Marina Granado e Sá

**CARACTERIZAÇÃO DO TRANSPORTE DE ZINCO
EM CÉLULAS ISOLADAS DO EPITÉLIO
BRANQUIAL DA LAGOSTA *Homarus americanus***

São Paulo
2008

Marina Granado e Sá

**CARACTERIZAÇÃO DO TRANSPORTE DE ZINCO
EM CÉLULAS ISOLADAS DO EPITÉLIO
BRANQUIAL DA LAGOSTA *Homarus americanus***

Dissertação apresentada ao Instituto
de Biociências da Universidade de São
Paulo, para obtenção do Título de
Mestre em Ciências, na Área de
Fisiologia Geral

Orientadora: Prof^a Dr^a Flávia Pinheiro
Zanotto

São Paulo
2008

Sá, Marina Granado e
Caracterização do transporte de zinco em células isoladas do epitélio
branquial da lagosta *Homarus americanus*, 86 p.

Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biociências da Universidade de
São Paulo. Departamento de Fisiologia Geral.

1. Transporte de zinco 2. Cálcio 3. Lagosta I. Universidade de São
Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Fisiologia Geral

Comissão Julgadora:

Prof^a. Dr^a. Carolina Arruda de Oliveira Freire

Prof. Dr. Márcio Reis Custódio

Prof^a. Dr^a. Flávia Pinheiro Zanotto

Trabalho dedicado a Edécio, Telma, Felipe, Gabriel e Régis.
Com todo meu amor.

As oportunidades normalmente se apresentam disfarçadas de trabalho árduo e é por isso que muitos não as reconhecem *(Ann Landers)*

Sucesso é o resultado da prática constante de fundamentos e ações vencedoras. Não há nada de milagroso no processo, nem sorte envolvida. Amadores aspiram profissionais trabalham. *(Bill Russel)*

AGRADECIMENTOS

- Agradeço a Prof^a Dr^a Flávia Pinheiro Zanotto, pela confiança em meu trabalho e pela oportunidade de conhecer e trabalhar em laboratório no exterior;
- Agradeço o Prof^o Gregory A. Ahearn por me acolher em sua equipe de laboratório em Jacksonville e por me ensinar tanto em tão pouco tempo;
- Ao Instituto de Biociências, USP, por possibilitar o encontro com docentes que muito contribuíram para este processo e com colegas que sempre estiveram presentes em minha vida, de uma forma ou de outra;
- Agradeço a Roseli, Erika e todos os funcionários do Instituto de Biociências, que sempre estiveram dispostos a ajudar;
- À Universidade Presbiteriana Mackenzie, presente na minha vida desde 2002, por possibilitar o desenvolvimento do nosso laboratório e nossas pesquisas em suas dependências;
- À University of North Florida, Jacksonville, FL, por possibilitar o desenvolvimento do trabalho no laboratório junto ao Biology Department;
- Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pelo apoio financeiro para desenvolvimento deste projeto;
- Ao Prof^o Dr^o Gilberto Fernando Xavier, coordenador de Pós Graduação, por possibilitar o acesso dos alunos à congressos e demais atividades acadêmicas;
- Aos técnicos do laboratório, Esther e Danilo, sempre me encorajando com pensamentos positivos. Obrigada por todos os nossos dias de diversão;
- Aos amigos Thiago Amir e Tiago Gabriel que me apoiaram e estiveram sempre do meu lado durante todo este processo;

- Aos amigos Arnaldo, João e Lucas do IB que sempre estiveram do meu lado, mostrando o lado bom das situações;
- Às pessoas que passaram pela minha vida e que independente da intensidade, deixaram palavras de otimismo e que muito me ensinou;
- Aos meus pais, que se não acreditassem na minha profissão, nada teria acontecido. Obrigada pelo apoio, tanto nacional quanto internacional;
- Aos meus irmãos, que perto ou longe, participaram de tudo isso;
- Aos meus avós, Anna e Waldemar, Senhorinha (*in memmoriám*) e Walter (*in memmoriám*) pelo incentivo para as novas oportunidades da vida, palavras sábias em momentos de anseio, medo e alegrias;
- Aos tios e primos que sempre compartilharam e vibraram com este sonho;
- A Regis, pela compreensão, amizade, apoio, amor e participação nos momentos mais importantes da minha vida. Sem tudo isso, seria mais difícil.

RESUMO

Pouco se sabe sobre o transporte de metais pesados, particularmente do zinco (Zn), em células branquiais de lagostas. Visando um maior entendimento do processo, os filamentos branquiais da lagosta Americana, *Homarus americanus*, foram dissociados em solução salina fisiológica e os diversos tipos celulares separados em gradiente de 30, 40, 50 e 80% de sacarose (C30, C40, C50, C80) através de centrifugação de alta velocidade. As células provenientes de cada solução de sacarose foram incubadas em $^{65}\text{Zn}^{2+}$ visando caracterizar a tomada de zinco para cada tipo celular. A caracterização do acúmulo de zinco em cada célula foi investigada na presença e ausência de 10mM de cálcio (CaCl_2), variadas concentrações de NaCl e pH, presença de 100 μM de verapamil, nifedipina (inibidores de canais de Ca^{2+}) e ionóforo de cálcio, A23187. O influxo de $^{65}\text{Zn}^{2+}$ foi descrito pela cinética de Michaelis-Menten nas concentrações de zinco variando de 1-1000 μM . O cálcio externo não afetou o transporte de Zn para as células C30, C40 e C50, mas atuou como estimulador para as células C80. O cálcio reduziu o K_m e a velocidade máxima de transporte (V_{max}) para as células C30, enquanto duplicou aparentemente a velocidade máxima de transporte para as células C80. Os resultados sugerem que o cálcio, sódio e prótons entram nas células branquiais através de um canal para cátion com ampla especificidade. Diferenças observadas no transporte de zinco em relação aos diferentes tipos de células aparentemente estão relacionadas com as diferentes taxas de afinidade de cada transportador em cada tipo celular. O transporte de $^{65}\text{Zn}^{2+}$ também foi estudado em filamentos branquiais isolados e intactos, demonstrando

propriedades de transporte muito parecidas com as observadas pelas células C80. Os resultados sugerem que a tomada de Zn aqui relatada se dá por processo de transporte na membrana apical das brânquias. Um modelo experimental para o transporte de Zn em células de brânquias de lagostas é apresentado.

Palavras-chave: *Homarus americanus*, brânquias, zinco, cálcio, transporte de zinco.

ABSTRACT

Nowadays, little is known about heavy metal transport, mainly zinc (Zn) in lobster gill cells. To know more about this process, gill filaments of the American lobster, *Homarus americanus*, were dissociated in a physiological saline and separated into several cell types on a 30, 40, 50, and 80% sucrose gradient (C30, C40, C50 and C80). Cells from each sucrose solution were separately resuspended in physiological saline and incubated in $^{65}\text{Zn}^{2+}$ in order to assess the nature of metal uptake by each cell type. Characteristics of zinc accumulation by each kind of cell was investigated in the presence and absence of 10 mM calcium (CaCl_2), variable NaCl concentrations and pH values, and 100 μM verapamil, nifedipine (calcium channel inhibitors), and the calcium ionophore, A23187. $^{65}\text{Zn}^{2+}$ influxes were hyperbolic functions of zinc concentration (1-1000 μM) and followed the Michaelis-Menten kinetics. External calcium was neutral to cells C30, C40 and C50, but stimulatory for cells C80. However, calcium reduced both apparent zinc binding affinity (K_m) and maximal transport velocity ($J_{\max}$) for C30 cells, while doubling the apparent maximal transport velocity for C80 cells. Results suggest that calcium, sodium, and protons enter gill epithelial cells by way of an endogenous broad-specificity cation channel and trans-stimulate metal uptake by a plasma membrane carrier system. Differences in zinc transport observed between gill epithelial cell types appear related to apparent affinity differences of the transporters in each kind of cell. Low affinity cells C30 were partially inhibited by calcium, while high affinity cells C80 were stimulated. $^{65}\text{Zn}^{2+}$ transport was also studied by isolated, intact, gill filament tips. These intact gill fragments generally displayed the same

transport properties as did cells C80 and provided support for metal uptake processes being an apical phenomena. A working model for zinc transport by lobster gill cells is presented.

Key-words: *Homarus americanus*, gill, zinc, calcium, zinc transport.

INTRODUÇÃO

Os crustáceos constituem um grupo muito diverso de organismos, que habitam uma variedade grande de ecossistemas incluindo água doce, marinho e terrestre, devido à ampla radiação evolutiva do grupo (Lucu e Towle, 2003). Crustáceos são freqüentemente utilizados como bioindicadores e biomonitores em diversos sistemas aquáticos. Isso porque constituem um grupo de muito sucesso, distribuído em diferentes habitats e de grande interesse para investigações comparativas (Martinez *et al.*, 1999; Rinderhagen *et al.*, 2000).

Durante a evolução, organismos aquáticos e terrestres desenvolveram diversas estratégias para manutenção da homeostase de íons e de metais presentes no meio ambiente. As células utilizam os íons necessários para sua regulação e homeostase e excluem aqueles que não o são, mantendo a concentração interna dos íons em situação ótima (Perales-Vela *et al.*, 2006).

O aumento da independência em relação a flutuações no ambiente externo ocorreu com a alteração de diversas estratégias regulatórias como a diminuição da permeabilidade da superfície corpórea à água ou solutos, restrições na taxa de influxo e perda de íons, e tomada de íons através da modulação das funções de transporte (Lucu e Towle, 2003). As mudanças funcionais visando a adaptação ao ambiente envolvem mecanismos regulatórios encontrados nas células epiteliais tais como as brânquias,

tegumento, hepatopâncreas e glândula antenal, os quais permitem a passagem de íons entre o meio externo e a hemolinfa (Martinez *et al.*, 1999).

Abaixo do exoesqueleto, a membrana celular do epitélio consiste em uma barreira para a entrada de íons e metais, como ocorre para a entrada de substâncias químicas em qualquer célula, protegendo as rotas bioquímicas do organismo como um todo. A membrana celular é uma bicamada lipídica, com grupos hidrofóbicos direcionados para o lado interior e grupo hidrofílico para o lado exterior da membrana. A membrana celular também conta com diversas proteínas e estas são essenciais para passagem através da membrana de moléculas hidrofóbicas e íons, incluindo metais traço (Rainbow, 1997).

Em crustáceos, assim como em diversos invertebrados, as células epiteliais do sistema digestório, brânquias, tegumento e glândula antenal (rins) regulam a concentração de cálcio no sangue. Embora as atividades simultâneas das proteínas transportadoras de Ca estejam presentes nas membranas plasmáticas apical e basolateral destas células, os animais habitantes de tais ambientes como água do mar e água doce são capazes de manter concentrações fisiológicas adequadas deste cátion de modo que processos de demanda biológica como ecdise periódica e desenvolvimento/crescimento possam facilitar, sem danos, as funções sinalizadoras das células que demandam controle intracelular preciso da concentração de Ca (Mandal *et al.*, 2005).

A superfície dos crustáceos é recoberta por uma cutícula secretada pelas células do epitélio exterior. Pequenos crustáceos são tipicamente

permeáveis como um todo, enquanto que crustáceos maiores podem restringir a permeabilidade para regiões selecionadas, como as brânquias. Organismos marinhos são continuamente expostos às concentrações variáveis de metais na água do mar. Isso ocorre particularmente ao longo da costa, que é influenciada pelos contaminantes depositados antropogenicamente. Neste aspecto, moluscos, crustáceos e outros invertebrados marinhos são conhecidos por acumular altos níveis de metais pesados em seus tecidos e ainda assim sobrevivem nestes ambientes poluídos (Viarengo e Nott, 1993). Tal tolerância depende da habilidade destes animais em regular concentração de cátions de metal pesado dentro da célula e acumular excesso de metal sob formas não tóxicas (Viarengo e Nott, 1993).

Alterações na salinidade não só causam mudanças físico-químicas no meio, mas também na fisiologia dos crustáceos. No caso de crustáceos braquiúros estuarinos expostos à salinidade reduzida, os fluidos corpóreos são hipertônicos em relação ao meio e a água entra osmoticamente. O crustáceo responde ao aumento da entrada osmótica da água através do aumento na produção de urina, esta isotônica em relação à hemolinfa e, conseqüentemente, esse aumento é associado com a concomitante perda da maioria dos íons (Na, Ca) na urina (Rainbow, 1997).

1 – Lagostas

A Classe Malacostraca contém mais da metade (22.651) de todas as espécies conhecidas de crustáceos (38.000), bem como a maioria das formas maiores tais como caranguejos, lagostas e os camarões (Barnes, 1996).

A Ordem Decapoda contém os familiares camarões, lagostins, lagostas e caranguejos, possuindo como principal característica os 3 primeiros pares de apêndices torácicos denominados maxilípedes e brânquias firmemente fechadas pela lateral da carapaça. Os aproximadamente 10.000 decápodos descritos representam quase $\frac{1}{4}$ das espécies conhecidas. A maioria dos decápodos é marinha, mas os lagostins e alguns camarões e caranguejos invadiram a água doce e outros o ambiente terrestre.

