

MARINA TENÓRIO BOTELHO

Investigando efeitos genotóxicos e reprodutivos em anfípodas marinhas

São Paulo

2021

MARINA TENÓRIO BOTELHO

Investigando efeitos genotóxicos e reprodutivos em anfípodas marinhas

Tese apresentada ao Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências, Programa de Oceanografia, área de Oceanografia Biológica.

Orientador: Prof. Dr. Vicente Gomes
Coorientadora: Profa. Dra. Gisela de Aragão Umbuzeiro

São Paulo

2021

BOTELHO, M. T. **Investigando efeitos genotóxicos e reprodutivos em anfípodas marinhas**. Tese (Doutorado) apresentada ao Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências, Programa de Oceanografia, área de Oceanografia Biológica.

Aprovado em: ___/___/_____

Versão corrigida

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição _____

Presidente

Assinatura _____

Prof. Dr. _____ Instituição _____

Conceito _____ Assinatura _____

Prof. Dr. _____ Instituição _____

Conceito _____ Assinatura _____

Prof. Dr. _____ Instituição _____

Conceito _____ Assinatura _____

AGRADECIMENTOS

Às agências de fomento: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pela concessão das bolsas e pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa (processo da bolsa no país 2017/16168-2 e no exterior 2019/14398-2); Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001 e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa disponibilizada no início do doutorado. As opiniões, hipóteses e conclusões ou recomendações expressas neste material são de responsabilidade da autora e não necessariamente refletem a visão das agências de fomento FAPESP, CAPES e CNPq.

Ao meu orientador Prof. Dr. Vicente pela atenção, apoio e ensinamentos, contribuindo para meu crescimento científico, intelectual e pessoal. À minha coorientadora Profa. Dra. Gisela por toda ajuda e conselhos durante esse período. À Zezé por todo apoio no cultivo dos anfípodes, durante os experimentos e na escrita deste trabalho.

A todos que me ajudaram em diferentes etapas experimentais deste trabalho, em especial à Amanda, por mesmo estando em laboratórios diferentes compartilharmos diversas experiências com a *Parhyale* e nos apoiarmos mutuamente; ao Prof. Dr. Rubens Lopes Figueira e à Tailisi por toda ajuda nas análises da ração de prata; ao Prof. Dr. José Roberto, Will, Renata e André por toda a ajuda durante o trabalho; ao Douglas e à Juliana por me ajudarem sempre que necessário nos meus experimentos.

Aos funcionários do Instituto Oceanográfico que ajudaram de alguma forma neste trabalho, em especial a equipe do DOB (Sandrinha, Davi, André e Luis) por todo auxílio e ajuda na manutenção dos anfípodes no período de pandemia. À Profa. Dra. June e ao Prof. Dr. Marcelo Dottori pela oportunidade de realizar o estágio de preparação pedagógica.

A todos do Institute of Marine Sciences da Universidade de Portsmouth por terem me recebido para o estágio no exterior, em especial ao Prof. Alex Ford por me receber em seu laboratório, ter aceitado supervisionar meu estágio, pelos ensinamentos e por toda atenção especialmente nos tempos de pandemia; à Bidemi por ter sido minha companheira de campo e laboratório compartilhando aprendizados e experimentos; à Shanelle por ter me ensinado as técnicas e análises. Um agradecimento especial à Helena e sua família por terem me acolhido na Inglaterra e me ajudado a enfrentar esse momento longe de casa.

À minha família, em especial minha mãe e meu pai, às amigas de BH (Vi, Mari, Natália e Gabi) e aos amigos de São Paulo por me apoiarem ao longo de todo esse caminho e pelos momentos de descontração.

RESUMO

BOTELHO, M. T. **Investigando efeitos genotóxicos e reprodutivos em anfípodes marinhos**. 2021. 92 f. Tese (Doutorado) – Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

O ambiente marinho é considerado um sorvedouro de contaminantes, principalmente de origem antrópica, portanto é cada vez mais necessário o desenvolvimento de novos modelos e técnicas para avaliação do impacto desses compostos nesse ambiente. Anfípodes são um grupo de crustáceos que possuem uma grande importância no funcionamento do ecossistema e são comumente utilizados em ensaios ecotoxicológicos. Neste trabalho, técnicas de avaliação de genotoxicidade foram desenvolvidas e otimizadas para anfípodes marinhos e posteriormente aplicadas em conjunto com marcadores reprodutivos para avaliação de impactos de contaminantes emergentes (nanopartículas de prata e ftalatos) e da qualidade ambiental. *Parhyale hawaiiensis* foi utilizado para avaliação da genotoxicidade e *Echinogammarus marinus* para avaliar os impactos reprodutivos. A otimização das técnicas para avaliação da genotoxicidade foi realizada inicialmente com ajustes nos protocolos que geraram um bom efeito dose resposta com agentes genotóxicos de referência e baixos níveis de lesões em condições controle. Após exposição a nanopartículas de prata, foi observado um aumento significativo na frequência de micronúcleos e anormalidades nucleares conforme o aumento da concentração e período de exposição, mas não foram observados danos ao DNA pelo ensaio cometa. Dentre os ftalatos utilizados, DEHP causou um aumento da ocorrência de mudas, enquanto DBP diminuiu significativamente a contagem dos espermatozóides. Com relação à comparação entre locais com águas com diferentes graus de poluição, foi observada uma redução significativa da contagem dos espermatozóides de anfípodes residentes em áreas consideradas poluídas em relação a locais de referência. Além disso, anfípodes coletados em uma área de proteção ambiental apresentaram contagens de espermatozóides similares as áreas poluídas. As técnicas utilizadas nesse trabalho demonstraram ser eficazes para avaliação do estado fisiológico de anfípodes tanto em estudos de laboratório como ambientais.

Palavras-chave: crustáceos; ensaio cometa; micronúcleo; espermatozóides; nanomateriais; aditivos de plástico

ABSTRACT

BOTELHO, M. T. **Investigating genotoxic and reproductive effects in marine amphipods.** 2021. 92 f. Tese (Doutorado) – Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

Marine environment is considered to be a sink of contaminants, mainly of anthropic origin, therefore the need of developing new models and techniques to evaluate the impact of these compounds in the environment is increasingly. Amphipods are a group of crustaceans that have great importance in the ecosystem functioning and are commonly used in ecotoxicological tests. In this work, genotoxicity assessment techniques were developed and optimized for marine amphipods and later applied with reproductive endpoints to assess impacts from emerging contaminants (silver nanoparticles and phthalates) and environmental quality. *Parhyale hawaiensis* was used to assess genotoxicity and *Echinogammarus marinus* to assess reproductive impacts. The optimization of the techniques for evaluating genotoxicity was initially performed with adjustments in the protocols that generated a good dose response effect after exposure to reference genotoxic agents and low levels of DNA damage in control conditions. After exposure to silver nanoparticles, a significant increase in micronuclei and nuclear abnormalities frequencies was observed with the increased of concentration and exposure period, but no DNA damage measured by comet assay was detected. Among the phthalates used, DEHP caused an increase in moulting occurrence, while DBP significantly decreased sperm counts. Regarding the comparison among sites with different pollution degrees, a significant reduction in sperm count of amphipods residing in areas considered polluted in relation to reference sites was observed. Furthermore, amphipods collected in an environment protected area showed similar sperm counts to polluted areas. The techniques used in this work proved to be effective to evaluate amphipods physiological state in both laboratory and field studies.

Keywords: crustacean; comet assay; micronuclei; sperm cells; nanomaterials; plastic additives

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Anfípodes *Parhyale hawaiiensis* (A; foto de Renata Stecca Iunes) e *Echinogammarus marinus* (B).....13

Capítulo I:

Figura 1: Controle positivo do ensaio de micronúcleo e demais anormalidades nucleares em *Parhyale hawaiiensis* expostos ao zinco (n = 22 para cada condição). As frequências são apresentadas como média ± erro padrão e * indica diferenças significativas em relação à condição de controle.....29

Figura 2: Controle positivo do ensaio cometa realizado em hemócitos de *Parhyale hawaiiensis*. A: Controle positivo *in vitro* com H₂O₂ (n = 8 lâminas para cada condição) separado por gênero, visto que machos e fêmeas apresentaram diferença significativa. B: Controle positivo *in vivo* com MMS (n = 16 lâminas para cada condição), machos e fêmeas foram agrupados, pois não foi encontrada diferença significativa entre eles. %DNA na cauda está apresentado como média ± erro padrão.....30

Figura 3: Anormalidades nucleares em hemócitos de *Parhyale hawaiiensis* expostos a nanopartículas de prata (n = 15 para cada condição). As frequências estão apresentadas como média ± erro padrão e * indica diferenças significativas em relação à condição de controle...32

Figura 4: Anormalidades nucleares em hemócitos de *Parhyale hawaiiensis* expostos a sal de prata, AgNO₃ (n = 15 para cada condição). As frequências estão apresentadas como média ± erro padrão e * indica diferenças significativas em relação à condição de controle.....32

Figura 5: Comparação entre frequência de micronúcleos e concentração interna de prata (dados de Vannuci-Silva et al (2019)) de *Parhyale hawaiiensis* exposto a duas formas de prata (sal e nanopartículas) por uma (A) e duas semanas (B).....35

Capítulo II:

