Priscila Ortega

Transporte de cádmio em células
branquiais do caranguejo de mangue

Ucides cordatus

Cadmium transport in gill cells of the
mangrove crab *Ucides cordatus*

São Paulo

2012

Priscila Ortega

Transporte de cádmio em células
branquiais do caranguejo de mangue
Ucides cordatus

Cadmium transport in gill cells of the
mangrove crab *Ucides cordatus*

Esta dissertação trata-se da versão corrigida. A versão original se encontra disponível tanto na Biblioteca da Unidade que aloja o Programa quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

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

Orientador (a): Flávia Pinheiro Zanotto

São Paulo

2012

Ortega, Priscila

Transporte de cádmio em células branquiais do caranguejo de mangue *Ucides cordatus*

83 pg.

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

1. Transporte de cádmio 2. Células branquiais 3. *Ucides cordatus* I. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Fisiologia Geral.

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a)

Prof(a). Dr(a)

Prof(a). Dr(a). Orientador(a)

*Dedico esta dissertação à Paulo Roberto
Ortega, Rosana Maria Ortega e Cibele
Cristina Ortega, pela ajuda e
compreensão nos momentos difíceis.*

Agradecimentos

Primeiramente, agradeço à Universidade de São Paulo, em especial ao Instituto de Biociências, Departamento de Fisiologia Geral, por permitir a realização deste trabalho.

Agradeço à Universidade Presbiteriana Mackenzie, principalmente ao Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, por conceder suporte teórico e técnico para a elaboração da pesquisa; agradeço também à orientadora Flávia P. Zanotto pelo incentivo e toda a colaboração no desenvolvimento da linha de pesquisa, contribuindo para o desenvolvimento do trabalho e meu crescimento profissional. Agradeço também ao CNPQ pelo apoio financeiro e por permitir meu aperfeiçoamento.

Agradeço aos técnicos do laboratório Natália, Danilo, Márcia, Júnior e Layor pela cooperação e pelo apoio psicológico nos momentos de angústia. Agradeço aos amigos de laboratório Marina, Leonardo, Júlia, Luca, Hermann, Rudney e Flávia pela grande colaboração nos experimentos e no projeto.

Agradeço à toda minha família, entre eles, minha mãe Rosana e minha irmã Cibele, por me proporcionar momentos de desabafo, pelo companheirismo e pela grande compreensão e paciência nos momentos mais difíceis; ao meu pai Paulo, por me acompanhar nos dias de coleta e pela ajuda em toda a minha vida escolar; ao Denis, que, sempre me escutou e esteve ao meu lado, me apoiando e dando força quando tudo parecia perdido.

Por último, agradeço à Deus pela paciência, força, perseverança, trabalho, empenho e por me proporcionar um grande aprendizado.

Índice

1. INTRODUÇÃO GERAL.....	9
CAPÍTULO 1. O <i>UCIDES CORDATUS</i> E SEU AMBIENTE.....	11
1.1. INTRODUÇÃO.....	11
1.1.1. O mangue e o <i>Ucides cordatus</i>	11
1.1.2. As brânquias.....	12
1.1.3. As células branquiais.....	14
CAPÍTULO 2. O CÁDMIO E AMBIENTE.....	16
<i>Abstract</i>	16
Resumo.....	16
2.1. INTRODUÇÃO.....	17
2.1.1. Cádmio (Cd) e seus efeitos.....	17
2.1.2. Transporte de cádmio.....	20
2.2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	21
2.2.1. Os animais.....	21
2.2.2. Obtenção das células branquiais.....	22
2.2.3. O transporte celular.....	23
2.3. RESULTADOS.....	24
2.3.1. FluoZin e sulfato de cádmio (CdSO ₄).....	24
2.3.2. Fluo-3 am e cloreto de cádmio (CdCl ₂).....	27
2.4. DISCUSSÃO.....	32
2.4.1. FluoZin e sulfato de cádmio (CdSO ₄).....	32
2.4.2. Fluo-3 am e cloreto de cádmio (CdCl ₂).....	32

CAPÍTULO 3. O CÁLCIO E O ZINCO EM INTERAÇÃO COM O CÁDMIO.....	35
<i>Abstract</i>	35
Resumo.....	35
3.1. INTRODUÇÃO.....	36
3.1.1. O cálcio e sua importância.....	36
3.1.2. O zinco.....	39
3.2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	41
3.2.1. O transporte celular com adição de cálcio e zinco.....	41
3.2.1.1. O Cálcio.....	41
3.2.1.2. O Zinco.....	41
3.3. RESULTADOS.....	41
3.3.1. Transporte de cádmio em interação com cálcio (Ca^{2+}) e zinco (Zn^{2+}).....	41
3.3.2. Animais de Itanhaém X Animais de Cananéia.....	44
3.4. DISCUSSÃO.....	46
3.4.1. Transporte de cádmio em interação com cálcio (Ca^{2+}) e zinco (Zn^{2+}).....	46
3.4.2. Animais de Itanhaém X Animais de Cananéia.....	48
CAPÍTULO 4. OS INIBIDORES E SUAS AÇÕES.....	50
4.1. INTRODUÇÃO.....	50
4.1.1. Vanadato.....	50
4.1.2. ATP e mobilização de cálcio.....	50
4.1.3. Amilorida.....	51
4.1.4. Ouabaína.....	52
4.1.5. BAPTA.....	53
4.2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	55
4.2.1. Amilorida.....	55

4.2.2. Vanadato.....	55
4.2.3. Ouabaína.....	55
4.2.4. ATP.....	56
4.2.5. BAPTA.....	56
4.3. RESULTADOS.....	56
4.3.1. Transporte de cádmio e diferentes inibidores.....	56
4.3.2. Cádmio em presença de ATP.....	59
4.3.3. Efeito do BAPTA (quelante intracelular de Ca^{2+}).....	61
4.4. DISCUSSÃO.....	64
4.4.1. Transporte de cádmio e diferentes inibidores.....	64
4.4.2. Cádmio em presença de ATP.....	67
4.4.3. Efeito do BAPTA (quelante intracelular de Ca^{2+}).....	68
2. DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES.....	70
RESUMO GERAL.....	72
ABSTRACT.....	73
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	74
ANEXOS.....	83

1. INTRODUÇÃO GERAL

Os crustáceos estão presentes em vários ambientes, com cerca de 30.000 espécies descritas. Primeiramente, eles invadiram ambientes marinhos, ocupando em seguida os dulcícolas e terrestres, que são extremamente diversos do ponto de vista osmorregulatório (Mulford e Villena, 2000). Para isso, os crustáceos possuem adaptações especializadas das células epiteliais das brânquias, tegumento, hepatopâncreas e glândula antenal, para a regulação e passagem de moléculas e íons entre o meio externo e a hemolinfa (Ahearn *et al.*, 1999; Monteilh-Zoller *et al.*, 1999).

As brânquias posteriores são responsáveis pela regulação iônica e osmótica, confirmados através da aclimação de caranguejos a diferentes salinidades (Tsai e Lin, 2006). Dessa forma, essa é a região branquial mais sujeita a responder às variações de salinidade, desempenhando, assim, uma função reguladora, tanto iônica quanto osmótica, entre o animal e o meio ambiente (Bouaricha *et al.*, 1994). As brânquias anteriores, por outro lado, são responsáveis pelas trocas gasosas no animal, possuindo células específicas para o desempenho desta função.

As brânquias, por estarem em constante contato com o meio ambiente, são suscetíveis às mudanças ambientais. Muitas áreas estuarinas e costeiras são objeto de despejo de metais pelo homem e o acúmulo destes é dependente da concentração ambiental presente na água, nos alimentos e do período no qual os animais são expostos a essas concentrações (Kamude *et al.*, 2002). Metais potencialmente tóxicos podem, assim, impregnar os animais pelos principais epitélios de troca, como as brânquias, como também por meio da alimentação, ocorrendo contaminação, principalmente no hepatopâncreas (Ahearn *et al.*, 2004).

Deste modo, o objetivo do trabalho foi caracterizar o transporte de cádmio e sua interação com o cálcio, zinco, inibidores específicos, ATP e BAPTA, em células branquiais do caranguejo de manguezal *Ucides cordatus*. Este estudo é relevante do ponto de vista ambiental e fisiológico, pois caracteriza os

mecanismos de acumulação do metal cádmio, não-essencial, nas brânquias desse caranguejo. Além disso, este braquiúro é utilizado como fonte de alimentação humana, e as informações obtidas a respeito do acúmulo deste metal podem ser extrapoladas para a potencial transferência do mesmo às populações humanas.

Para o desenvolvimento do presente trabalho, a metodologia utilizada foi a dissociação enzimática de células branquiais, pela adição de Tripsina (0,05%). Posteriormente, as células foram marcadas com Fluo 3 am e colocadas em placas de Elisa para leitura em espectrofluorímetro, adicionando-se diferentes concentrações de cádmio para uma caracterização detalhada dos processos de transporte desse metal.

CAPÍTULO 1: O *UCIDES CORDATUS* E SEU AMBIENTE

1.1. INTRODUÇÃO

1.1.1. O manguezal e o *Ucides cordatus*

Os manguezais compreendem cerca de 60-75% da costa tropical e subtropical, englobando, aproximadamente, 17,1 milhões de hectares. Este ecossistema brasileiro se estende ao longo dos 6.800 km de costa, correspondendo a mais ou menos 1 milhão de hectares (Nordhaus, 2003). São áreas de alto valor ambiental e econômico, pois evitam a erosão da região costeira, protegem recifes de corais e algas marinhas do aporte de sedimentos terrestres, além de servirem como locais para o desenvolvimento de animais, como várias espécies de peixes, mamíferos, pássaros e invertebrados, figurando entre estes últimos, os caranguejos (Nordhaus, 2003). Nos mangues há uma grande diversidade de espécies e de biomassa de caranguejos braquiúros, exercendo importante impacto na cadeia alimentar desse ecossistema (Nordhaus, 2003).

O caranguejo *Ucides cordatus* é uma espécie semi-terrestre, habitante exclusivamente de manguezais, distribuindo-se no Atlântico Ocidental, desde a Flórida até o Uruguai, e ilhas do Caribe (Nordhaus, 2003). Estes animais constroem tocas no sedimento do manguezal, com aproximadamente 2 m de profundidade, durante as marés baixas protegendo-se contra predadores e a dessecação (Nordhaus, 2003; Castilho-Westphal *et al*, 2008). Alimentam-se de folhas do mangue, que são coletadas e consumidas diretamente ou armazenadas em suas tocas. Este processo de consumo direto das folhas contribui para a diminuição do aporte de matéria orgânica para o estuário, preservando assim os nutrientes presentes no mangue (Nordhaus, 2003). Dessa forma, o *U.cordatus* desempenha uma importante função na degradação das folhas através do processo de digestão voltando ao ambiente parcialmente digeridas, em forma de matéria orgânica fecal. Nesta condição o consumo é facilitado aos organismos detritívoros, auxiliando a colonização de

microorganismos, e acelerando o ciclo de nutrientes no interior do manguezal (Nordhaus, 2003).

1.1.2. As brânquias

Os crustáceos possuem relativa tolerância às mudanças de salinidade, principalmente as espécies que vivem em estuários ou na zona intertidal ou do entre-marés (Rinderhagen *et al.*, 2000). Diferentes órgãos e mecanismos estão envolvidos nesta regulação. Os principais são a glândula antenal, que realiza excreção e regulação osmótica, o epitélio do hepatopâncreas e, finalmente, as brânquias (Rinderhagen *et al.*, 2000). Estas últimas são um importante órgão para a troca de íons com a água, possuindo, assim, um epitélio especializado para tal função. Nos braquiúros as brânquias apresentam aspecto mais compacto, sendo do tipo filobrânquias, que segundo Stevcic (1971) é uma das características de caranização deste grupo taxonômico. O *U. cordatus*, possui 5 pares branquiais, sendo um organismo eurialino com capacidade de manutenção homeostática por um mecanismo osmorregulatório presente nas brânquias posteriores. Este mecanismo se dá, principalmente, por meio da Na^+/K^+ ATPase, responsável pelo movimento transepitelial de íons monovalentes (Castilho-Westphal *et al.*, 2008).

As brânquias possuem uma fina cutícula e uma grande superfície que permite a troca de gases. Em alguns crustáceos, não há uma região específica para a respiração, que pode ocorrer através da superfície corporal (Rinderhagen *et al.*, 2000), enquanto que na grande maioria, a respiração ocorre por meio de brânquias. Estas, de modo geral, apresentam lamelas sustentadas por um eixo central, que representa um centro de transporte de íons; estas lamelas possuem um epitélio de camada única recoberto por uma cutícula, possuindo nódulos externos que previnem o colapso da estrutura branquial durante o processo de exposição ao ar (Martinez *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 2006). Os podócitos branquiais são importantes para a detoxificação e destruição de

metais prejudiciais e para a destruição de agentes invasores que passam através das brânquias (Maina, 1998). Estes são distribuídos difusamente por toda a brânquia, estando presentes no espaço intralamelar final, no vaso eferente hemolinfático, na veia branquial e no espaço intralamelar central e marginal (Figura 1).

Figura 1: Representação esquemática e morfológica da brânquia posterior. Cutícula (1); células estriadas (2); células pilares (3); espaço hemolinfático (4) e septo intra-lamelar (5). Adaptado de Freire, C.A. *et al.*, **A structure–function analysis of ion transport in crustacean gills and excretory organs**. Comp. Biochem. Physiol. A (2007), doi:10.1016/j.cbpa.2007.05.008.

Sabe-se que as brânquias são estruturas essenciais à respiração. Porém, não realizam apenas trocas gasosas, estando associadas, também, ao transporte de íons, enzimas, absorção e excreção de amônia. Além disso, possuem canais que transportam cálcio, sais (NaCl) e potássio, entre outros íons (Freire *et al.*, 2007). Para que cada função seja realizada com sucesso, as brânquias possuem células específicas que realizam a respiração e a osmorregulação.