As lagostas, lagostins e os camarões escavadores ainda possuem um grande abdômen estendido portando todo o complemento de apêndices e a carapaça é sempre mais longa do que larga. As lagostas são decápodos de corpos pesados e são geralmente habitantes de orifícios e fendas de fundos rochosos e coralinos (Barnes, 1996).

A cutícula de *H. gammarus* é altamente permeável a íons comparado com espécies osmorreguladoras de água doce ou ambiente estuarino. A carapaça desta lagosta é 650 vezes mais permeável do que a carapaça do caranguejo *E. sinensis* e 4500 vezes mais permeável que a carapaça do

lagostim de água doce, *A. leptodactylus* (Haond *et al.*, 1998). A cutícula da lagosta *Homarus americanus* é também muito permeável e grande perda de íons provavelmente ocorre através da cutícula em lagostas aclimatadas a baixas salinidades, prevenindo da manutenção da alta osmolalidade da hemolinfa. A capacidade osmorregulatória das lagostas é, desse modo, limitada. A hemolinfa tem osmolalidade de aproximadamente 610mOsmKg⁻¹ e 500mOsm em salinidade de 17‰ (Haond *et al.*, 1998). As lagostas são também conhecidas por acumular altas concentrações de metais (Ag, Cd, Cu, Mn, Zn) do meio ambiente e por sintetizar metalotioneína que se liga aos metais no hepatopâncreas (Chou *et al.*, 2002). Devido à distribuição espacial e temporal de metal nas lagostas, estes podem também variar sazonalmente (Chou *et al.*, 2002).

A lagosta americana *Homarus americanus* pode atingir um comprimento de 60cm e um peso de 22Kg. São capturadas comercialmente em potes ou armadilhas, nas quais o animal entra procurando abrigo ou isca. A população de lagostas ao longo das costas da Nova Inglaterra e do Canadá foi extremamente reduzida pela pesca, e as grandes capturas são hoje empreendidas em alto mar, ao longo da plataforma continental e nas bordas desta (Barnes, 1996). A lagosta americana participa da Ordem Decapoda, Subordem Pleocyemata, Infraordem Astacidea, composta por lagostins e lagostas com garras grandes. Possui cefalotórax mais ou menos cilíndrico, abdômen bem desenvolvido e achatado dorsoventralmente (Barnes, 1996).

Homarus americanus é encontrada principalmente ao longo da costa leste dos EUA e Canadá, de Cape Hatteras (Carolina do Norte) até o Oceano Ártico e habitam áreas remotas tanto quanto áreas próximas aos centros populacionais. Como possuem distribuição migratória, as lagostas têm alta probabilidade de serem expostas a contaminantes antropogênicos presentes e/ou seus resquícios nas águas costeiras. Metais traço de particular interesse como Cu, Cd e Zn normalmente são encontrados nos tecidos das lagostas e participam de processos fisiológicos e bioquímicos que regulam estes mesmos metais (Engel *et al.*, 2001).

2 – Brânquias

As brânquias de *Homarus americanus* apresentam morfologia externa e vascular basicamente similar às demais lagostas e lagostins, possuindo um complemento de 20 brânquias em cada lado do corpo, distribuídas como se segue: uma brânquia no segundo e três brânquias no terceiro maxilípedes, e quatro brânquias em cada uma das patas, exceto as primeiras, que possuem três, e as últimas, que possuem somente uma (Barnes, 1996). A brânquia é composta por um eixo central ao longo do qual as extensões ou ramos laterais se arranjam. A estrutura dos ramos branquiais varia entre os decápodos. No eixo de cada brânquia, ocorrem canais branquiais aferentes e eferentes. O sangue flui a partir do canal aferente para o interior de cada filamento ou lamela e depois de volta para o interior do canal eferente (Barnes, 1996). A corrente ventilatória é produzida pelo batimento de um escafognatito ou alça branquial em forma de remo, uma projeção da segunda maxila. A água é puxada para frente e a corrente exalante flui para fora, anteriormente, em frente

à cabeça (Barnes, 1996). A água é movida (bombeada) para as brânquias posteriormente na maioria das espécies, incluindo as lagostas, mas é interrompido em intervalos irregulares por “batidas reversas” que propiciam a volta da água pelas brânquias (Wilkens e McMahon, 1972). A epipodite e o lado interno dos branquiostegitos não mostram alterações anatômicas como dobras para aumentar área de superfície para troca de íons. Epipodites são órgãos lamelares e o lado interno dos branquiostegitos em lagostas é quase uma superfície plana (Haond *et al.*, 1998).

Para muitos animais aquáticos, as brânquias são órgãos muito importantes para manutenção da vida, provêem uma interface seletiva entre meios externo e interno e em animais marinhos são cruciais para respiração, excreção, balanço ácido-básico e regulação iônica e osmótica (Bhavan e Geraldine, 2000 ;Wu e Chen, 2004; Romano e Zeng, 2007; Tsai e Lin, 2007). O epitélio branquial é o epitélio de maior contato entre os meios interno e externo o qual é sempre osmoticamente hostil e frequentemente está significativamente poluído (Wood, 1992). As brânquias anteriores, caracterizadas por possuir epitélio delgado, são tidas como predominantemente responsáveis pelas trocas gasosas (Romano e Zeng, 2007). Em contraste com a vasta literatura nos aspectos bioquímicos e fisiológicos das brânquias de crustáceos, as informações relacionadas com arquitetura e ultraestrutura deste órgão é bastante escassa (Martinez *et al*, 1999).

Animais aquáticos, quando expostos a metais pesados, têm as brânquias como primeiro local de entrada de metais e atua como transiente

para acúmulo de metais e, além disso, o dano direto para as estruturas branquiais e funções é causado pela exposição a altos níveis de metais pesados. (Hogstrand *et al.*, 1995; Wu e Chen, 2004). O primeiro local de impacto das águas poluídas nos peixes de água doce são as brânquias e o acúmulo de metal no epitélio respiratório é assumido como a causa inicial do dano (McGeer *et al.*, 2000). Substâncias tóxicas podem causar danos ao tecido branquial, reduzindo o consumo de oxigênio nos organismos aquáticos (Bhavan e Geraldine, 2000).

A água do mar costeira é geralmente contaminada por diversos tipos de poluentes devido às atividades humanas. Os metais pesados são os poluentes mais comuns em diversas áreas costeiras. A concentração de Zn em águas costeiras foi detectada variando de 4-800 ug/L (Wu e Chen, 2004). Usualmente, a água contaminada com Cu ou Zn interfere na atividade respiratória das brânquias de crustáceos, resultando na redução da transferência de gases e na sua eficiência, como também na diminuição do desempenho respiratório. Foi observado também a redução do consumo de O₂ e do desempenho cardíaco (Harris e Santos, 2000). Animais que habitam áreas cronicamente poluídas fazem ajustes em seus processos regulatórios para contra-atacar esses efeitos dos metais e assim manter a homeostase (Harris e Santos, 2000).

Poluentes como os metais pesados são também encontrados em sedimentos atingidos por esgotos e podem ser prejudiciais para invertebrados bentônicos expostos e carregados através da dieta, incluindo os seres humanos,

já que estes consomem frutos-do-mar. Diversos estudos têm demonstrado a capacidade de organismos bênticos próximos a esgotos em acumular metais (Morales-Hernández *et al.*, 2004). Recentemente, alguns autores têm reconhecido o paradoxo onde a água pode ser ao mesmo tempo fonte vital e também veículo para eliminação de poluentes. Esse paradoxo pode ser considerado como parte da crise ambiental atual que está inserida no conflito entre natureza e tecnologia. De acordo com Kriiger (2001), o paradigma para estabelecimento de condições homeostáticas em sistemas naturais devem ser inclusos em processos de monitoramento. Este paradigma é acompanhado pelo emprego de biomarcadores, previamente definidos para mensuramento de fluidos corpóreos, células ou tecidos que indicam em termos bioquímicos e celulares a presença de contaminantes (Monserrat *et al.*, 2006). Essa definição vem tentando incluir parâmetros de comportamento, agora reconhecidos por serem extremamente importantes em estabelecer interferências ecológicas como observações bioquímicas e/ou responsabilidades fisiológicas (Monserrat *et al.*, 2006).

3– Metais Pesados

O termo metal pesado se refere a elementos de transição e de pós transição da tabela periódica (Viarengo e Nott, 1993).

Metais de transição (Cu, Zn, Fe, Co, Se, Mn) são essenciais para a saúde da maioria dos organismos, formando componentes integrantes de proteínas envolvidas em todos os aspectos das funções biológicas. Sua ubiquidade é “governada” por suas habilidades em formar uma gama grande

de coordenadas geométricas e estados de redox, que permitem a esses elementos a interação com muitas entidades celulares, atuando ambigualmente na respiração celular, transporte de oxigênio, estabilidade protéica, “limpeza” de radicais livres, e ação de diversas enzimas celulares, bem como na transcrição do DNA. No entanto, em excesso podem ser tóxicos, ligando-se inapropriadamente às moléculas sensíveis ou formando perigosos radicais livres. Conseqüentemente, há um fino balanço entre a deficiência do metal e isso é vital para que os organismos mantenham homeostase através do balanço entre absorção e excreção (Bury *et al.*, 2003).

Metais pesados são normalmente constituintes de organismos e alguns deles como Cu, Zn e Co são essenciais em concentrações traço para crescimento e desenvolvimento normais. Outros como Hg e Cd não apresentam funções biológicas, mas também são acumulados pelos animais (Canli e Furness, 1993). Metais traço, incluindo aqueles definidos como metais pesados, provenientes de atividades industriais e mineiras são descartados nas águas costeiras e estuarinas em diversos locais (Harris e Santos, 2000). A mineração é considerada uma das mais importantes fontes antropogênicas de metais pesados, juntamente com queima de combustível fóssil, incineração, processo e produção de químicos, despejo industrial associado a atividades com extração de metal, e representam ameaças contínuas ao ambiente aquático (Martín-Díaz *et al.*, 2005).

Após o desastre de Minamata que ocorreu no Japão em 1956, que causou muitas doenças humanas, como perda parcial da visão, perda de

coordenação motora, anormalidades neurológicas, distúrbios hormonais e enzimáticos, muita atenção foi dada à poluição por metais pesados e muitos experimentos têm sido feitos para examinar o acúmulo e efeitos tóxicos de metais essenciais ou não (Canli e Furness, 1993).

Problemas de poluição são comuns na costa do Atlântico Norte, derivado do despejo de metais, nutrientes e compostos orgânicos. Em diversos sistemas os efeitos diretos e indiretos de poluentes têm causado impactos ambientais e econômicos. Impacto ambiental inclui o acúmulo de contaminantes no biota, aparente aumento de anomalias de reprodução e desenvolvimento relacionados com a poluição, e alterações nas condições físicas, fisiológicas e bioquímicas de peixes e invertebrados (O'Connor e Charmantier, 1998).

Metais pesados são tomados e acumulados por organismos aquáticos, tanto pelo meio em que vivem como também via dieta. Muitos metais traço atuam como metais essenciais no metabolismo, e todos possuem potencial para causar efeitos ecotoxicológicos. O bioacúmulo químico em organismos aquáticos resulta da exposição de químicos através de múltiplas rotas. O resíduo químico no tecido dos organismos representa a dose agregada para determinação de efeitos de contaminantes bioacumulativos (Martín-Díaz *et al.*, 2005). Metais traço acumulados requerem detoxificação fisiológica, tipicamente pela ligação com grânulos inorgânicos de alta afinidade, freqüentemente com base fosfato, ou são direcionados para uma proteína detoxificatória, como metalotioneína ou ferritina (Rainbow, 1997).

A baixa dose de metais pesados aos quais os organismos aquáticos são expostos pode resultar em diversas manifestações e alterações bioquímicas, fisiológicas e histológicas em tecidos primários. Essas alterações têm sido demonstradas em crustáceos, por exemplo, *Palaemoneta pugio* e muitos exemplares da espécie *Macrobrachium* sp que foram expostos à diversos químicos no meio ambiente, incluindo Cu, Zn, Cd e Hg (Li *et al.*, 2007). Diversos efeitos adversos têm sido descrito na fisiologia dos crustáceos, especialmente osmorregulação, respiração, absorção, armazenamento e secreção (Li *et al.*, 2007).