Figura 1: Macho de *Echinogammarus marinus* (A) e o processo de dissecação para a remoção dos testículos: primeiramente a cabeça e o trato digestório devem ser removidos (B) e em seguida um corte na região ventral é realizado permitindo visualizar os testículos, destacado

em um círculo preto (C). Quando cheios de esperma os testículos apresentam uma coloração branca brilhante.....49

Figura 2: Concentração de DEHP encontrada no Reino Unido medidas pela Agência Ambiental: dados de diferentes tipos de ambiente (A), áreas marinhas (B) e áreas estuarinas (C). Diferentes cores nos gráficos B e C representam diferentes locais de coleta. Os dados estão disponibilizados no site da Agência Ambiental do Reino Unido (ENVIRONMENTAL AGENCY, 2021).....52

Figura 3: Relação entre a contagem de espermatozoides e o peso de machos de *Echinogammarus marinus* expostos a diferentes concentrações de DEHP (A) e DBP (B) por 14 dias.....55

Figura 4: Médias da contagem de espermatozoides divididas pelos pesos de machos de *Echinogammarus marinus* expostos a diferentes concentrações de DEHP (A) e DBP (B) por 14 dias. As barras de erro indicam o erro padrão, n o número amostral e * grupos significativamente diferentes do controle.....56

Capítulo III:

Figura 1: Mapa dos locais de coleta de *Echinogammarus marinus* utilizados neste estudo.....68

Figura 2: Relação entre a contagem dos espermatozoides e o peso de *Echinogammarus marinus*: A: coletados em diferentes regiões do Reino Unido (para os resultados da correlação de Pearson ver Tabela 3); B: coletados em Langstone Harbour em diferentes períodos, sendo anfípodes de 2009 amostrados diretamente do campo e anfípodes coletados em 2012, 2015, 2016 e 2017 mantidos em laboratório por um período de tempo (informações sobre o tempo disponíveis na Tabela 1).....73

Figura 3: Média \pm erro padrão de contagem de espermatozoides dividida pelo peso do organismo de *Echinogammarus marinus* coletados em diferentes locais do Reino Unido. Grupos com adição do termo “Lab” ao nome foram mantidos em laboratório por um período (para maiores informações sobre o período de manutenção no laboratório consultar Tabela 1).
.....74

Figura 4: Relação entre a viabilidade e a contagem de espermatozoides de anfípodes *Echinogammarus marinus* coletados em Langstone Harbour, Inglaterra, em diferentes períodos.....75

LISTA DE TABELAS

Capítulo I:

Tabela 1: %DNA na cauda de anfípodas *Parhyale hawaiiensis* expostos a nanopartículas (AgNP) e sal (AgNO₃) de prata via alimentação por diferentes períodos.....31

Capítulo II:

Tabela 1: Mortalidade observada em *Echinogammarus marinus* expostos a diferentes concentrações de DEHP e DBP por 14 dias.....53

Tabela 2: Porcentagem de anfípodas *Echinogammarus marinus* expostos a diferentes concentrações de DEHP e DBP que realizaram muda durante os 14 dias de exposição.....53

Capítulo III:

Tabela 1: Amostras de *Echinogammarus marinus* utilizadas neste estudo.....69

Tabela 2: Correlação de Pearson analisando a contagem de espermatozoides e o peso de *Echinogammarus marinus* coletados em diferentes localidades do Reino Unido.....73

Tabela 3: Número de ovos de *Echinogammarus marinus* coletados em Langstone Harbour.. 75

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	12
2 OBJETIVOS.....	18
3 RESULTADOS.....	19
CAPÍTULO I.....	20
<i>Resumo.....</i>	<i>21</i>
<i>1 Introdução.....</i>	<i>22</i>
<i>2 Metodologia.....</i>	<i>23</i>
2.1 Cultivo dos anfípodas.....	23
2.2 Desenvolvimento/otimização das técnicas.....	24
2.2.1 Ensaio de micronúcleo e demais anormalidades nucleares.....	24
2.2.2 Ensaio cometa.....	25
2.3 Caracterização de AgNP e concentração de Ag no alimento.....	26
2.4 Experimento de genotoxicidade da prata.....	27
2.5 Análise estatística.....	27
3 Resultados.....	28
3.1 Desenvolvimento/otimização das técnicas.....	28
3.1.1 Ensaio de micronúcleo e demais anormalidades nucleares.....	28
3.1.2 Ensaio cometa.....	29
3.2 Caracterização de AgNP e concentração de Ag no alimento.....	30
3.3 Experimento de genotoxicidade da prata.....	30
4 Discussão.....	33
Referências.....	37
Anexo I.....	42
CAPÍTULO II.....	44
<i>Resumo.....</i>	<i>45</i>
<i>1 Introdução.....</i>	<i>46</i>
<i>2 Metodologia.....</i>	<i>48</i>
<i>3 Resultados e discussão.....</i>	<i>50</i>
<i>4 Conclusão.....</i>	<i>57</i>
Referências.....	58
CAPÍTULO III.....	62

<i>Resumo</i>	63
<i>1 Introdução</i>	64
<i>2 Metodologia</i>	66
2.1 Coleta.....	66
2.2 Contagem e viabilidade dos espermatozoides.....	69
2.3 Número de ovos.....	71
<i>3 Resultados</i>	71
<i>4 Discussão</i>	76
<i>Referências</i>	81
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS	86
REFERÊNCIAS	88

1 INTRODUÇÃO

Atividades antrópicas, tais como a agricultura, desenvolvimento urbano, industrial e portuário, transporte, pesca, aquicultura e recreação, podem introduzir diferentes substâncias e materiais no oceano, por meio de atividades desenvolvidas diretamente neste ambiente ou por descarte de esgoto, de materiais sólidos, trocas com a atmosfera e/ou descargas fluviais. A natureza desses compostos é bem variada, podendo ser química (como nutrientes, biocidas, metais, óleo e fármacos), física (por exemplo, fragmentos de plástico, temperatura e radiação) ou biológica (como introdução de espécies exóticas), porém todos eles, ao atingirem determinados valores, têm potencial de causar efeitos deletérios para a comunidade biótica ou até mesmo para todo o ecossistema (CABRAL et al., 2019). Os organismos-teste são ferramentas importantes para avaliação dos possíveis impactos que esses compostos de origem antrópica podem causar no ecossistema.

Invertebrados constituem mais de 90% das espécies existentes e apresentam um papel chave no funcionamento dos ecossistemas. Crustáceos normalmente são considerados excelentes indicadores para monitorar ambientes aquáticos por sua importância nas teias tróficas e por mostrarem alta sensibilidade a estressores ambientais (ISSARTEL et al., 2010). Dentre eles, os anfípodes compõem um grupo bastante diversificado, com cerca de 7.900 espécies descritas, que fazem parte de diferentes níveis das tramas tróficas aquáticas, contribuindo para o bom funcionamento do ecossistema. Diversas espécies desse grupo possuem características biológicas e ecológicas específicas, que os tornam potenciais organismos-teste para avaliação da qualidade do ambiente marinho; dentre essas características pode-se ressaltar a ocupação de diferentes nichos, ampla distribuição geográfica, sensibilidade a contaminantes ambientais e facilidade de cultivo e experimentação em laboratório (PODLESÍŃSKA; DAŹBROWSKA, 2019). A utilização desses organismos vem crescendo nos últimos anos devido a algumas vantagens que eles possuem em relação a outros grupos, como ciclo de vida curto e facilidade de reprodução e cultivo em laboratório (DI DONATO et al., 2016; NEUPARTH et al., 2014). Duas espécies amplamente utilizadas em estudos de laboratório são *Parhyale hawaiiensis* (Dana, 1853) e *Echinogammarus marinus* (Leach, 1815) (Figura 1), espécies semelhantes que vivem em regiões diferentes, sendo a primeira de áreas tropicais e a segunda de zona temperada.

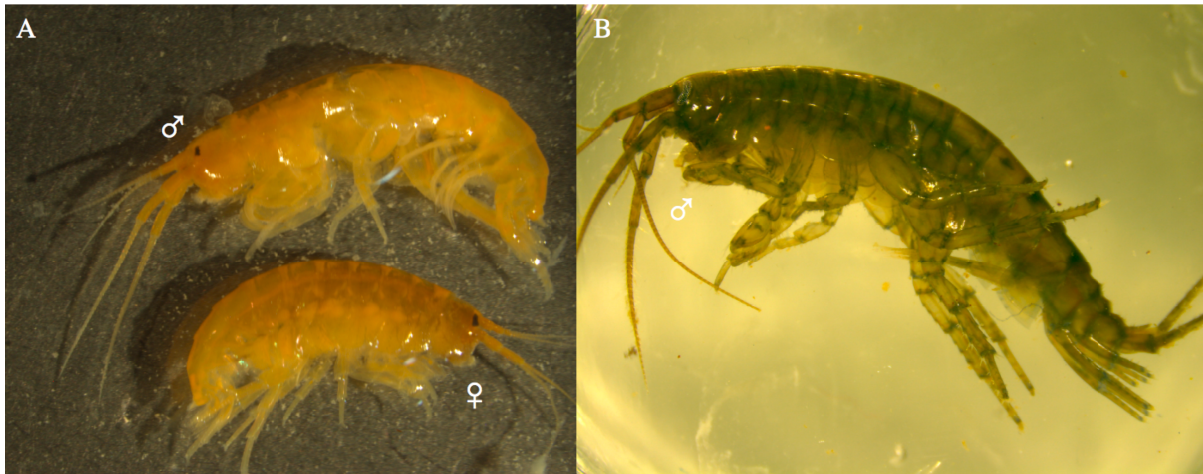


Figura 1: Anfípodes *Parhyale hawaiiensis* (A; foto de Renata Stecca Iunes) e *Echinogammarus marinus* (B).