Assim, as brânquias anteriores se apresentam como um órgão vital, responsável pela respiração do animal (Henry e Cameron, 1982). Já as brânquias posteriores contêm inúmeras mitocôndrias, além de apresentarem em suas células a Na^+/K^+ ATPase, sendo responsável pela regulação iônica e osmorregulação (Tsai e Lin, 2006; Castilho-Westphal *et al.*, 2008). Dessa forma, as brânquias posteriores exercem um papel fundamental na regulação iônica e osmótica, sugerindo seu envolvimento na capacidade do animal em invadir ambientes eurialinos (Bouaricha *et al.*, 1994).

1.1.3. As células branquiais

As estruturas branquiais contêm células especializadas e diferenciadas, já estudadas em crustáceos, principalmente em caranguejos, camarões e lagostins. Considera-se a existência de quatro a cinco tipos celulares nas brânquias (Lawson *et al.*, 1995; Martinez *et al.*, 1999; Freire *et al.*, 2007):

- Células estriadas: envolvidas no transporte de íons, rica em mitocôndrias, com 10 a 20µm de profundidade;
- Células principais: pequenas com alguns vacúolos, localizadas na região anterior da brânquia, possuem grande área de superfície, predominando a função respiratória;
- Células pilares: multinucleadas e possivelmente relacionadas ao tecido conjuntivo, podendo atuar como sítios respiratórios e no transporte iônico. Possuem, ainda, microtúbulos desenvolvidos que permitem suporte e passagem da hemolinfa através da lamela branquial;
- Hemócitos granulares e nefrócitos (ou podócitos branquiais): os hemócitos granulares estão envolvidos na coagulação, encapsulação e fagocitose; já os nefrócitos estão associados à áreas de maior oxigenação, podendo remover partículas metabólicas, moléculas estranhas ou tóxicas.

Contudo, esses tipos celulares podem mudar com a espécie de crustáceo. No caranguejo *Ucides cordatus* estima-se que as brânquias anteriores possuem em torno de 27% de células principais, 40% de hemócitos e 16% de células estriadas/pilares; as brânquias posteriores possuem 15% de células principais, 28% de hemócitos e 29% de estriadas/pilares (Ortega *et al.*, 2011). Em camarões, lagostas e lagostins de água doce, por exemplo, encontram-se as células de rebordo, também denominadas “células franja”. Essas possuem uma fina cutícula formando microvilos e folhetos, que reduzem ou desaparecem com a aclimação em salinidade média, podendo apresentar tanto função respiratória quanto de transporte de íons (Freire *et al.*, 2007). Já em caranguejos marinhos osmoconformadores, encontram-se células finas que constituem uma função basicamente respiratória; porém, estas células podem atuar na excreção de amônia ou na absorção iônica (Freire *et al.*, 2007). Por outro lado, em caranguejos osmorreguladores encontram-se células mais espessas ou grossas, possuindo um grande número de mitocôndrias, com uma membrana em forma de folha ou microvilos, típicas para o transporte de íons (Freire *et al.*, 2007).

CAPÍTULO 2: O CÁDMIO E AMBIENTE

Abstract

Ucides cordatus is a mangrove crab with a very important role in human food consumption. Mangrove areas can be contaminated with heavy metals, like cadmium (Cd), through waste and disposal of batteries from industries. This metal reaches the animal through its gills, when is dissolved in the water, or through its hepatopancreas, from consumption of contaminated food. Because this metal does not have any physiological role for the animal, small concentrations can be extremely toxic. The objective of the work was to characterize the kinetics of Cd transport. For this, the gills of Cananéia and Itanhaém animals were separated at anterior and posterior gills and its cells were separated by enzymatic dissociation and then, labeled by Fluo 3 am. After that, the kinetics of Cd transport was characterized in the spectrofluorimeter, with addition of successive CdSO_4 and CdCl_2 concentrations (0.5, 1.0 and 1.5 μM), respectively. Results showed a sigmoidal curve for Cd transport after the addition of CdSO_4 and the presence of a Cd peak within 5 seconds after the injection of CdCl_2 . The results showed the presence of a Cd transport in the gill cells of the crab *Ucides cordatus*.

Key words: Gill cells, cadmium transport, *Ucides cordatus*

Resumo

O *Ucides cordatus* é um caranguejo que habita manguezais, sendo importante na alimentação humana. Estas regiões podem ser contaminadas com metais pesados, principalmente cádmio, através de dejetos de indústrias e descarte de pilhas e baterias. Esse metal atinge o animal inicialmente pelas suas brânquias, quando dissolvido na água, ou pelo hepatopâncreas, por meio da alimentação. Como não é um metal essencial, pequenas concentrações podem ser

extremamente tóxicas. Assim, o objetivo do trabalho foi caracterizar a cinética de transporte do cádmio. Para isso, as brânquias dos animais tanto de Cananéia quanto de Itanhaém foram separadas em anteriores e posteriores e suas células foram dissociadas pelo método de dissociação enzimático e marcadas com Fluo 3 am. Posteriormente, caracterizou-se a cinética do transporte no espectrofluorímetro, com sucessivas adições de CdSO_4 e CdCl_2 nas concentrações de 0,5, 1,0 e 1,5 μM . Obteve-se como resultado uma curva sigmóide para a adição de CdSO_4 , e um pico de entrada de Cd após 5 segundos de injeção para a adição de CdCl_2 concluindo-se que existe um transporte de Cd nas células branquiais do caranguejo *Ucides cordatus*.

Palavras chaves: Células branquiais, transporte de cádmio, *Ucides cordatus*

2.1. INTRODUÇÃO

2.1.1. Cádmio (Cd) e seus efeitos

O cádmio é um metal de transição, pertencente ao grupo IIB da tabela periódica, sendo encontrado em concentrações ao redor de 0,1 a 1,0 ppm na crosta terrestre. Este metal é o sexagésimo sétimo em abundância, entre 90 elementos presentes naturalmente na crosta terrestre (Joseph, 2009). Quantidades significativas de Cd são introduzidas no ambiente através de atividades naturais ou antropogênicas, sendo que estas últimas contribuem de 3-10 vezes mais à deposição de cádmio no ambiente quando comparadas com as atividades naturais (Joseph, 2009). Atividades vulcânicas, combustão de fósseis, queima de florestas e transporte de partículas de solos contaminados pelo vento, constituem as maiores atividades naturais responsáveis pela introdução de cádmio no ambiente (Joseph, 2009). O Cd possui grandes aplicações industriais e sua produção, em 2005, foi estimada em 20.000 toneladas. Este metal é frequentemente utilizado em galvanoplastia, pigmentos, pinturas (como estabilizantes), soldagem e em pilhas e baterias de Ni-Cd (Joseph, 2009).

Metais pesados provenientes de efluentes industriais contaminam os sistemas fluviais, os ambientes por onde percorrem e sua biota. Muitas áreas estuarinas e costeiras recebem o despejo de Cd pelo homem, afetando algumas espécies animais, como o caranguejo de manguezal, *Ucides cordatus* (Harris e Santos, 2000). As possíveis fontes de contaminação são os aterros sanitários, o esgoto residencial, o descarte de pilhas e baterias, efluentes de indústrias de fundição e metalúrgicas existentes na região (Ramos e Geraldo, 2007).

O acúmulo de metais em animais depende de sua concentração na água, sedimento e alimentos, bem como do período no qual os animais são expostos a essas concentrações (Kamude *et al.*, 2002). Estes metais podem impregnar os animais através dos epitélios de troca, como as brânquias, ou ainda através da alimentação (Pedersen e Bjerregaard, 1999; Nuñez-Nogueira e Rainbow, 2004; Ahearn *et al.*, 2004). Os metais podem acumular em tecidos de acordo com sua concentração externa, não sendo evidenciada qualquer regulação interna do cádmio em crustáceos (Soegianto *et al.*, 1999). O metal não é um elemento essencial aos processos metabólicos deste caranguejo, não apresentando aparente função fisiológica e regulação pelo organismo, variando em concentração nos tecidos de acordo com a exposição (Turoczy *et al.*, 2001); podendo ser tóxico mesmo em baixas concentrações (Playle *et al.*, 1993). O Cd pode substituir outros metais que são essenciais como o cobre (Cu) e o Zinco (Zn) no funcionamento de enzimas e co-fatores, interferindo no papel destes. O cádmio, ainda, induz a produção de metalotioneínas, proteínas que sequestram metais, como já observado para outros metais essenciais, como o Cu (Pedersen *et al.*, 1998; Mouneyrac *et al.*, 2001).

Vários estudos mostram que altas concentrações de cádmio podem ser letais aos crustáceos, possibilitando a ocorrência de efeitos fisiológicos adversos, especialmente na respiração e osmorregulação (Soegianto *et al.*, 1999). Exposições em altas concentrações (de 2.000 a 4.000 $\mu\text{g Cd.L}^{-1}$) reduz significativamente a capacidade de hipoosmorregulação em camarões expostos (Soegianto *et al.*, 1999). Assim, as brânquias, como são cruciais para

a respiração, balanço ácido-básico, regulação osmótica e iônica, ao entrar em contato com altas concentrações do metal, podem sofrer danos morfológicos resultando em deficiência respiratória e osmorregulatória (Soegianto *et al.*, 1999).

Além disso, os metais em geral são fortes inibidores da anidrase carbônica, enzima responsável pelas trocas gasosas (Christensen e Tucker, 1976; Skaggs e Henry, 2002), bem como de processos integrativos de transporte iônico e osmorregulação em crustáceos eurialinos. Assim, a inibição dessa enzima poderia potencialmente afetar a regulação de múltiplos íons de maneira indireta (Vitale *et al.*, 1999).

Outros estudos relataram que Cd pode alterar a expressão de centenas de genes envolvidos nas respostas de estresse, no desenvolvimento e crescimento de camundongos, além de afetar os níveis de segundo mensageiros, como o AMP cíclico e cálcio (Tvermoes *et al.*, 2011). Sugere-se, desta forma, que o cádmio pode ser capaz de ativar certos genes, resultando em uma elevação de cálcio intracelular. Contudo, os mecanismos pelos quais ocorre esta elevação de cálcio no meio intracelular são pouco compreendidos (Tvermoes *et al.*, 2011).

Através de estudos realizados por Tvermoes e colaboradores (2011), com células do intestino de camundongos, percebeu-se que concentrações de cádmio entre 1 e 10 μM não surtiram efeito na viabilidade celular e nos níveis de cálcio intracelular, embora já sejam suficientes para induzir respostas ou modificações gênicas. A viabilidade celular começa a diminuir quando as concentrações de Cd são de 30 μM ou mais, sendo assim consideradas concentrações altas para o organismo. Nessas concentrações ocorre uma grande morte celular, com redução dos estoques de cálcio do retículo endoplasmático e alterações da atividade transcricional de genes que respondem ao cálcio. Assim, acredita-se que concentrações de cádmio não citotóxicas induzem à transcrição de genes, independente da mobilização intracelular de cálcio, enquanto que em concentrações de cádmio citotóxicas, ocorre a morte celular e a mobilização seus estoques de cálcio do retículo

endoplasmático. Dessa maneira, Tvermoes e colaboradores (2011) acreditam que as alterações de cálcio intracelular ocorrem em consequência da morte celular, do que em ação direta da atividade do cádmio em induzir a liberação de cálcio no interior celular.

2.1.2. Transporte de cádmio

A maioria das pesquisas tem como foco a retirada do Cd do meio aquático e sua acumulação, mas pouca informação existe sobre seu transporte celular. As respostas tóxicas dos metais geralmente envolvem aspectos geoquímicos, pois a competição e complexação desses metais podem interferir com a sua quantidade disponível na água, afetando a biodisponibilidade para os animais expostos (Matsuo *et al.*, 2005). Em crustáceos, a retirada de metais aparentemente ocorre através das brânquias, onde o cádmio poderia passar por este epitélio através das vias paracelulares, junções ou entradas transcelulares (Pedersen e Bjerregaard, 1999).

Diversos estudos também observaram o efeito do Cd em animais em pós-muda, aparentemente relacionado à interação deste com o Ca (Delisle e Roberts, 1994; Zanders e Rojas, 1992). A retirada de Cd e Ca no caranguejo *Carcinus* em pós-muda, e o uso de radioisótopos para os dois íons, mostrou que o Cd é retirado do meio via canais de Ca localizados na membrana apical das brânquias desses caranguejos, após competição entre os dois íons (Bondgaard e Bjerregaard, 2005).

O influxo de Cd também parece ser dependente da salinidade. O acúmulo e os efeitos tóxicos do cádmio parecem aumentar em ambientes com baixas salinidades ou baixos níveis de cálcio (Zanders e Rojas, 1996). Quando há diminuição de salinidade, a quantidade de Cd livre no meio aumenta, tornando-o mais tóxico, por não se complexar com os íons de cloreto que ficam indisponíveis em baixa salinidade (Wright, 1995; Hall *et al.*, 1995). Como o cádmio compete com o cálcio, em baixas concentrações deste íon há a maior

entrada de cádmio, principalmente em animais que estão em meios diluídos (Zanders e Rojas, 1996).

Em resumo, o Cd parece entrar em células de crustáceos via canais para Ca, trocadores Na/Ca e via Ca ATPase, embora nenhum estudo tenha efetivamente observado em crustáceos, em nível celular, o transporte de Cd, utilizando inibidores específicos para cada tipo de transportador.

Assim, o objetivo desta primeira etapa experimental foi caracterizar o transporte de sulfato de cádmio em células branquiais marcadas com FluoZin, e o transporte de cloreto de cádmio em células marcadas com Fluo 3 am, nas concentrações de 0,5, 1,0 e 1,5 μM .

2.2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.2.1. Os animais

Os espécimes *Ucides cordatus* (Ordem: Decapoda; Família: Ucididae) foram coletados em Itanhaém, especificamente na Praia dos Pescadores, e em Cananéia, ambos pertencentes ao litoral de São Paulo, e trazidos para a Universidade Presbiteriana Mackenzie (campus São Paulo), onde foram aclimatados no viveiro da Universidade, em temperatura ambiente, alternando 12 horas claro/12 horas escuro. Os caranguejos foram acondicionados em tanques com água do mar, cascalho, filtro de água e canos/tijolos para uso como esconderijos e a emersão dos animais, respectivamente. A água do mar utilizada para acondicionar os caranguejos foi preparada, utilizando-se o sal “Red Sea Salt” (Red Sea) a uma salinidade final de 20.