Metais pesados divalentes, como Cd, Zn e Co têm sido demonstrados como perturbadores da tomada branquial de Ca em peixes de água doce. Inibição da tomada de Ca pelos metais é principalmente devido à interferência com a extrusão basolateral de Ca, embora haja também competição com Ca no canal de Ca sensível a lantânio presente nas células de cloreto ricas em mitocôndrias nas brânquias de peixes (Bury e Wood, 1999). Metais pesados são conhecidos pelos seus efeitos deletérios nos processos de tomada de íons. Em peixes de água doce, o principal local de toxicidade para metais pesados são as brânquias, onde estes metais primariamente inibem o transporte de enzimas na membrana basolateral. Para exercer esta ação tóxica, o metal tem que entrar na brânquia e atravessar o citoplasma. Existem evidências de que a rota de entrada nas brânquias de peixes para metais pesados é ligada ao processo de tomada de cátions, o qual é perturbado pelos metais (Bury e Wood, 1999).

3.1 – Zinco

O zinco (segundo elemento traço mais abundante no organismo) é um micronutriente com função ativa em diversos sistemas enzimáticos, devido à sua importância estrutural vital e/ou catalítica em mais de 300 proteínas envolvidas na transcrição e tráfego de proteínas e na variabilidade celular (Canli e Furness, 1993). Possui também funções importantes no desenvolvimento, reprodução, crescimento, visão e funções imunológicas (Bury *et al.*, 2003), como também é tóxico em concentrações elevadas (Chowdhury *et al.*, 2003; Mandal *et al.*, 2006). O zinco é utilizado como centro ativador de metaloenzimas e de outros sistemas enzimáticos (anidrase carbônica), enquanto que o cobre é parte integral do pigmento respiratório, hemocianina, a contar pelos altos índices de cobre observados no hepatopâncreas. Devido ao fato que esses metais são essenciais, eles também são fonte de grandes regulações, sendo detoxificados pela metalotioneína, eliminados por excreção através das fezes e/ou urina, e via hemolinfa através de órgãos excretórios ou brânquias (Alcorlo *et al.*, 2006).

A atividade intracelular de zinco é correlacionada com o fato da célula possuir processos como proliferação, diferenciação, apoptose e modificações da homeostase do zinco que estão ligados a diversas patologias que afetam humanos em qualquer estágio de vida. Essa homeostase resulta da regulação coordenada por diferentes proteínas envolvidas na tomada, excreção e estocagem/tráfego intracelular de zinco (Mandal *et al.*, 2006).

O zinco é um importante micronutriente para os organismos aquáticos incluindo os peixes, mas pode ser tóxico por interferir na tomada de Ca e no seu metabolismo quando o Zn estiver presente em concentrações altas. Em peixes, o Zn pode ser assimilado através da fase aquosa ou da dieta (Zhang e Wang, 2005). O Zn em elevadas concentrações pode impedir a tomada branquial de Ca^{2+} . Em *Salmo trutta*, uma concentração letal de Zn causa uma cadeia de perda de Ca^{2+} , por afetar tanto as variáveis de influxo quanto efluxo (Hogstrand *et al.*, 1995). No entanto, peixes expostos cronicamente ao zinco regulam fisiologicamente e a exposição prolongada envolve redução progressiva no influxo branquial de zinco e restauração de cálcio no plasma (Niyogi e Wood, 2006).

Para a fase aquosa do zinco, as brânquias e o intestino são os melhores “pontos” de absorção (Zhang e Wang, 2005). O metabolismo de zinco nas lagostas e no caranguejo azul (siri) é similar e aparentam ser regulados, mas se as lagostas forem alimentadas com altas concentrações de Zn (através das ostras), elas poderão acumular quantidades significativas de zinco que serão retidas com o passar do tempo (Rainbow, 2007). O zinco também é abundante nos sedimentos, onde as lagostas utilizam como habitat (Engel *et al.*, 2001).

Crustáceos decápodos, incluindo caranguejos, mantêm relativamente constante e baixo os níveis corpóreos quando expostos a concentrações de zinco dissolvido na água do mar, devido à baixa permeabilidade integumental

aos metais. A cutícula também pode atuar como rota na tomada e acúmulo de metais em algumas espécies de crustáceos (Harris e Santos, 2000).

A lagosta, em particular, é uma espécie que apresenta diversos caminhos/rotas para bioacumulação de metais e outros poluentes, absorvendo pela superfície branquial, ingestão de água e sedimentos e através do consumo de organismos que já estão acumulados por metais (Morales-Hernández *et al.*, 2004).

Cu e Zn inibem também a Na/K ATPase e pode interagir com o carreador de Na e Cl. Cu e Zn podem atuar diretamente nos receptores alfa adrenérgicos e, além disso, metais pesados alteram a permeabilidade da membrana celular (Crespo e Karnaky, 1983).

4 – Transporte de Zinco

Com o passar dos anos, extensos estudos têm sido conduzidos na tomada de metais na água pelos peixes, que é intimamente relacionada com a toxicidade aguda. Muitos focam a tomada branquial de metais pesados pelos peixes na água e mecanismos fisiológicos envolvidos neste processo (Zhang e Wang, 2007).

Muitos dos metais entram passivamente nas células transportados através de células da membrana apical por canais de membrana onde há locais de grande afinidade. Geralmente é assumido que há canais específicos para cada íon de metal essencial, mas há potencial para qualquer íon de metal

entrar via outros canais de acordo com as características seletivas de cada canal, o tamanho da molécula do metal, se está hidratado ou não, custo de desidratação, etc. Claramente, metais não essenciais também entram nas células e o fazem também por canais onde entram os metais essenciais ou íons como o Ca (Rainbow, 1997).

Íons zinco são hidrofílicos e não atravessam as membranas celulares por difusão passiva. Transportadores de zinco localizados na membrana plasmática das células e com vesículas intracelulares sem dúvida influenciam o metabolismo de zinco (Cousins e McMahon, 2000). Fora da membrana apical, o metal precisa ser quimicamente compatível com o canal de membrana para entrar pelo mesmo ou deve estar ligado a uma proteína da membrana. Geralmente, os metais são considerados biodisponíveis quando estão sob forma livre.

Estudos com epitélio gastrointestinal demonstrou a capacidade desse epitélio em seqüestrar e detoxificar os metais pesados do meio ambiente. Este processo de detoxificação ocorre em 3 etapas: (1) entrada do metal no citoplasma da célula epitelial através da membrana plasmática; (2) transporte para compartimentos endossômicos e complexação com enxofre ou fósforo; (3) exocitose através da membrana luminal das células hepatopancreáticas e perda através da excreção (Martinez *et al.*, 1999). Recentes evidências sugerem que a tomada apical de Cd e Zn nas brânquias ocorre através do transporte de Ca apical nas células do epitélio branquial (Glynn, 2001).

5 – Cálcio

O cálcio possui função biológica muito importante entre as células eucarióticas, atuando em uma gama grande de reguladores e sinalizando rotas entre as células. A modulação desta atividade no citosol é crucial para a variabilidade e sobrevivência celular (Mandal *et al.*, 2005). O cálcio é de primordial importância para os crustáceos porque cristais de carbonato de cálcio (CaCO_3) devem ser depositados no novo exoesqueleto para seu enrijecimento após a ecdise (troca de exoesqueleto) (Zanotto *et al.*, 2004).

Exposições prolongadas ao Ca podem resultar em apoptose, onde há aumento citosólico da concentração de Ca podendo dificultar e até inibir sinais de transdução (Mandal *et al.*, 2005). A atividade intracelular de Ca é em qualquer momento estabelecida pela integração da atividade de transportadores e canais de Ca da membrana plasmática e por organelas que possuem mecanismo de seqüestro (Mandal *et al.*, 2005).

O gradiente de concentração iônica promove tomada de Ca via canais apicais e é mantido pelo bombeamento ativo de Ca para fora da célula, através de Ca-ATPase na membrana basal no caso de ionócitos em crustáceos decápodos (Rainbow, 1997). A tomada apical de cálcio é amplamente passiva, envolvendo também canais e trocadores eletroneutros/eletrogênicos $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^+$ (Wheatly *et al.*, 1999).

No caso de crustáceos, a concentração de Ca na água do mar é em torno de 10mM enquanto que a concentração intracelular é de 20 μM . A

tomada de Ca via canal de cálcio na membrana apical é, além disso, passivo e por gradiente eletroquímico. A baixa concentração intracelular é mantida por uma bomba ativa que faz o efluxo através da membrana basal dos ionócitos branquiais para a hemolinfa, envolvendo a Ca-ATPase basal, e/ou interação entre Na/K ATPase e anidrase carbônica (Rainbow, 1997).

6 – Transporte de Cálcio

Recentemente diversos estudos com crustáceos (tecido epitelial) indicam que a membrana plasmática, mitocondrial e lisossomal possuem proteínas que atuam no transporte de Ca e de metais pesados como Cu, Zn e Cd (Mandal *et al.*, 2005). Esses estudos sugerem que mecanismos regulatórios da atividade intracelular de Ca podem ser interrompidos ou até mesmo abolidos na presença de concentração significativa de metais pesados (Mandal *et al.*, 2005).

Hoje existem evidências que Zn, Cd e Co entram nas brânquias de peixe de água doce via canal de Ca situado na membrana apical. Na presença de aumento das concentrações de Ca no ambiente, a afinidade do sistema de transporte para Zn, Cd e Co diminuem, ilustrando competição entre Ca e os respectivos íons metais (Bury e Wood, 1999). Recentemente foi observado que níveis subletais de Zn na água competitivamente inibem o influxo branquial de Ca^{2+} de *Oncorhynchus mykiss* (truta), sugerindo novamente que Zn e Ca possam competir pelos mesmos sítios de tomada (Hogstrand *et al.*, 1995).

Uma simples interação competitiva entre Ca e Zn na superfície de brânquias podem também explicar o tão bem conhecido efeito protetor quando há aumento da concentração de Ca na água em peixes expostos ao Zn^{2+} . Estudos indicam que Zn afeta a permeabilidade apical de Zn e Ca de maneira similar, pela inibição da Ca-ATPase, trocador responsável pela saída basolateral de Ca^{2+} na membrana celular dos animais (Glynn, 2001).

JUSTIFICATIVA

O zinco, por ser um metal essencial presente no ambiente marinho, torna-se importante verificar a concentração de zinco que as células branquiais são capazes de retirar do ambiente e, dessa forma, desenhar um modelo fisiológico para esse transporte.

Além de ser essencial, o zinco é um micronutriente que em determinada concentração torna-se tóxico. Dessa forma, pretende-se verificar se altas concentrações de zinco (concentração no ambiente aquático é de $25\mu\text{M}$), influem na fisiologia das lagostas e se a presença de cálcio atua como competidor/inibidor ou catalisador da tomada de zinco pelas células branquiais. Além de ser um íon divalente, o cálcio é encontrado em altas concentrações no ambiente marinho (10mM).

OBJETIVOS

---

1 – Objetivos Gerais

O objetivo deste trabalho é verificar a tomada de ^{65}Zn através dos 4 tipos de células branquiais da lagosta americana (*Homarus americanus*), na presença e ausência de cálcio.

2 – Objetivos Específicos

- Verificar o transporte de zinco em células presentes em diferentes gradientes de sacarose, na presença e ausência de cálcio e de bloqueadores de canais de cálcio (verapamil e nifedipina), visando observar se o transporte de zinco é dependente ou não da presença de cálcio no meio externo;

- Verificar o efeito do pH e do ionóforo de cálcio (A23187) na entrada de zinco pela membrana celular das células branquiais;

- Verificar o efeito de variação de concentração de NaCl (40 e 400mM) no transporte de zinco nas células de brânquias;

- Além do emprego de inibidores de canais de cálcio, variações de pH e de salinidade, há o objetivo de verificar a tomada de zinco em diferentes concentrações de zinco no meio externo;

- A partir dos experimentos realizados será proposto um modelo fisiológico para a caracterização do transporte de zinco nas diferentes células branquiais da lagosta americana, *Homarus americanus*

MATERIAL E MÉTODOS

---

1 – Animais

Lagostas macho (*Homarus americanus*) com peso médio de 500 $\pm$ 5g foram adquiridas em lojas especializadas em peixes em Jacksonville (FL) e mantidas em tanques com água do mar a 15°C. Os animais foram mortos através de denervação seguida pela remoção do coração.

2 – Soluções

As salinas utilizadas para a separação e transporte das células foram as seguintes:

Solução salina de dissociação (mmol.l⁻¹): 27 citrato de sódio, 440 NaCl, 3 KCl, 5 NaH₂PO₄.2H₂O, 5.6 Na₂SO₄, 10 glicose, 1 EDTA, 1 PMSF.

Solução salina de transporte (mmol.l⁻¹): 467 NaCl, 10 KCl, 1 NaH₂PO₄, 4NaHCO₃, 8.4Na₂SO₄, 30 Hepes, 10 glicose, 1 EDTA.

3 – Dissociação Celular

Os tecidos das brânquias foram separados em suspensão de células através de cortes em pedaços com auxílio de lâmina e adição da seguinte solução isosmótica (mmol.l^{-1}): 27 citrato de sódio, 440 NaCl, 3 KCl, 5 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 5.6 Na_2SO_4 , 10 glicose, 1 EDTA e 1 PMSF.