P. hawaiiensis é uma espécie de anfípode detritívoro e epibêntico de águas rasas e entremarés, globalmente distribuído em regiões tropicais. No ambiente, esses anfípodes são encontrados em altas densidades em acumulações de *Rhizophora* sp. em decomposição (POOVACHIRANON; BOTO; DUKE, 1986). Organismos desta espécie são utilizados como modelos para estudos de desenvolvimento embriogênico, genômico e de evolução (BROWNE et al., 2005; KAO et al., 2016; PARCHEM et al., 2010; REHM et al., 2009); e, mais recentemente, também estão sendo utilizados em estudos ecotoxicológicos (ARTAL et al., 2018, 2020; VACCHI et al., 2019; VANNUCI-SILVA et al., 2018, 2019). As principais vantagens dessa espécie estão na distribuição ampla, relevância ecológica, facilidade de cultivo em laboratório, período entre gerações relativamente curto (cerca de 7 a 8 semanas) e no fato de ser apropriada para diversas manipulações experimentais (BROWNE et al., 2005; HANNIBAL; PRICE; PATEL, 2012). Por ser um anfípode epibêntico e se alimentar de material depositado no fundo pode ser particularmente útil para avaliar o efeito de substâncias tóxicas que entram no organismo via alimentação e/ou que também estejam presentes na água e na superfície do sedimento.

Já a espécie *E. marinus* é a mais abundante em comunidades litorâneas do nordeste do Atlântico, ocorrendo principalmente associada a assembléias da macroalga *Fucus* sp. na zona entremarés. Esses anfípodes também possuem grande importância na estrutura e funcionamento das comunidades da região entremarés, agindo como um predador ativo para outros invertebrados e sendo uma importante presa para aves pernaltas (MARTINS; LEITE; CONSTANTINO, 2014). Além disso, eles são utilizados com sucesso em estudos

ecotoxicológicos (BOSSUS et al., 2014; BRUCK; FORD, 2018; KOHLER; PARKER; FORD, 2018a, 2018b; MARTINEZ-HARO et al., 2016).

Diversos parâmetros e técnicas podem ser utilizados para avaliar os efeitos que substâncias químicas causam nos organismos. Efeitos como genotoxicidade e na reprodução são alguns dos *endpoints* avaliados em estudos ecotoxicológicos. A otimização das técnicas a serem utilizadas para novas espécies, especialmente marinhas, são sempre necessárias para que a qualidade dos dados seja apropriada. Pequenos ajustes metodológicos podem ajudar a reduzir o nível basal dos dados obtidos com os organismos das condições controle, possibilitando resultados mais confiáveis e reprodutivos (DI DONATO et al., 2016).

Quando expostos a substâncias nocivas, as primeiras respostas ocorrem em níveis celulares e bioquímicos, como danos ao DNA (OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003) e alterações nas atividades enzimáticas (RONCI et al., 2015). Uma dessas possíveis respostas são as genotóxicas, que se referem a habilidade de agentes químicos alterarem o material genético do organismo, comprometendo sua integridade e estabilidade (GAJSKI et al., 2019). Alterações no DNA podem ser de natureza reparável, como quebras na fita de DNA detectadas pelo ensaio cometa, ou irreparáveis, como os micronúcleos (OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003). Porém genotoxicidade é um termo mais amplo que inclui tanto danos ao DNA ou como alterações cromossômicas, podendo incluir ou não mutações, que são definidas como uma alteração hereditária na estrutura e no conteúdo do material genético (GOLLAPUDI, 2017).

O ensaio cometa pode ser aplicado em diversos tipos celulares derivados de diferentes órgãos; é um ensaio de baixo custo, fácil de ser realizado e pode ser executado em curto período de tempo. Por ser uma técnica sensível e com resultados confiáveis, é utilizada em diversos campos, desde genética e toxicologia ambiental até epidemiologia humana e biomonitoramento (GAJSKI et al., 2019). O protocolo desta técnica foi desenvolvido originalmente para células de mamíferos e passou a ser aplicado para diferentes táxons, incluindo invertebrados marinhos, com adaptações. LEE; STEINERT (2003) sugeriram utilização de tampões de diferentes concentrações de sais para peixes e invertebrados marinhos, devido às diferenças de osmolaridade dos fluidos corporais destes dois grupos. Apesar dessa recomendação, ela não é padronizada, tornando difícil a comparação dos resultados de diferentes grupos de pesquisadores.

O ensaio de micronúcleos e demais anormalidades nucleares é usado para detectar efeitos em cromossomos (DIXON, 2002). Essa é uma técnica bastante utilizada em ensaios de laboratório e em monitoramento ambiental por ser simples e rápida, principalmente quando

comparada com outras análises de aberrações cromossômicas (BOLOGNESI; HAYASHI, 2011). Estudos de campo e laboratório com moluscos, poliquetas, gastrópodes e ouriços-do-mar frequentemente utilizam esse ensaio para determinação de efeitos genotóxicos (UDROIU, 2007), porém não foram encontrados trabalhos com crustáceos marinhos.

Técnicas relacionadas a efeitos na reprodução também são importantes de serem avaliadas, pois elas podem estimar impactos causados por contaminantes com consequências populacionais. A fertilização é um passo fundamental para o sucesso reprodutivo e depende principalmente de uma boa produção de espermatozóides, incluindo alta viabilidade, grandes quantidades, integridade do DNA, motilidade adequada conforme o meio de desova para atingir os ovócitos (LEWIS; FORD, 2012; VANNUCI-SILVA, 2018). Diversos contaminantes do ambiente marinho têm o potencial de afetar alguma das condições das quais o sucesso da fertilização depende (LEWIS; FORD, 2012). Poucas informações estão disponíveis na literatura sobre anormalidades em invertebrados machos relacionadas à reprodução (YANG; KILLE; FORD, 2008), sendo que a maioria dos estudos são referentes à motilidade e consumo de oxigênio dos espermatozóides, que se mostraram marcadores sensíveis (LEWIS; FORD, 2012).

A qualidade dos espermatozóides é relacionada à sua capacidade de promover uma fertilização de sucesso e é um marcador bastante utilizado em estudos ecotoxicológicos para avaliar o impacto dos contaminantes no sucesso reprodutivo dos machos (LEWIS; FORD, 2012). Uma ferramenta útil e simples para avaliar a qualidade dos espermatozóides é a contagem dos mesmos. Em anfípodas, uma redução na contagem de espermatozóides foi relatada em indivíduos provenientes de lugares contaminados com PCBs, metais e hidrocarbonetos quando comparados com organismos coletados em regiões de referência (YANG; KILLE; FORD, 2008). Reduções na contagem e viabilidade dos espermatozóides podem gerar um impacto negativo no sucesso da fertilização com consequências diretas na estrutura das populações (FORD; MARTINS; DUNN, 2012; LEMAÎTRE et al., 2009; LEWIS; FORD, 2012). A contagem dos espermatozóides é uma boa ferramenta para avaliação do estado reprodutivo de anfípodas coletados diretamente do campo ou expostos em laboratório.

Nas últimas décadas a preocupação da comunidade científica com relação aos contaminantes emergentes tem aumentado. Essa categoria é definida como compostos químicos que não possuem regulamentação e são suspeitos de causar efeitos no ambiente e/ou seus efeitos não são completamente conhecidos (DAUGHTON, 2004). Com o aumento da concentração deles no ambiente aquático ao longo dos anos e a evidência de efeitos

biológicos adversos devido à exposição aos mesmos, diversos estudos vêm sendo realizados em diversos compostos dessa categoria. Uma atenção especial vem sendo dada a nanopartículas, aditivos de plástico, fármacos e produtos de uso pessoal (CABRAL et al., 2019).

Nanopartículas de prata (AgNP) têm despertado preocupação da comunidade científica devido ao risco de aumento de carcinogênese após exposição às mesmas (DE MARCHI et al., 2019). Por esse motivo, esse composto foi utilizado para a realização de um estudo de caso com aplicação de técnicas genotóxicas em anfípodas. A maioria das nanopartículas metálicas é capaz de produzir diretamente radicais livres, através da liberação de íons metálicos e interações com moléculas de água, que são os primeiros responsáveis pelo aumento da genotoxicidade; além disso, esse aumento na produção de radicais livres e de morte celular causado pelas nanopartículas metálicas podem estimular reações de redução/oxidação, que levariam a uma produção endógena contínua desses radicais (MORTEZAEI et al., 2019). Acredita-se que AgNP seja introduzida no ambiente aquático durante os processos de produção, estocagem e utilização (ZHANG; XIAO; FANG, 2018). Ao chegarem ao ambiente aquático, quando estão dissolvidas na água, elas interagem facilmente com os organismos, porém possuem uma tendência de se aglomerar o que aumenta o seu tamanho e as tornam mais difíceis de se mover na coluna d'água; neste estágio, elas tendem a se depositar no sedimento, tornando-se menos disponíveis para os organismos pelágicos, mas altamente disponíveis e um grande risco para a comunidade bentônica, principalmente para os depositívoros (FREIXA et al., 2018). Entretanto, a maioria dos estudos de toxicidade de AgNP é feita com organismos pelágicos, apesar de os bentônicos estarem em maior risco devido ao comportamento desses materiais no ambiente (DE MARCHI et al., 2019). No ambiente marinho, AgNP é capaz de interagir com diversas espécies de invertebrados, afetando tecidos biológicos, como pele, brânquia, trato digestório e paredes celulares (DE MARCHI et al., 2019; ZHANG; XIAO; FANG, 2018).