2.2.2. Obtenção das células branquiais

Primeiramente, as brânquias foram separadas como anteriores e posteriores, sendo que os três primeiros filamentos branquiais são os anteriores, enquanto que os dois últimos são os posteriores. Assim, para cada tipo de filamento branquial, foi realizado o mesmo procedimento descrito abaixo.

Em uma proveta, colocou-se 10 mL de solução de extração e 200 µL de Tripsina (0,05%). As brânquias foram ressuspensas em solução e mantidas em gelo, ficando ali imersas durante 15 minutos. Foram então fragmentadas com tesoura (em solução de extração com Tripsina), por mais 15 minutos. Em seguida, foram levadas ao agitador em banho maria a 30°C por 15 minutos a 100rpm. Logo após, as brânquias foram filtradas em gaze, colocadas em tubos Falcon e levadas à centrifugação. As brânquias filtradas foram reservadas para a segunda digestão.

Tabela 1 abaixo mostra a composição da solução de extração celular:

Tabela 1: Composição da solução de extração de células de *Ucides cordatus*.

Composição	mM
NaCl	395
KCl	10
NaHCO ₃	2,5
NaH ₂ PO ₄	2,5
Hepes	3,75
Glicose	1
EDTA	0,9

As células foram centrifugadas sob refrigeração, a 5°C, por 5 minutos, em 115 g. Depois desta primeira centrifugação, uma parte das células que sedimentaram (pellet) foi ressuspensa em solução de extração e armazenadas em gelo, consistindo, assim, na primeira digestão. A segunda digestão foi feita nos mesmos parâmetros anteriores, utilizando-se as brânquias filtradas e reservadas da primeira digestão.

Em um eppendorf, colocou-se 200 µL de solução de células das brânquias anterior e posterior para 20 µL de Tripán Blue. Estas foram colocadas na câmara de Neubauer e observadas ao microscópio para contagem da viabilidade. Escolheram-se, aleatoriamente, quatro quadrantes e contaram-se as células viáveis, ou seja, as que não foram coradas pelo Tripán Blue, e as células inviáveis, que são aquelas coradas pelo reagente. Fez-se uma estimativa da viabilidade das células através da média aritmética entre os quatro quadrantes contados e, para obter o número total de células viáveis ou inviáveis presentes nas brânquias dos animais, multiplicou-se o resultado por 10^4 .

2.2.3. O transporte celular

As células foram marcadas por Fluo 3 am (1µM extracelular) durante 1 hora, em agitador a 100 rpm, em temperatura ambiente. Posteriormente, as células foram centrifugadas à 405 g por 5 minutos e, em seguida, lavadas com a mesma solução salina citada anteriormente, mas sem a presença de EDTA. No fluorímetro KC Júnior, a emissão utilizada foi de 525 nm e excitação de 495 nm, sendo o transporte de cádmio medido a cada 90 segundos.

Na placa de Elisa foi utilizado um volume de 180 µL de solução de células, que receberam sulfato de cádmio e, posteriormente, cloreto de cádmio em concentrações intracelulares de 0,5, 1,0 e 1,5 µM, com posterior medição da variação da fluorescência.

2.3. RESULTADOS

2.3.1. FluoZin e sulfato de cádmio (CdSO_4)

No início do experimento, as células apresentavam uma viabilidade em torno de 90% (dados não demonstrados). Logo em seguida, utilizou-se o FluoZin, altamente específico para o íon cádmio, como marcador fluorescente para as células branquiais, sendo testado o transporte de sulfato de cádmio (CdSO_4) nas concentrações de 6, 11 e 22 μM . O marcador apresentou baixa fluorescência na presença das células, indicando, possivelmente, que não apresentavam cádmio em seu interior. Porém, ao utilizar as concentrações previamente estabelecidas de CdSO_4 , as células apresentavam uma alta taxa de mortalidade, em torno de 80% (dados não demonstrados), indicando serem concentrações elevadas, afetando a viabilidade celular. Assim, foram testadas menores concentrações (0,5, 1,0 e 1,5 μM de CdSO_4). As células apresentaram um processo de transporte celular de sulfato de cádmio, porém um padrão de transporte não muito claro e com muita variação. Conforme visualizado nas figuras 2 e 3.

Figura 2: Média ($\pm$ erro padrão) do transporte de cádmio (CdSO_4) nas concentrações de 0,5, 1,0 e 1,5 μ M, medidas como variação de fluorescência em células das brânquias anteriores marcadas com FluoZin (N=4).

Figura 3: Média ($\pm$ erro padrão) do transporte de cádmio (CdSO_4) nas concentrações de 0,5, 1,0 e 1,5 μM , medidas como variação de fluorescência em células das brânquias posteriores marcadas com FluoZin (N=4).

Apesar do transporte de Cd estar mais elevado nas brânquias posteriores ($V_{\text{máx}}$) e com maior afinidade em relação às brânquias anteriores (K_m), percebeu-se que o sulfato de cádmio apresentava baixa dissociação quando em solução aquosa, deixando pouco Cd livre em solução, em função de sua constante de dissociação (K_d) ser próxima de 0,5 μM (Paddock *et al.*, 1999). Portanto, através de outros trabalhos desenvolvidos com esse metal, resolveu-se utilizar o cloreto de cádmio (CdCl_2), cujo $K_d = 1000 \mu\text{M}$ (Lou *et al.*, 1991). Isso ocorre porque o CdSO_4 é considerado um eletrólito fraco, não se

dissociando totalmente na água, e liberando poucos íons a medida que se dissolve.

2.3.2. Fluo 3 am e cloreto de cádmio (CdCl_2)

Desse modo, foi então testado o transporte de cloreto de cádmio nas células branquiais, em três concentrações (0,5, 1,0 e 1,5 μM), utilizando outro marcador específico para íons divalentes, em animais de Cananéia (Figuras 4 e 5). Através deste transporte inicial, pode-se observar o padrão de entrada do cádmio, onde, após os 30 segundos iniciais, houve um pico de entrada do metal e uma posterior queda do mesmo após 5 segundos, muitas vezes chegando a valores iniciais de fluorescência, principalmente nas concentrações de 1,0 e 1,5 μM . Na concentração de 0,5 μM , por sua vez, houve um transporte que se manteve significativamente mais alto em relação às concentrações de 1,0 e 1,5 μM (ANOVA; $*P<0,05$). As Figuras 6 e 7, por sua vez, demonstram a entrada de cádmio nos animais provenientes de Itanhaém. Da mesma forma, foi observado, também, um padrão de entrada de cádmio, com um pico após 30 segundos iniciais, com uma queda na fluorescência após 5 segundos em todas as concentrações, porém não significativamente. Percebe-se claramente uma diferença no padrão de marcação e variação de fluorescência das células, com um maior aumento da variação da fluorescência nas células dos animais de Itanhaém quando comparados aos de Cananéia.

Figura 4: Processo de entrada de cádmio (μM) medido como variação de fluorescência em relação ao tempo (s) nas brânquias anteriores de *Ucides cordatus* provenientes de Cananéia (SP), (N=4).

Figura 5: Processo de entrada de cádmio (μM) medido como variação de fluorescência em relação ao tempo (s) nas brânquias posteriores de *Ucides cordatus* provenientes de Cananéia (SP), (N=4; *P<0,05).

Figura 6: Processo de entrada de cádmio (μM), medido como variação de fluorescência em relação ao tempo (s), nas brânquias anteriores de *Ucides cordatus* provenientes de Itanhaém, (N=4).

Figura 7: Processo de entrada de cádmio (μM), medido como variação de fluorescência em relação ao tempo (s), nas brânquias posteriores de *Ucides cordatus* provenientes de Itanhaém, (N=4).

Após estes testes iniciais, foi possível comparar o transporte de cádmio ocorrido nas brânquias anteriores e posteriores, que nos dois casos foi crescente, de acordo com o aumento da concentração do metal. Nas brânquias anteriores, houve um aumento contínuo de entrada de cádmio, de acordo com o aumento da sua concentração. O maior aumento ocorreu na concentração de 1,5 μM (Figura 8A) sendo significativamente maior que as outras concentrações (ANOVA; $*P<0,05$). Já nas brânquias posteriores (Figura 8B), também ocorreu um aumento contínuo de entrada de cádmio de acordo com o aumento da sua concentração. Houve aumento significativo de cádmio nas concentrações de 1,0 e 1,5 μM , em relação à concentração de 0,5 μM (ANOVA; $*P<0,05$).

Na Figura 9, pode ser observado que ocorreu uma diferença de transporte entre as brânquias anteriores e posteriores. O transporte de cádmio foi maior nas brânquias posteriores, somente na concentração de 1,5 μM . (ANOVA, * $P < 0,05$).

Figura 9: Média ($\pm$ erro padrão) do transporte de cádmio, medido como variação de fluorescência, nas concentrações de 0,5, 1,0 e 1,5 μM nas brânquias anteriores e posteriores do caranguejo de manguezal *Ucides cordatus*, da região de Itanhaém, durante 5 segundos (N = 4; ANOVA; * $P < 0,05$).

2.4. DISCUSSÃO

Os crustáceos tornaram-se úteis como modelos experimentais *in vitro* para o estudo de processos endocrinológicos e neurofisiológicos (Mulford e Villena, 2000). Porém, poucos trabalhos com células de invertebrados foram realizados, tornando-se extremamente escasso e dificultoso a caracterização morfológica das células branquiais dos caranguejos.

2.4.1. FluoZin e sulfato de cádmio (CdSO_4)

Em um primeiro momento, realizaram-se os experimentos com o marcador FluoZin e com CdSO_4 . Estes experimentos apresentaram uma baixa marcação, pois o FluoZin é um marcador específico para cádmio e as concentrações intracelulares do metal eram baixas. Dessa forma, a marcação não foi satisfatória, com uma baixa fluorescência inicial. Além disso, com a utilização de sulfato de cádmio, houve menor presença de íons cádmio em solução, devido à sua menor constante de dissociação, quando comparado com o cloreto de cádmio (Paddock *et al.*, 1999). Por isso, foi necessário substituir o marcador FluoZin e o sulfato de cádmio, para o Fluo 3 am e cloreto de cádmio, respectivamente.

2.4.2. Fluo 3 am e cloreto de cádmio (CdCl_2)

Após as devidas substituições, iniciou-se o processo de verificação do transporte de cádmio. Neste caso, pode-se perceber que o cádmio apresentou um transporte rápido para o interior da célula, tanto nos animais provenientes de Cananéia quanto naqueles de Itanhaém. Este transporte caracterizou-se por um pico de entrada durante 5 segundos, com uma posterior queda, não ocorrendo o mesmo somente para a concentração de 0,5 μM . Este rápido transporte pode ser explicado devido à membrana plasmática das células branquiais. Estas células, por estarem em constante contato com o meio,

apresentam grande quantidade de transportadores e canais, permitindo que ocorra um processo de difusão e de transporte de íons e metais de maneira eficiente e rápida (Freire *et al.*, 2007).

Em seu trabalho de revisão, Freire e colaboradores (2007) destacam que existem células específicas responsáveis pelos processos de respiração e osmorregulação. Assim, as principais células responsáveis pela respiração do organismo são aquelas denominadas principais. Estas possuem uma grande quantidade de mitocôndrias, sendo encontradas, principalmente, nas brânquias anteriores. Já as brânquias posteriores possuem este tipo celular em menor quantidade, sendo muito mais abundante as células estriadas. Estas células possuem mitocôndrias e microtúbulos, sendo responsáveis principalmente pela troca iônica e osmorregulação. Assim, de acordo com a abundância de determinadas células, as brânquias possuem funções diferenciadas, sendo a brânquia anterior responsável pela respiração por conter uma maior quantidade de células principais; e, a brânquia posterior responsável pela osmorregulação, por conter uma grande quantidade de células estriadas (Ortega *et al.*, 2011). Desse modo, os tipos celulares de cada região branquial, evidenciam a principal função que cada brânquia desempenhará no organismo, sendo o fator primordial para evidenciar a maior entrada de cádmio nas brânquias posteriores quando comparadas com as anteriores, como visto aqui.

No primeiro experimento realizado, nas quais as brânquias anteriores e posteriores estavam expostas a diferentes concentrações de cádmio, estas funções tornaram-se mais evidentes. Neste caso, apenas a concentração de 1,5 μM houve uma maior entrada do metal em relação às outras concentrações, no caso das brânquias anteriores. Isso possivelmente ocorreu porque esta última concentração foi a maior utilizada e, como as brânquias anteriores são responsáveis pela respiração do animal, estas não realizam com grande eficiência a osmorregulação, contribuindo para este processo apenas quando encontra-se exposta a uma maior concentração de cádmio. Assim, acredita-se que não houve uma entrada significativa do metal nas brânquias

anteriores, porque estas estavam em concentrações baixas, além de não possuírem como principal função a osmorregulação e o transporte de íons.

Já as brânquias posteriores, por sua vez, são responsáveis pelos processos osmorregulatórios e de troca iônica, possuindo pouca capacidade respiratória (Freire *et al.*, 2007). Este processo também foi evidenciado no primeiro experimento, onde houve uma entrada significativa de cádmio nas brânquias posteriores nas concentrações de 1,0 e 1,5 μM . Isso provavelmente ocorreu porque estas são as maiores concentrações utilizadas, afetando com maior intensidade a capacidade de regulação das brânquias posteriores. Comparando-se os resultados das brânquias anteriores em relação ao das posteriores, percebeu-se que a entrada de cádmio foi significativamente maior nestas últimas na concentração de 1,5 μM . Este fato comprova, novamente, que as brânquias posteriores possuem uma maior capacidade de regular a entrada/saída de cádmio, possuindo uma função osmorregulatória muito mais evidenciada quando comparada com as brânquias anteriores (Freire *et al.*, 2007).