Esta mistura foi mantida em gelo e colocada em agitador orbital durante 20 minutos para dissociação das células dos tecidos ainda presentes. A suspensão celular resultante foi filtrada em gaze para remoção de tecido não dissociado. As células foram então centrifugadas a 100g (4°C) por 10 minutos e o pellet resultante foi re-suspenso na mesma solução salina.

O pellet re-suspenso foi centrifugado em gradiente descontínuo de sacarose contendo 30, 40, 50 e 80% de sacarose na mesma solução de separação celular (Srinivas *et al.*, 2004). As células foram removidas das soluções de sacarose e re-suspensas em solução salina para os experimentos em transporte.

4 – Transporte de Zinco

A caracterização do transporte de zinco nas brânquias da lagosta foi realizada em temperatura ambiente (23°C). Os experimentos foram iniciados pela diluição de um pequeno volume de suspensão de células (20µL) em meio salino contendo concentrações traço de $^{65}\text{ZnCl}_2$. A composição da suspensão final de células e os meios de incubação são descritos separadamente para cada experimento. A tomada do Zn radioativo foi iniciada pela rápida homogeneização de 20µL de suspensão de células, incubadas anteriormente em solução isosmótica (pH 7.2) com 180µL de solução de transporte (descrita anteriormente) e incubadas por tempos pré-determinados. O transporte foi suspenso pela adição de 2ml de solução salina gelada (stop solution – diluição 10X) e a suspensão foi imediatamente coletada por uma bomba de vácuo em um filtro Millipore (HAWP, 45µm de diâmetro), utilizando técnica de filtração Millipore desenvolvida por Hopfer et al. (1973). Estes filtros coletados da bomba foram então dissolvidos em líquido de cintilação (Ecolume, Beckman, Fullerton, CA, USA) e a radioatividade medida em Contador de Cintilação Multi-uso Beckman Coulter LS6500 que tem o seguinte princípio de operação: o líquido de cintilação envolve a detecção e quantificação do decaimento radioativo. A amostra radioativa é combinada com o coquetel de líquido de cintilação e o decaimento da radioatividade produz partículas de ionização. Parte da energia cinética da partícula de ionização é transferida para o “cintilador” que converte a energia da partícula emitida durante o processo de decaimento em luz, a qual é detectada pelo sistema LS6500. O número de fótons produzido de uma partícula ionizante é proporcional à sua energia de

cinética. Todos os fótons produzidos por uma partícula de ionização são emitidos em escala de tempo de nano-segundos.

O sistema óptico do LS6500 direciona os fótons emitidos por 2 tubos fotomultiplicadores (PMT's). Se os PMT's são ativados por um fóton, então o evento de decaimento nuclear é registrado e convertido em um pulso elétrico mensurável. O pulso de voltagem produzido pelos PMT's é proporcional ao número de fótons. Conseqüentemente, a altura do pulso na saída dos tubos é proporcional à energia da partícula. Os pulsos provenientes dos PMT's são analisados, convertidos para forma digital, e armazenados em canais apropriados de um analisador multicanal correspondente à energia da partícula. Os dados acumulados no analisador multicanal sobre o tempo de análise da amostra são utilizados para determinar a energia das partículas e a taxa (cpm – contagem por minuto) de decaimento radioativo das amostras.

A tomada de isótopo é expressa em nmol/mg proteína x segundo. A dosagem protéica das células foi determinada pelo método Bradford (Bradford, 1976) utilizando albumina de soro bovino como padrão.

Em alguns experimentos, o influxo de $^{65}\text{Zn}^{2+}$ foi medido para determinar as constantes da cinética de transporte e os dados destes experimentos são apresentados em nmol/mg proteína /seg. Para o estudo de cinética de influxo, foram obtidos os “brancos”, onde o isótopo e as células simultaneamente incubados em meio salino a 0°C são rapidamente filtrados para que o transporte não ocorra. O isótopo aderido às células sob essas condições é

subtraído da tomada em temperatura ambiente para estimar a quantidade de isótopo acumulado somente pelos processos de transporte.

Transporte de $^{65}\text{Zn}^{2+}$ (25 μM) em células isoladas e purificadas foi realizado em solução salina com e sem 10mM CaCl_2 por período de 0, 10, 20, 60 e 300 segundos. O mesmo protocolo foi utilizado para cada grupo de célula separado nos 4 gradientes de sacarose (30, 40, 50 e 80%). Outros experimentos de transporte de zinco foram realizados com células dos grupos de 30 e 80% de sacarose com efeito do pH (6.0 e 7.1).

5 – Variáveis

Os efeitos de 100 μM de verapamil e nifedipina (bloqueadores de canais de cálcio) no transporte de zinco foram mensurados nas células de 30 e 80% sacarose tanto na presença quanto na ausência de 10mM CaCl_2 em período de incubação de 0 a 300 segundos. Em outros experimentos, para testar os efeitos de concentrações externas de sódio na tomada de zinco, células foram isoladas em gradiente de 80% sacarose e incubadas em salina contendo 40 ou 400mM NaCl e 100 μM verapamil. A tomada de $^{65}\text{Zn}^{2+}$ pelas células isoladas nos gradientes 30 e 80% de sacarose também foi mensurado na presença do ionóforo de cálcio (A23187) para verificar a influência de rotas adicionais de cálcio no transporte do metal.

Em alguns casos, experimentos com filamentos intactos das brânquias foram realizados. Nesse caso, a metade distal dos filamentos branquiais

selecionados foram removidos do animal, incubados em salina contendo $^{65}\text{Zn}^{2+}$ por intervalos de tempo pré-determinados, enxaguados em solução salina gelada para remoção de isótopo não específico aderido e dissolvido em HCl para que fosse possível “recuperar” toda a atividade celular antes da avaliação do isótopo no contador de cintilação. A concentração de proteína foi determinada anteriormente e normalizada para a concentração final de 1mg/ml.

6 – Análise Estatística

Os experimentos foram realizados em triplicatas em 4 animais diferentes. Os dados foram analisados no software Sigma Plot 10.0. Análises estatísticas foram realizadas no software SPSS. Teste t (Student) foi realizado para comparar os pontos máximos para tomada de zinco entre as diferentes células. ANOVA de duas vias foi utilizado para comparar os diferentes tratamentos com inibidores na presença e ausência de Ca e para a tomada de Zn em relação à concentração de zinco. Uma vez que os dados não obedecessem aos pressupostos da ANOVA, estes eram transformados em logaritmo na base 10.

RESULTADOS

Fig 1: Efeito de 10mM de Ca^{2+} na tomada de $25\mu\text{M}$ ^{65}Zn (nmol.mg proteína $^{-1}$) em células branquiais dissociadas e por diferentes tipos celulares separados por gradiente descontínuo de sacarose. (A) Transporte de Zn por células totais das brânquias; (B) Transporte de Zn nas células em 30 % de sacarose (C30); (C) Transporte de Zn em células em 40% de sacarose (C40); (D) Transporte de Zn nas células em 50% de sacarose (C50); (E) Transporte de Zn em células em 80% de sacarose (C80). Média $\pm$ SE. N=4. Asteriscos denotam diferenças significativas para transporte de Zn em 300seg (teste t).

1 – Efeito de CaCl_2 no transporte de zinco nas células branquiais

A Figura 1A demonstra que a tomada de $25 \mu\text{M } ^{65}\text{Zn}^{2+}$ nas células branquiais combinadas foi mais alto quando Ca não estava presente no meio de incubação do que quando havia 10mM CaCl_2 presente no meio no período de 300 segundos de incubação (Teste t, $P=0.03$). A mesma resposta foi observada quando a tomada de zinco foi mensurada nas populações de células isoladas nos gradientes de sacarose de 30 a 50% (C30 a C50; Figuras 1B, 1C e 1D), mas a tendência não foi significativa (Teste t, $P>0.05$). No entanto, na Figura 1E, ao contrário dos demais resultados, a presença de 10mM Ca^{2+} aumentou o transporte de $^{65}\text{Zn}^{2+}$ nas células isoladas em sacarose 80% (C80; Teste t, $P=0.001$).

Observações visuais das células branquiais no gradiente descontínuo de sacarose indicam que as células C30, C40 e C50 aparentemente são menores e de coloração mais clara do que as células C80 e sugere-se que as células isoladas das regiões menos densas do gradiente de sacarose são similares entre si e apresentam grandes diferenças das células encontradas no gradiente obtido do fundo do tubo que corresponde ao gradiente de 80% de sacarose.

Fig 2: Efeito de 10mM Ca^{2+} e variação pH (pH 6 ou 7.1) na tomada de 25 μM de ^{65}Zn (nmol.mg proteí $^{-1}$) pelas C30; (A) C80 (B). Média $\pm$ SE. N=4. Asteriscos denotam diferenças significativas entre os tratamentos (ANOVA).

2 – Efeito do pH no transporte de zinco nas células branquiais

A Figura 2A demonstrou que o transporte de $25\mu\text{M } ^{65}\text{Zn}^{2+}$ pelas C30 foi maior na ausência de 10mM Ca^{2+} em pH 7.1 do que em pH 6.0 (ANOVA, $P<0.0001$). A tomada de $^{65}\text{Zn}^{2+}$ na presença de 10mM Ca foi menor e independente do pH (Student's Newman-Keuls, $P>0.05$). O resultado oposto foi obtido nas C80, quando a tomada de zinco foi mensurada tanto na presença de cálcio quanto com variação da concentração de prótons. Nesta instância, a máxima tomada de zinco ocorre quando 10mM Ca e pH 6.0 estão presentes no meio de incubação (Fig. 2B; ANOVA, $P<0.0001$), sugerindo que os íons cálcio e os prótons são aparentemente estimuladores do acúmulo de metal por estas células.

Fig 3: Efeitos de 10mM Ca^{2+} , 100 μM verapamil e 100 μM nifedipina na tomada de 25 μM ^{65}Zn (nmol.mg proteína⁻¹) pelas C30, C80 e filamentos branquiais intactos. (A) Transporte de zinco em C30 $\pm$ verapamil; (B) Transporte de zinco em C80 $\pm$ verapamil; (C) Transporte de zinco pelos filamentos branquiais $\pm$ verapamil; (D) Transporte de zinco por C80 $\pm$ nifedipina; (E) Transporte de zinco pelos filamentos branquiais $\pm$ nifedipina. Média $\pm$ SE. N=4. Asteriscos denotam diferenças significativas entre tratamentos (ANOVA).

Fig 4: Efeitos da variável NaCl (400 e 40mM) e 100 μ M verapamil na tomada de 25 μ M de ^{65}Zn (nmol.mg proteína $^{-1}$) pelas células da brânquias C80 e incubadas em meio livre de cálcio. (A) Transporte de zinco em 400mM NaCl $\pm$ verapamil; (B) Transporte de zinco em 40mM NaCl $\pm$ verapamil. Média $\pm$ SE. N=4. Asteriscos denotam diferenças significativas entre tratamentos (ANOVA).

3 – Efeitos do verapamil e nifedipina no transporte de zinco nas células branquiais

Para verificar se há contribuição de canais de cátion para a tomada de zinco pelas células epiteliais das brânquias de lagostas, verapamil e nifedipina (bloqueadores de canais de cálcio) foram utilizados em C30 e C80 e filamentos intactos de brânquias. A Figura 3A demonstra que a tomada de $^{65}\text{Zn}^{2+}$ foi maior nas C30 na ausência de 10mM Ca^{2+} e ausência de $100\mu\text{M}$ de verapamil, mas foi a mais baixa quando ambos estiveram juntos no meio de incubação (ANOVA, $P=0.006$). Esses resultados sugerem que $^{65}\text{Zn}^{2+}$ pode utilizar canais de cátion sensíveis ao verapamil quando são transportados nas C30. No entanto, para C80 (Fig. 3B) e filamentos branquiais intactos (Fig. 3C), o oposto foi verificado, que consiste no baixo transporte de $^{65}\text{Zn}^{2+}$ na ausência de 10mM Ca^{2+} e $100\mu\text{M}$ verapamil, e apresentando maior tomada na presença de 10mM Ca^{2+} e ausência de $100\mu\text{M}$ verapamil (ANOVA, $P<0.0001$ para C80 e $P=0.001$ para filamentos branquiais). Esses resultados sugerem que tomada de $^{65}\text{Zn}^{2+}$ pelas C80 e filamentos intactos aparentemente é estimulada pelo cálcio externo e também utiliza canais catiônicos sensíveis à verapamil para entrada nas células branquiais.