Os ftalatos estão sendo estudados do ponto de vista toxicológico, principalmente por sua ação como disruptores endócrinos, afetando a reprodução e comportamento dos indivíduos, mesmo em baixas concentrações (XU et al., 2020), sendo, portanto, bons compostos para um estudo de caso de técnicas relativas à reprodução. Esses compostos podem estimular ou interferir em funções fisiológicas relacionadas à síntese, secreção e excreção do estrogênio, afetando o crescimento e desenvolvimento dos indivíduos (PU et al., 2020). Além disso, problemas na reprodução, como danos aos espermatozoides, puberdade precoce em fêmeas, anormalidades no sistema reprodutivo, má formação fetal e resultados

adversos na gravidez já foram relatados em humanos e outros vertebrados (QIAN et al., 2020). Diversos organismos modelos, como peixes, ratos, insetos, anelídeos e crustáceos, estão sendo utilizados para avaliar a toxicidade e os efeitos desses compostos (GAO et al., 2018; PU et al., 2020) e uma maior atenção tem sido direcionada aos efeitos na reprodução de invertebrados aquáticos (WEI et al., 2018). Moluscos, crustáceos e anfíbios têm se mostrado mais sensíveis a esses compostos, sendo observados efeitos biológicos em exposições com concentrações ambientalmente relevantes (na faixa de ng/L a µg/L) (OEHLMANN et al., 2009). Devido a sua alta toxicidade, ftalatos já são considerados poluentes prioritários em regulamentações de água de alguns países como Estados Unidos, União Européia e China (PALUSELLI et al., 2019). Dentre os ftalatos, o dibutilftalado (DBP) e o bis (2-etil-hexil) ftalato (DEHP) são os mais encontrados no ambiente aquático, com concentrações em níveis de µg/L; estes compostos apresentam uma alta toxicidade, devido sua maior solubilidade em água e suas cadeias alquílicas mais longas (LI et al., 2020; WANG et al., 2019). Em rios e águas marinhas costeiras, as concentrações de ésteres ftalatos variam entre 0,0453 – 179,1µg/L, sendo DBP e DEHP os componentes principais (GU et al. 2021). A liberação dos ftalatos na água ocorre principalmente durante sua produção, uso, após o descarte de resíduos sólidos (PU et al., 2020; SUN et al., 2020) e também devido a indústrias, descartes de água agrícolas e manuseio inadequado de plásticos (WANG et al., 2019). Um dos principais problemas para o ambiente é que a ligação entre os ftalatos e os polímeros plásticos não é uma ligação química covalente e, sim, pontes de hidrogênio ou força de van der Waals, portanto, os ftalatos são mais propensos a lixiviar do plástico para a água, solo ou um tecido animal (LI et al., 2020; PALUSELLI et al., 2019; QIAN et al., 2020; SHEN et al., 2019). Além disso, como sua estrutura química é estável e de cadeia longa, é difícil destruí-los por métodos convencionais e os processos naturais de degradação são lentos (YU et al., 2020).

Neste trabalho, foram estudadas três diferentes abordagens de exposição dos anfípodas: a primeira expondo organismos cultivados em laboratório (*P. hawaiiensis*); a segunda com anfípodas (*E. marinus*) coletados do campo e expostos em laboratório; e a terceira realizando amostragens em anfípodas (*E. marinus*) encontrados no meio ambiente para comparação de locais com diferentes graus de poluição. Nas exposições em laboratório, diferentes marcadores relativos à genotoxicidade e reprodução foram utilizados para avaliar os impactos de alguns contaminantes emergentes, como nanopartículas de prata e ftalatos. Com relação ao trabalho do campo, os indivíduos foram coletados em duas regiões consideradas contaminadas, uma área de preservação ambiental e duas regiões consideradas de referência para avaliar e comparar possíveis diferenças no estado reprodutivo dos machos.

2 OBJETIVOS

O objetivo desse trabalho foi avaliar contaminantes emergentes e qualidade ambiental utilizando marcadores genotóxicos e reprodutivos em anfípodes marinhos. Os objetivos específicos foram:

- Otimizar e aplicar protocolos de genotoxicidade para avaliação de nanopartículas de prata no anfípode tropical *P. hawaiiensis* (Capítulo 1);
- Avaliar efeitos na reprodução do anfípode de zona temperada *E. marinus* expostos a ftalatos (Capítulo 2);
- Avaliação do estado reprodutivo de *E. marinus* coletados em regiões consideradas pristinas e impactadas (Capítulo 3).

3 RESULTADOS

Os resultados desta tese foram organizados em três capítulos conforme descrito a seguir. O “Capítulo I – Efeitos genotóxicos de nanopartículas de prata em um anfípode marinho tropical exposto via alimentação” apresenta protocolos de ensaio cometa e ensaio de micronúcleo e demais anormalidades nucleares otimizados para anfípodes marinhos e aplicados após exposição dos organismos a nanopartículas de prata via alimentação. Este trabalho foi submetido à *Mutation Research – Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*.

O “Capítulo II - Avaliação de efeitos reprodutivos em *Echinogammarus marinus* expostos a aditivos de plástico” avalia o efeito reprodutivo em anfípodes machos expostos a dois ftalatos utilizados como aditivos de plástico. Esse trabalho foi desenvolvido durante o período de estágio sob supervisão do Prof. Alex Ford na Universidade de Portsmouth. Os resultados serão submetidos posteriormente em conjunto com a avaliação do comportamento dos anfípodes em parceria com a aluna de doutorado Bidemi Green-Ojo.

O “Capítulo III - Relações incomuns entre o tamanho e a contagem de espermatozóides em um anfípode marinho costeiro indicam uma deficiência reprodutiva por agentes tóxicos desconhecidos” compara o estado reprodutivo de anfípodes avaliados imediatamente após a coleta em diferentes locais do Reino Unido, dentre eles áreas consideradas pristinas, contaminadas e de preservação. Este trabalho foi publicado na *Aquatic Toxicology*, realizado sob supervisão do Prof. Alex Ford durante o estágio de pesquisa na Universidade de Portsmouth e apresenta dados coletados por diferentes colaboradores.

Capítulo I

Efeitos genotóxicos de nanopartículas de prata em um anfípode marinho tropical exposto via alimentação

Botelho, M. T.¹; Passos, M. J. de A. C. R.¹; Trevizani, T. H.¹; Figueira, R. C. L.¹; Umbuzeiro, G. de A.²; Gomes, V.¹

¹Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil

²Faculdade de Tecnologia, Universidade de Campinas, Limeira, Brasil

Submetido a Mutation Research – Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis

Resumo

Nanopartículas de prata (AgNP) são amplamente utilizadas na indústria e acabam por ser descartadas no ambiente. Uma vez na água, estas nanopartículas tendem a agregar e depositar no sedimento, onde muitos organismos se alimentam. Os anfípodes epibênticos e detritívoros *Parhyale hawaiensis* estão globalmente distribuídos em zonas tropicais e são considerados um modelo potencial para estudos ecotoxicológicos. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos genotóxicos de AgNP e sal de Ag neste organismo através da alimentação, uma vez que eles vivem e se alimentam no sedimento, onde as nanopartículas tendem a se acumular. Os anfípodes foram cultivados em laboratório e expostos a alimentação contendo AgNP e sal de Ag. A hemolinfa foi coletada para realizar o teste de anormalidades nucleares, incluindo micronúcleos, e o ensaio cometa. Protocolos de ambas as técnicas foram desenvolvidos/otimizados para serem eficientemente aplicados em invertebrados marinhos. Um aumento na frequência de micronúcleos, núcleos com bolha e anormalidades totais foi detectado em relação à concentração e ao período de exposição em organismos expostos a AgNP e sal de Ag em comparação aos de condições controle. Nenhum dano ao DNA foi detectado com aplicação do ensaio cometa, provavelmente devido a uma ação de *crosslinking* da prata. As frequências de micronúcleos foram mais altas após 5 dias de exposição para sal de Ag em comparação com AgNP, porém, após 13 dias, as frequências de micronúcleos foram semelhantes para ambas as formas de prata. AgNP levou mais tempo para causar efeitos mutagênicos provavelmente devido ao tempo necessário para liberação dos íons de Ag, os responsáveis pelo efeito mutagênico.

1 Introdução

Nanopartículas de prata (AgNP) são amplamente utilizadas para diversos fins, inclusive como agentes anti-incrustantes, e possuem como destino final o ambiente estuarino e marinho (RAMASUBBURAYAN et al., 2017; SAM et al., 2015; YANG et al., 2016). AgNP apresenta as maiores taxas de comercialização entre as nanopartículas metálicas, o que aumenta sua descarga no meio ambiente (DUBEY et al., 2015). AgNP pode aumentar o estresse oxidativo em diversos organismos, como peixes (MASSARSKY et al., 2013), nematodes (LIM et al., 2012), plantas aquáticas (JIANG et al., 2014) e crustáceos (AN et al., 2019). Efeitos genotóxicos causados por AgNP já foram observados em *Drosophila* (DEMIR et al., 2011), moluscos (ALE et al., 2019; GOMES et al., 2013), poliquetas (BUFFET et al., 2014) e estudos *in vitro* utilizando peixe-zebra (DUBEY et al., 2015). Poucos estudos avaliaram o efeito genotóxico de nanopartículas em invertebrados marinhos, e a maioria deles avaliou danos ao DNA em moluscos e poliquetas (BUFFET et al., 2014; GOMES et al., 2013). A maioria desses estudos utilizou a água como estratégia de exposição, porém a tendência dessas partículas é de se acumular e depositar no sedimento (DE MARCHI et al., 2019), onde os organismos bentônicos se alimentam. Estudos com exposições via alimentação são ainda mais raros, mas apresentam resultados relevantes, como aumento do dano ao DNA em *Drosophila* (DEMIR et al., 2011) e aumento da concentração interna de prata em um anfípode marinho (VANNUCI-SILVA et al., 2019).