CAPÍTULO 3: O CÁLCIO E O ZINCO EM INTERAÇÃO COM O CÁDMIO

Abstract

Calcium is an important ion for intracellular signaling, and is found in the exoskeleton of crustaceans as calcium carbonate. Zinc is present as cofactors of enzymes, assisting in animal metabolism. The objective of this study was to observe the interaction of calcium and zinc on cadmium transport in gills cells of *Ucides cordatus*. Gills were divided into anterior and posterior, and their cells were dissociated by enzymatic process (Trypsin, 0.05%). Cells were labeled with Fluo 3 am and analyzed for the transport of cadmium (Cd), cadmium + calcium (Cd + Ca), cadmium + zinc (Cd + Zn), calcium (Ca) and zinc (Zn) at a concentration of 0.5, 1.0 and 1.5 μ M for each treatment. The results showed a competition between calcium and cadmium, and a possible competition between cadmium and zinc.

Key words: Cadmium, competition, calcium, zinc

Resumo

O cálcio é um importante íon na sinalização intracelular, além de compor a carapaça de crustáceos como carbonato de cálcio. O zinco está presente como cofatores de enzimas, auxiliando no metabolismo animal. O objetivo da pesquisa foi observar a interação do cálcio e do zinco no transporte de cádmio em células branquiais de *Ucides cordatus*. As brânquias foram separadas em anteriores e posteriores e suas células foram dissociadas através do processo enzimático (Tripsina, 0,05%). As células foram marcadas com Fluo 3 am e analisou-se o transporte de cádmio (Cd), cádmio + cálcio (Cd + Ca), cádmio + zinco (Cd + Zn), cálcio (Ca) e zinco (Zn), nas concentrações de 0,5, 1,0 e 1,5

μM para cada tratamento. Obteve-se como resultado a competição entre cálcio e cádmio e, uma possível competição entre cádmio e zinco.

Palavras chaves: Cádmio, competição, cálcio, zinco

3.1. INTRODUÇÃO

3.1.1. O cálcio e sua importância

O cálcio (Ca) é extremamente importante para o funcionamento dos organismos eucariotos. Nos animais, este íon desempenha um papel intracelular, através da sinalização para a formação de tecidos mineralizados, como os ossos e cutículas. Porém, o ciclo da muda dos crustáceos surgiu como um importante sistema modelo para o estudo da homeostase do cálcio (Wheatly *et al.*, 2002), devido a duas razões: 1) os crustáceos passam por estágios de muda, que caracterizam o crescimento, quando o animal necessita acumular íons cálcio em concentrações em torno de 2.000 a 3.500 $\mu\text{mol/Kg/h}$ para formar o novo exoesqueleto de CaCO_3 (Sá *et al.*, 2009); 2) o transporte de cálcio através de células epiteliais dos crustáceos pode ocorrer em qualquer direção, através do epitélio, dependendo do tecido estudado. Isto ocorre porque alguns crustáceos estocam cálcio durante a pré-muda, no hepatopâncreas e no estômago em forma de gastrólitos, mobilizando-o durante a pós-muda (Sá *et al.*, 2009). Estes animais também podem liberar cálcio através das brânquias durante a pré-muda, enquanto que na pós-muda, o cálcio é acumulado novamente.

Assim, por ser um íon divalente e essencial aos crustáceos, deposita-se na forma de carbonato de cálcio no novo exoesqueleto, após a carapaça antiga ser eliminada pelo animal (Zanotto *et al.*, 2004). Períodos críticos para a entrada do íon ocorrem durante os eventos da muda, quando os caranguejos precisam liberar a carapaça antiga e calcificar a nova durante o processo de pós-muda (Zanotto *et al.*, 2004).

O modelo celular para transporte de cálcio em células epiteliais em crustáceos (Figura 10) baseia-se em estudos de perfusão com membranas vesiculares *in vitro*, pertencentes à crustáceos aquáticos em intermuda, oriundos de diferentes ambientes e osmolaridades, com extrapolação para outros estágios de muda (Wheatly *et al.*, 2002). Assim, o modelo geral aceito determina um influxo unidirecional do cálcio, onde o íon entra passivamente pela membrana apical, através de uma difusão facilitada e mediada por trocadores ($\text{Ca}^{2+}/\text{nNa}^{+}$ ou H^{+}), ou canais de cálcio. Assim, o transporte de cálcio envolve um canal de cálcio sensível a verapamil, um trocador $\text{Ca}^{2+}/\text{nNa}^{+}$ ou H^{+} que pode ser sensível à amilorida, caso seja eletrogênico, ou insensível, caso seja eletroneutro (Sá *et al.*, 2009). Já o efluxo do íon ocorre pelo lado basolateral da membrana, envolvendo uma Ca^{2+} ATPase (PMCA), que regula os níveis intracelulares de cálcio, um trocador $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^{+}$ (NCX), responsável pelo efluxo de cálcio nas brânquias e no hepatopâncreas, e um canal de cálcio sensível à verapamil, que pode estar aberto em células hepatopancreáticas em pré-muda, para a entrada de cálcio, garantindo os estoques intracelulares (Wheatly *et al.*, 2002; Sá *et al.*, 2009). Além disso, para a manutenção de níveis de cálcio intracelulares no hepatopâncreas, há o envolvimento de proteínas que se ligam ao íon, grânulos responsáveis pelo estoque de cálcio, como o $\text{CaPO}_4/\text{CaSO}_4$, ou o sequestro em organelas como os retículo endoplasmático ou sarcoplasmático, mitocôndrias e lisossomos, utilizando-se de bombas de ATP (Sá *et al.*, 2009).

Figura 10: Modelo Representativo do influxo e efluxo de cálcio em crustáceos. Adaptado de Wheatly, M.G. *et al.*, **Calcium homeostasis in crustaceans: subcellular Ca dynamics**. Comp. Biochem. Physiol. B 132, 163-178. 2002.

O balanço de cálcio flutua significativamente durante o processo de muda. Na intermuda, os crustáceos aquáticos mantêm o balanço deste íon; na pré-muda ocorre a desmineralização da cutícula, resultando em efluxo; e na pós-muda ocorre um influxo significativo de cálcio de uma fonte externa para a mineralização da carapaça (Wheatly *et al.*, 2002).

Os caranguejos terrestres, por sua vez, possuem mecanismos para a regulação do cálcio através de suas brânquias. Porém, de acordo com a dieta existente, esses animais podem obter uma maior ou menor quantidade de cálcio, tornando necessária uma regulação ainda mais eficiente via dieta (Zanotto *et al.*, 2004). A obtenção de cálcio por meio da dieta, portanto, é extremamente importante aos caranguejos terrestres, desempenhando diferentes estratégias para a conservação desse íon, tais como a estocagem na hemolinfa e no sistema digestório (Zanotto *et al.*, 2004).

Assim, Zanotto e colaboradores (2004) realizaram estudos com o intuito de observar a homeostase e regulação do cálcio em dois caranguejos semi-terrestres, *Sesarma rectum* e *Neohelice granulata*. Percebeu-se que o fluxo de

cálcio era similar àquele encontrado no lagostim de água doce, *Procambarus clarkii*, porém não diminuindo após a ecdise nos caranguejos semi-terrestres. A partir deste fato, constatou-se que a entrada de cálcio através das brânquias de caranguejos semi-terrestres é extremamente importante ao balanço deste íon nestes animais, mas a dieta a longo prazo parece também ser importante a este fim. Além disso, por serem animais que realizam a muda no interior de galerias, há uma constante disponibilidade de água e de cálcio, sendo necessário tal contato com esta fonte hídrica durante a pós-muda. Outro ponto a ser considerado é que, por não haver disponibilidade de alimento durante o experimento, estes caranguejos mantiveram o alto fluxo de cálcio através da captação do íon pelas brânquias (Zanotto, *et al.*, 2004). Quando se forneceu uma dieta com quantidades diferentes de cálcio, constatou-se que os animais consumiram mais a dieta que apresentava uma maior quantidade do sal de cálcio. Assim, pode-se perceber que estes caranguejos detectam e utilizam tanto o cálcio presente na água, como na dieta.

3.1.2. O Zinco

Os metais pesados são os poluentes mais comuns em áreas costeiras. Porém, os metais de transição, como o zinco, são essenciais à saúde de muitos organismos, formando proteínas, envolvidas em várias funções biológicas. No entanto, concentrações excessivas desses íons podem ser tóxicas, ligando-se inapropriadamente às moléculas biologicamente sensíveis ou, ainda, formando radicais livres (Sá *et al.*, 2009). Consequentemente, há um fino balanço entre a falta ou excesso de metais, sendo vital à manutenção da homeostase destes nos organismos, através da absorção ou excreção (Sá *et al.*, 2009).

O zinco, por sua vez, é um metal essencial devido à sua importante função estrutural e catalítica para várias proteínas, desempenhando papel fundamental no crescimento, reprodução, desenvolvimento, visão e funções imunes. Além disso, o zinco também é cofator em inúmeras metaloenzimas, sendo também

um componente funcional para fatores de transcrição de proteínas que contribuem para a expressão gênica e regulação (Sá *et al.*, 2009).

Este metal exerce, ainda, uma influência significativa nos sistemas nervoso e imune, no metabolismo da vitamina A e na calcificação normal dos ossos (Sá *et al.*, 2009). Porém, em peixes, o zinco pode ser tóxico, interferindo na homeostase de cálcio, tendo nas brânquias o principal alvo de várias ações tóxicas, devido ao sistema de transporte iônico no epitélio branquial, principalmente do cádmio e zinco, que atravessam o epitélio (entrada apical), atingindo as células de cloreto.

Numerosos estudos mostram que o cálcio inibe a entrada de zinco pelas brânquias dos peixes. O cálcio interage com o transportador para entrada de zinco, sugerindo que a entrada deste metal pode ocorrer via um canal de cálcio sensível a lantânio, localizado nas células de cloreto branquiais. Quimicamente, o zinco está relacionado com o cálcio, ocasionando hipocalcemia através da inibição do transporte de cálcio pela Ca ATPase da membrana basolateral das células de cloreto (Sá *et al.*, 2009).

De acordo com Sá e colaboradores (2009), o zinco não parece ser transportado pela membrana basolateral, por uma Ca ATPase ou por um mecanismo dependente do efluxo de sódio. Sugere-se que, este metal, possa ser transportado através do epitélio basolateral por um transportador de zinco, porém, o efluxo de zinco precisa ser melhor estudado.

A análise da cinética do efeito que o cálcio exerce no transporte de zinco na membrana apical de células branquiais do camarão, mostra que aumentando a concentração de cálcio na água, eleva-se o K_m para o influxo de zinco. Isso sugere que o cálcio e zinco podem competir pelo mesmo sítio de entrada na membrana apical das células branquiais do camarão (Soegianto *et al.*, 1999).

Assim, o objetivo desta segunda etapa experimental foi caracterizar a interação entre cloreto de cádmio e cálcio, e entre cádmio e zinco em células branquiais de animais da região de Cananéia e Itanhaém.

3.2. MATERIAIS E MÉTODOS

3.2.1. O transporte celular com adição de cálcio e zinco

3.2.1.1. O Cálcio

Este experimento foi realizado utilizando-se o procedimento de transporte celular. Assim, 180 μ L de células branquiais viáveis (cerca de 90%) da região anterior e posterior foram colocados em placas de Elisa. Após esta etapa, iniciou-se o processo de transporte adicionando-se cloreto de cádmio somente (Cd), cloreto de cádmio + cálcio (Cd + Ca), e cálcio somente (Ca), nas concentrações de 0,5, 1,0 e 1,5 μ M, observando-se a variação da fluorescência.

3.2.1.2. O Zinco

Para o tratamento com zinco, seguiu-se o mesmo procedimento citado anteriormente. As células foram marcadas com Fluo 3 am (1 μ M extracelular) , durante 1 hora. Em seguida, as células foram centrifugadas durante 5 minutos a 405 g e lavadas com tampão sem EDTA. Logo em seguida, foram colocados 180 μ L de células em uma placa de Elisa e injetaram-se soluções de cádmio controle (Cd), cádmio + zinco (Cd + Zn) e apenas zinco (Zn), nas concentrações de 0,5, 1,0 e 1,5 μ M. Assim, houve uma medição de fluorescência inicial, 30 segundos após ocorreu a injeção das respectivas soluções, com a nova medição da fluorescência após 5 segundos de injeção.

3.3. RESULTADOS

3.3.1. Transporte de cádmio em interação com cálcio e zinco

Após a verificação da viabilidade do transporte de cádmio, efetuou-se o

transporte de cálcio em associação com o Cd, nas concentrações de 0,5, 1,0 e 1,5 μM . Para melhor compreensão, optou-se por realizar gráficos separados para cada tipo branquial. Assim, notaram-se diferenças de transporte entre os tipos branquiais ocorrendo um menor transporte de cádmio nas brânquias anteriores quando comparadas às brânquias posteriores. Porém, tanto as brânquias anteriores quanto as posteriores apresentaram um transporte significativo de cádmio (ANOVA; $*P<0,05$), seja em relação ao cálcio ou ao cádmio + cálcio juntos (Figuras 11A e 11B):

Após os experimentos desenvolvidos com Cd + Ca, resolveu-se testar a interferência do zinco (Zn) no transporte de Cd, já que este também é um íon divalente, como o cálcio. Desta forma, houve uma medição da fluorescência inicial das células e, após 30 segundos, injetou-se cádmio nas concentrações pré estabelecidas. Em um outro conjunto de células, realizou-se o mesmo procedimento, porém injetando Cd + Zn nas mesmas concentrações utilizadas em todos os outros experimentos e, por último, em um outro conjunto de células, injetou-se apenas Zn. Não houve diferença significativa entre os diferentes tratamentos (Figura 12A). O mesmo ocorrendo em relação às brânquias posteriores (Figura 12B).

manguezal <i>Ucides cordatus</i> da região de Cananéia (N=4).	manguezal <i>Ucides cordatus</i> da região de Cananéia (N=4).
---	---

3.3.2. Animais de Itanhaém X Animais de Cananéia

Todos os resultados com o marcador FluoZin e sulfato de cádmio, além dos experimentos com Cd + Ca, foram realizados com animais provenientes de Itanhaém (Praia dos Pescadores). Porém, os resultados dos experimentos realizados com Cd + Zn, e todos os outros experimentos seguintes, foram realizados com animais oriundos de Cananéia. Logo, os mesmos testes realizados com o controle de cádmio em animais de Itanhaém também foram aplicados aos animais de Cananéia, obtendo-se resultados diferenciados em relação à entrada do íon Cd, medidos como variação de fluorescência, mais baixos no caso de animais de Cananéia. Isso pode ser observado na comparação dos resultados apresentados na Figura 13A (Cananéia) em relação à figura 8A (Itanhaém). O mesmo sendo obtido para as brânquias posteriores, que apresentaram menor transporte de cádmio para Cananéia (Figura 13 B) quando confrontado ao de Itanhaém (Figura 8B).