Como observado nas figures 3D e 3E, nifedipina, um segundo bloqueador de canais de cálcio, apresenta efeitos semelhantes na tomada de $^{65}\text{Zn}^{2+}$ pelas C80 e filamentos intactos na presença e ausência de 10mM cálcio como demonstrado previamente para o verapamil (Figs 3B e 3C). A maior tomada de zinco foi registrada nas C80 e células dos filamentos branquiais,

onde ocorreu na ausência do inibidor e na presença de 10mM Ca^{2+} , enquanto que a menor tomada de zinco ocorreu na ausência de cálcio e presença de nifedipina (ANOVA, $P < 0.0001$ para C80 e $P = 0.003$ para filamentos branquiais). Esses resultados, como os encontrados com verapamil, sugerem que a tomada de $^{65}\text{Zn}^{2+}$ é estimulada pelo cálcio externo e utiliza canais de cátion para entrada nas células.

Experimentos adicionais foram realizados utilizando 100 μM de verapamil combinado com gradiente de cátions através da membrana plasmática das células de brânquias. Duas soluções salinas foram preparadas, ambas sem cálcio, uma contendo 400mM NaCl (concentração fisiológica) ou 40mM NaCl. A tomada de $^{65}\text{Zn}^{2+}$ (25 μM) pelas células C80 foi mensurado nestas duas soluções, uma contendo 100 μM verapamil enquanto que a outra não apresentava o inibidor de canal de cálcio. A Fig 4 A demonstra que a presença de 400mM NaCl, mas na ausência de verapamil, o transporte de $^{65}\text{Zn}^{2+}$ ocorreu rapidamente e atingiu o equilíbrio no tempo de 300 segundos (ANOVA, $P = 0.04$). No entanto, a adição de 100 μM verapamil no meio de incubação resulta numa significativa redução na tomada do metal e um equilíbrio em baixos níveis nestas células. Em contraste, quando a concentração de 40mM NaCl foi adicionada na presença e ausência de verapamil não foi observada diferença estatística entre os tratamentos (Fig 4B, ANOVA, $P > 0.05$). Esses resultados sugerem que íons sódio, em concentrações fisiológicas, são capazes de utilizar canais sensíveis ao verapamil para tomada de metal para o interior da célula e pode estimular o transporte de zinco.

Fig 5: Efeitos de 10mM Ca^{2+} e 100 μM de cálcio ionóforo (A23187) na tomada de $^{65}\text{Zn}^{2+}$ (nmol.mg proteína⁻¹) pelas células de brânquias de gradiente 30%, 80% e filamentos branquiais. (A) Transporte de zinco nas células C30; (B) Transporte em células C80; (C) Transporte de zinco em filamentos branquiais. Média $\pm$ SE. N=4. Asteriscos denotam diferenças significativas entre tratamentos (ANOVA).

4 – Efeitos de ionóforo de cálcio (A23187) no transporte de zinco nas células branquiais

Figuras 3 e 4 demonstraram que o canal catiônico da membrana plasmática sensível a verapamil e nifedipina, acomodam tanto cálcio quanto sódio, e pode aumentar o transporte de $^{65}\text{Zn}^{2+}$ na presença de gradientes internos dos cátions.

Para demonstrar o acoplamento de um canal de cátion para uma proteína carreadora na tomada de $^{65}\text{Zn}^{2+}$, experimentos foram conduzidos com células C30 e C80, bem como filamentos branquiais intactos, que foram incubados em soluções que contavam com presença e ausência de cálcio e ionóforo de cálcio, A23187.

Como demonstrado na Fig. 5A, a tomada máxima de $^{65}\text{Zn}^{2+}$ nas C30 ocorre na ausência de cálcio, mas na presença de A23187, enquanto o menor transporte de metal tomou lugar nos canais quando o cálcio estava presente, e na ausência de ionóforo de cálcio (ANOVA, $P < 0.0001$). Em contraste, para as C80, houve maior transporte de zinco quando o meio de incubação era composto simultaneamente por cálcio e ionóforo de cálcio (Fig. 5B, ANOVA, $P = 0.05$), sugerindo que a adição de rotas que atravessam a membrana plasmática através do ionóforo de cálcio realça o transporte de metal em maior proporção do que o ocorrido nos experimentos com somente canais sensíveis a verapamil/nifedipina. Para os filamentos branquiais, não houve diferença estatística significativa entre os tratamentos (ANOVA, $P > 0.05$).

Fig.6: Efeitos de 10mM Ca^{2+} no cinética de influxo de $^{65}\text{Zn}^{2+}$ em concentrações de zinco de 0, 25, 50, 100, 500 e 1000 μM pelas células C30 e C80. (A) Influxo de $^{65}\text{Zn}^{2+}$ (nmol.mg proteína⁻¹) nas células C30; (B) Influxo de $^{65}\text{Zn}^{2+}$ (nmol.mg proteína⁻¹) nas células C80. Média $\pm$ SE. Asteriscos denotam diferenças significativas entre os tratamentos (ANOVA).

5 – Efeitos do aumento da concentração de zinco no transporte de zinco

Transporte de $^{65}\text{Zn}^{2+}$ (nmol /mg proteína x seg) em função da concentração externa de zinco (μM) foi mensurado na presença e ausência de cálcio externo tanto para C30 quanto para C80 (Fig.6). Como a figura indica, o influxo de metal em ambas as células apresentaram função hiperbólica em relação às concentrações de metal que varia de 0 a 1000 μM , seguindo cinética típica de Michaelis-Menten para transporte mediado por carreador como descrito abaixo:

$$V_{\text{Zn}} = V_{\text{max}} [\text{Zn}] / (K_m + [\text{Zn}])$$

Onde V_{max} indica o taxa máxima de transporte (nmol/mg proteína x seg), K_m indica constante de afinidade (μM), e $[\text{Zn}]$ consiste na concentração externa do metal (0-1000 μM). Valores das constantes de cinética, K_m e V_{max} e seus erros padrões associados, são demonstrados na Tabela 1.

Os efeitos das respectivas constantes de cinética K_m e V_{max} na presença e ausência de cálcio foram similares com o que foi divulgado para os efeitos deste cátion em relação ao tempo de tomada de $^{65}\text{Zn}^{2+}$ discutido previamente. Nesta instância, nas C30, cálcio foi inibitório para a tomada de zinco através da significativa redução do K_m e V_{max} do influxo de zinco, mas foi estimulatório para o transporte nas C80 como resultado de aparente aumento da V_{max} , sem o efeito na afinidade de ligação (Fig.6A,B; Tabela 1).

Houve diferença estatística significativa entre $V_{\max}$ para 80 e 30% de sacarose na presença e ausência de cálcio (ANOVA, $P=0.02$ e $P=0.04$, respectivamente) e para K_m na presença e ausência de Ca (ANOVA, $P=0.02$ e $P=0.001$, respectivamente).

Fig 7: Modelo de transporte de $^{65}\text{Zn}^{2+}$ pelas células epiteliais das brânquias de lagosta na presença de solução salina fisiológica ou água do mar normal. Assume-se para este modelo que os resultados experimentais obtidos neste estudo pertencem em grande parte às propriedades de transporte da membrana apical das células epiteliais das brânquias. Os filamentos de brânquias aparentemente possuem canais sensíveis à verapamil/nifedipina, canal de cátions que acomodam Zn, Ca, Na e H e permitem difusão desses itens de gradientes do ambiente da água do mar para o citoplasma.

Além disso, esta membrana também exibe um antiporte a cátion que troca Zn externo por uma grande variedade de cátions citoplasmáticos que podem ser originados internamente ou como resultado de difusão através de canais de cátion do ambiente externo.

Um canal de cátion suplementar pode ser induzido nesta membrana com ionóforo A23187 que mimetiza as propriedades de transferência de cátion deste canal endógeno e realça a atividade do antiporte. Aparentes dissimilaridades no transporte de zinco entre diferentes tipos de células aparentam ser relacionadas às diferenças nas propriedades de ligação no antiporte em cada tipo de célula para metais e outros cátions.

Tabela 1: Efeito de 10mM Ca^{2+} na constante de cinética de transporte de $^{65}\text{Zn}^{2+}$ nos filamentos branquiais isoladas e em C30 e C80 incubadas em salina fisiológica. Diferenças estatísticas significativas entre os tipos celulares são demonstrados.

Tipo de célula	10 mM Ca^{2+}	Constante de Cinética	
		K_m	V_{max}
		(μM) (nmol mg proteína ⁻¹ seg ⁻¹)	
C30	+	186 ± 47*	39 ± 3
C30	-	618 ± 224**	173 ± 29*
C80	+	65 ± 17*	38 ± 3
C80	-	47 ± 16**	22 ± 2*

Média ± SE. N = 4.

DISCUSSÃO

Muitos contaminantes ambientais não somente entram através das brânquias, mas também exercem efeitos tóxicos primários no epitélio branquial devido à interferência em um ou mais processos fisiológicos essenciais (Wood,1992). Qualquer invertebrado aquático tomará metais traço do meio para os fluidos corpóreos através de superfícies permeáveis (Rainbow, 2007).

As rotas mais importantes para assimilação de zinco em peixes são brânquias e hepatopâncreas. A relativa importância dessas rotas tem sido foco de muitos estudos, tanto em peixes marinhos quanto em peixes de água doce (Bury *et al.*, 2003). Invertebrados aquáticos também acumulam metais traço essenciais ou não e todos estes apresentam potencial para causar efeitos tóxicos. As concentrações teciduais e corpóreas de metais traço acumulados demonstram enorme variabilidade em invertebrados (Rainbow, 2007).

Quando o metal penetra no crustáceo após a tomada através de superfícies externas permeáveis ou através da endoderme do hepatopâncreas, estará inicialmente disponível metabolicamente, apresentando potencial para se ligar às moléculas nas células receptoras após o transporte via hemolinfa (Rainbow,2007). A hemolinfa contém diversas proteínas que participam da ligação com o metal e subseqüentemente transportam para os órgãos para utilização, estoque e/ou excreção. Esta dinâmica intracelular de captação do metal é parte da regulação e detoxificação, e podem ser influenciados por respostas fisiológicas do ambiente para aclimação durante exposição crônica

tanto para metais nutrientes quanto para não nutrientes (Chowdhury *et al.*, 2003). Há, dessa maneira, dois mecanismos potenciais para a tomada de metais traço dissolvidos no meio: (1) ligação em uma proteína carreadora específica para metais traço; (2) entrada via rota que faz a tomada da maioria dos íons.

Em ambientes poluídos, os peixes são continuamente expostos ao ambiente rico em zinco, tanto pela água quanto através da dieta. Diversos estudos recentes em truta têm indicado que as mudanças nas tomadas do metal e nos processos fisiológicos ocorrem após exposição ao zinco (Zhang e Wang, 2005). Por exemplo, após exposição crônica ao zinco na água, a afinidade deste de se ligar às brânquias é reduzida. Em contraste a isso, após exposição crônica à dieta rica em zinco, houve um pico máximo de tomada do metal pelas brânquias, embora a afinidade do transporte tenha sido proporcionalmente reduzida (Zhang e Wang, 2005).

As células epiteliais das brânquias, hepatopâncreas, glândula antenal e tegumento em crustáceos controlam os movimentos de cátions e ânions entre hemolinfa e meio ambiente, e isso feito, regulam atividades biológicas como regulação iônica e osmótica, acidificação gástrica, ecdise e detoxificação de metais pesados (Martinez *et al.*, 1999). O epitélio é basicamente uma camada única de células e a habilidade adaptativa para se “recuperar” dos danos causados pelos metais pesados é restrita (Yang *et al.*, 2007).

Embora em algumas espécies possam ocorrer altas concentrações de metal e ainda assim manter funcional os processos fisiológicos, podem ocorrer alterações nos processos de excreção e formas de detoxificação (Harris e Santos, 2000). Esta visão é aceita sob o aspecto de que os efeitos tóxicos são vistos como excesso de acúmulo de metal pesado e atua como desruptor dos processos celulares (Harris e Santos, 2000).

As brânquias dos crustáceos têm como principal função nos processos osmo e ionorregulatórios, trocas gasosas, regulação ácido-básica da hemolinfa e excreção de nitrogênio (metabólitos e produtos) (Masauí *et al.*, 2002). Comparado às demais partes do animal e sendo a primeira proteção nos crustáceos, as brânquias são imediatamente expostas ao ambiente externo (Chowdhury *et al.*, 2003; Wu e Chen, 2004). Alterações na ultraestrutura das brânquias de crustáceos já foi observado como resultado da exposição a metais pesados (Lawson *et al.*, 1995).

A tomada de qualquer metal ao nível da membrana celular é governada por um transportador específico, transporte por canais de proteínas, difusão passiva de metais lipossolúveis e endocitose (Alcorlo *et al.*, 2006). O estudo feito por Hogstrand *et al.* (1998) foi o primeiro a explorar a cinética de Michaelis-Menten de influxo de Ca e Zn durante exposição do peixe a elevados níveis de Zn na água. A exposição prévia de Zn provoca redução na afinidade do sistema de transporte de Ca e a aclimação fisiológica ao Zn é associada à diminuição da tomada do mesmo (Hogstrand *et al.*, 1998). McDonald e Wood (1993) propuseram que a adaptação ao metal resulta num processo em 2

etapas, envolvendo dano inicial no epitélio branquial seguido pelo período de reparo do tecido, durante o qual mecanismos responsáveis pela adaptação são expressos (McDonald e Wood, 1993). O zinco na água está biodisponível como cátion divalente livre, Zn^{2+} , o que em parte, possui rota de tomada muito parecida com o cálcio em brânquias de peixes de água doce. Devido a esse fenômeno, o aumento de zinco vai alterar especificamente a tomada de cálcio através das brânquias, levando à hipocalcemia, o que pode culminar na morte do animal em poucos dias, dependendo da concentração (Niyogi e Wood, 2006). Portanto, as brânquias representam o principal local para entrada de muitos dos contaminantes da água (Wood, 1992).