Diversas técnicas podem ser utilizadas para avaliar a mutagenicidade e/ou danos ao DNA, mas as mais comuns são o ensaio de micronúcleo e o ensaio cometa, respectivamente (BOLOGNESI; HAYASHI, 2011; DIXON, 2002; GAJSKI et al., 2019). Muitos estudos de campo e de laboratório analisaram micronúcleos em invertebrados marinhos, como mexilhões, poliquetas, gastrópodes e ouriços-do-mar (BOLOGNESI; HAYASHI, 2011; UDROIU, 2007). No entanto, nenhum estudo analisando micronúcleos em crustáceos marinhos, incluindo anfípodas, foi encontrado na literatura. O ensaio cometa pode ser utilizado em diferentes tipos celulares e para detectar diferentes lesões de DNA, como quebras de fita simples e dupla, ligações cruzadas de DNA e oxidação de base de DNA, com ligeiras alterações no protocolo (GAJSKI et al., 2019). A versão alcalina padrão é utilizada para detectar quebras de fita simples e dupla de DNA e sítios alcalinos lábeis (COLLINS et al., 2008), entretanto, este protocolo não é apropriado para detectar danos ao DNA causados por agentes de ligação cruzada, uma vez que eles podem impedir fisicamente a migração dos fragmentos de DNA (GAJSKI et al., 2019). Modificações no protocolo podem ser utilizadas para identificar danos específicos, como a oxidação do DNA, por meio da enzima hOGG1

para identificar adutos e nucleotídeos oxidados, e a ligações cruzadas, através da enzima proteinase K para a distinção entre as ligações cruzadas DNA-DNA e DNA-proteína (GAJSKI et al., 2019; KLINGELFUS et al., 2019). Essas modificações são muito úteis para identificar o modo de ação de um agente mutagênico. O ensaio cometa está bem estabelecido para invertebrados de água doce (LACAZE et al., 2010), porém não existe um protocolo padronizado para hemócitos de invertebrados marinhos. LEE; STEINERT (2003) sugeriram o uso de tampões com diferentes concentrações de sal para peixes e invertebrados marinhos, devido à diferença na osmolaridade entre os organismos marinhos e de água doce. No entanto, essa recomendação não é seguida em todos os estudos, o que aumenta a dificuldade de comparação dos resultados.

Os anfípodos são organismos modelo ideais devido ao seu ciclo de vida curto e possibilidade de manutenção e reprodução em laboratório. Eles têm sido utilizados com sucesso em ecotoxicologia há uma década (PODLESÍNSKA; DAŁBROWSKA, 2019) e são componentes essenciais dos ecossistemas aquáticos, pois ocupam vários nichos tróficos (GLAZIER, 2014). *Parhyale hawaiiensis* é um anfípode com distribuição circuntropical, facilmente cultivado em laboratório e recentemente utilizado em diversos estudos ecotoxicológicos (ARTAL et al., 2018; DIEHL et al., 2021; VACCHI et al., 2019; VANNUCI-SILVA et al., 2018, 2019). Esta espécie é um anfípode epibêntico, pois vive e se alimenta associado ao substrato marinho e/ou acúmulos de algas/plantas em decomposição em áreas costeiras (POOVACHIRANON; BOTO; DUKE, 1986). No meio ambiente, AgNP tende a se acumular no sedimento, assim organismos bentônicos e epibênticos têm um maior risco de exposição (POYNTON et al., 2013). Portanto, *P. hawaiiensis* exposto a alimentos contendo AgNP é uma estratégia de teste interessante para verificar os efeitos genotóxicos dessas nanopartículas.

O objetivo deste estudo foi desenvolver/otimizar protocolos para teste de micronúcleos e ensaio de cometa e aplicá-los para avaliar os efeitos genotóxicos de AgNP e sal de Ag no anfípode marinho tropical *Parhyale hawaiiensis*.

2 Metodologia

2.1 Cultivo dos anfípodos

Os anfípodos utilizados nesse trabalho foram cultivados em laboratório de acordo com ARTAL et al. (2018). Eles foram mantidos em recipientes plásticos com pedras como substrato. As condições de cultivo foram: temperatura da água $24 \pm 2^\circ\text{C}$, salinidade 30 ± 2 , aeração constante e fotoperíodo de 12h. Os organismos foram alimentados cinco vezes por

semana com a ração comercial JBL Novo Fect® (dados do fabricante: proteína 35%, cinzas brutas 8%, fibra bruta 5% e gordura bruta 5%) e 50% da água era trocada uma vez por semana para manter a qualidade. Uma vez por mês, a água e os recipientes eram trocados completamente. Os indivíduos utilizados neste estudo tinham 10 meses de idade.

2.2 Desenvolvimento/otimização das técnicas

2.2.1 Ensaio de micronúcleo e demais anormalidades nucleares

Para o preparo de cada lâmina, a hemolinfa de um indivíduo foi coletada com uma agulha de capilar de vidro confeccionada manualmente inserida no segundo segmento dorsal e colocada em um *vial* com 20µL de água do mar reconstituída gelada (Red Sea Salt®; salinidade 30). A suspensão de hemócitos foi incubada em uma lâmina em câmara úmida por 15min. Em seguida, as lâminas foram enxaguadas duas vezes com água do mar reconstituída e fixadas em paraformoldeído 1:10 em água do mar reconstituída por 10min. As lâminas secas foram imersas em metanol por 10min e então coradas com Giemsa 10% por 20min. Para análise, 500 células de cada lâmina foram contadas e classificadas como normais, com micronúcleos, núcleos com bolhas e núcleos segmentados. A frequência das anormalidades nucleares foi calculada considerando 1000 células para facilitar a comparação da literatura.

Zinco, na forma de Zn^{2+} , foi utilizado para o controle positivo do ensaio de micronúcleos e demais anormalidades nucleares, por ser considerado um agente clastogênico em diversos sistemas biológicos (MAJONE; BELTRAME; BRUNETTI, 1988; SHARMA; TALUKDER, 1987). O controle positivo foi realizado em quatro experimentos independentes (um com 4 indivíduos em cada condição e três com 6 indivíduos para cada condição), nos quais os organismos foram expostos a Zn^{2+} (0,5mg/L; 1,0mg/L; 2,0mg/L e 4,0mg/L) por 48h. A temperatura da água foi mantida a $24 \pm 0,5^{\circ}C$, a salinidade a 30 ± 1 e a aeração foi constante. As lâminas foram coradas com Giemsa, analisadas e coradas com laranja de acridina para comparação dos resultados. Embora o laranja de acridina seja um método mais confiável, é mais complicado de executar, já que as lâminas perdem a fluorescência com o tempo. Após serem analisadas, as lâminas coradas com Giemsa foram imersas em metanol e ácido acético (9:1) por 10min para remoção da coloração. Depois de secas, foram coradas com laranja de acridina 0,1% em tampão de Sorensen por 7,5min e imediatamente analisadas em microscópio de fluorescência com luz de excitação azul e filtro de barreira amarelo (G247). Esse procedimento foi realizado apenas no controle positivo, uma vez que não foi observada diferença significativa entre as duas técnicas de coloração, sendo apenas o Giemsa utilizado nas demais preparações deste trabalho. Os dados foram analisados por

ANOVA multifatorial seguida pelo Teste de Tukey para avaliar os efeitos de gênero, concentração e técnica de coloração. Os resíduos do modelo foram testados quanto à normalidade e homocedasticidade usando o teste de Shapiro-Wilk e o teste de Levene. Dados sem diferença estatística significativa entre machos e fêmeas foram agrupados para apresentação.

2.2.2 Ensaio cometa

Um teste preliminar foi realizado para definir as melhores condições para o ensaio cometa. Água do mar reconstituída (SW: Red Sea Salt[®]; salinidade 30), tampão fosfato salino (PBS: NaCl 0,14M, KCl 2,68mM, Na₂HPO₄.12H₂O 10mM, KH₂PO₄ 0,02M, pH 7,4) e tampão salino de Kenny (KEN: NaCl 0,4M, KCl 9mM, K₂HPO₄ 0,7mM, NaHCO₃ 2mM, pH 7,5) foram testados para preservar as células após a extração e para preparar o gel de agarose de baixo ponto de fusão. Como as células tinham maior viabilidade na água do mar reconstituída (Anexo 1 - Tabela S1), ela também foi utilizada em combinação com os outros dois tampões. As condições testadas foram: PBS para preservação das células e preparação do gel de agarose; KEN para preservar as células e preparar gel de agarose; SW para preservar as células e PBS para preparar o gel de agarose; e SW para preservar as células e KEN para preparar o gel de agarose. A combinação SW para preservar as células e KEN para preparar o gel de agarose foi a melhor combinação dentre as testadas quando comparado o nível basal (Anexo 1 - Figura S1) e a resposta *in vitro* a H₂O₂ (Anexo 1 - Figura S2).