A seguir, as brânquias anteriores e posteriores foram analisadas em conjunto, (Figura 14), tendo sido confirmado um maior transporte nas brânquias posteriores, em relação às anteriores, independente da concentração utilizada (ANOVA; ***P<0,001).

Figura 14: Média ($\pm$ erro padrão) do transporte de cádmio, medido como variação de fluorescência, nas concentrações de 0,5, 1,0 e 1,5 μM nas brânquias anteriores e posteriores do caranguejo de manguezal *Ucides cordatus*, da região de Cananéia. (N=4; ANOVA; ***P<0,001).

3.4. DISCUSSÃO

3.4.1. Transporte de cádmio em interação com cálcio (Ca^{2+}) e zinco (Zn^{2+})

Neste experimento, foi adicionado cálcio às células, nas concentrações de 0,5, 1,0 e 1,5 μM (veja Figuras 11A e 11B). Neste caso, houve uma entrada maior de cádmio em todas as concentrações, quando comparado com somente cálcio e cádmio + cálcio, sendo esta entrada significativa apenas na concentração de 1,5 μM nas brânquias anteriores. Já nas brânquias posteriores, a entrada de cádmio foi maior àquela ocorrida nas brânquias anteriores, significativa independente da concentração testada. Isso se dá, primeiramente, pela característica das células encontradas em cada região branquial, sendo

aquelas responsáveis pela osmorregulação, as células estriadas, muito mais presentes nas brânquias posteriores (29%) às anteriores (16%) (Freire *et al.*, 2007; Ortega *et al.*, 2011)).

Outro fator importante é a característica do cádmio, com geometria muito parecida à do íon cálcio (Bondar *et al.*, 1995). Desse modo, a célula possivelmente transportaria o cádmio por sua característica morfológica muito similar à do íon cálcio, passando livremente através de transportadores de cálcio (ou canais para o cálcio). Além disso, a Figura 10 revela uma maior entrada de cádmio quando se encontra sozinho menor na presença de cálcio, sugerindo uma competição entre eles pelo sítio de entrada na célula. Isso pode ser comprovado por estudos realizados com o caranguejo *Carcinus* em pós-muda usando radioisótopos para os dois íons, mostrando que o Cd é retirado do meio via canais de Ca localizados na membrana apical das brânquias desses caranguejos, após competição entre os dois íons (Bondgaard e Bjerregaard, 2005).

Em peixes, cátions metálicos se acoplam às brânquias e determinam a toxicidade do metal (Matsuo *et al.*, 2005). O Cd causa alterações na homeostase do Ca, envolvendo competição entre os dois íons pelo canal de entrada de Ca, provavelmente contido nas células de cloreto das brânquias de peixes; além disso, o Cd interrompe a homeostase do Ca através da inibição de bombas da Ca ATPase basolaterais nestas mesmas células (Matsuo *et al.*, 2005). Estes autores observaram que o tambaqui exposto a 10-80 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de Cd resultou em inibição da retirada de Ca do meio.

Após estes experimentos realizados, iniciou-se o estudo do transporte de zinco, cádmio e zinco + cádmio. De acordo com estudos anteriores, o zinco possui uma alta afinidade com o marcador Fluo 3 am, sendo maior que a afinidade pelo cálcio e semelhante à afinidade do cádmio por este marcador (Minta *et al.*, 1989). Desse modo, foi possível realizar os testes utilizando o marcador Fluo 3 am.

Assim, nas células das brânquias anteriores e posteriores foram realizados transportes de cádmio, zinco + cádmio e zinco nas concentrações de 0,5, 1,0 e

1,5 μM . Não foi constatada diferença entre os tratamentos, sendo uma primeira possibilidade, seria que os íons cádmio e zinco não interagem entre si.

Outra possibilidade seria a existência de canais específicos para zinco, que são codificados por genes, como, por exemplo, o ZIP8 e o ZIP14. Estudos revelam que a super expressão do ZIP8 conduz a uma entrada e retenção de zinco na célula, além de cádmio e manganês. Já o ZIP14, começou a ser estudado em 2005, resultando em um papel similar ao ZIP8, além de permitir a entrada de ferro para compor proteínas (Jenkitkasemwong *et al.*, 2012). Dessa forma, o cádmio poderia utilizar estes canais de zinco para entrar na célula, competindo também com este metal por sítios ativos. Assim, também se pode sugerir a entrada de cádmio através de canais para zinco, pois, os canais ZIP8 e ZIP14 podem transportar metais divalentes (Zn^{2+} , Fe^{2+} , Mn^{2+} e Cd^{2+}), não sendo um canal específico (Jenkitkasemwong *et al.*, 2012).

Contudo, de acordo com os resultados obtidos, pode-se perceber que, há uma competição entre o cádmio e o zinco, porque, quando os dois íons estão em conjunto, não há uma entrada maior desses metais (ou uma maior fluorescência total). Dessa forma, acredita-se que há uma interferência do zinco na entrada do cádmio, ocorrendo a competição pelos canais e trocadores da célula. Outra possibilidade seria que, com a adição de Zn, há um aumento do transporte de Cd no sentido basolateral para apical e, conseqüentemente, há uma diminuição do acúmulo celular de Cd. Dessa forma, com a entrada de Zn há uma saída de Cd (Endo, 2002).

3.4.2. Animais de Itanhaém X Animais de Cananéia

Vale ressaltar que os experimentos iniciais foram realizados com animais provenientes de Itanhaém e, a partir dos experimentos com o metal zinco, os animais utilizados eram de Cananéia. Notou-se claramente uma diferença de variação de fluorescência, onde os animais de Itanhaém apresentavam uma

variação de fluorescência de cádmio maior quando comparada aos animais de Cananéia. Estes animais, por estarem em diferentes regiões estuarinas e costeiras, encontram-se em concentrações variadas de metais pesados, provenientes de indústrias (Harris e Santos, 2000). Logo, os animais presentes em Itanhaém poderiam estar em contato com concentrações diferentes de metais quando comparados com os animais de Cananéia, assim, as células branquiais poderiam transportar os metais pesados de maneiras diferentes, devido à diferença de concentração do metal no ambiente e ao tempo de exposição e contato deste animal com fontes contaminadas (Kamude *et al.*, 2002). Este fato ainda encontra-se em estudo, requerendo mais pesquisas para determinar a influência ambiental no transporte de metais em células branquiais.

CAPÍTULO 4: ATP, OS INIBIDORES E SUAS AÇÕES

4.1. INTRODUÇÃO

Os inibidores ou bloqueadores de canais são tipos de drogas que se ligam à um sítio específico no interior de canais iônicos, bloqueando o fluxo de íons através destes canais, resultando em uma alteração no gradiente eletroquímico de uma célula. Os principais bloqueadores são aqueles de canais de cálcio, de cloreto, de potássio e de sódio. Além disso, existem inibidores responsáveis pela inibição de enzimas associadas a determinados processos catalíticos. Entre eles está o vanadato, um inibidor de enzimas responsáveis pela fosforilação do ATP (Wheatly *et al.*, 2002).

4.1.1. Vanadato

O ortovanadato é um potente inibidor da fosforilação de ATPases, incluindo as cálcio-ATPases. Este inibidor interage com o sítio intracelular hidrolítico do ATP, inibindo as enzimas responsáveis pela fosforilação do ATP durante o processo catalítico. Assim, o vanadato inibe a entrada de cálcio dependente de ATP em vesículas de lagostim e hepatopâncreas de lagosta (Wheatly *et al.*, 2002).

4.1.2. ATP e mobilização de cálcio

A entrada de cálcio dependente de ATP foi parcialmente caracterizada em dois estudos utilizando vesículas de crustáceos marinhos. As bombas de cálcio dependentes de ATP só foram bem caracterizadas, posteriormente, em isolados de vesículas de epitélio de membranas basolaterais e em brânquias de crustáceos (lagostim) de água doce em intermuda (Wheatly *et al.*, 1999). O

cálcio dependente de ATP entra nas vesículas epiteliais da mesma maneira como em bombas de cálcio presentes na membrana basolateral, chamadas de Ca ATPase (PMCA). Dessa forma, com a depleção de ATP há uma diminuição das taxas de entrada de cálcio em vesículas de espécies marinhas (Wheatly *et al.*, 1999). Em células inteiras, a bomba de cálcio auxilia a retirar Ca de dentro da célula, mantendo a homeostase interna deste íon na célula.

4.1.3. Amilorida

Amilorida tem sido largamente utilizado como um inibidor epitelial do transporte de sódio. Este diurético pode bloquear canais de sódio, antiporters Na^+/H^+ , antiporters $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ e eventuais rotas paracelulares. Este inibidor é usado em vários estudos de absorção de NaCl através de brânquias posteriores de caranguejos litorâneos hiperosmorreguladores, como *Carcinus maenas* (Onken e Riestenpatt, 2002). Uma variedade de efeitos é observada, sugerindo interações entre o inibidor e antiporters Na^+/H^+ , canais apicais de sódio, rotas paracelulares e a cutícula branquial (Onken e Riestenpatt, 2002). Em dois estudos, concentrações externas de amilorida foram utilizadas para observar a interação e efeitos deste no transporte em brânquias de caranguejos. Nestes estudos, o fluxo de sódio, através de brânquias isoladas perfundidas, foi inibido pelo amilorida externo de maneira dose dependente, e a diferença de potencial transbranquial interna negativa tornou-se hiperpolarizada (Onken e Riestenpatt, 2002). Este fato reflete que a absorção de sódio ocorre via apical antiporter Na^+/H^+ . Além disso, sugere que este transporte é paracelular, passivo e sensível à amilorida (Onken e Riestenpatt, 2002).

Em estudos com lamelas branquiais, um fluxo de corrente transepitelial negativo elevou-se para valores mais negativos através da adição de amilorida externamente, e a resistência transepitelial aumentou simultaneamente. Estes resultados revelam uma captação de sódio eletrogênico via canais apicais de sódio ou via trocadores eletrogênicos $2\text{Na}^+/\text{H}^+$, juntamente com a absorção de NaCl simporte mediada (Onken e Riestenpatt, 2002). Outro fato constatado foi

que, em vesículas de membranas de brânquias de caranguejos litorâneos, há um trocador eletrogênico sensível à amilorida $2\text{Na}^+/1\text{H}^+$.

Corroborando com os efeitos em níveis celulares, a cutícula isolada de brânquias também demonstrou ser sensível à amilorida. Em concentrações de 1 mmol/L, o inibidor reduziu a condutância da cutícula de *Carcinus maenas*. Porém, a localidade do sítio sensível à amilorida em brânquias de caranguejos litorâneos permanece desconhecida (Onken e Riestenpatt, 2002). Dessa forma, pode-se constatar que o fluxo de sódio através da cutícula é inibido pelo uso do amilorida, através de uma interação entre o inibidor e o lado externo da cutícula, descartando interações entre a droga e os transportadores na membrana apical ou entre as junções paracelulares. Isto pode ser observado por meio das características presentes nas cutículas de caranguejos, sendo esta lipoprotéica, não calcificada e permeável (Onken e Riestenpatt, 2002).

Esta permeabilidade seletiva ocorre devido a específicas regiões, que discriminam ânions de cátions e partículas de tamanhos diferentes. Com base neste fato, o amilorida pode inibir, de modo geral, a condutância de cátions nas cutículas de brânquias de caranguejos litorâneos (Onken e Riestenpatt, 2002).

Porém, deve-se ressaltar que o amilorida não inibe completamente o influxo e efluxo de sódio. Em doses máximas do inibidor, de 20-30% do fluxo de sódio é mantido. Assim, rotas paracelulares presentes no epitélio branquial do caranguejo litorâneo apresentam seleção de cátions, com alta condutância. Desse modo, o sódio absorvido do espaço subcuticular poderia ser reciclado ao longo destas rotas, aumentando o fluxo de corrente transepitelial (Onken e Riestenpatt, 2002).

4.1.4. Ouabaína

O inibidor ouabaína afeta Na^+/K^+ ATPase, implicando em um movimento transepitelial de Na^+ em brânquias de crustáceos e de peixes teleósteos, porém

de maneira circunstancial (Burnett e Towle, 1990). Estudos em brânquias perfundidas de teleósteos evidenciam um aumento na pressão de perfusão induzida pela ouabaína, além de inibir a excreção de amônia pelas brânquias dos teleósteos (Burnett e Towle, 1990).

Porém, em um experimento realizado com brânquias perfundidas de *Callinectes sapidus*, comprovou-se que a ouabaína não produz efeito algum na pressão de perfusão e nem na taxa de fluxo, conseguindo separar os efeitos produzidos na circulação dos efeitos específicos no transporte de Na^+ (Burnett e Towle, 1990). Assim, a ouabaína presente em uma perfusão interna, inibe a entrada de Na^+ , e sua concentração depende da presença da Na^+/K^+ ATPase, que pode ser saturada. Desse modo, a ouabaína aplicada internamente causa uma grande redução do influxo de Na^+ através de brânquias perfundidas, também demonstrada em um trabalho realizado com *Carcinus maenas* (Burnett e Towle, 1990).

Contudo, a falta de uma inibição completa do influxo de Na^+ pela ouabaína possui explicações. A Na^+/K^+ ATPase em crustáceos é pouco sensível à inibição por ouabaína quando comparada com a Na^+/K^+ ATPase de outros artrópodes ou de vertebrados. Esta baixa sensibilidade, juntamente com o potencial problema de acesso do inibidor aos sítios transportadores nas invaginações da membrana basolateral, sugere que somente algumas frações de Na^+/K^+ ATPase são inibidas. Outra explicação, é que poderia existir um outro sistema de transporte de Na^+ localizado na membrana basolateral, independente da Na^+/K^+ ATPase, sendo um sistema de co-transporte envolvendo $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ inibido por furosemida, identificado em brânquias de teleósteos (Burnett e Towle, 1990).

