experimentos foram retirados 5 organismos, aleatoriamente, dos grupos controle e experimental após os tempos: zero, 30 minutos, 1, 2, 6, 12 e 24 horas. O mesmo ensaio foi realizado tanto com organismos de Cubatão como de Juréia.

Conforme os organismos eram retirados nos tempos estipulados, foram mensurados o comprimento de carapaça e o peso de cada indivíduo. Para análises posteriores da expressão de HSP70 foram extraídos o hepatopâncreas, brânquia anterior

e brânquia posterior, que foram separados em tubos plásticos de 2,5mL e congelados a -80°C até a análise. Para a análise da expressão das proteínas foram feitos ensaios de ELISA (do inglês, *Enzyme Linked ImmunoSorbentAssay*) (FIG. 5) utilizando um protocolo de imunoenaios adaptado de Hernroth *et al.* (2011) e Zilberberg *et al.* (2011)

Inicialmente foi realizada a extração das proteínas totais dos tecidos escolhidos. Um pequeno pedaço da amostra com aproximadamente um centímetro foi cortado e colocado em um microtubo plástico, de 1,5 mL. Um volume de 540 microlitros (μ L) do tampão de extração, composto de TBS 1X (do inglês *Tris Buffered Saline*, 50 mM Tris + 150 mMNaCl, pH 7.5) + EDTA 1 mM e também 60 μ L de coquetel inibidor de proteases (Roche) 10X foram adicionados e a amostra foi macerada com auxílio de pistilos plásticos. Todo o procedimento foi realizado sobre gelo. Após a maceração, as amostras foram centrifugadas, a 4°C, por 10 minutos, sob 13.000 r.p.m em uma micro centrífuga. O sobrenadante foi então, colocado em outro microtubo de 1,5 mL sendo este centrifugado mais uma vez nas mesmas condições citadas anteriormente. Se após a segunda centrifugação as amostras estivessem límpidas não era necessário repetir o processo, estando prontas para a dosagem de proteínas. Após cada extração as amostras eram colocadas à -20°C para posterior quantificação.

As amostras foram quantificadas por meio do método de Bradford (1976), utilizando um kit comercial. O reagente de Bradford para sua utilização foi diluído na proporção de 1:4 em água destilada. Primeiramente, foi feita uma curva de titulação, com várias concentrações de albumina de soro bovina (BSA, do inglês *Bovine Serum Albumin*, Sigma-Aldrich™). As diluições seriadas utilizadas foram: 1.000 μ g, 500 μ g, 250 μ g, 125 μ g, 62,5 μ g e 0 microgramas (μ g). A reação consistia em adicionar 10 μ L de cada diluição a 500 μ L de reagente de Bradford em microtubos de 1,5 mL. Após 10 minutos de reação, a absorbância de cada concentração era medida em microplaca de 96 poços, utilizando um espectrofotômetro modelo SpectraMax 250 da Molecular Devices, ajustado para 595 nanômetros (nm) de comprimento de onda. Cada leitura no espectrofotômetro era feita em duplicata.

As concentrações de cada titulação foram calculadas através da conversão dos valores de absorção para concentração, utilizando a curva de regressão do teste de titulação com o BSA.

Para a quantificação da concentração de proteínas, foram adicionados 2 μ L de cada amostra diluída 5x + 8 μ L de água destilada e 500 μ L de reagente de Bradford em microtubos de 1,5 mL. A leitura foi realizada em microplaca de 96 poços, após 10 min.

Todas as amostras foram analisadas em triplicata e as absorbâncias comparadas com a curva de titulação. As concentrações em μg foram calculadas com base no valor da absorção a 595 nanômetros. Após a quantificação as amostras foram colocadas em freezer à -20°C para posterior análise de expressão.

Figura 5- Esquema do teste de ELISA. Adaptado do manual do Kit TMB KPL®

O ensaio de ELISA foi realizado em microplaca com 96 poços, em um volume total de 100 μL de uma solução contendo as amostras diluídas para a concentração desejada em PBS 1x (do inglês, Phosphate Buffered Saline, NaCl 137 mM + KCl 3 mM + Na_2HPO_4 20mM + KH_2PO_4 2mM, pH 7,4), utilizando os valores obtidos na quantificação proteica por Bradford. O branco da reação foi feito somente com PBS 1x.

As amostras foram incubadas na placa por 24 horas, sendo uma hora em agitador orbital e o resto do tempo, na geladeira a 4°C . Após a incubação, toda a solução na placa foi descartada e três lavagens de um minuto cada com o tampão PBS-T (PBS 1x + Tween-20 0,05%) foram feitas. Para bloquear ligações inespecíficas, cada placa foi incubada por 24 horas com BSA 3% sendo uma hora em agitador orbital e o resto do tempo, na

geladeira a 4°C. Após o bloqueio, a solução foi descartada e as placas foram lavadas com o tampão PBS-T três vezes por um minuto.

Após as lavagens as placas foram incubadas com o anticorpo primário específico anticorpo de Coelho Hsp 70 (SANTA CRUZ) na diluição de 1:500 por duas horas e 30 minutos, em estufa a 29°C. Após a incubação, a solução foi descartada e a placa foi lavada três vezes por um minuto com o tampão PBS-T. Posteriormente, foi feita a incubação da placa com o anticorpo secundário conjugado com a peroxidase e específico anticorpo Goat Anti-Rabbit IgG-Hrp (SANTA CRUZ) na diluição de 1:1000 por duas horas e 30 min, em estufa a 29°C. Após a segunda incubação, a solução foi descartada e as placas foram novamente lavadas com tampão PBS-T, três vezes por um minuto.

O processo de revelação usou o 3,3',5,5'-tetrametilbenzidino (TMB, kit comercial de revelação KPL) como substrato para a peroxidase, seguindo as recomendações do fabricante. Em cada poço da microplaca foi adicionado 80µL de solução reveladora (duas soluções do kit TMB misturadas na proporção de 1:1) e incubados no escuro por 10min. Após este tempo, a reação de revelação era interrompida com 50µL de ácido fosfórico 2mM. A absorbância da solução, resultado da reação de revelação foi lida à 450nm em espectrofotômetro. As absorbâncias foram comparadas entre as amostras do controle e do tratamento.