O ensaio cometa foi realizado de acordo com SINGH et al. (1988) com as modificações da otimização e a descrição da metodologia seguiu as orientações de MØLLER et al. (2020). A hemolinfa de dois indivíduos foi extraída com inserção de uma agulha de capilar de vidro, confeccionada manualmente, no segundo segmento dorsal e armazenada em um *vial* com 20µL de água do mar reconstituída (Red Sea Salt[®]; salinidade 30). Imediatamente após a coleta, esta suspensão de células foi misturada em 120µL de agarose de baixo ponto de fusão 1,0% preparada em tampão salino de Kenny e espalhada na superfície de uma lâmina de vidro previamente revestida com agarose de ponto de fusão normal 1,5% preparada em água destilada. Cada lâmina foi coberta com uma lamínula e mantida a 4°C no escuro por 20min até a solidificação do gel. Em seguida, a lamínula foi removida e as lâminas foram imersas em uma solução de lise (NaCl 2,5M, EDTA 100M, Tris 10mM, Triton X-100 1%, DMSO 10%, pH 10) no escuro por 2h a 4°C. As lâminas foram enxaguadas com água destilada resfriada e transferidas para a câmara de eletroforese preenchida com tampão de eletroforese alcalino (Na₂EDTA 1mM, NaOH 300mM, pH > 13) por 5min a 4°C para

unwinding do DNA. Na mesma temperatura, foi realizada eletroforese por 20min a 20V (0,71V/cm) e 250mA. Após a eletroforese, as lâminas foram lavadas 3 vezes com solução de neutralização (Tris 0,4 M, pH 7,5) por 5min de cada vez e fixadas em etanol por 5min. Após a secagem das lâminas, elas foram coradas com prata conforme método descrito por GARCÍA et al. (2004). A porcentagem de DNA na cauda foi calculada para cem nucleóides de cada lâmina utilizando CometScore™ Versão 2.0 (TriTek Corporation®). A viabilidade das amostras foi avaliada pelo método de exclusão do azul tripano em diferentes organismos expostos às mesmas condições. A viabilidade das células foi superior a 80% em todas as amostras.

O controle positivo da melhor condição para o ensaio cometa foi realizado de duas formas: *in vitro* e *in vivo*. Para o controle positivo *in vitro*, os hemócitos foram coletados, incluídos nas lâminas e então expostos a H₂O₂ (2, 15, 30 e 60μM) por 30min. O controle positivo *in vivo* foi realizado com exposição a metanossulfonato de metila, MMS (0, 20, 40 e 80 μmol/L), por 5 dias. O MMS foi dissolvido em água do mar reconstituída (Red Sea Salt®; salinidade 30) para confeccionar uma solução estoque de 800μmol/L e a quantidade correta da solução estoque foi adicionada a 500mL de água do mar artificial para preparar o meio de exposição. Os anfípodes foram mantidos a 24 ± 0,5°C, salinidade de 30 ± 1, com aeração; a água era renovada diariamente. Quatro experimentos independentes com 8 anfípodes em cada concentração foram realizados. Os dados foram analisados por ANOVA bifatorial seguida pelo Teste de Tukey para avaliar os efeitos de gênero e concentração. Os resíduos do modelo foram testados quanto à normalidade e homocedasticidade usando o teste de Shapiro-Wilk e o teste de Levene. Dados sem diferença estatística significativa entre machos e fêmeas foram agrupados para apresentação.

2.3 Caracterização de AgNP e concentração de Ag no alimento

Pó de nanopartículas de prata da Sigma-Aldrich® (7440-22-4) foi utilizado para preparar a ração oferecida no experimento nas seguintes concentrações nominais: 250, 500 e 750mg/kg. O ingrediente básico da ração era JBL Novo Fect®. Soluções de AgNP/sal de Ag (0,625mg/mL; 1,25mg/mL e 1,875mg/mL) foram misturadas com ração JBL Novo Fect® macerada para obter a concentração de Ag desejada por kg de ração. Primeiramente, 1,5g de ração foi homogeneizada em 4,5mL da solução de prata correspondente. Em seguida, mais 13,5g de ração foram adicionados à mistura, que foi homogeneizada. Finalmente, 1,5mL de solução de prata foi adicionado e a mistura foi homogeneizada novamente. Rolos de ração foram feitos, cortados e secos em estufa a 50°C pernoite.

O tamanho de partícula e o potencial zeta das soluções de AgNP que foram misturadas com a ração (0,625mg/mL; 1,25mg/mL e 1,875mg/mL) foram medidos. Três medidas foram realizadas para cada amostra utilizando a técnica de espalhamento dinâmico de luz no equipamento Zetasizer Nano Zs90 da Malvern®. Um índice de refração de 0,135 e um índice de absorção de 3,99 foram considerados para nanopartículas de prata a 632nm (dados fornecidos pelo fabricante do dispositivo). A concentração de prata no alimento foi analisada seguindo o método de extração ácida (TREVIZANI et al., 2016). Uma amostra de 0,35g foi digerida em 4mL de HNO₃ e, após 6h, 1mL de H₂O₂ foi adicionado e deixado por 15h. Em seguida, as amostras foram colocadas em um bloco digestor a 90°C por 3h. Após o resfriamento, o volume foi ajustado para 35mL com água Milli-Q e filtrado para análise em ICP-OES (Plasma Indutivamente Acoplado - Espectrometria de Emissão Óptica). Cinco repetições de cada concentração foram realizadas.

2.4 Experimento de genotoxicidade da prata

Os organismos foram expostos a AgNP e sal de Ag (AgNO₃) via alimentação nas concentrações nominais expressas em prata: 250, 500 e 750mg Ag/kg. Dois experimentos independentes com oito indivíduos para cada condição foram realizados para o ensaio cometa e três experimentos independentes com seis indivíduos para cada condição foram realizados para o ensaio do micronúcleo. As metodologias do ensaio cometa e de micronúcleo utilizadas foram descritas previamente na sessão de otimização das técnicas. Os organismos foram mantidos em recipientes plásticos preenchidos com 200mL de água do mar reconstituída (Red Sea Salt, salinidade 30) e coral triturado como substrato. Eles foram alimentados com comida contendo prata em dias alternados e a água foi completamente renovada 2h após a alimentação para garantir que a exposição seria apenas através da alimentação. A temperatura da água foi mantida a $24,0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, a salinidade a 30 ± 1 e a água foi aerada continuamente. A hemolinfa de diferentes anfípodes foi coletada após diferentes períodos de exposição, sendo após 5, 9, 13, 16 e 20 dias de exposição a AgNP e após 5, 13 e 20 dias de exposição a sal de Ag. Dados sem diferença estatística significativa entre machos e fêmeas foram agrupados para apresentação.

2.5 Análise estatística

Os dados da exposição à prata foram analisados por ANOVA bifatorial seguido pelo Teste de Tukey para avaliar os efeitos do período de exposição e concentração de prata. A exposição à prata também foi analisada por ANOVA unifatorial seguida pelo Teste de Tukey

para avaliar as diferenças entre as concentrações no mesmo período de exposição. Dados sem diferença entre machos e fêmeas foram agrupados. Os resíduos do modelo foram testados quanto à normalidade e homocedasticidade usando o teste de Shapiro-Wilk e o teste de Levene. Os resíduos não tiveram distribuição normal em algumas condições, mas suas variâncias foram homogêneas. Apesar da distribuição não normal, a ANOVA foi usada, pois permanece um teste robusto em distribuições não normais (GLASS; PECKHAM; SANDERS, 1972; LIX; KESELMAN; KESELMAN, 1996). A comparação da forma de prata foi realizada usando um teste T em dados de 500mg/kg em 5 dias e 13 dias para comparar a frequência de micronúcleos e a concentração interna de prata observada por VANNUCI-SILVA et al. (2019). Valores de p inferiores a 0,05 foram considerados significativos.

3 Resultados

3.1 Desenvolvimento/otimização das técnicas

3.1.1 Ensaio de micronúcleo e demais anormalidades nucleares

A exposição ao zinco via água foi utilizada como controle positivo e uma resposta clara à concentração foi observada ($p < 0,001$ para micronúcleos, núcleos com bolhas e anormalidades totais) (Figura 1). Duas técnicas de coloração comumente utilizadas no ensaio de micronúcleos, um corante clássico (Giemsa) e um corante fluorescente (laranja de acridina), forneceram resultados semelhantes ($p > 0,05$ em todas as anormalidades testadas) e adequados. As respostas dos diferentes gêneros na frequência de anormalidades nucleares também foram avaliadas e não foram observadas diferenças significativas ($p > 0,05$ em todas as anormalidades testadas).