4.1.5. BAPTA

Em organismos vivos, a sinalização de cálcio (Ca^{2+}) é central para a fisiologia celular. O BAPTA tem sido utilizado como um quelante para testar o papel do

Ca^{+} em diversas funções celulares (Saoudi *et al.*, 2004). Esta substância é conhecida como um quelante de Ca^{+} intracelular, além de bloquear a ativação do potencial de ação de Ca^{+} , no caso de células neuronais (Zhang e Harris-Warrick, 1995).

O BAPTA possui em sua composição anéis de benzeno ligados entre oxigênio e nitrogênio, resultando em uma melhor ação do quelante. Além disso, por não perder elétrons em pH fisiológico e nem durante a sua complexação com o cálcio, mostra-se mais eficiente na taxa de complexação do cálcio, quando comparado com o EGTA (Saoudi *et al.*, 2004).

Em contrapartida, o BAPTA e seus análogos podem ser utilizados para fins terapêuticos. Este quelante, especificamente, demonstra-se capaz de atenuar a liberação de neurotransmissores em sinapses centrais de mamíferos; outros estudos comprovam, ainda, que o BAPTA pode reduzir a isquemia neuronal *in vivo* (Saoudi *et al.*, 2004).

Saoudi e colaboradores (2004) evidenciaram que o BAPTA pode estar envolvido na despolimerização de microtúbulos, ocorrendo no citoesqueleto de maneira geral, sendo completamente independente do que se sabe a respeito das propriedades de um quelante de cálcio. Além disso, estudos demonstraram que o BAPTA pode ser utilizado como indicador fluorescente de cálcio e possui grande capacidade de se ligar ao cádmio com afinidade de cerca de 70% quando comparado ao cálcio (Tvermoes *et al.*, 2011).

Assim, o objetivo desta terceira etapa experimental foi caracterizar o transporte de cloreto de cádmio em interação com os inibidores, ATP e BAPTA, em células marcadas com Fluo 3 am, nas concentrações de 0,5, 1,0 e 1,5 μM .

4.2. MATERIAIS E MÉTODOS

4.2.1. Amilorida

O mesmo procedimento de transporte celular utilizado anteriormente foi empregado neste transporte com a utilização de inibidores. Dessa forma, 180 μ L de células branquiais da região anterior e 180 μ L de células branquiais da região posterior de animais da região de Cananéia, marcadas por Fluo 3 am (1 μ M extracelular) foram colocadas em placas de Elisa e incubadas com amilorida 3 mM durante 3 minutos. Posteriormente, injetou-se cloreto de cádmio nas concentrações de 0,5, 1,0 e 1,5 μ M, analisando-se a variação da fluorescência emitida.

4.2.2. Vanadato

O procedimento aplicado com amilorida também foi executado com o vanadato. Assim, 180 μ L de células branquiais (células da região anterior e da região posterior) foram colocadas em placa de Elisa e incubadas com vanadato 100 μ M durante 3 minutos. Logo em seguida, injetou-se cloreto de cádmio de acordo com as concentrações previamente utilizadas, analisando a variação da fluorescência.

4.2.3. Ouabaína

O mesmo foi realizado com a ouabaína, incubando as células branquiais com o inibidor a 3 mM durante 3 minutos. Após este procedimento, também se injetou cloreto de cádmio e analisou-se a variação da fluorescência.

4.2.4. ATP

Com o ATP, seguiu-se um procedimento diferente. 180µL de células foram colocadas em placa de Elisa. Em seguida, injetaram-se soluções de cloreto de cádmio somente e cloreto de cádmio + ATP na concentração de 1,5 µM. Logo após, analisou-se o transporte celular em tempo real.

4.2.5. BAPTA

Também foi analisado o transporte celular com a utilização de BAPTA a 2 mM. Este foi incubado nas células juntamente com o marcador Fluo 3 am, durante 1 hora, à temperatura ambiente. Em seguida, as células foram centrifugadas a 405 g durante 5 minutos e lavadas com tampão sem EDTA. Posteriormente, foram colocadas 180 µL de células previamente incubadas com BAPTA em placa de Elisa, e injetaram-se soluções de cloreto de cádmio e soluções de cloreto de cádmio + ATP, na concentração de 1,5 µM. Dessa forma, o transporte envolvendo cádmio + ATP foi analisado em tempo real.

4.3. RESULTADOS

4.3.1. Transporte de cádmio e diferentes inibidores

Nesta etapa, iniciou-se o processo de transporte de cádmio utilizando-se os inibidores amilorida, vanadato e ouabaína. A Figura 15A demonstra os resultados obtidos com o experimento. As células das brânquias anteriores apresentaram um menor transporte de cádmio com os inibidores em todas as concentrações testadas de cádmio, sendo este transporte significativo com

relação ao controle (ANOVA; * $P < 0,05$). Para o amilorida, na concentração de 0,5 μM o transporte foi mais elevado comparado ao controle sem amilorida (ANOVA; * $P < 0,05$; Figura 15A). As brânquias posteriores apresentaram transporte de cádmio tanto nas células controle quanto nas células com os inibidores. Ocorreu um maior transporte de cádmio de forma significativa (ANOVA; * $P < 0,05$), apenas na concentração de 1,0 μM em presença de ouabaína, com relação ao controle (Figura 15B).

Posteriormente ao experimento das células com as brânquias anteriores e posteriores submetidas aos inibidores, iniciou-se o experimento em que as células, após serem incubadas com BAPTA, foram submetidas aos mesmos inibidores amilorida, vanadato e ouabaína. Os resultados mostram que as células das brânquias anteriores transportaram em todas as concentrações de cádmio à que se encontravam, porém, não ocorreu de forma significativa ($P=0,9$). Isso é observado na figura abaixo (Figura 16A). Da mesma forma, as células das brânquias posteriores também foram incubadas com BAPTA e submetidas aos inibidores. Estas células também apresentaram um transporte de cádmio em todas as concentrações presentes no experimento e, como nas brânquias anteriores, este transporte não foi significativamente diferente do controle para nenhuma concentração. Pode-se observar este resultado na Figura 16B.

concentrações de 0,5, 1,0 e 1,5 μM em células controle e com os inibidores amilorida, vanadato e ouabaína, incubadas com BAPTA, nas brânquias anteriores do caranguejo de manguezal <i>Ucides cordatus</i> da região de Cananéia (N=4).	concentrações de 0,5, 1,0 e 1,5 μM em células controle e com os inibidores amilorida, vanadato e ouabaína, incubadas com BAPTA, nas brânquias posteriores do caranguejo de manguezal <i>Ucides cordatus</i> da região de Cananéia (N=4).
--	---

4.3.2. Cádmio em presença de ATP

Após os experimentos realizados com BAPTA, iniciaram-se os testes com ATP. Assim, iniciou-se uma leitura de fluorescência controle das células e, após 30 segundos, injetou-se o ATP junto com o Cd na concentração de 1,5 μM , e o transporte foi analisado em tempo real. Os gráficos que se seguem estão separados por concentração para facilitar a visualização. Desse modo, observa-se que, nas brânquias anteriores, as células + ATP na concentração de 1,5 μM possuiu uma variação de fluorescência menor com relação às células controle, sendo esta diferença significativa (ANOVA; *** $P < 0,001$). Isso pode ser observado na Figura 17.

Em relação às brânquias posteriores, estas também apresentam o mesmo padrão de transporte em relação às brânquias anteriores. As células + ATP apresentaram uma variação de fluorescência menor que as células controle, ocorrendo de forma significativa (ANOVA; *** $P < 0,001$; Figura 18).

Figura 17: Média e erro padrão da variação de fluorescência na brânquia anterior controle e na presença de ATP na concentração de 1,5μM (N=4; ANOVA; ***P<0,001).

Figura 18: Média e erro padrão da variação de fluorescência na brânquia posterior controle e na presença de ATP na concentração de 1,5μM (N=4; ANOVA; ***P<0,001).

4.3.3. Efeito do BAPTA (quelante intracelular de Ca)

Após esta primeira etapa de experimentos, resolveu-se testar a influência do BAPTA (quelante de cálcio intracelular) no transporte de cádmio. Dessa forma, os gráficos abaixo demonstraram o transporte de cádmio quando as células estão ou não incubadas com BAPTA a 2 mM. Nota-se que, nas brânquias anteriores, as células não incubadas com BAPTA apresentam um menor transporte em relação às células incubadas com o BAPTA, porém, este transporte foi significativo na concentração de 1,5 μM (** $P < 0,001$). Isso pode ser visualizado na Figura 19A. O mesmo procedimento foi realizado com as brânquias posteriores, onde células com e sem BAPTA foram submetidas ao transporte de cádmio. Ao contrário do que ocorreu nas brânquias anteriores, as células sem BAPTA das brânquias posteriores apresentaram um maior transporte de cádmio em todas as concentrações testadas, quando comparadas com as células com BAPTA, sendo este transporte significativo (ANOVA; *** $P < 0,001$; Figura 19B).

<p>Figura 19A: Média ($\pm$ erro padrão) do transporte de cádmio, medido como variação de fluorescência, nas concentrações de 0,5, 1,0 e 1,5μM em células com e sem BAPTA, nas brânquias anteriores do caranguejo de manguezal <i>Ucides cordatus</i> da região de Cananéia (N=4; P<0,001).</p>	<p>Figura 19B: Média ($\pm$ erro padrão) do transporte de cádmio, medido como variação de fluorescência nas concentrações de 0,5, 1,0 e 1,5μM em células com e sem BAPTA, nas brânquias posteriores do caranguejo de manguezal <i>Ucides cordatus</i> da região de Cananéia (N=4; P<0,001).</p>
--	--

Os mesmos testes com ATP realizados anteriormente, também foram executados, porém, na presença das células incubadas com BAPTA a 2 mM. O procedimento utilizado foi o mesmo; houve uma primeira leitura da fluorescência das células incubadas com BAPTA e, após 30 segundos, houve a injeção de ATP nas concentrações pré determinadas. Os resultados também foram separados por região branquial para serem melhor visualizados. Nas brânquias anteriores, as células incubadas com BAPTA + ATP apresentaram uma queda na variação da fluorescência, não sendo significativa, podendo ser observado na Figura 20. Nas brânquias posteriores, por sua vez, as células + ATP apresentaram um ligeiro aumento na variação da fluorescência em relação ao controle, sendo significativo na concentração de 1,5 μ M (ANOVA; *P<0,05). Estes resultados estão demonstrados na Figura 21.

Figura 20: Média e erro padrão da variação de fluorescência na brânquia anterior controle e na presença de ATP, pré-incubadas com BAPTA a 2 mM na concentração de 1,5μM (N=4).

Figura 21: Média e erro padrão da variação de fluorescência na brânquia posterior controle e na presença de ATP, pré-incubadas com BAPTA a 2 mM na concentração de 1,5μM (N=4; ANOVA; *P<0,05).

4.4. DISCUSSÃO

4.4.1. Transporte de cádmio e diferentes inibidores

O inibidor amilorida atua nos trocadores Na^+/H^+ e $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ eletrogênico, com a inibição deste trocador, houve a entrada significativa de cádmio na concentração de 0,5μM, nas brânquias anteriores. Dessa forma, acredita-se que o cádmio utilizou outra via para entrada, utilizando canais de cálcio (Silvestre *et al.*, 2004), já que o metal compete com o cálcio, podendo utilizar de seus canais para a entrada na célula. Porém, houve uma diminuição significativa da entrada de cádmio na concentração de 1,0 e 1,5 μM, sugerindo assim que, nestas concentrações, o metal pode utilizar os trocadores Na^+/H^+ e $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ eletrogênico como possível rota de entrada de cádmio. Outra possível

rota de entrada do cádmio é através de um trocador inorgânico aniônico (Endo, 2002). Em brânquias posteriores, por outro lado, houve a entrada de cádmio equivalente ao controle em todas as concentrações utilizadas na presença de amilorida, dessa forma, pode-se sugerir que o cádmio entra nas brânquias posteriores por um trocador inorgânico aniônico ou via canais de cálcio (Endo, 2002).

De acordo com Endo (2002), há dois tipos de trocadores aniônicos inorgânicos ($\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$): dependente de Na^+ , que media a entrada de Na^+ e HCO_3^- e a saída de Cl^- ; e outro independente de Na^+ , que media a entrada de Cl^- e a saída de HCO_3^- , ocorrendo o transporte de cádmio de maneira significativa pelo trocador aniônico dependente de Na^+ quando comparado com o trocador aniônico independente de Na^+ . Dessa forma, acredita-se que o Cd poderia utilizar também de um trocador aniônico inorgânico dependente de Na^+ , competindo com este íon pelo trocador, para atingir o interior celular.

Já o inibidor vanadato atua na Ca ATPase, inibindo assim a saída de Ca^{2+} . Contudo, houve uma diminuição significativa da entrada de cádmio nas concentrações testadas nas brânquias anteriores (veja figura 15A), enquanto que, nas brânquias posteriores, o vanadato não apresentou efeito significativo. Endo (2002), em seus estudos, sugere uma secreção de Cd via trocador H^+ . Nesta pesquisa, a secreção de cádmio via trocador H^+ foi testada em vesículas de rim de ratos e em intestino do mesmo animal. Os resultados demonstraram que, com a saída de H^+ , há um acúmulo de Cd no interior das vesículas e, consequentemente, com a entrada de H^+ há uma saída de Cd, assim, pode-se sugerir a existência de um trocador $\text{Cd}^{2+}/\text{H}^+$ na membrana celular. Outro possível fator seria que, com um aumento de cálcio intracelular, pois o vanadato, atuando na Ca ATPase, impediria a saída de cálcio, o cádmio, por competição com o cálcio, não entraria na célula, diminuindo assim a variação da fluorescência medida (Bondgaard e Bjerregaard, 2005).