Os resultados foram analisados no programa SigmaStat 3.1(© Systat Software GmbH) e GraphPadPrism 6 (GraphPad Software, Inc). Foi utilizado o teste T de student entre o controle de Cubatão e o de Juréia, para averiguar uma possível diferença. Já para análise dos tempos foram feitos testes de normalidade tipo K-S (Kolmogorov Smirnov) nos resultados da espectrofotometria. E para as amostras identificadas como não paramétricas foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis com o teste de Dunns a posteriori para comparação entre todas as amostras, dentro e fora dos respectivos grupos, com $P=0.1$.

RESULTADOS

Os organismos coletados em Cubatão tinham média de peso 178,72g ($\pm 4,74$) e largura de Carapaça 64,24mm ($\pm 0,68$). Enquanto que os organismos da Juréia

apresentaram média de peso 194,06g ($\pm 5,11$) e largura de carapaça de 69,74mm ($\pm 0,74$) (FIGURA 6). Teste t para o peso ($p=0,0295$) e para a largura de carapaça ($p<0,0001$). Já a relação peso pela largura de carapaça mostra uma tendência alométrica positiva para Juréia ($R^2=0.53$). E uma ausência de relação para os animais de Cubatão ($R^2=0.0$).

Peso x Largura da carapaça

FIGURA 6: Largura da carapaça (mm) em relação ao peso (g) com linha de tendência e R^2 para cada área de coleta. N=150

Durante os experimentos ocorreu o óbito de 19 indivíduos, tanto dos grupos controles como experimentais. Dentre estes, nove do grupo proveniente da Juréia e dez de Cubatão. No grupo controle dos animais coletados na Juréia, ocorreram duas mortes na primeira meia hora. E no grupo controle de Cubatão houveram duas mortes após trinta minutos e uma após uma hora. Após a exposição ao cádmio, observou-se que no grupo proveniente da Juréia houve mortalidade após 12 e 24 horas de exposição ao metal. Enquanto que no grupo coletado em Cubatão houve mortalidade após 2, 6 e 12 horas de experimento (FIGURA 7).

FIGURA 7: Número de animais mortos de acordo com os tempos de exposição (0, 30, 1, 2, 6, 12 e 24 hs) (N=75 animais) (A) Juréia; (B) Cubatão

Para testar se o manuseio e manutenção dos organismos em laboratório influencia a expressão da proteína marcadora, foram comparadas amostras dos organismos recém coletados no ambiente e dos aclimatizados em laboratório. Na comparação entre os controles de campo e os controles de laboratório, há diferença significativa da concentração de HSP70 para hepatopâncreas, brânquias anteriores e posteriores provenientes dos animais da Jureia. Já para os animais de Cubatão só há diferença significativa em hepatopâncreas e brânquias posteriores. As brânquias anteriores não apresentaram a concentração mínima detectada pelo método (FIGURA 8). As brânquias, tanto anteriores quanto posteriores, dos organismos da Juréia mantidos em laboratório apresentaram as maiores concentrações de HSP70. Todas as comparações foram realizadas utilizando o teste de Friedman, com $P \leq 0.1$.

FIGURA 8: Concentração de HSP70 nos grupos controle de campo e controle de laboratório. No eixo X, foram usadas as seguintes abreviações HP = hepatopâncreas, BA = brânquia anterior, BP = brânquia posterior e lab = laboratório.

Simultaneamente com a exposição de organismos ao cádmio, indivíduos foram mantidos nas mesmas condições ambientais que os grupos experimentais, mas sem adição de cádmio na água para avaliar a influência do manuseio nas respostas dos organismos. Nestes organismos que compõem o grupo controle, observou-se que no hepatopâncreas dos organismos coletados na Juréia, um aumento inicial da concentração da proteína nos primeiros trinta minutos, com diferença significativa em relação ao tempo 0h e no tempo 2h (FIGURA 9-A). Nos organismos de Cubatão (FIGURA 9-B), o aumento ocorreu após uma hora, sendo uma diferença significativa com os tempos 0, 2 horas, 6 horas e 12 horas.

Nas brânquias anteriores da Juréia observou-se concentrações, significativamente diferente entre dois grupos, mais altas nos tempos 0, 30 minutos e 2 horas e concentrações mais baixas nos tempos 1, 6 e 12 horas (FIGURA 9-C). Já as brânquias anteriores dos organismos de Cubatão, com exceção dos tempos 1 hora e 2 horas que não diferem significativamente, as concentrações foram abaixo da sensibilidade do método utilizado para medição (FIGURA 9-D).

E nas brânquias posteriores dos organismos da Juréia, ocorreu aumento da expressão de HSP70 nos tempos 30 minutos e 12 horas. Que são significativamente

diferentes dos tempos 1, 2 e 6 horas (FIGURA 9-E). Enquanto os organismos de Cubatão só apresentaram aumento significativo no tempo 12 horas (FIGURA 9-F).

Controle

FIGURA 9: Expressão da proteína HSP70 em *Ucides cordatus* após início do experimento para cada área estudada. Tempos 0, 30 minutos, 1, 2, 6 e 12 horas nos grupos não expostos ao cádmio. As barras correspondem à média da absorbância e aos respectivos erros padrão. Círculos e triângulos representam grupos e estrela quando somente um tempo é significativamente diferente dos demais.

A expressão de HSP70 nos grupos que foram expostos ao cloreto de cádmio está representada no gráfico 5. Nos hepatopâncreas dos indivíduos da Jureia somente o tempo 6h aumentou significativamente (FIGURA 10-A). Já nos indivíduos de Cubatão (FIGURA 10-B) a concentração de HSP70 no tempo 1h se manteve elevada embora com um segundo aumento no tempo 6h enquanto que no controle a concentração diminuiu.

A concentração da proteína nas brânquias anteriores dos animais de Juréia (FIGURA 10-C) foi pouco alterada pela exposição ao cádmio, uma vez que os valores não apresentaram diferença significativa com os do grupo controle (FIGURA 10-C). Enquanto as brânquias anteriores de Cubatão não sofreram alterações (FIGURA 10-D). Nas brânquias posteriores da Juréia não houve variação significativa, embora seja possível observar uma tendência a diminuição da expressão (Gráfico 5-E) quando comparado ao controle (FIGURA 9-E). Nas brânquias posteriores de Cubatão também é possível observar uma queda na expressão (FIGURA 10-E), ainda mais quando se observa o inverso no mesmo tempo do grupo controle (FIGURA 9-E).