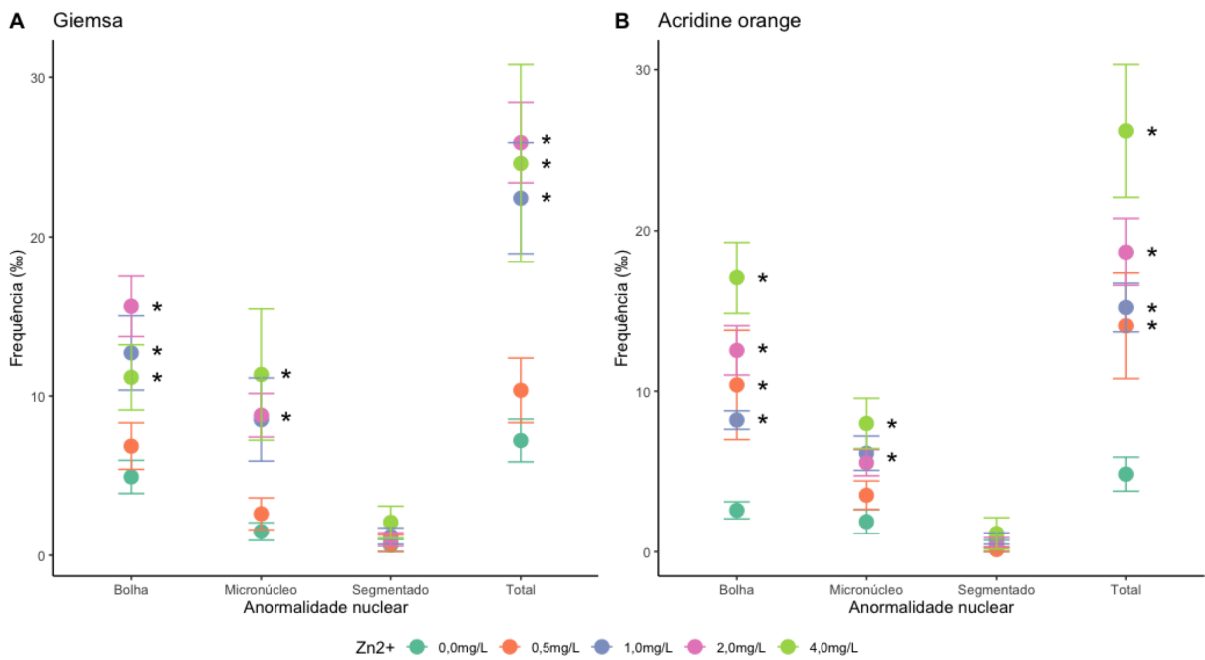


Figura 1: Controle positivo do ensaio de micronúcleo e demais anormalidades nucleares em *Parhyale hawaiensis* expostos ao zinco (n = 22 para cada condição). As frequências são apresentadas como média \pm erro padrão e * indica diferenças significativas em relação à condição de controle.

3.1.2 Ensaio cometa

Diferentes condições para realizar o ensaio cometa foram avaliadas e os resultados estão apresentados no Anexo I. Água do mar reconstituída foi o melhor tampão para preservar hemócitos com viabilidade significativamente maior (Anexo I, Tabela A1). O ensaio cometa com água do mar reconstituída para preservar as células e a solução salina de Kenny para preparar o gel de agarose de baixo ponto de fusão mostrou danos significativamente menores no controle negativo (Anexo I, Figura A1) e uma melhor resposta em relação ao aumento da concentração dos agentes genotóxicos de referência (Anexo I, Figura A2). Experimentos *in vitro* e *in vivo* como controles positivos (H₂O₂ e MMS) forneceram dose-respostas satisfatórias (Figura 2) e, quando os resultados dos diferentes gênero foram comparadas, nenhuma diferença significativa foi observada ($p > 0,05$).

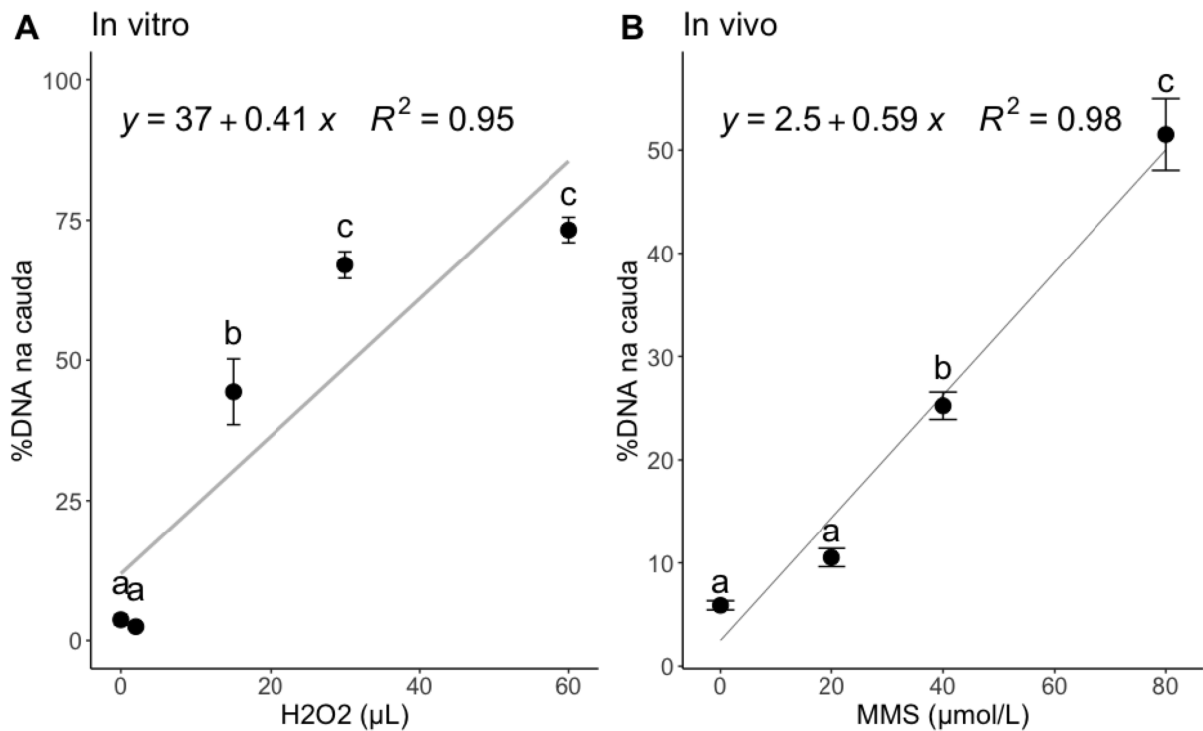


Figura 2: Controle positivo do ensaio cometa realizado em hemócitos de *Parhyale hawaiiensis*. A: Controle positivo *in vitro* com H₂O₂ (n = 8 lâminas para cada condição) separado por gênero, visto que machos e fêmeas apresentaram diferença significativa. B: Controle positivo *in vivo* com MMS (n = 16 lâminas para cada condição), machos e fêmeas foram agrupados, pois não foi encontrada diferença significativa entre eles. %DNA na cauda está apresentado como média ± erro padrão.

3.2 Caracterização de AgNP e concentração de Ag no alimento

O potencial zeta das soluções de AgNP (0,625mg/mL; 1,25mg/mL e 1,875mg/mL) foram $-24,6 \pm 6,6$, $-26,5 \pm 8,9$ e $-28,4 \pm 3,1$ mV. O módulo do potencial zeta entre 20-30mV indica que as soluções são moderadamente estáveis (PATEL; AGRAWAL, 2011). O tamanho médio das nanopartículas de prata para soluções de AgNP foi de 122,7, 131,1 e 111,1nm, respectivamente. As concentrações nominais de prata de 250, 500 e 750mg/kg corresponderam a $155,82 \pm 37,67$, $299,21 \pm 40,16$ e $346,89 \pm 53,75$ mg/kg, respectivamente.

3.3 Experimento de genotoxicidade da prata

Aumentos significativos nas frequências de micronúcleos ($p < 0,001$), núcleos com bolha ($p < 0,001$) e anormalidades totais ($p < 0,001$) foram observados após exposição a AgNP e sal de Ag em comparação ao controle (Figuras 3 e 4). Nenhum efeito genotóxico significativo foi detectado utilizando o ensaio cometa para AgNP e sal de Ag ($p = 0,932$ para AgNP e $p = 0,155$ para sal de Ag) (Tabela 1).

Diferentes respostas em relação ao tempo de exposição foram observadas ao comparar AgNP e sal de Ag. Frequências de micronúcleos mais altas foram observadas para sal de Ag ($8,44 \pm 4,96 \%$) em comparação a AgNP ($2,70 \pm 3,15 \%$) no dia 5, mas frequências semelhantes foram observadas no dia 13 ($7,18 \pm 4,53 \%$, $8,25 \pm 4,67 \%$, respectivamente) para concentração nominal de 500mg/kg (Figuras 4 e 5).

Tabela 1: %DNA na cauda de anfípodas *Parhyale hawaiensis* expostos a nanopartículas (AgNP) e sal (AgNO₃) de prata via alimentação por diferentes períodos.