O inibidor ouabaína, por sua vez, atua na Na^+/K^+ ATPase, inibindo-a. Na brânquia anterior, houve uma diminuição significativa nas concentrações testadas (veja figura 15A). Assim, acredita-se que, o sódio poderia atuar na

entrada de cádmio (Silvestre *et al.*, 2004), via um trocador $\text{Na}^+/\text{Cd}^{2+}$ e, com a inibição da Na^+/K^+ ATPase, diminuiria o gradiente de Na^+ na célula, afetando a entrada de Cd. Outras rotas que também poderiam ser utilizadas, como discutido anteriormente, seriam os canais de cálcio, forte competidor com o metal Cd, ou ainda trocadores aniônicos este último também dependente do equilíbrio de Na^+ na célula (Silvestre *et al.*, 2004; Endo, 2002).

A brânquia posterior, por sua vez, apresentou um transporte de cádmio igual ao controle na presença de todos os inibidores utilizados. Mas, as células, na presença de ouabaína a 1,0 μM , realizaram um transporte significativo de cádmio, mais elevado comparado ao controle. A ouabaína é um inibidor atuante na Na^+/K^+ ATPase. Dessa forma, com um aumento na concentração de sódio no interior celular, houve um aumento na entrada de cádmio, sugerindo que o sódio atuaria na entrada de cádmio (Silvestre *et al.*, 2004), ou ainda a participação de trocadores aniônicos inorgânicos dependente de sódio, como relatado anteriormente, ou ainda uma difusão passiva de cádmio (Endo, 2002). Nas concentrações de 0,5 e 1,5 μM de cádmio na presença de ouabaína, não houve um transporte de cádmio diferente do controle, indicando assim a possível entrada do metal por outras rotas, tais como canais de cálcio ou trocadores aniônicos inorgânicos (Postel *et al.*, 1998; Endo, 2002; Silvestre *et al.*, 2004). Porém, no presente momento, não é possível determinar efetivamente essas diferenças.

Os inibidores também foram utilizados em células incubadas com BAPTA. Porém, tanto em brânquias anteriores como em brânquias posteriores, houve o transporte de cádmio, mas sem resultados significativos entre os diferentes inibidores. Isso ocorre devido à composição do BAPTA. Este quelante possui anéis de benzeno que se ligam fortemente ao cálcio, mas, como o cádmio apresenta uma geometria semelhante ao íon, o BAPTA também se liga ao cádmio, diminuindo, dessa forma, a variação da fluorescência e, conseqüentemente, diminui também a concentração intracelular de cádmio

disponível na célula, já que sua maior parte apresenta-se quelado ao BAPTA (Tvermoes *et al.*, 2011), anulando o efeito dos diferentes inibidores.

4.4.2. Cádmio em presença de ATP

Realizaram-se experimentos com a injeção de ATP, após 30 segundos de medição da fluorescência em células controle, sem BAPTA. Nas brânquias anteriores, observou-se uma queda significativa da variação de fluorescência de cádmio na concentração de 1,5 μM + ATP. Através deste fato, pode-se concluir que as células da brânquia anterior, por desempenharem um forte papel na respiração animal (Freire *et al.*, 2007), transportaram o cádmio ou o cálcio para o meio extracelular. Esta queda significativa da variação da fluorescência pode ter ocorrido devido à saída de cálcio pela Ca ATPase, ou ainda através da saída do cádmio pela Ca ATPase, pois o metal apresenta uma geometria muito semelhante ao cálcio, podendo substituí-lo.

Já as brânquias posteriores apresentam células específicas para a osmorregulação no animal (Freire *et al.*, 2007). Houve uma diminuição significativa da variação de fluorescência de cádmio na concentração de 1,5 μM + ATP, com um pico de entrada de cádmio e posterior queda. Pode-se concluir, dessa forma, que o ATP poderia não auxiliar na entrada de cádmio, sendo assim, o metal seria transportado por um trocador e não por uma bomba (Endo, 2002). Outra característica que comprova esta conclusão é que o cádmio apresenta um aspecto inibidor da Na^+/K^+ ATPase e da Ca ATPase (Postel *et al.*, 1998). Dessa forma, a célula não utilizaria energia para a entrada de cádmio, apresentando uma entrada do metal por canais de cálcio, já que o cádmio compete com o íon, trocadores de sódio ou ainda por trocadores aniônicos (Postel *et al.*, 1998; Endo 2002). De acordo com Postel e colaboradores (1998), o cádmio é um inibidor da Na^+/K^+ ATPase, sendo comprovado que o metal é transportado para o interior celular através de trocadores, não sendo necessário a utilização de energia (ATP) para a entrada de cádmio. Para que a Na^+/K^+ ATPase funcione adequadamente, necessita-se

do zinco para catalisar a fosforilação da enzima, para que esta haja de forma eficiente. Contudo, com a ligação do cádmio na enzima, o metal muda o estágio de fosforilação, inibindo os efeitos da Na^+/K^+ ATPase (Postel *et al.*, 1998). Outra possível explicação seria que, com a presença de ATP, a Ca ATPase seria ativada e, conseqüentemente, colocaria os íons cálcio para fora da célula, diminuindo a variação da fluorescência no interior celular, devido à saída de cálcio, ou ainda, poderia atuar na saída de cádmio da célula, pois o metal apresenta uma geometria semelhante ao cálcio, possivelmente não existindo uma Cd ATPase.

4.4.3. Efeito do BAPTA (quelante intracelular de Ca)

Com a utilização do BAPTA como quelante de cálcio intracelular, as brânquias anteriores apresentaram um transporte similar de cádmio em células incubadas com BAPTA e comparadas com as células controle. Já nas brânquias posteriores, as células controle apresentaram um transporte maior em relação às células incubadas com BAPTA, sendo este transporte significativo para todas as concentrações. Primeiramente, deve-se ressaltar a diferença encontrada entre os tipos celulares de cada região branquial. A brânquia anterior apresenta células próprias para a respiração, desempenhando esta função no organismo, já as brânquias posteriores apresentam células específicas para a osmorregulação e transporte de íons e metais (Freire *et al.*, 2007). Em um segundo momento, o BAPTA apresenta uma composição com anéis de benzeno, ligando-se fortemente com o cálcio, mas, em contrapartida, como o cádmio apresenta uma geometria muito semelhante ao do cálcio, o BAPTA também poderia se ligar ao metal no interior celular, diminuindo assim a concentração de cádmio intracelular (Tvermoes *et al.*, 2011). Dessa forma, acredita-se que a baixa variação de fluorescência de cádmio na presença de BAPTA ocorreu devido à ligação do metal com o quelante de cálcio intracelular,

já que a conformação geométrica do cádmio assemelha-se ao cálcio, podendo assim, influenciar na concentração intracelular desse metal.

Em seguida, o mesmo experimento com ATP foi realizado, porém, as células foram incubadas com BAPTA. Os mesmos procedimentos foram realizados, com a injeção de ATP após 30 segundos de medição de fluorescência. Para as células das duas brânquias, tanto o controle quanto as células com ATP e BAPTA, a variação de fluorescência foi negativa. As células das brânquias anteriores apresentaram uma diminuição da variação de fluorescência na concentração de $1,5 \mu\text{M}$ + ATP comparado ao controle. Já as brânquias posteriores apresentaram uma diminuição significativa na variação de fluorescência do controle em relação à concentração de $1,5 \mu\text{M}$ + ATP. Pode-se sugerir que, as brânquias anteriores, por possuírem células específicas para a respiração (Freire *et al.*, 2007), não transportaria o cádmio com eficiência, ou, o cálcio seria transportado para o meio extracelular via Ca ATPase, ou ainda, o cádmio, devido à geometria semelhante do metal em relação ao cálcio, poderia também ser transportado para o meio extracelular via Ca ATPase, não existindo uma Cd ATPase. Já nas brânquias posteriores, com a presença de BAPTA, houve uma menor variação de fluorescência em relação às células controle, porém, uma variação negativa. Assim, da mesma forma, o ATP não poderia atuar na entrada de cádmio, mas sim na saída do metal via Ca ATPase. Contudo, o BAPTA, além de quelar o cálcio intracelular, também quela o cádmio, sendo assim, percebe-se uma menor concentração intracelular de cádmio, tanto nas células controle, quanto nas células + ATP, sugerindo novamente uma saída de cádmio via Ca ATPase, pois a célula não apresenta uma Cd ATPase, já que observou-se uma queda da concentração de cádmio no meio intracelular (Tvermoes *et al.*, 2011).

2. DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES

O cádmio, presente em pilhas e baterias, pode ser descartado no meio ambiente, principalmente em regiões costeiras e estuarinas, atingindo assim os mangues. O animal *Ucides cordatus*, por habitar estas áreas, encontra-se em contato direto com o metal, principalmente suas brânquias, sendo necessário, assim, mecanismos de regulação para a entrada e saída do cádmio. Assim, iniciou-se o processo de estudo das células branquiais na regulação do metal cádmio.

Para tanto, utilizou-se, primeiramente, um marcador específico para cádmio, o FluoZin, porém, este não apresentava uma marcação satisfatória, possivelmente porque a célula possuía concentrações muito baixas de cádmio intracelulares. Dessa forma, primeiramente, pode-se concluir que o melhor marcador a ser utilizado para a detecção de cádmio era o Fluo 3 am, pois este evidenciou uma maior variação de fluorescência em relação ao FluoZin, além de constatar uma maior interação com cádmio quando comparado ao cálcio.

Posteriormente, estudaram-se os processos de transporte. Ao utilizar CdSO_4 , as células apresentaram um transporte de Cd em cinética, com uma curva sigmóide, onde, possivelmente, há o auxílio de outros íons para este transporte, mas, como o sulfato de cádmio dissocia-se fracamente em meio aquoso, decidiu-se utilizar o cloreto de cádmio.

Percebeu-se, assim, que o transporte de cádmio se dá nas concentrações de 0,5, 1,0 e 1,5 μM , sem causar danos celulares, e se torna mais eficiente quando utilizado o cloreto de cádmio, por dissociar-se de maneira mais eficiente em meio aquoso. Esse transporte ocorre através de um pico de entrada do metal, logo após 5 segundos de injeção de cádmio nas concentrações de 0,5, 1,0 e 1,5 μM , e uma posterior queda, sendo as brânquias posteriores as principais regiões de troca iônica e de transporte.

Após verificar o transporte de cádmio, decidiu-se utilizar o cálcio e zinco, com o intuito de observar a interação desses íons com o cádmio, já que são íons divalente, assim como o metal. Observou-se, dessa forma, uma competição entre os íons cálcio e o cádmio, onde, sugere-se que o cádmio poderia entrar nas células por canais de cálcio. Com relação ao zinco, também se observou uma competição entre os íons, porém, necessita-se de maiores estudos. O ATP, por apresentar uma sinalização via receptor purinérgico, não entrando na célula, pode influenciar na saída de cádmio via Ca.

Ao utilizarem-se os inibidores, percebeu-se que o cádmio poderia ser transportado via canais de cálcio, trocadores Na^+/H^+ , ou ainda através de trocadores aniônicos inorgânicos dependentes ou não de Na^+ , porém, necessita-se de maiores estudos. Já o BAPTA apresentou-se também como um quelante de cádmio, através da diminuição da variação de fluorescência apresentada pelas células, indicando que o quelante de cálcio poderia também ser utilizado como um quelante intracelular de cádmio.

RESUMO

O *Ucides cordatus* é um caranguejo que habita mangues. Estas regiões podem ser contaminadas com o cádmio, através de dejetos de indústrias e descarte de pilhas e baterias, atingindo o animal por meio de suas brânquias. Assim, o objetivo da dissertação foi verificar a cinética de transporte do cádmio com o uso de inibidores específicos, e sua interação com o cálcio, zinco e ATP. Para isso, as brânquias foram separadas em anteriores e posteriores, e as células foram dissociadas pelo método de dissociação enzimática; a seguir, as células foram marcadas com Fluo 3 am e realizada a cinética de transporte no espectrofluorímetro, adicionando-se concentrações de 0,5, 1,0 e 1,5 μ M de sulfato de cádmio (CdSO₄), cloreto de cádmio (CdCl₂), cádmio + cálcio, cádmio + zinco, cálcio e zinco para verificar a interação do Cd com cálcio ou zinco. Posteriormente, houve a adição dos inibidores como vanadato, amilorida, ouabaína e BAPTA às células, e, novamente, efetuou-se o transporte de cádmio nas concentrações 0,5, 1,0 e 1,5 μ M. Em seguida, adicionou-se ATP e efetuou-se o transporte de cádmio nas mesmas concentrações citadas anteriormente. Os resultados mostraram um transporte de cádmio sigmoidal, quando em presença de CdSO₄, e um pico de 5 segundos de entrada de cádmio e uma posterior queda, quando em presença de CdCl₂; além de uma provável competição entre o cádmio e o cálcio e entre o cádmio e o zinco. Observou-se também uma efetiva ação dos inibidores, indicando que o cádmio possivelmente entrou na célula através de canais de cálcio, trocadores Na⁺/H⁺ e trocadores aniônicos dependentes ou não de Na⁺. Percebeu-se ainda que o ATP não influenciou na entrada de cádmio, ou seja, aparentemente não existe uma Cd ATPase nas células branquiais de *Ucides cordatus*.

Palavras chaves: Transporte de cádmio, células branquiais, *Ucides cordatus*

ABSTRACT

Ucides cordatus is a crab that lives in mangroves. These regions may be contaminated with cadmium by industrial wastes and disposal of batteries, reaching the animal through its gills, being a toxic metal. The aim of the study was to investigate the kinetics of cadmium transport using specific inhibitors, and its interaction with calcium, zinc and ATP. For this, the gills were separated in anterior and posterior regions, and their cells were dissociated by enzymatic dissociation. After, the cells were labeled with Fluo 3 am and the kinetics of transport of cadmium were performed in a spectrofluorimeter by adding CdSO_4 and CdCl_2 at concentrations of 0.5, 1.0 and 1.5 μM . For the interaction experiments Cd was added as, cadmium + calcium, cadmium + zinc, calcium and zinc alone. A subsequent experiment, addition of inhibitors such as vanadate, amiloride, ouabain and BAPTA were performed, and again, the transport of cadmium was studied at concentrations of 0.5, 1.0 and 1.5 μM . Then, ATP was added and the transport of cadmium was performed in the same concentrations mentioned above. Results showed a sigmoidal curve, when in presence of CdSO_4 , and a peak of 5 seconds for cadmium uptake and a posterior decline when in the presence of CdCl_2 . In addition, probably occurred a competition between calcium and cadmium and between cadmium and zinc, and here was also an effective action of some inhibitors, indicating that cadmium probably entered the cell by calcium channels, Na^+/H^+ exchangers and exchangers anionic inorganic dependent of Na^+ or not. ATP had no effect for cadmium influx, suggesting that there is no Cd ATPase present in gill cells of *Ucides cordatus*.