Experimental

FIGURA 10: Concentração da proteína HSP70 em *Ucides cordatus* expostos a 5mg/L de cloreto de cádmio em seis tempos de exposição para cada área estudada, sendo controle de campo, tempo 0, 30 minutos, 1 hora, 2 horas, 6 horas e 12 horas. As barras correspondem à média da absorbância e aos respectivos erros padrão. Círculos e triângulos representam grupos e estrela quando somente um tempo é significativamente diferente dos demais.

DISCUSSÃO

O caranguejo *Ucides cordatus* tem sido bastante utilizado em estudos populacionais e ecológicos, visando, principalmente, ao uso da espécie como recurso pesqueiro e no seu manejo. Dada sua importância econômica para as populações das regiões litorâneas.

O uso como recurso de pesca é evidenciado pela diferença no tamanho dos animais. Quando comparamos as duas áreas observamos que em Cubatão a largura média de Carapaça é de 64,24mm ($\pm 0,68$). Enquanto que os organismos da Juréia apresentaram média de largura de carapaça de 69,74mm ($\pm 0,74$). A presença de indivíduos com a carapaça menor indica a ocorrência de intensa atividade pesqueira no local, uma vez que os animais de maior porte são capturados, corroborando com dados de outros trabalhos (Trippel, 1995; Heino & Godo, 2002; Fenberg & Roy, 2007; Goes *et al* 2010). Assim era de se esperar uma maior concentração de HSP70, em resposta aos estressores, nos animais mais jovens, com menor largura de carapaça. Pois estes apresentam uma maior capacidade metabólica e conseqüentemente de produção proteica (Martin *et al* 1993)

A morte dos organismos tanto do grupo controle como do grupo exposto ao cádmio, de ambos os pontos de coleta, mostrou que os animais também são sensibilizados pelo manuseio e aclimatização em laboratório. A diferença pode ser vista também na expressão de HSP70 entre os grupos controle de campo e controle de laboratório, evidenciando uma resposta das brânquias às mudanças ambientais assim como proposto por Kamude (2002) e Bouaricha (1994). Mostrando que o manuseio desses animais requer uma atenção especial na aclimatização e pode não ser a melhor forma de trabalhar com o grupo.

O cádmio, usado como contaminante no ensaio em *U. cordatus*, foi previamente descrito na literatura para diversas espécies como indutor da expressão de HSP70. Proteína relacionada à proteção contra danos, principalmente, às proteínas e ao material genético do organismo (Connon *et al.*, 2008; Fulda *et al.*, 2010; Haap&Köhler, 2009). Os resultados deste trabalho mostraram que a concentração de 5mg/L cloreto de cádmio, foi letal para o modelo utilizado, uma vez que ocasionou óbito dos organismos em até 24 horas do começo da exposição. No entanto, até 12 horas de exposição houve uma oscilação da expressão da HSP70 no hepatopâncreas e brânquias, dois órgãos

fundamentais na sobrevivência do organismo. Segundo Pyza (1997) e Eckwert (1997), em casos onde o estressor é letal, as concentrações de HSP70 se elevam e em seguida tendem a diminuir até um momento onde o organismo perde a capacidade de produção da proteína e de se proteger do agente estressor.

A concentração de 5mg/L foi escolhida, inicialmente, como uma concentração sub letal. Assim como o observado nos estudos com outros crustáceos decápodes. Xuan (2011) utilizou 2.9mg/L e realizou ensaios por 21 dias sem mortalidade com *Sinopotamon yangtsekiense*, um caranguejo de água doce. Já Rodríguez (2001) utilizou 10mg/L por 4 dias *Chasmagnathus granulata*, caranguejo estuarino e obteve mortalidade menor que 50%. Assim como a literatura mostra, os crustáceos apresentam uma grande variedade de respostas em relação a acumulação e toxicidade a metais. Os resultados mostram que 5mg/L foi sub-letal para o tempo na espécie *U. Cordatus*, média de 15% de mortalidade até 12h e 95% até 24h de exposição.

Mesmo em uma concentração sub-letal é interessante observar as concentrações de HSP70 nos órgãos dos organismos de Cubatão. Que corroboram com os estudos realizado em crustáceos da espécie *Daphnia magna* de áreas contaminadas, nos quais há um atraso na resposta e uma resposta menor que nos animais provenientes de uma área não contaminada, uma vez que estes organismos vivem em uma condição regular de estresse (Bervoets & Blust, 2003; Lopes *et al.*, 2006; Muysen *et al.*, 2010). As repostas subsequentes tendem a ser de intensidade menor em comparação aos casos de primeira exposição. E a segunda resposta seria mais fraca devido a danos causadas durante a primeira exposição (Hofmann & Somero, 1996; Schill *et al.*, 2003; Hofmann 2005). Uma possível explicação seria por ocasionar danos aos processos de tradução e transcrição (Pytharopoulou *et al.*, 2006). Já outros autores acreditam que essa queda se dá pela exaustão metabólica da célula, uma vez que a produção de HSP70 é bem custosa para o organismo em termos energéticos (Lannig *et al.*, 2006, 2008; Sokolova & Lannig, 2008; Ivanina *et al.*, 2009). Devido aos constantes contatos com os estressores, o organismo passaria a diminuir a intensidade de sua resposta e evitando um desgaste metabólico (Sørensen *et al.*, 2003; Barua *et al.*, 2008; Sokolova *et al.*, 2012). Corroborando com esses autores, os dados encontrados apontam para uma maior expressão pelos indivíduos da Jureia. Tanto nos grupos controles como nos expostos, quanto na resposta desencadeada pelo estresse da aclimação.

As brânquias, de *U. cordatus* por estarem em constante contato com o meio, podem ser mais sensíveis às mudanças ambientais. São divididas de acordo com suas funções, as posteriores são responsáveis pela regulação iônica e osmótica (Tsai e Lin, 2006). Já as brânquias anteriores são responsáveis diretamente pelas trocas gasosas no animal (Bouaricha *et al.*, 1994). No entanto, nos animais de Cubatão as brânquias anteriores não apresentam uma resposta em concentração mínima para detecção pelo método. Não respondendo a presença do cloreto de cádmio na água, possivelmente pelo constante contato com os estressores, como discutido no parágrafo anterior. Já as brânquias posteriores tiveram uma resposta branda e de curta duração em comparação com o grupo controle. O mesmo vale para o hepatopâncreas, onde nos animais da Jureia mostram um a crescente reposta aos estressores, enquanto os animais de Cubatão aumentam duas vezes as concentrações de HSP70, mas acaba por diminuir, apresentando uma resposta fraca.