Já foi demonstrado previamente que elevadas concentrações de metais pesados induzem reflexos e efeitos osmorregulatórios e respiratórios em crustáceos (Lawson *et al.*, 1995). O mecanismo de tomada de zinco branquial é agora bem conhecido e entendido em peixes de água doce. Muitas investigações têm demonstrado que a concentração de Ca na água oferece efeito de proteção contra a toxicidade de zinco. Elevação do nível de Ca na água geralmente protege contra metais, gerando inibição ou redução da entrada de metais como Cd e Zn nos peixes (Wood, 1992). As relações entre homeostase de Ca e Zn é também aparente na fase de tomada apical branquial. Diversos estudos demonstraram que o Ca inibe tomada branquial de Zn em peixes (Spry e Wood, 1989; Hogstrand *et al.*, 1996) e, correspondentemente, que o zinco compete com a tomada de cálcio (Bury *et al.*, 2003).

Os resultados aqui apresentados demonstraram pela primeira vez que os filamentos branquiais da lagosta americana (*Homarus americanus*) são compostos por diversos tipos de células que respondem diferentemente quando incubadas em presença de zinco. Um gradiente, consistindo de 30, 40, 50 e 80% de gradiente de sacarose foi utilizado para dissociar suspensão de células em populações relativamente puras, possibilitando o monitoramento do transporte de zinco externo nas membranas das mesmas células. Além disso, processos de transporte para tomada de $^{65}\text{Zn}^{2+}$ por tipos celulares individuais das brânquias foi comparado ao acúmulo de metal sob condições salinas similares por filamentos de brânquias isolados contendo todos os tipos de células em sua orientação natural. Nenhum dos tipos de células isoladas das brânquias das lagostas foi identificado. No entanto, células presentes no gradiente superior (C30) foram consideradas menores, presumidamente menos densas, e aparentemente similares às demais. Em contraste, células C80 foram caracterizadas como maiores, mais densas, e mais escuras do que as demais células.

Trabalhos considerando a anatomia celular de lagostas e outros crustáceos sugerem que o epitélio respiratório das brânquias em todas as espécies é complexo e consiste em diversos tipos de células (Johnson, 1980; Haond *et al.*, 1998; Flik e Haond, 2000; Freire *et al.*, 2007). Em *Homarus gammarus*, foram encontradas células epiteliais diferenciadas para transporte iônico na cavidade branquial, no lado interno das branquiostegites e epipodites, e foi sugerido como possuindo a função de osmorregulação e ionorregulação (Haond *et al.*, 1998; Flik e Haond, 2000). As células utilizadas no presente

estudo são ao menos parcialmente respiratórias e osmorregulatórias e provavelmente entram em contato com o zinco e outros metais provenientes do meio ambiente.

As células isoladas C30, C40 e C50 demonstraram respostas similares na presença e ausência de cálcio externo, portanto comparações posteriores foram feitas somente com as células provenientes dos gradientes de 30 e 80% de sacarose (C30 e C80). Somente a tomada de $^{65}\text{Zn}^{2+}$ pelas células C80 foi estimulada pela presença de cálcio externo na solução. Uma resposta similar foi descrita para o zinco, onde a tomada através das brânquias de trutas em ambiente com concentrações crescentes de cálcio mostrou que os dois metais apresentam dinâmicas muito parecidas de tomada (Grosell e Wood, 2002). O transporte de Zn e Ca através das brânquias interagem através de uma competição simples e há correlação evidente de que as células de cloreto participam da tomada de Zn. Ainda é desconhecido onde esta competição ocorre: nos canais apicais, na ATPase basolateral ou em ambos (Wood, 1992).

Os trabalhos de Bryan (1964,1967) demonstraram que o zinco é regulado pelos crustáceos de diferentes formas e através de diferentes rotas (Wright, 1995). No entanto, existem diversos exemplos de interações entre metais traço e vários aspectos do metabolismo de cálcio. Existem novas evidências para o “compartilhamento” de mecanismos regulatórios epiteliais entre cálcio e metais traço em diversos níveis (exemplo: canais de cálcio, calmodulina, ATPase; Wright,1995).

No presente trabalho, a tomada de Zn pelas C30 foi inibida tanto por cálcio quanto por íons hidrogênio, enquanto que cálcio e íons hidrogênio mostraram-se estimulantes para a tomada de Zn nas C80. Existem diversas enzimas responsáveis pelo transporte iônico nas brânquias de crustáceos, incluindo Na^+/K^+ ATPase, H^+ -ATPase, anidrase carbônica, trocador Cl/HCO_3 e trocador Na^+/H^+ (Tsai e Lin, 2007). A H^+ -ATPase tem sido descrita como a responsável pelo balanço ácido-básico e excreção de nitrogênio. É uma proteína altamente conservada em eucariontes, o que inclui plantas e animais (Tsai e Lin, 2007). Vários trabalhos sugerem que a H^+ -ATPase está envolvida nos processos osmorregulatórios quando localizada na membrana apical das células de caranguejos (Tsai e Lin, 2007).

O presente modelo de tomada de Ca suporta a idéia de que o cátion entra nas células através de difusão passiva ao longo do gradiente eletroquímico via canal seletivo para Ca independente de voltagem (Wood, 1992). Em brânquias de peixes de água doce, o cálcio “entra” no citosol das células de cloreto passivamente através de canais apicais e é transportado ativamente através da membrana basolateral via Ca^{2+} -ATPase com alta afinidade por calmodulina. Os resultados do estudo feito por Pedersen e Bjerregaard (1995) indicam que o influxo de Ca através das brânquias de *C. maenas* ocorre principalmente por mecanismos passivos (Pedersen e Bjerregaard, 1995).

Se o influxo de Ca ocorre passivamente através das brânquias, pode também acontecer por uma via paracelular resultante de altas concentrações

de cálcio em meio externo (2-10mM) e baixas em meio interno (20μM), explicando a difusão passiva (Pedersen e Bjerregaard, 1995). Já o Ca intracelular é transportado através da membrana basolateral pela Ca^{2+} ATPase, mas provavelmente a entrada de metal intracelular é ligado à proteína metalotioneína no citosol e não parece ser transportado para a hemolinfa (Pedersen e Bjerregaard, 1995).

A dissimilaridade aqui observada entre os tipos celulares branquiais na resposta ao cálcio externo e prótons sugere que há provavelmente propriedades diferentes de transporte em cada tipo de célula para acúmulo de metal proveniente do ambiente. Os mecanismos tóxicos de ação como diminuição e aumento do pH de muitos metais influenciam a tomada branquial “normal” e processos de excreção, bem como a perda por difusão passiva de eletrólitos através das brânquias (Wood, 1992).

Para avaliar se o canal de cátion está envolvido na tomada de Zn por um ou mais tipos celulares, dois bloqueadores de canais de cálcio, verapamil e nifedipina, foram utilizados em presença de cálcio externo. Os resultados demonstraram que tanto o cálcio quanto o verapamil foram inibitórios para a tomada de Zn nas células C30. Em contraste, a tomada de Zn pelas células C80 ou filamentos branquiais intactos foram estimulados pelo cálcio externo, mas inibidos quando verapamil e nifedipina estavam presentes. Esses dados, em conjunto, sugerem que a inibição dos canais catiônicos por verapamil e nifedipina, acomodando tanto cálcio quanto zinco, estão provavelmente

presentes nas células C30 e C80 e são de maneira similar bloqueados na presença de ambos os inibidores.

Interessantemente, em peixes as mudanças ocorrem pela alteração da afinidade de transporte (K_m) do trocador apical Ca/Zn enquanto mantém a máxima taxa de tomada de cálcio (V_{max}) relativamente inalterada. Essas observações sugerem que as brânquias possuem papel importante na manutenção da homeostase de cálcio sob condições crônicas de exposição dos peixes ao zinco (Barron e Albeke, 2000). Alsop e Wood (1999) e Barron e Albeke (2000) também demonstraram que o Ca presente na água reduz a tomada de zinco em peixes, após 3 horas de exposição. Outras investigações para caracterização da natureza do canal de cátion da membrana plasmática em células branquiais de peixe foram realizadas para verificar se outros íons além do cálcio são afetados por canais sensíveis ao verapamil e influenciam a tomada de Zn externo. É razoável assumir que o aumento do influxo de zinco branquial ocorre devido ao aumento do influxo de Ca, desde que utilizem a mesma via de tomada (Barron e Albeke, 2000).

Foram examinados aqui os possíveis efeitos do gradiente de sódio transmembrana em solução salina com ausência de cálcio, e na presença e ausência de verapamil, na tomada de Zn em células C80. A tomada de Zn foi significativamente estimulada nas células incubadas na solução isosmótica contendo 400mM NaCl, e este estímulo foi eliminado na adição de verapamil. Em contraste, quando somente 40mM NaCl foi empregado não foi observado nenhum efeito na tomada do metal. Estes resultados suportam fortemente a

idéia de que o sódio externo, prótons e cálcio são capazes de atravessar a membrana plasmática destas células através de um canal sensível ao verapamil, estimulando a tomada de Zn.

Sabe-se que a salinidade afeta a especificação e biodisponibilidade de metais traço, influenciando a tomada pelos organismos aquáticos. Usualmente, a redução na salinidade é associada ao aumento da tomada de diversos metais pelos organismos aquáticos. O aumento da tomada pode resultar no aumento da concentração de íons livres no meio, uma consequência da diminuição da complexação metálica por cloretos em baixas salinidades (Monserrat *et al.*, 2006). Desse modo, uma redução na salinidade poderá causar aumento da tomada de Ca e posteriormente potencializando a entrada de metais como Cd via rotas de tomada de Ca. Este tipo de tomada está potencialmente sob controle fisiológico (Rainbow, 1997).

Há evidências de que a concentração de Ca afeta a tomada de Cd no caranguejo *Carcinus maenas* independentemente do efeito da salinidade. Por outro lado, a tomada de zinco pelo decápoda *Palaemon elegans* não aparenta ser seguido por nenhuma rota de outros íons que responda às mudanças na osmolalidade do meio (Rainbow, 1997). Há ainda uma resposta fisiológica adicional nos crustáceos que podem afetar a tomada de metais traço. Alguns crustáceos podem ainda alterar a permeabilidade em resposta à baixa salinidade, e talvez assim ocorram mudanças nas proporções da tomada de metais traço (Rainbow, 1997).

Na membrana basolateral, o zinco não aparenta ser transportado pela $\text{Ca}^{2+}\text{ATPase}$, porque a inibição é tanto competitiva como não competitiva; nem também o zinco é transportado por mecanismos dependentes de Na, portanto o mecanismo de translocação ainda não é conhecido em peixes (Marshall, 2002).

Se o canal de cátion sensível ao verapamil na membrana plasmática epitelial das células provenientes do gradiente de 80% de sacarose trabalha em conjunto com proteínas carreadoras de metal para facilitar a tomada de Zn proveniente do exterior da célula, a adição de um segundo canal de cálcio para esta membrana deve aumentar a tomada de zinco mais do que ocorre por canais endógenos individuais. Foi testada a incorporação de cálcio ionóforo A23187 na membrana de cada tipo celular e dos filamentos branquiais. Em células C80, a adição de A23187 na presença de cálcio foi estimulante para a tomada de Zn além do que o registrado somente com o cálcio externo.

Os efeitos diferenciais do cálcio no transporte de zinco nos dois tipos de células e nos filamentos de brânquias sugerem que os transportadores apresentam diferentes constantes cinéticas para zinco e conduzem para os resultados observados experimentalmente. Os resultados (Tabela 1) claramente demonstram que o cálcio externo tem significativo efeito na cinética do influxo de zinco nas C30 em comparação às C80. Primeiro, o cálcio externo foi fortemente inibitório para influxo de Zn nas C30, enquanto o Ca significativamente estimula o influxo de Zn característico das C80.

Efeitos de cálcio foram largamente devidos à redução (C30) ou aumento (C80) na velocidade de transporte máxima de Zn (V_{max}) com menor influência na extensão da ligação do zinco à proteínas de transporte (K_m). Segundo, a relativa afinidade de ligação (K_m) para Zn nas C30 foi menor na presença e ausência de Ca (valores mais altos de K_m) do que em C80, sugerindo que as concentrações ambientais de zinco (menor do que 25 μ M) sejam provavelmente mais transportadas em C80 e que este transporte seria realçado por concentrações ambientais de cálcio, de aproximadamente 10mM.