Key words: Cadmium transport, gill cells, *Ucides cordatus*

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHEARN, G.A.; DUERR, J.M.; ZHUANG, Z.; BROWN, R.J.; ASLAMKHAN, A.; KILLEBREW, D.A. **Ion transport processes of crustacean epithelial cells.** *Physiol. Biochem. Zool.*, 72(1):1-18, 1999.

AHEARN, G.A.; MANDAL, P.K.; MANDAL, A. **Mechanisms of heavy-metal sequestration and detoxification in crustaceans: a review.** *J. of Comp. Physiol. B.* 174(6): 439-452, 2004.

BONDAR, V. S.; SERGEEV, A. G.; ILLARIONOV, B. A.; VERVOORT, J. AND HAGEN, W. R. **Cadmium -induced luminescence of recombinant photoprotein obelin.** *BBA*, 1231, 29-32, 1995.

BONDGAARD, M. AND BJERREGAARD, P. **Association between cadmium and calcium uptake and distribution during the moult cycle of female shore crabs, *Carcinus maenas*: an in vivo study.** *Aquat. Toxicol.* 72. 17-28. 2005.

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

BURNETT, L. E. AND TOWLE, D. W. **Sodium ion uptake by perfused gills of the blue crab *Callinectes sapidus*: effects of ouabain and amiloride.** J. Exp. Biol., 149, 293-305, 1990.

CASTILHO-WESTPHAL, G. G.; OSTRENSKY, A.; PIE, M. R.; BOEGER, W. A. **The state of the art of the research on the mangrove land crab, *Ucides cordatus*.** Arch. Veter. Science, 13, n. 2: 151-166. 2008.

CHRISTENSEN, G. AND TUCKER, J. **Effects of selected water toxicants on in vitro activity of fish carbonic-anhydrase.** Chemico-Biological Interact. 13. 181-192. 1976.

DELISLE, P. AND ROBERTS, M. **The effect of salinity on cadmium toxicity in the estuarine mysid *mysidopsis-bahia* – roles of osmoegulation and calcium.** Mar. Environ. Res. 37. 47-62. 1994.

ENDO, T. **Transport of cadmium across the apical membrane of epithelial cell lines.** Comp. Biochem. Physiol., C 131, 223-229, 2002.

FREIRE, C. A.; ONKEN, H. AND MCNAMARA, J. C. REVIEW. **A structure function analysis of ion transport in crustacean gills and excretory organs.** Comp. Biochem. Physiol.,A: 151(3): 272-304, 2007.

HALL, L.; ZIEGENFUSS, M.; ANDERSON, R. AND LEWIS, B. **The effect of salinity on the acute toxicity of total and free cadmium to a Chesapeake Bay copepod and fish.** Mar. Pollut. Bull. 30. 376-384. 1995.

HARRIS, R. R. AND SANTOS. M. C. F. **Heavy metal contamination and physiological variability in the Brazilian mangrove crabs *Ucides cordatus* and *Callinectes danae* (Crustacea: Decapoda).** Mar. Biol. 137. 691-703. 2000.

HENRY, R. P. AND CAMERON, J. N. **The role of carbonic anhydrase in respiration, ion regulation and acid-base balance in the aquatic crab *Callinectes sapidus* and the terrestrial crab *Gecarcinus lateralis*.** J. Exp. Biol. 103: 205-223. 1982.

JENKITKASEMWONG, S.; WANG, C.-Y.; MACKENZIE, B. AND KNUTSON, M. D. **Physiologic implications of metal-ion transport by ZIP14 and ZIP18.** Biometals, 2012.

JOSEPH, P. **Mechanisms of cadmium carcinogenesis.** TAAP, 238, 272-279, 2009.

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

LAWSON, S. L.; JONES, M. B. AND MOATE, R. M. **Effect of copper on the ultrastructure of the gill epithelium of *Carcinus maenas* (Decapoda: Brachyura).** Mar. Poll. Bull. 31: 63-72. 1995.

LOU, M.; GARAY, R. AND ALDA, J. O. **Cadmium uptake through the anion exchanger in human red blood cells.** J. of Phhysiol. 443: 123-136. 1991.

MAINA, J. N. **Locations, ultrastructural morphology, and putative functions of the branchial podocytes of the fresh water crab *Potamon niloticus* – Savigy (Crustacea, Decapoda, Potaminidae).** Tissue & Cell. 30: 5 562-572, 1998.

MARTINEZ, 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 & Cell. 31: 3 380-389, 1999.

MATSUO, A. Y. O.; WOOD, C. M. AND VAL, A. L. **Effects of copper and cadmium on ion transport and gill metal binding in the Amazonian teleost tambaqui (*Colossoma macropomum*) in extremely soft water.** Aquatic Toxicology, 74, 351-364, 2005.

MINTA, A.; KAO, J. P. Y. AND TSIEN, R. Y. **Fluorescent indicators for cytosolic calcium based on rhodamine fluorescein chromophores.** J. Biol. Chem, 264, 8171-8178, 1989.

MONTEILH-ZOLLER, M.; ZONNO, V.V.; STORELLI, C.; AHEARN, G. **Efeffects of zinc on L-[H-3]proline uptake by lobster (*Homarus americanus*) hepatopancreatic brush-border membrane vesicles.** J. Exp. Biol., 202, 3003-3010, 1999.

MOUNEYRAC, C. AMIARD-TRIQUET, C. AMIARD, J. AND RAINBOW, P. **Comparison of metallothionein concntrations and tissue distribution of trace metals in crabs (*Pachygrapsus marmoratus*) from a metal-rich estuary, in and out of the reproductive season.** Comp. Biochem. Physiol. C 129, 193-209. 2001.

MULFFORD, A. L. AND VILLENA, A. J. **Cell cultures from crustaceans: Shrimps, crabs and crayfish.** In: MOTHERSILL, C. AND AUSTIN, B. *Aquatic invertebrate cell culture*. Springer Verlag. Berlin. 63-134. 2000.

NORDHAUS, I. **Feeding ecology of the semi-terrestrial crab *U. cordatus* (Decapoda: Brachyura) in a mangrove forest in northern Brazil.** Tese (Doutorado em Ciência Naturais) – Zentrum für Marine Tropenökologie, Universität Bremen, 217 p., 2003.

NUÑEZ-NOGUEIRA, G. AND RAINBOW, P. S. **Cadmium uptake and accumulation by the decapod crustacean *Penaeus indicus*.** Mar. Environ. Resear. 60. 339-354. 2005.

ONKEN, H. AND RIESTENPATT, S. **Ion transport across posterior gills of hyperosmoregulating shore crabs (*Carcinus maenas*): amiloride blocks the cuticular Na⁺ conductance and induces current-noise.** J. Exp. Biol., 205, 523-531, 2002.

ORTEGA, P.; SÁ, M. G.; CUSTÓDIO, M. R. AND ZANOTTO, F. P. **Separation and viability of gill and hepatopancreatic cells of a mangrove crab *Ucides cordatus*.** In Vitro Cell. Dev. Biol.- Animal, 47, 346-349, 2011.

PADDOCK, M. L.; GRAIGE, M. S.; FEHER, G. AND OKAMURA, M. Y. **Identification of the proton pathway in bacterial reaction centers: inhibition of proton transfer by binding of Zn²⁺ or Cd²⁺.** Proc. Natl. Acad. Sci., 96, 6183-6188, 1999.

PEDERSEN, S. N.; PEDERSEN, K. L.; HOJRUP, P.; KNUDSEN, J. AND DEPLEDGE, M. H. **Induction and identification of cadmium-, zinc- and copper-metallothioneins in the shore crab *Carcinus maenas* (L.)**. Comp. Biochem. Physiol. C 120, 251-259. 1998.

PEDERSEN, T. V. AND BJERREGAARD, P. **Cadmium influx and efflux across perfused gills of the shore crab, *Cacinus maenas***. Aqua. Toxicol. 48. 223-231. 1999.

PLAYLE, R. DIXON, D. BURNISON, K. **Copper and cadmium-binding to fish gills-estimates of metal gill stability-constants and modeling of metal accumulation**. Canadian Journal Fish Aquatic Sciences, 50, 2678-2687, 1993.

POSTEL, U.; PETRAUSCH, G.; RIESTENPATT, S.; WEIHRAUCH, D.; MALYKH, J.; BECKER, W. AND SIEBERS, D. **Inhibition of Na/K ATPase and of active ion transport functions in the gills of the shore crab *Carcinus maenas* induced by cadmium**. Mar. Biol., 130, 407-416, 1998.

RAMOS, M. G. M. AND GERALDO, L. P. **Engenharia Sanitária Ambiental**. 12: 4, Rio de Janeiro. 2007.

RINDERHAGEN, M.; RITTERHOFF, J. AND ZAUKE, G. P. **Crustaceans as bioindicators**. Env. Res. Forum. 9: 161-194. 2000.

SÁ, M. G.; AHEARN, G. A. AND ZANOTTO, F. P. **$^{65}\text{Zn}^{2+}$ transport by isolated gill epithelial cells of the American lobster, *Homarus americanus***. J. Comp. Physiol., 179, 605-615, 2009.

SAOUDI, Y.; ROUSSEAU, B.; DOUSSIÈRE, J.; CHARRASSE, S.; GAUTHIER-ROUVIÈRE, C.; MORIN, N.; SAUTET-LAUGIER, C.; DENARIER E.; SCAÏFE, R.; MIOSKOWSKI, C. AND JOB, D. **Calcium independent cytoskeleton disassembly induced by BAPTA**. Eur. J. Biochem., 271, 3255-3264, 2004.

SILVESTRE, F.; TRAUSCH, G.; PEQUEUX A. AND DEVOS, P. **Uptake of cadmium through isolated perfused gills of the Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis***. Comp. Biochem. Physiol. A 137, 189-196. 2004.

SKAGGS, H. AND HENRY, R. **Inhibition of carbonic anhydrase in the gills of two euryhaline crabs, *Callinectes sapidus* and *Carcinus maenas*, by heavy metals**. Comp. Biochem. Physiol. C 133, 605-612. 2002.

SOEGianto, A.; CHARMANTIER-DAURES, M.; TRILLES, J.-P. AND CHARMANTIER, G. **Impact of cadmium on the structure of gills and epipodites of the shrimp *Penaeus japonicus* (Crustacea: Decapoda)**. Aquat. Living Resour. 12 (1). 57-70. 1999.

STEVICIC, Z. **The main features of brachyuran evolution**. Syst. Zool., 22: 625-632. 1971.

TSAI, J. R. AND LIN, H. C. **V-type H⁺-ATPase and Na⁺, K⁺-ATPase in the gills of 13 euryhaline crabs during salinity acclimation**. J. Exp. Biol 210: 620-627. 2006.

TUROCZY, N. J.; MITCHELL, B. D.; LEVINGS, A. H. AND RAJENDRAM, V. S. **Cadmium, copper, mercury, and zinc concentrations in tissues of the King**

Crab (*Pseudocarcinus gigas*) from southeast Australian waters. *Envir. Intern.* 27. 327-334. 2001.

TVERMOES, B. E.; BIRD, G. S. AND FREEDMAN, J. H. **Cadmium induces transcription independently of intracellular calcium mobilization.** *PLoS ONE*, 6:6, 2011.

VITALE, A.; MONSERRAT, J.; CASTILHO, P. AND RODRIGUEZ, E. **Inhibitory effects of cadmium on carbonic anhydrase activity and ionic regulation of the estuarine crab *Chasmagnathus granuata* (Decapoda: Grapsidae).** *Comp. Biochem. Physiol. C* 122, 121-129. 1999.

WHEATLY, M. G.; PENCE, R. C. AND WEIL, J. R. **ATP-dependent calcium uptake into basolateral vesicles from transporting epithelia of intermolt crayfish.** *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 276, R566-R574, 1999.

WHEATLY, M. G.; ZANOTTO, F. P. AND HUBBARD, M. G. **Calcium homeostasis in crustaceans: subcellular Ca dynamics.** *Comp. Biochem. Physiol. B* 132, 163-178. 2002.

WRIGHT, D. **Trace-metal and major interactions in aquatic animals.** *Mar. Pollut. Bull.* 31, 8-18. 1995.

YANG, Z. B., ZHAO, Y. L., LI, N. AND YANG, J. **Effect of waterborne copper on the microstructures of gill and hepatopancreas in *Eriocheir sinensis* and is induction of metallothionein synthesis.** *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 52: 222-228. 2006.

ZANDERS, I. AND ROJAS, W. **Cadmium accumulation, lc_{50} and oxygen-consumption in the tropical marine amphipod *Elasmopus rapax*.** Mar Biol. 113, 409-413. 1992.

ZANDERS, I. AND ROJAS, W. **Salinity effects on cadmium accumulation in various tissues of the tropical fiddler crab *Uca rapax*.** Environ. Pollut. 94, 293-299. 1996.

ZANOTTO, F. P.; WHEATLY, M. G.; BRITO, L. A. AND PINHEIRO F. **Some considerations on calcium homeostasis in semi-terrestrial crabs.** Int. Congr. Series, 1275, 89-95, 2004.

ZHANG, B. AND HARRIS-WARRICK, R. M. **Calcium-dependent plateau potentials in a crab stomatogastric ganglion motor neuron. I. Calcium current and its modulation by serotonin.** J. Neurophysiol., 74, 1929-1937, 1995.