CONCLUSÃO

Visto que não havia referências anteriores sobre as concentrações letais e sub-letais de cádmio para *U. cordatus*, esta é uma das contribuições deste trabalho. Esse trabalho também mostrou que as concentrações de HSP70 não variam de forma clara em resposta ao cádmio. Evidencia que o período de 7 dias não é suficiente para as concentrações de HSP70 retornarem ao nível encontrado em campo. Os resultados mostram também a necessidade de novos estudos sobre as condições necessárias para manter esta espécie em laboratório.

REFERÊNCIAS

- ABD ALLAH, A. T.; WANAS, M. Q. S.; THOMPSON, S. N. Dissolved heavy metals, lead, cadmium and mercury, accumulate in the body of the schistosome vector *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda: Pulmonata). *J. Moll. Stud.*, v. 69, p. 35-41. 2003.
- ABD ALLAH, A. T.; WANAS, M. Q. S.; THOMPSON, S. N. Effects of heavy metals on survival and growth of *Biomphalaria glabrata* Say (Gastropoda: Pulmonata) and interaction with schistosome infection. *J. Moll. Stud.*, v. 63, p. 79-86. 1997.
- ABRUNHOSA, Fernando Araújo. Importância da alimentação e do alimento no primeiro estágio larval de *Ucides cordatus cordatus* (Linnaeus, 1763)(Decapoda: Ocypodidae). *RevCiêncAgron*, v. 33, n. 2, p. 5-12, 2002.
- AL-WHAIBI, M. H. Plant heat shock proteins: A mini review. *Journal of King Saud University – Science*, v. 23, p. 139-150. 2011.
- AMIARD, J.-C. Metallothioneins in aquatic invertebrates: their role in metal detoxification and their use as biomarkers. *Aquatic Toxicology*, v. 76, n. 2, p. 160-202, 2006.
- AMORIM, L. C. A. Os biomarcadores e sua aplicação na avaliação da exposição aos agentes químicos ambientais. *Rev. Bras. Epidemiol.*, v. 6, p. 158-170. 2003.
- AMOUREUX, J. M.; TAVARES, M. Natural recovery of Amazonian mangrove Forest as revealed by brachyuran crab fauna: preliminary description. *Vie et milieu*, v. 55, n. 2, p. 71-79, 2005.
- ANDRADE, C. E. Biologia e pesca do caranguejo-uçá, *Ucides cordatus* (Linnaeus, 1763), no estuário do Rio Curimataú, município de Canguaretama–Rio Grande do Norte. *Boletim Técnico-Científico do CEPENE*, v. 15, n. 1, p. 31-41, 2007.
- ANSALDO, M.; NAHABEDIAN, D. E.; BROWN, E. H.; AGOTE, M.; ANSAY, C. V.; VERRENGIA GUERRERO, N. R.; WIDER, E. A. Potential use of glycogen level as biomarker of chemical stress in *Biomphalaria glabrata*. *Toxicology*, v. 224, p. 119-127. 2006.

ANSALDO, M.; NAHABEDIAN, D. E.; BROWN, E. H.; AGOTE, M.; ANSAY, C. V.; VERRENGIA GUERRERO, N. R.; WIDER, E. A. Potential use of glycogen level as biomarker of chemical stress in *Biomphalaria glabrata*. *Toxicology*, v. 224, p. 119-127. 2006.

ANSALDO, M.; NAHABEDIAN, D. E.; DI FONZO, C.; WIDER, E. A. Effect of cadmium, lead and arsenic on the oviposition, hatching and embryonic survival of *Biomphalaria glabrata*. *Sci. Total Environ.*, v. 407, p. 1923-1928. 2009.

ARAÚJO, M. S. L. C.; CALADO, Tereza CS. Bioecologia do Caranguejo-Uçá *Ucides cordatus* (Linnaeus) no Complexo Estuarino Lagunar Mundáu/Manguaba (CELMM), Alagoas, Brasil. *Revista da Gestão Costeira Integrada*, v. 8, n. 2, p. 169-181, 2008.

AZEVEDO, C. M.; BORGES, C. C.; ANDRADE, Z. A. Behavior of *Schistosoma mansoni*-induced histopathological lesions in *Biomphalaria glabrata* submitted to ionizing radiation. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 37, p. 218-221. 2004.

AZEVEDO, F. A. & CHASIN, A. A. M. (Coord.) As bases toxicológicas da ecotoxicologia. São Carlos: RiMa, 2003. p. 167-220.

BARUA, D.; HECKATHORN, S. A.; COLEMAN, James S. Variation in Heat-shock Proteins and Photosynthetic Thermotolerance among Natural Populations of *Chenopodium album* L. from Contrasting Thermal Environments: Implications for Plant Responses to Global Warming. *Journal of integrative plant biology*, v. 50, n. 11, p. 1440-1451, 2008.

BERVOETS, L.; BLUST, R. Metal concentrations in water, sediment and gudgeon (*Gobiogobio*) from a pollution gradient: relationship with fish condition factor. *Environmental pollution*, v. 126, n. 1, p. 9-19, 2003.

BIERKENS, J. G. E. A. Applications and pitfalls of stress-proteins in biomonitoring. *Toxicology*, v. 153, p. 61-72. 2000.

BINEY, C.; AMUZU, A.T.; CALAMARI, D.; KABA, N.; MBOME, I.L.; NAEVE, H.; OCHUMBA, P.B.O.; OSIBANJO, O.; RADEGONDE, V. E SAAD, M.A.H. Review of

heavy metals in the african aquatic environment. *Ecotoxicology Environmental Safety*, v.28, p.134-159, 1994.

BORÉM, A. & VIEIRA, M. L. C. Glossário de biotecnologia. Viçosa: Editora Folha de Viçosa, 2005. 183 p. Disponível em: <<http://www.cib.org.br/glossario.php>>. Acessoem: 11 Ago 2014

BOUARICHA, N.; CHARMANTIER-DAURES, M.; THUET, P.; TRILLES, J. P. AND CHARMANTIER G. Ontogeny of osmoregulatory structures in the shrimp *Penaeus japonicus* (Crustacea, Decapoda). *Biol. Bull.*186: 29-40. 1994.

BOWEN, J.J.M. Environmental chemistry of the elements, London Academic Press. p.333, 1979.

BRADFORD, M.M.. A rapid and sensitive method for the quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72:248-254.(1976)

Bradley, B.P., Ward, J.B., Detection of a major stressprotein using a peptide antibody. *Marine Environ. Res.* 28, 471–475.1989.