As diferenças na relativa afinidade de ligação (K_m) para Zn das células C30 e C80 podem parcialmente explicar suas diferenças na presença de cálcio externo. C80 apresenta afinidade de ligação muito maior do que C30 e sob essas condições o íon cálcio será um inibidor potente de proteína transportadora compartilhada nas células C30 se a aparente afinidade de ligação para cálcio e zinco for similar para cada tipo de célula, enquanto que para as células C80 o íon cálcio será estimulante da proteína transportadora.

Em C80, um carreador compartilhado pode ser preferencialmente ligado ao zinco e qualquer influência competitiva de entrada de cálcio e zinco seria mínima. O efeito estimulatório do cálcio na tomada de Zn em C80 muito provavelmente resulta da entrada de cálcio nas células branquiais através de canais de cátion e subsequentemente estimula a tomada de Zn por estímulo mediado por proteínas carreadoras.

Em estudos relacionados, Chavez-Crooker *et al.* (2001) sugeriu que a tomada de Cu^{2+} pelas células epiteliais do hepatopâncreas da lagosta ocorre pela combinação de processos de transporte dependentes e independentes de Ca^{2+} . O cálcio aparentemente afeta tanto a constante cinética K_m quanto V_{max} para o transporte de Cu, sugerindo que a ligação do metal e a máxima taxa de transporte através da membrana foram influenciadas pelo cálcio. Foi sugerido neste estudo que Cu e Zn pode utilizar os mesmos sistemas dependentes de cálcio e mediado por carreador para o transporte nos 4 tipos celulares do epitélio do hepatopâncreas (Chavez-Crooker *et al.*, 2001). Outros experimentos com células epiteliais isoladas de hepatopâncreas revelaram a presença de canais sensíveis ao verapamil nestas células e o bloqueador de canais de cálcio apresenta significativa inibição na tomada de Cu/Zn pelas células do hepatopâncreas (Chavez-Crooker *et al.*, 2001).

Baseado nos resultados do presente estudo, um modelo fisiológico para o transporte de zinco nas células branquiais de lagosta foi proposto para efeitos de mudança na composição iônica externa na tomada de Zn pelas brânquias da lagosta americana (Fig.7). Este modelo indica que as C30 e C80 entram nas células pela combinação de uma proteína antiporte específica e por um canal específico. Experimentos apresentados nesta dissertação sugerem que cálcio, sódio e prótons, adicionados ao meio externo, são estimulantes para a tomada de zinco pelas C80. Tais resultados provavelmente ocorrem como resultado da difusão de cátions através de canais de cátion, trans-estimulando a tomada de Zn. A adição externa de A23187 e cálcio ou sódio também estimulam a tomada de Zn pelas C80, indicando a atividade de uma

segunda rota de difusão para cátions entrando através de um antiporte para o metal.

As diferenças entre C30 e C80 podem ser atribuídas a diferenças nas afinidades do antiporte de ligação ao metal entre os dois tipos de células, resultando em diferenças nos efeitos competitivos com outros cátions. Como resultado, a adição de cálcio externo às C30, houve inibição da tomada de zinco através da inibição do antiporte, enquanto que o cálcio estimulou a tomada de Zn nas C80 devido à preferência do antiporte pelo zinco e seu trans-estímulo pela adição de cálcio via um canal catiônico.

O modelo apresentado na Figura 7 para o transporte de zinco é similar ao proposto para tomada de cobre e cálcio através da membrana apical das células epiteliais do hepatopâncreas da lagosta americana (Ahearn e Zhuang, 1996; Zhuang e Ahearn, 1998; Ahearn *et al.*, 1999; Chavez-Crooker *et al.*, 2001), sugerindo um canal/carreador epitelial altamente conservado para regulação do transporte de metal neste animal. Estudos da tomada de metal pelas brânquias de peixes têm reportado canais/carreadores similares para a tomada epitelial de prata, cobre e zinco tanto em peixes marinhos quanto de água doce (Bury *et al.*, 1999, 2003; Bury and Wood, 1999; Grosell and Wood, 2002; Hogstrand *et al.*, 1994).

Devido à presença de mecanismos regulatórios nas células epiteliais das brânquias e do trato gastrointestinal de animais aquáticos para o controle da entrada de metais provenientes do meio-ambiente e da dieta nestes

organismos, sugere-se que os transportadores apresentam relativa conservação no transporte de metais, claramente observados através do estudo em diferentes filos em resposta a este comum “desafio” fisiológico. Conseqüentemente, o modelo apresentado pode ser um mecanismo comum para a regulação epitelial de uma grande variedade de metais em animais presentes em ambientes diversos.

CONCLUSÃO

- A tomada de zinco foi inibida na presença de 10mM CaCl_2 nas células totais dissociadas das brânquias
- Já as células em 80% do gradiente de sacarose houve aumento do transporte de zinco na presença de 10mM CaCl_2 no meio externo; o que não ocorreu para as células em 30, 40 e 50% do gradiente de sacarose.
- As células em 30% de sacarose, que apresentam menor densidade e mais claras que as demais, apresentaram maior transporte de zinco na ausência de cálcio externo em pH fisiológico 7.1, na ausência de verapamil e presença de ionóforo de cálcio. Assim como o transporte de zinco aumenta na ausência de cálcio, este também aumenta de acordo com o aumento da concentração de ZnCl_2 ;
- As células em 80% de sacarose, mais densas e mais escuras (possivelmente ricas em organelas), apresentam maior transporte de zinco na presença de cálcio externo no meio, em meio rico em íons H^+ devido à redução do pH (de 7.1 para 6.0). Os inibidores verapamil e nifedipina, inibiram a tomada de zinco, principalmente na ausência de cálcio. A adição de ionóforo de cálcio (A23187)

aumentou a tomada de zinco na presença de cálcio e observou-se o mesmo resultado de acordo com o aumento da concentração de zinco no meio externo. Os dados dos experimentos que compararam as concentrações de NaCl no meio demonstraram que houve maior transporte de zinco na ausência de cálcio e de verapamil e com a concentração de 400mM NaCl no meio externo;

- Em relação aos experimentos com os filamentos branquiais dissolvidos em HCl, concluiu-se que essas células apresentam cinéticas de transporte semelhantes às células presentes no gradiente de 80% de sacarose, ou seja, aumento do transporte de zinco na presença de cálcio e de ionóforo de cálcio, enquanto que a tomada do metal é inibida na presença de verapamil e nifedipina.
- De acordo com todos os dados obtidos neste conjunto de experimentos, conclui-se que há diferentes rotas de tomada de zinco, ou seja, células em 30, 40 e 50% do gradiente de sacarose apresentam rota semelhante entre si com inibição da tomada de zinco na presença de cálcio, indicando competição entre íons Ca^{2+} e Zn^{2+} . Células do gradiente de 80% de sacarose e células dos filamentos branquiais apresentam tomadas de zinco diferentes, isto é, há potencialização do transporte de zinco na presença de cálcio e, dessa maneira, há uma dependência do zinco em relação ao cálcio para que o metal passe pelos canais das membranas das células.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahearn, G.A.; Zhuang, Z. Cellular mechanisms of calcium transport in crustaceans. *Physiology and Zoology*, 69(2): 383-402, 1996.
- Ahearn, G.A.; Duerr, J.M.; Zhuang, Z.; Brown, R.J.; Aslamkhan, A.; Killebrew, D.A. Ion transport processes of crustacean epithelial cells. *Physiology and Biochemistry Zoology*, 72(1): 1-18, 1999.
- Alcorlo, P.; Otero, M.; Crehuet, M.; Baltnás, A.; Montes, C. The use of the red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*), girard as indicator of the bioavailability of heavy metal in environmental monitoring in the River Guadiamar (SW, Spain). *Science of the Total Environment*, 366:380-390, 2006.
- Alsop, D.H.; Wood, C.M. Influence of waterborne cations on zinc uptake and toxicity in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 56(11): 2112-2119, 1999.
- Barron, M.G.; Albeke, S. Calcium control of zinc uptake in rainbow trout. *Aquatic Toxicology*, 50: 257-264, 2000.
- Bhavan, P.S.; Geraldine, P. Histopathology of the hepatopancreas and gills of the prawn *Macrobrachium malcolmsonii* exposed to endosulfan. *Aquatic toxicology*, 50: 331-339, 2000.
- Bryan, G.W. Zinc regulation in the lobster *Homarus vulgaris*. I. Tissue zinc and copper concentrations. *Journal of Marine Biology Association, UK*, 44: 549-563, 1964.

- Bryan, G.W. Zinc regulation in the freshwater crayfish (including some comparative copper analysis). *Journal of Experimental Biology*, 46:281-296, 1967.
- Bury, N.F.; Wood, C.M. Mechanism of branchial apical silver uptake by rainbow trout is via the proton-coupled Na⁺ channel. *American Journal of Physiology*, 277: R1385-R1391, 1999.
- Bury, N.F.; Walker, P.A.; Glover, C.N. Nutritive metal uptake in teleost fish. *Journal of Experimental Biology*, 206: 11-23, 2003.
- Canli, M.; Furness, R.W. Toxicity of heavy metal dissolved in sea water and influences of sex and size on metal accumulation and tissue distribution in the Norway lobster *Nephrops norvegicus*. *Marine Environmental Research*, 36(4): 217-236, 1993.
- Chavez-Crooker, P.; Garrido, N.; Ahearn, G.A. Copper transport by lobster hepatopancreatic epithelial cells separated by centrifugal elutriation: measurements with the fluorescent dye Phen Green. *Journal of Experimental Biology*, 204(8): 1433-1444, 2001.
- Chou, C.L.; Paon, L.A.; Moffatt, J.D. Metal contaminants for modeling lobster *Homarus americanus* migration patterns in the Inner Bay of Fundy, Atlantic Canada. *Marine Pollution Bulletin*, 44:134-141, 2002.
- Chowdhury, M.J.; Grosell, M.; McDonald, D.G.; Wood, C.M. Plasma clearance of cadmium and zinc in non-acclimated on metal-acclimated trout. *Aquatic Toxicology*, 64:259-275, 2003.
- Cousins, R.J.; McMahon, R.J. Zinc and health: current status and future directions. *Journal of Nutrition*, 130:1384S-1387S, 2000.
- Crespo, S.; Karnaky Jr. K.J. Copper and zinc inhibit chloride transport across the opercular epithelium of seawater-adapted killifish *Fundulus heteroclitus*.

Short communication. *Journal of Experimental Biology*, 102:337-341, 1983.

Engel, D.W.; Brouwer,M.; Mercaldo-Allen,R. Effects of molting and environmental factors on trace metal body-burdens and hemocyanin concentrations in the American lobster, *Homarus americanus*. *Marine Environmental Research*, 52:257-269, 2001.

Flik, G.; Haond, C. Na⁺ and Ca²⁺ pumps in the gills, epipodites and branchiostegites of the European lobster *Homarus gammarus*: Effects of dilute sea water. *Journal of Experimental Biology*,203: 213-220,2000.

Freire, CA, Onken H, McNamara JC (2007) A structure-function analysis of ion transport in crustacean gills and excretory organs. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A: Molecular Integrative Physiology*, 151(3): 272-304, 2008.

Glynn, A.W. The influence of zinc on apical uptake of cadmium in the gills and cadmium influx to the circulatory system in zebrafish (*Dania rerio*). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C: Toxicology and Pharmacology*, 128(2): 165-172,2001.

Grosell, M.; Wood, C.M. Copper uptake across rainbow trout gills: mechanisms of apical entry. *Journal of Experimental Biology*, 205: 1179-1188, 2002.

Haond, C.; Flik, G.; Charmantier, G. Confocal laser scanning and electron microscopical studies on osmoregulatory epithelia in the branchial cavity of the lobster *Homarus gammarus*. *Journal of Experimental Biology*, 201: 1817-1833,1998.

Harris,R.R.; Santos, M.C.F. Heavy metal contamination and physiological variability in the Brazilian mangrove crabs *Ucides cordatus* e *Callinectes danae* (Crustacea: Decapoda). *Marine Biology*, 137:691-703, 2000.