BRANCO, Joaquim Olinto. Aspectos bioecológicos do caranguejo *Ucides cordatus* (Linnaeus, 1763)(Crustacea, Decapoda) do manguezal do Itacorubi, Santa Catarina, BR. *Arquivos de biologia e tecnologia*, v. 36, n. 1, p. 133-148, 1993.

CAJARAVILLE, M. P., The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. *Science of the Total Environment*, v. 247, p. 295-311, 2000.

CAPARIS, Maria E.; RAINBOW, Philip S. Accumulation of cadmium associated with sewage sludge by a marine amphipod crustacean. *Science of the total environment*, v. 156, n. 3, p. 191-198, 1994.

CELLURA, C.; TOUBIANA, M.; PARRINELLO, N.; ROCH, P. HSP70 gene expression in *Mytilus galloprovincialis* hemocytes is triggered by moderate heat shock and *Vibrio anguillarum*, but not by *V. splendidus* or *Micrococcus lysodeikticus*. *Dev. Comp. Immunol.*, v. 30, p. 984-997. 2006.

CETESB. Relatório de qualidade do ar no Estado de São Paulo - 2000. Série relatórios. Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental, São Paulo. 2001

CLARCK, H. Marine Pollution. Clarendon Press. Oxford, 1997.

CONDE, J.E.; M.M.P. TOGNELLA; E.T. PAES; M.L.G. SOARES; I.A. LOURO & Y. SCHAEFFER-NOVELLI. 2000. Population and life history features of the crab *Aratus pisonii* (Decapoda: Grapsidae) in a subtropical estuary. *Interciência* 25 (3): 151-158.

CONNON, R., HOOPER, H.L., SIBLY, R.M., LIM, F.-L., HECKMANN, L.H., MOORE, D.J., WATANABE, H., SOETAERT, A., COOK, K., MAUND, S.J., HUTCHINSON, T.H., MOGGS, J., DECOEN, W., IGUCHI, T., CALLAGHAN, A., 2008. Linking molecular and population stress responses in *Daphnia magna* exposed to cadmium. *Environ. Sci. Technol.* 42, 2181–2188.

CONNON, Richard. Linking molecular and population stress responses in *Daphnia magna* exposed to cadmium. *Environmental science & technology*, v. 42, n. 6, p. 2181-2188, 2008.

DALABONA, G. & J. LOYOLA-SILVA. 2005. Período reprodutivo de *Ucides cordatus* (Linnaeus) (Brachyura, Ocypodidae) na Baía das Laranjeiras, sul do Brasil. *Acta Biológica Paranaense* 34: 115-126.

DAVID, E.; TANGUY, A.; PICHAVANT, K.; MORAGA, D. Response of the pacific oyster *Crassostrea gigas* to hypoxia exposure under experimental conditions. *FEBS J.*, v. 272, p. 5635-5652. 2005.

DIELE, K. 2000. Life history and population structure of the exploited mangrove crab *Ucides cordatus* (Linnaeus, 1763) (Decapoda: Brachyura) in the Caeté Estuary, North Brazil. Bremen, Center for Tropical Marine Ecology, Contribution 9, ZMT Bremen, 103p.

DIELE, K.; V. KOCH & U. SAINT-PAUL. 2005. Population structure, catch composition and CPUE of the artisanally harvested mangrove crab *Ucides cordatus* (Ocypodidae) in the caeté estuary, North Brazil: Indications for overfishing? *Aquatic Living Resource* 18: 169-178.

DONG S., SHEN H.M., ONG C.N., Cadmium-induced apoptosis and phenotypic changes in mouse thymocytes, *Molecular and Celular Biochemistry*, v.222 p.11–20, 2001.

ECKWERT, E., Alberti, G., Kohler, H-R., 1997. The induction of stress proteins (hsp) in *Oniscusasellus* (Isopoda) as a molecular marker of multiple heavy-metal exposure: I. Principles and toxicological assessment. *Ecotoxicology* 6, 249–262.

EISLER R. Trace Metal concentrations in marine organisms. London: Pergamon Press, 1981.

FANG M.Z., MAR W., CHO M.H., Cadmium affects genes involved in growth regulation during two-stage transformation of Balb/3T3 cells, *Toxicology* ,v.177, p.253–265, 2002.

FARCY, E.; VOISEUX, C.; LEBEL, J.; FIEVET, B. Seasonal changes in mRNA encoding for cell stress markers in the oyster *Crassostreagigas* exposed to radioactive discharges in their natural environment. *Sci. Total Environ.*, v. 374, p. 328-341. 2007.

FAVATIER, F., BORNMAN, L., HIGHTOWER, L.E., GUNTER, E., POLLA, S. Variation in hspgene expression and Hsp polymorphism: do they contribute to differentialdisease susceptibility and stress tolerance? *Cell Stress Chaperones* 2, 141–155.1997

FENBERG, P. B.; ROY, K. Ecological and evolutionary consequences of size-selective harvesting: how much do we know?.*Molecular Ecology*, v. 17, n. 1, p. 209-220, 2008.

FULDA, S. Cellular stress responses: Cell survival and cell death. *International Journal of Cell Biology*, v. 2010, 2010.

FULDA, S; Adrienne M. Gorman, Osamu Hori, and AfshinSamali, “Cellular Stress Responses: Cell Survival and Cell Death,” *International Journal of Cell Biology*, vol. 2010, Article ID 214074, 23 pages, 2010.

GILFORD, J. Environmental toxicology and risk assessment. LANDIS. (Ed). STP 1179.Astm Internacional p. 7-21, 1993.

GOES, Péricles. Bioecology of the uçá-crab, *Ucides cordatus* (Linnaeus, 1763), in Vitória Bay, Espírito Santo State, Brazil. Brazilian Journal of Oceanography, v. 58, n. 2, p. 153-163, 2010.

GONZALEZ, C.; GREENWOOD, R.; QUEVAUVILLER, P. Rapid chemical and biological techniques for water monitoring. Chichester: Wiley. 2009. p. 39-50; 125; 134; 221-239.

GUEST, M.A.; R.M. CONNOLLY; S.Y. LEE; N.R. LONERAGAN & M.J. BREITFUSS. Mechanism for the small-scale movement of carbon among estuarine habitats: Organic matter transfer not crab movement. Oecologia 148: 88-96. 2006

GUPTA, R. C. (ed.) Veterinary Toxicology: Basic and clinical principles. London: Elsevier, 2007. p. 422-426.

GUPTA, S. C.; SHARMA, A.; MISHRA, M.; MISHRA, R. K.; CHOWDHURI, D. K. Heat shock proteins in toxicology: How close and how far? Life Sci., v. 86, p. 377-384. 2010.

HAAP, T., Köhler, H.-R.. Cadmium tolerance in seven *Daphnia magna* clones is associated with reduced HSP70 baseline levels and induction. Aquat. Toxicol. 94, 131–137. 2009

HAAP, Timo; KÖHLER, Heinz-R. Cadmium tolerance in seven *Daphnia magna* clones is associated with reduced HSP70 baseline levels and induction. Aquatic toxicology, v. 94, n. 2, p. 131-137, 2009.

HEINO, Mikko; GODØ, Olav Rune. Fisheries-induced selection pressures in the context of sustainable fisheries. Bulletin of Marine Science, v. 70, n. 2, p. 639-656, 2002.

HERNROTH, Bodil. Immune suppression of the echinoderm *Asterias rubens* (L.) following long-term ocean acidification. Aquatic toxicology, v. 103, n. 3, p. 222-224, 2011.

HIGHTOWER LE. Stress proteins in biology and medicine. In: Morimoto, RI, Tissieres, A, Georgopoulos, C (Eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, p. 450, 1990.

HOFMANN, G. E.; SOMERO, G. N. Interspecific variation in thermal denaturation of proteins in the congeneric mussels *Mytilus trossulus* and *M. galloprovincialis*: evidence from the heat-shock response and protein ubiquitination. *Marine Biology*, v. 126, n. 1, p. 65-75, 1996.

HOFMANN, Gretchen E. Patterns of Hsp gene expression in ectothermic marine organisms on small to large biogeographic scales. *Integrative and Comparative Biology*, v. 45, n. 2, p. 247-255, 2005.

HOMA, Joanna. Early-phase immunodetection of metallothionein and heat shock proteins in extruded earthworm coelomocytes after dermal exposure to metal ions. *Environmental Pollution*, v. 135, n. 2, p. 275-280, 2005.

IVANINA, A. V.; TAYLOR, C.; SOKOLOVA, I. M. Effects of elevated temperature and cadmium exposure on stress protein response in eastern oysters *Crassostrea virginica* (Gmelin). *Aquatic Toxicology*, v. 91, n. 3, p. 245-254, 2009.

IVO, C. T. C.; GESTEIRA, T. C. V. Sinopse das observações sobre a bioecologia e pesca do caranguejo-uçá, *Ucides cordatus cordatus* (Linnaeus, 1763), capturado em estuários de sua área de ocorrência no Brasil. *Boletim Técnico científico. CEPENE*, v. 7, p. 9-51, 1999.

JOSEPH, P. Mechanisms of cadmium carcinogenesis. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, v. 238, p. 272-279. 2009.

JOSEPH, P.; MACDONELL, M.; HAROUN, L.; MONETTE, F. Radiological and Chemical Fact Sheets to Support Health Risk Analyses for Contaminated Areas. Washington: U.S. Department of Energy. 2007. p. 5-6.

KAMUDE, C.; GROSELL, M.; HIGGS, D.; WOOD, C.M. Copper metabolism in actively growing rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): interactions between dietary and waterborne copper uptake. *J. Exp. Biol.*, 205:279-290, 2002.

Karp G. 2005. *Biologia celular e molecular: conceitos e experimentos*. 3aEd. Editora Manole, São Paulo, p.832.

KIM, Y. K.; YOO, W. I.; LEE, S. H.; LEE, M. Y. Proteomic analysis of cadmium-induced protein profile alterations from marine alga *Nannochloropsis oculata*. *Ecotoxicology*, v. 14, p.589-596. 2005.

KIMBROUGH, K. L.; JOHNSON W. E; LAUENSTEIN G. G.; CHRISTENSEN J. D.; APETI D. A. An Assessment of Two Decades of Contaminant Monitoring in the Nation's Coastal Zone. Silver Spring, MD. NOAA Technical Memorandum NOS NCCOS 74. Silver Spring: NOS NCCOS. 2008. 105 pp.

KREGEL, K. C. Heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance. *J. Appl. Physiol.*, v. 92, p. 2177-2186. 2002.

LACOSTE, A.; CIAN, M. C.; CUEFF, A.; POUYLET, S. A. Noradrenaline and α adrenergic signaling the HSP70 gene in mollusk immune cells. *J. Cell Sci.*, v. 14, p. 35573564. 2001.

LAM, P.K.S. & GRAY, J.S. 2003. The use of biomarkers in environmental monitoring programmes. *Marine Pollution Bulletin*, 46(2): 182-186.

LANNIG, G.; FLORES, J. F.; SOKOLOVA, I. M. Temperature-dependent stress response in oysters, *Crassostrea virginica*: pollution reduces temperature tolerance in oysters. *Aquatic Toxicology*, v. 79, n. 3, p. 278-287, 2006.

LEE, S. M.; LEE, S. B.; PARK, C. H.; CHOI, J. Expression of heat shock protein and hemoglobin genes in *Chironomus tentans* (Diptera, chironomidae) larvae exposed to various environmental pollutants: a potential biomarker of freshwater monitoring. *Chemosphere*, v. 65, p. 1074-1081. 2006.

LEITE, M. M. L. F., A.A.; SILVA, J.R.F.; CARDOSO, N.S. Maturidade reprodutiva funcional do caranguejo-uçá, *Ucides cordatus* (Crustacea, Decapoda), no estuário do Rio Coreá, Camocim, Ceará. *Boletim Técnico-Científico do CEPENE*, v. 14, n. 2, p. 41-49, 2006.

LINDQUIST, S. & CRAIG, E. A. The heatshock proteins. *Annu. Rev. Genet.*, v. 22, p. 631-677. 1988.

LINDQUIST, S. The heat shock response. *Annu. Rev. Biochem.*, v. 55, p. 1151-1191. 1986.

MAJER BJ, TSCHERKO D., PASCHKE A., WENNRICH R, KUNDI M, KANDELER E., KNASMÜLLER S. Effects of heavy metal contamination of soils on micronucleus induction in *Tradescantia* and on microbial enzyme activities: A comparative investigation. *Mutation Research*, v. 515, p. 111-124, 2002.