- Hogstrand, C.; Wilson, R.W.; Polgar, D.; Wood, C.M. Effects of Zn on the kinetics of branchial calcium-uptake in fresh water rainbow trout during adaptation to waterborne Zn. *Journal of Experimental Biology*, 186: 55-73, 1994.
- Hogstrand, C.; Reid, S.D.; Wood, C.M. Ca^{2+} versus Zn^{2+} transport in the gills of freshwater rainbow trout and the cost of adaptation to waterborne Zn^{2+} . *Journal of Experimental Biology*, 198:337-348, 1995.
- Hogstrand, C.; Galvez, F.; Wood, C.M. Toxicity, silver accumulation and metallothionein induction in freshwater rainbow trout during exposure to different silver salts. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 15(7): 1102-1108, 1996.
- Hogstrand, C.; Webb, N.; Wood, C.M. Covariation in regulation of affinity for branchial zinc and calcium uptake in freshwater rainbow trout. *Journal of Experimental Biology*, 201:1809-1815, 1998.
- Johnson PT (1980) Histology of the blue crab, *Callinectes sapidus*. Praeger Scientific, New York.
- Krüger, E. Uma abordagem sistêmica da atual crise ambiental. Desenvolvimento e Meio Ambiente. Volume 4, p.37-43, 2001.
- Lawson, S.L.; Jones, M.B.; Moate, R.M. Effect of copper on the ultrastructure of the gill epithelium of *Carcinus maenas* (Decapoda: Brachyura). *Marine Pollution Bulletin*, 31(1-3):63-72, 1995.
- Li, N.; Zhao, Y.; Yang, J. Impact of waterborne copper on the structure of gills and hepatopancreas and its impact on the content of metallothionein in juvenile giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* (Crustacea: Decapoda). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 52:73-79, 2007.

- Lucu, C. Towle, D.W. $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ in gills of aquatic crustacean. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A : Molecular and Biochemistry*, 135(2): 195-214, 2003.
- Mandal, P.K.; Mandal, A.; Ahearn, G.A. $^{65}\text{Zn}^{2+}$ transport by lobster hepatopancreatic lysosomal membrane vesicles. *Journal of Experimental Zoology*, 305A: 203-214, 2006.
- Masuí, D.C.; Furriel, R.P.M.; McNamara, J.C.; Mantelatto, F.L.M.; Leone, F.A. Modulation by ammonium ion of gill microsomal Na/K ATPase in the swimming crab *Callinectes danae*: a possible mechanism for regulation of ammonia excretion. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C: Toxicology and Pharmacology*, 132(4): 471-482, 2002.
- McGeer, J.C.; Szebedinszky, C.; McDonald, D.G.; Wood, C.M. Effects of chronic sublethal exposure to waterborne Cu, Cd or Zn in rainbow trout 2: tissue specific metal accumulation. *Aquatic Toxicology*, 50, 245-256, 2000.
- Monserat, J.M.; Martínez, P.E.; Geracitano, L.A.; Amado, L.L.; Martins, C.M.G.; Pinho, G.L.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 Physiology, Part C: Toxicology and Pharmacology*, 2006.
- Morales-Hernández, F.; Soto-Jiménez, M.F.; Páez-Osuna, F. Heavy metals in sediments and lobster (*Panulirus gracilis*) from the discharge area of the submarine sewage outfall in Mazatlán Bay (SE Gulf of California). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 46:485-491, 2004.
- Mandal, P.K.; Mandal, A.; Ahearn, G.A. Physiological characterization of $^{45}\text{Ca}^{2+}$ and $^{65}\text{Zn}^{2+}$ transport by lobster hepatopancreatic endoplasmic reticulum. *Journal of Experimental Zoology*, 303A: 515-526, 2005.

- Martín-Díaz, M.L.; Villena-Lincoln, A.; Bamber, S.; Blasco, J.; DelValls, T.A. An integrated approach using bioaccumulation and biomarker measurements in female shore crab, *Carcinus maenas*. *Chemosphere*, 58:615-626, 2005.
- Marshall, W.S.; Na^+ , Cl^- , Ca^{2+} and Zn^{2+} transport by fish gills: retrospective review and prospective synthesis. *Journal of Experimental Zoology*, 293:264-283, 2002.
- Martínez, C.B.R.; Alvares, E.P.; Harris, R.R.; Santos, M.C.F. A morphological study on posterior gills of the mangrove crab *Ucides cordatus*. *Tissue and Cell*, 1999.
- McDonald, D.G.; Wood, C.M. Branchial mechanisms of acclimation to metals in freshwater fish. In: *Fish Ecophysiology* (ed. J.C. Rankin and F.B. Jensen), p.297-321. London: Chapman and Hall. 1993.
- Niyogi, S.; Wood, C.M. Interaction between dietary calcium supplementation and chronic waterborne zinc exposure in juvenile rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C: Toxicology and Pharmacology*, 143:94-102, 2006.
- O'Connor, J.M.; Huggett, R.J. Aquatic pollution problems, North Atlantic coast, including Chesapeake Bay. *Aquatic toxicology*, 11:163-190, 1988.
- Pedersen, T.V.; Bjerregaard, P. Calcium and cadmium fluxes across the gills of the shore crab, *Carcinus maenas*. *Marine Pollution Bulletin*, 31(1-3): 73-77, 1995.
- Perales-Vela, H.V.; Peña-Castro, J.M.; Cañizares-Villanueva, R.O. Heavy metal detoxification in eukaryotic microalgae. *Chemosphere*, 64:1-10, 2006.
- Rainbow, P.S. Ecophysiology of trace metal uptake in crustaceans. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 44: 169-175, 1997.

- Rainbow, P.S. Trace metal bioaccumulation: models, metabolic availability and toxicity. Review article. *Environment International*, 33:576-582, 2007.
- Rinderhagen, M.; Ritterhoff, J.; Zauke, G.P. Crustaceans as bioindicators. *Environmental Research Forum*, 9: 161-194, 2000.
- Romano, N.; Zeng, C. Effects of potassium on nitrate mediated alterations of osmoregulation in marine crabs. *Aquatic Toxicology*, 85(3): 202-208, 2007.
- Rupert, E.E.; Barnes, R.D. Zoologia dos Invertebrados. 6ª edição. Editora Roca, São Paulo, 1026p, 1996.
- Spry, D.J.; Wood, C.M. A kinetic method for the measurement of Zn influx *in vivo* in the rainbow trout, and the effects of waterborne Ca on flux rates. *Journal of Experimental Biology*, 142: 425-446, 1989.
- Srinivas, K.S.; Chandrasekar, G.; Srivastava, R.; Puvanakrishnan, R. A novel protocol for the subcellular fractionation of C3A hepatoma cells using sucrose density gradient centrifugation. *Journal of Biochemistry and Biophysics Methods*, 60: 23-27, 2004.
- Tsai, J.R.; Lin, H.C. V-type H⁺ ATPase and Na⁺ K⁺ ATPase in the gills of 13 euryhaline crabs during salinity acclimation. *Journal of Experimental Biology*, 210: 620-627, 2007.
- Viarengo, A.; Nott, J.A. Mechanisms of heavy metal cation homeostasis in marine invertebrates. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C: Toxicology and Pharmacology*, 104(3): 355-372, 1993.
- Wheatly, M.G.; Pence, R.C.; Weil, J.R. ATP-dependent calcium uptake into basolateral vesicles from transporting epithelia of intermolt crayfish. *American Physiological Society*, R566-R574, 1999.

- Wilkens, J.L.; McMahon, B.R. Aspects of branchial irrigation in the lobster *Homarus americanus*. I. Functional analysis of scaphognathite beat, water pressures and currents. *Journal of Experimental Biology*, 56:469-479, 1972.
- Wood, C.M. Flux measurements as indices of H⁺ and metal effects on freshwater fish. *Aquatic Toxicology*, 22:239-264, 1992.
- Wright, D.A. Trace metal and major ion interactions in aquatic animals. *Marine Pollution Bulletin*, 31(1-3):8-18, 1995.
- Wu, J.P.; Chen, H.C. Effects of cadmium and zinc on oxygen consumption, ammonium excretion, and osmoregulation of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Chemosphere*, 57:1591-1598, 2004.
- Yang, Z.B.; Zhao, Y.L.; Li, N.; Yang, J. Effect of waterborne copper on the microstructure of gills and hepatopancreas in *Eriocheir sinensis* and its induction of metallothionein synthesis. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 52:222-228, 2007.
- Zanotto, F.P.; Pinheiro, F.; Brito, L.A.; Wheatly, M.G. Some considerations on calcium homeostasis in semi-terrestrial crabs. *International Congress Series*, 1275, 89-95, 2004.
- Zhang, L.; Wang, W.X. Effects of zinc pre exposure on Cd and Zn bioaccumulation and metallothionein levels in two species of marine fish. *Aquatic Toxicology*, 73: 353-369, 2005.
- Zhang, L.; Wang, W.X. Waterborne cadmium and zinc uptake in a euryhaline teleost *Acanthopagus schlegelii* acclimated to different salinities. *Aquatic Toxicology*, 84:173-181, 2007.
- Zhuang, Z.; Ahearn, G.A. Energized Ca²⁺ transport by hepatopancreatic basolateral plasma membranes of *Homarus americanus*. *Journal of Experimental Biology*, 201: 211-220, 1998.

BIOGRAFIA

I - ARTIGOS COMPLETOS PUBLICADOS EM PERIÓDICOS

- SÁ, M.G.; VALENTI, W.C.; ZANOTTO, F.P. **Dietary copper absorption and excretion in three semi-terrestrial grapsoid crabs with different levels of terrestrial adaptation.** *Comparative Biochemistry and Physiology C, Toxicology and Pharmacology*, 148: 112-116, 2008.

II – TRABALHOS PUBLICADOS EM ANAIS DE EVENTOS

- SÁ, M.G.; AHEARN, G.A.; ZANOTTO, F.P. **$^{65}\text{Zn}^{2+}$ transport processes of isolated gill epithelial cells of the American lobster *Homarus americanus*.** In: International Congress of Comparative Physiology and Biochemistry, S89, Agosto, Salvador, 2007.

- SÁ, M.G.; ZANOTTO, F.P. **Absorção de cobre através de dieta semi-purificada em caranguejos semi-terrestres *Chasmagnathus granulatus*, *Goniopsis cruentata* e *Sesarma rectum*.** In: Congresso Brasileiro de Zoologia, Londrina, Fevereiro, 127, 2006.

- SÁ, M.G.; AHEARN, G.A.; ZANOTTO, F.P. **Transporte de Zn nas células isoladas do epitélio da lagosta americana *Homarus americanus*.** In: Congresso Brasileiro de Carcinologia, p.197, Novembro, 2006.

III – TRABALHOS PUBLICADOS EM ANAIS DE EVENTOS (RESUMO EXPANDIDO)

- GIMENES, L.; SÁ, M.G.; PEDROTTI, J.J.; ZANOTTO, F.P. **Desenvolvimento de método analítico para determinação de cobre em amostras biológicas com detecção eletroquímica sobre microeletrodos de ouro.** XVI Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica, Águas de Lindóia, p.1-3, 2007.

- ZANOTTO, F.P.; PINHEIRO, F.; BRITO, L.A.; SÁ, M.G. **Regulação de cálcio em caranguejos semi-terrestres: existe relação com o nível de adaptação à vida terrestre?** In: Fronteiras da Biologia de Caranguejos Estuarinos: o caranguejo *Chasmagnathus granulatus* como modelo. Simpósio Internacional Fronteiras da Biologia de Caranguejos Estuarinos, Rio Grande do Sul, 2005.

IV – ARTIGOS EM REVISTAS (MAGAZINE)

- SÁ, M.G. **Metal pesado e meio ambiente.** www.cdcc.sc.usp.br/ciencia/artigos/art_44/educacao.html Revista Eletrônica de Ciências, São Carlos, Julho, 2008.

V – DEMAIS PRODUÇÕES BIBLIOGRÁFICAS

- BLOTTA-BAPTISTA, B.; SÁ, M.G. **Regulação de volume em hemócitos de caranguejo estuarino *Chasmagnathus granulatus*.** In: Congresso Brasileiro de Carcinologia, Guarapari, p.195, Novembro, 2006.

VI – DEMAIS PRODUÇÕES TÉCNICAS

- SÁ, M.G. **Efeito do pH em organismos aquáticos**. Curso de curta duração, Curso de Inverno USP – Fisiologia Geral, Julho, 2008.
- SÁ, M.G. **Ecofisiologia de metais pesados em organismos aquáticos**. Curso de curta duração, Curso de Inverno USP, Julho, 2007.

VII – ORIENTAÇÕES E SUPERVISÕES

- Débora Rocha. **Efeito do malathion sobre o metabolismo de baratas**. (curso de curta duração), Curso de Inverno USP – Fisiologia Geral, Julho, 2008.
- Priscila Ortega. **Viabilidade de células branquiais em caranguejo *Ucides cordatus***. Universidade Presbiteriana Mackenzie, Co-orientação de Iniciação Científica em Andamento.

VIII – ARTIGOS SUBMETIDOS

- Sá, M.G.; Ahearn, G.A.; Zanotto, F.P. $^{65}\text{Zn}^{2+}$ transport processes of isolated gill epithelial cells of the American lobster *Homarus americanus*. Journal of Comparative Physiology B, Setembro, 2008
- Zanotto, F.P.; Pinheiro, F.; Sá, M.G. Diet consumption in two semi-terrestrial crabs in relation to dietary calcium content . Inherigia Série Zoologia, Maio, 2008.