MARQUES, O.A.V. & DULEBA, W. Estação Ecológica Juréia-Itatins – Ambiente Físico, Flora e Fauna. Holos, Editora Ltda-ME, Ribeirão Preto, SP, 384p. 2004

MARTIN, G. R.; DANNER, D. B.; HOLBROOK, N. J. Aging causes and defenses. *Scientific basis of medicine annual reviews*, London, v. 44, p. 419-429, 1993

MARTIN-DIAZ, M.L.; VILLENA-LINCOLN, A.; BAMBER, S.; BLASCO, J.; DELVALLS, A., An integrated approach using bioaccumulation and biomarker measurements in female shore crab, *Carcinus maenas*. *Chemosphere*, v. 58, p.615-626. 2005.

MAZZONI-VIVEIROS, S.C.; TRUFEM, S.F.B. Efeitos da poluição aérea e edáfica no sistema radicular de *Tibouchina pulchra* Cogn. (Melastomataceae) em área de Mata Atlântica: associações micorrízicas e morfologia. *Revista Brasileira Botânica*, v.27, n.2, p. 337-348. 2004.

MCCARTY, L. S. & MUNKITTRICK, K. R. Environmental biomarkers in aquatic toxicology: Fiction, fantasy, or functional? *Hum. Ecol. Risk Assess.* v. 2, p. 268-274. 1996.

MELO, G.A.S. Manual de identificação dos Crustacea Decapoda de água doce do Brasil. Edições Loyola, 2003.

MEYER, T. N. & SILVA, A. L. Resposta celular ao estresse. *Rev. Assoc. Med. Brás.*, v. 45, p. 181-188. 1999.

MONSERRAT, J.M.; MARTÍNEZ, P.E.; GERACITANO, L.A.; AMADO, L.L.; MARTINS, C.M.; PINHO, G.L.; CHAVES, I.S.; FERREIRA-CRAVO, M.; VENTURA-LIMA, J., BIANCHINI, A. Pollution biomarkers in estuarine animals: critical review and

new perspectives. Comparative Biochemistry and Physiologypart C: Toxicology and Pharmacology, v.146, p.221-34, 2007.

MONTEIRO, B.R.; COELHO-FILHO, P. A. Estrutura populacional do caranguejo-uçá, *Ucides cordatus* (Linnaeus, 1763)(Crustacea, Decapoda, Ocypodidae), no estuário do Rio Paripe, Itamaracá-Pernambuco. Boletim Técnico-Científico do CEPENE, v. 12, n. 2, 2004.

MORIMOTO, R.I., A. Tissieres, and C. Georgopoulos. The stress response, function of the proteins, and perspectives. In Stress proteins in biology and medicine (ed. R.I. Morimoto, A. Tissieres, and C. Georgopoulos), pp. 1–36. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. 1990

MOSELEY, P. Stress proteins and the immune response. Immunopharmacology, v. 48, p. 299-302. 2000.

MUKHOPADHYAY, I.; NAZIR, A.; SAXENA, D. K.; CHOWDHURI D. K. Heat Shock Response: HSP70 in Environmental monitoring. J. Biochem. Mol. Toxicol., v. 17, p. 249-254. 2003.

MUYSEN, B.T.A.; MESSIAEN, M.; JANSSEN, C.R. Combined cadmium and temperature acclimation in *Daphnia magna*: physiological and sub-cellular effects. Ecotoxicology and environmental safety, v. 73, n. 5, p. 735-742, 2010.

NAS/NRC (National Academy of Sciences/National Research Council). Biologic Markers in Reproductive Toxicology, Washington, DC: National Academy Press. 1989. p. 15-29.

NOGAMI, E.M.; KIMURA, C.C.M.; RODRIGUES, C.; MALAGUTTI, A.R.; LENZI, E.; NOZAKI, J. 2000. Effects of dietary cadmium and its bioconcentration in *Tilapia Oreochromis niloticus*. Ecotoxicol. Environ. Safety, 45:291-295.

NORDHAUS, I.; M. WOLFF & K. DIELE. Litter processing and population food intake of the mangrove crab *Ucides cordatus* in a high intertidal forest in northern Brazil. Estuarine, Coastal and Shelf Science 67: 239-250. 2006

NOVER, Lutz. Heat shock response. Crc Press, 1991.

- OLIVEIRA, E. R.. Populações Humanas na Estação Ecológica de Juréia- Itatins. NUPAUB-USP. Série documentos e relatórios de pesquisa: nº 10. São Paulo. 1993
- PENTTINEN, S., KUKKONEN, J., AND OIKARI, A. The kinetics of cadmium in *Daphnia magna* as affected by humic substances and water hardness. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 30:72-76. 1995
- PIANO, A.; ASIRELLI, C.; CASELLI, F.; FABBRI, E. HSP70 expression in thermally stressed *Ostrea edulis*, a commercially important oyster in Europe. *Cell Stress & Chaperones*, v. 7, p. 250-257, 2002.
- PIANO, A.; VALBONESI, P.; FABBRI, E. Expression of cytoprotective proteins, heat shock protein 70 and metallothioneins, in tissues of *Ostrea edulis* exposed to heat and heavy metals. *Cell Stress & Chaperones*, v. 9, p. 134-142. 2004.
- PINHEIRO, M.A.A.; SILVA, P.P.G.; DUARTE, L.F.A.; ALMEIDA, A.A. e ZANOTTO, F.P. .Accumulation of six metals in the mangrove crab *Ucides cordatus* (Crustacea: Ucididae) and its food source, the red mangrove *Rhizophora mangle* (Angiosperma: Rhizophoraceae). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 81: 114-121 2012
- PINHEIRO, M.A.A; HATTORI, Gustavo Yomar. Relative growth of the mangrove crab *Ucides cordatus* (Linnaeus, 1763)(Crustacea, Brachyura, Ocypodidae) at Iguape, São Paulo, Brazil. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 49, n. 5, p. 813-823, 2006.
- POWERS, M. V. & WORKMAN, P. Inhibitors of the heat shock response: Biology and pharmacology. *FEBS Lett.*, v. 581, p. 3758-3769. 2007.
- PYTHAROPOULOU, S. Evaluation of the global protein synthesis in *Mytilus galloprovincialis* in marine pollution monitoring: seasonal variability and correlations with other biomarkers. *Aquatic toxicology*, v. 80, n. 1, p. 33-41, 2006.
- PYZA, E., MAK, P., KRAMARZ, P., LASKOWSKI, R., 1997. Heatshock proteins (HSP70) as biomarkers in ecological studies. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 38, 244–251.

- RAINBOW, P.S. Trace metal concentrations in aquatic invertebrates: why and so what? *Environmental Pollution*, v. 120, n. 3, p. 497-507, 2002.
- RAVERA, O. Influence of heavy metals on the reproduction and embryonic development of freshwater pulmonates (gastropoda; mollusca) and cladocerans (crustacea; Arthropoda). *Comp. Pharmacol.*, v.100, p. 215-219. 1991.
- RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. Mutagênese ambiental, Canoas: Editora ULBRA, 2003. p. 49-75.
- RITOSSA, F. A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. *Cell. Mol. Life Sci.*, v. 18, p. 571-573. 1962.
- RITOSSA, F. M. Experimental activation of specific loci in polytene chromosomes of *Drosophila*. *Exp. Cell Res.*, v. 35, p. 601-607. 1964.
- RITTSCHOF, D.; MCCLELLAN-GREEN, P. Molluscs as multidisciplinary models in environment toxicology. *Mar. Pollut. Bull.*, v. 50, p. 369-373. 2005
- RODRIGUEZ, E.M., BIGI, R., MEDESANI, D.A., STELLA, V.S., GRECO, L.S.L., MORENO, P.A.R., MONSERRAT, J.M., PELLERANO, G.N., & ANSALDO, M.. Acute and chronic effects of cadmium on blood homeostasis of an estuarine crab, *Chasmagnathus granulata*, and the modifying effect of salinity. *Braz J Med Biol Res*, Ribeirão Preto , v. 34, n. 4, p. 509-518, Apr. 2001
- ROSSNER, P.; SVECOVAA, V.; MILCOVAA, A.; LNECKOVAA, Z.; SOLANSKYA, I.; SANTELLAB R.M.; SRAM, R.J. Oxidative and nitrosative stress markers in bus drivers. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, v. 617, n. 1, p. 23-32, 2007.
- RUELAS, D. S.; KARENTZ, D.; SULLIVAN, J. T. Lethal and sub-lethal effects of UVB on juvenile *Biomphalaria glabrata* (Mollusca: Pulmonata). *J. Invertebr. Pathol.*, v. 93, p. 192-200. 2006.
- RYAN, J. A.; HIGHTOWER, L. E. Stress proteins as molecular biomarkers for environmental toxicology. In: *Stress-Inducible Cellular Responses*. Birkhäuser Basel, 1996. p. 411-424.

SANDERS, B. M. & MARTIN, L. S. Stress proteins as biomarkers of contaminant exposure in archived environmental samples. *Sci. Total Environ.*, v. 139/140, p. 459-470. 1993.

SANDERS, B. Stress proteins in aquatic organisms: an environmental perspective. *Crit. Rev. Toxicol.*, v. 23, p. 49-75. 1993.

SCHILL, R.O.; STEINBRÜCK, G.H.B.; KÖHLER, H. Stress gene (HSP70) sequences and quantitative expression in *Milnesiumtardigradum* (Tardigrada) during active and cryptobiotic stages. *Journal of Experimental Biology*, v. 207, n. 10, p. 1607-1613, 2004.

SCHRECK, C. B. Stress and fish reproduction: The roles of allostasis and hormesis. *Gen. Comp. Endocrinol.*, v. 165, p. 549-556. 2010.

SOKOLOVA, I.M. Energy homeostasis as an integrative tool for assessing limits of environmental stress tolerance in aquatic invertebrates. *Marine Environmental Research*, v. 79, p. 1-15, 2012.

SOKOLOVA, I.M.; LANNIG, G. Interactive effects of metal pollution and temperature on metabolism in aquatic ectotherms: implications of global climate change. *Climate Research*, n. CR Special 18, 2008.

SØRENSEN, J G; KRISTENSEN, T.N.; LOESCHCKE, Volker. The evolutionary and ecological role of heat shock proteins. *Ecology Letters*, v. 6, n. 11, p. 1025-1037, 2003.

TOMANEK, L. & SANFORD, E. Heat shock protein 70 (Hsp 70) as a biochemical stress indicator: an experimental field test in two congeneric intertidal gastropods (Genus: *Tegula*). *Biol. Bull.*, v. 205, p. 276-284. 2003.

TRIPPEL, E.A. Age at maturity as a stress indicator in fisheries. *Bioscience*, California, 45(11): 759-771. 1995

TSAL, J. R. AND LIN, H. C. V-type H⁺-ATPase and Na⁺, K⁺-ATPase in the gills of 13 euryhaline crabs during salinity acclimation. *J. Exp. Biol* 2010:

VENTURA, B.C.; ANGELIS, D.F.; MARIN-MORALES, M.A. Mutagenic and genotoxic effects of the Atrazine herbicide in *Oreochromis niloticus* (Perciformes,

Cichlidae) detected by the micronuclei test and the comet assay. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, v.90, p.42-51, 2008.

VIARENGO A. , LOWE D., BOLOGNESI C., FABBRI E., KOEHLER A. The use of biomarkers in biomonitoring: A 2-tier approach assessing the level of pollutant-induced stress syndrome in sentinel organisms. *Comparative Biochemistry and Physiology*, v. 146, p. 281– 300, 2007.

WIRTH D.; CHRISTIANS, E.; MUNAUT, C.; DESSY, C.; FOIDART, J. M.; GUSTIN, P. Differential heat shock gene HSP70-1 response to toxicants revealed by in vivo study of lungs in transgenic mice. *Cell Stress Chaperones*, v. 7, p. 387-395. 2002.

WUNDERLICH, A.C.; PINHEIRO, M.A.A.; RODRIGUES, A.M.T. Biology of the mangrove uçá crab, *Ucides cordatus* (Crustacea: Decapoda: Brachyura), in Babitonga Bay, Santa Catarina, Brazil. *Revista Brasileira de Zoologia*, v. 25, n. 2, p. 188-198, 2008.

XUAN, R.; WANG, L.; SUN, M.; REN, G.; JIANG, M. Effects of cadmium on carbohydrate and protein metabolism in the freshwater crab *Sinopotamon yangtsekiense*. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.*, v. 154, p. 268-274. 2011.

YANG P.M., CHIU S.J., LIN K.A., LIN L.Y., Effect of cadmium on cell cycle progression in Chinese hamster ovary cells, *Chemical Biology Interaction*, v.149, p.125–136, 2004.

ZILBERBERG, C; SERENO, D; LIMA, G; CUSTODIO, M.R.; LOBO-HAJDU, G. Effect of mussel's gender and size on a stress response biomarker. *Water, Air, & Soil Pollution*, v. 217, n. 1-4, p. 317-320, 2011.