Tempo de exposição	Condição	AgNP		Sal de Ag	
		Média	Erro padrão	Média	Erro padrão
5 dias	Controle	13,75	0,83	16,4	2,70
	250mg/kg	12,69	0,93	18,11	2,66
	500mg/kg	12,47	0,33	16,66	1,95
	750mg/kg	13,21	0,52	15,87	1,83
9 dias	Controle	12,13	0,82	-	-
	250mg/kg	12,36	0,77	-	-
	500mg/kg	14,36	1,484	-	-
	750mg/kg	14,76	1,34	-	-
13 dias	Controle	11,93	1,77	18,68	0,72
	250mg/kg	12,26	0,89	20,46	1,38
	500mg/kg	13,24	1,01	20,91	1,11
	750mg/kg	11,61	0,64	17,25	1,43
16 dias	Controle	13,62	1,55	-	-
	250mg/kg	13,33	1,75	-	-
	500mg/kg	11,40	0,90	-	-
	750mg/kg	12,69	0,90	-	-
20 dias	Controle	11,74	0,37	18,13	0,82
	250mg/kg	13,36	1,37	20,08	1,22
	500mg/kg	11,84	0,64	17,83	0,83
	750mg/kg	12,69	1,14	16,47	1,30

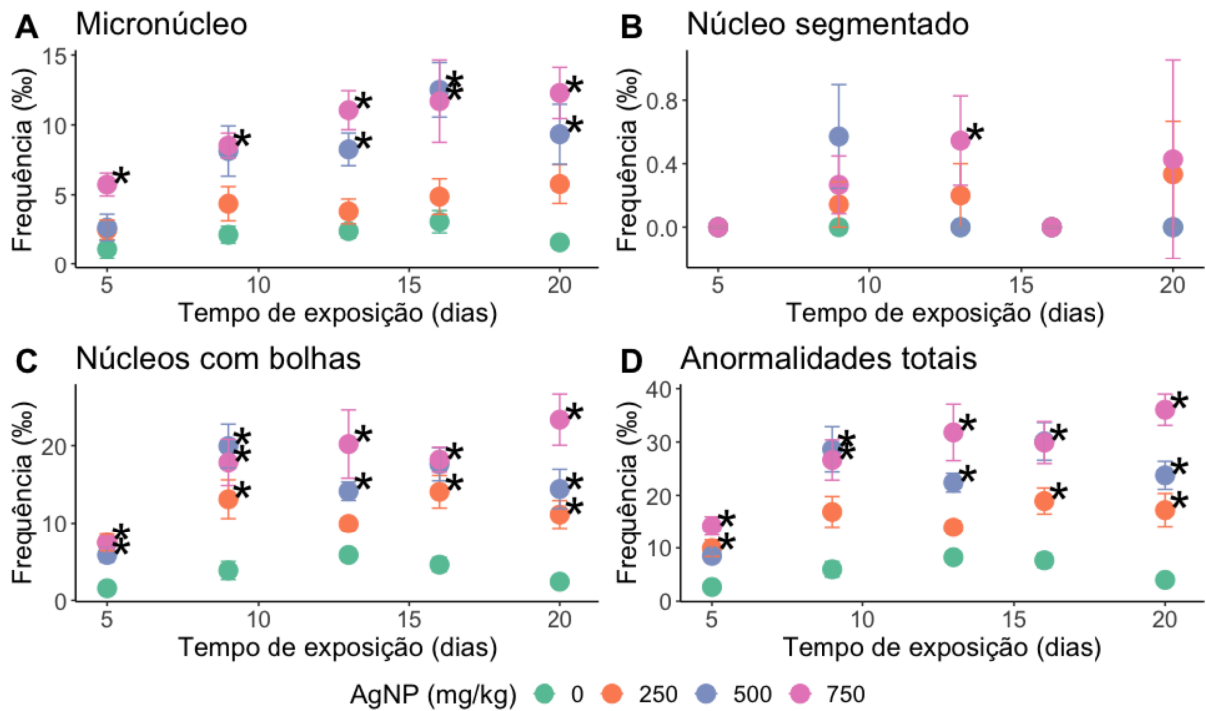


Figura 3: Anormalidades nucleares em hemócitos de *Parhyale hawaiiensis* expostos a nanopartículas de prata ($n = 15$ para cada condição). As frequências estão apresentadas como média \pm erro padrão e * indica diferenças significativas em relação à condição de controle.

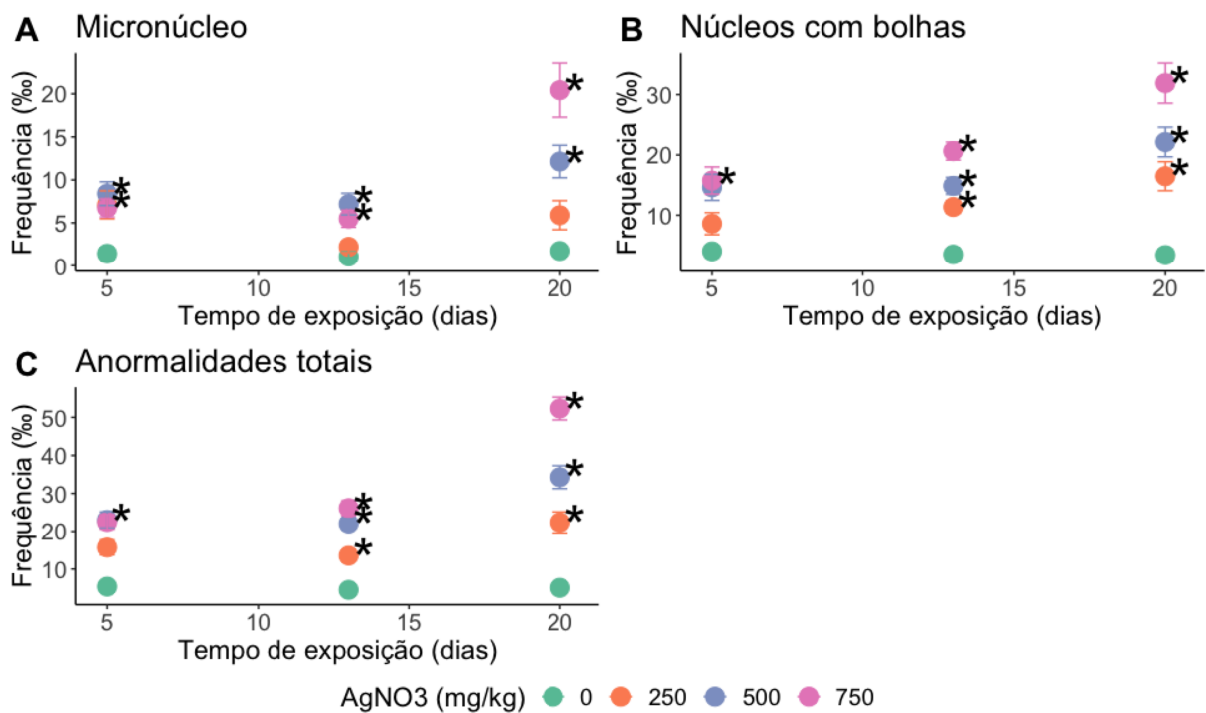


Figura 4: Anormalidades nucleares em hemócitos de *Parhyale hawaiiensis* expostos a sal de prata, AgNO₃ ($n = 15$ para cada condição). As frequências estão apresentadas como média \pm erro padrão e * indica diferenças significativas em relação à condição de controle.

4 Discussão

P. hawaiiensis como organismo modelo para ecotoxicologia tem muitas vantagens, como ser amplamente distribuído em áreas tropicais marinhas. Em genotoxicologia, as avaliações podem ser realizadas em invertebrados aquáticos coletados em campo, para monitorar a qualidade ambiental, ou em organismos cultivados em laboratório, para avaliações de genotoxicidade de agentes químicos e amostras ambientais. Diferentes técnicas podem ser aplicadas e as mais comumente utilizadas são o teste do micronúcleo e o ensaio cometa. Os protocolos para ensaio de micronúcleos encontrados na literatura são descritos principalmente para vertebrados marinhos e Giemsa é a coloração mais recomendada (MAJONE; BELTRAME; BRUNETTI, 1988). Porém, como *P. hawaiiensis* possui hemócitos granulados, corantes não específicos para DNA, como Giemsa, podem ocasionar uma coloração inespecífica, levando a falsos positivos. Portanto, uma opção seria utilizar um corante específico para DNA, como laranja de acridina (HAYASHI; SOFUNI; ISHIDATE, 1983). Porém, nas lâminas de micronúcleo de *P. hawaiiensis* não foram observadas diferenças significativas entre esses dois corantes, portanto, Giemsa é a melhor opção por fornecer preparações permanentes (MAJONE; BELTRAME; BRUNETTI, 1988). Protocolos para o ensaio cometa estão disponíveis para invertebrados aquáticos, mas principalmente para organismos de água doce. Como *P. hawaiiensis* é um invertebrado marinho, isso poderia exigir diferentes condições de osmolaridade durante a preservação de hemócitos e/ou inclusão dos mesmos no gel de agarose. Nossos resultados indicaram que a melhor condição para este ensaio foi utilizar água do mar reconstituída para preservar as células e tampão salino de Kenny para a preparação do gel de agarose (Anexo I).

AgNP e sal de Ag aumentaram as frequências de micronúcleos, núcleos com bolhas e anormalidades totais em *P. hawaiiensis* nas diferentes concentrações e tempos de exposição testados, corroborando com os resultados obtidos para células humanas (LI et al., 2017) e moluscos (*Mytilus galloprovincialis*) (ALE et al., 2019). No entanto, danos ao DNA não foram observados em nossos experimentos, tanto para AgNP quanto para sal de Ag, quando a versão padrão do ensaio cometa alcalino foi aplicada. Resultados contraditórios quando este ensaio é aplicado foram observados na literatura. Nenhum efeito genotóxico foi relatado em moluscos expostos a AgNP e sal de Ag via sedimento, apesar de uma bioacumulação de prata neles ter sido observada (DAI et al., 2013). Em poliquetas expostos a sedimentos contaminados com diferentes formas de Ag, as nanopartículas foram mais genotóxicas do que os íons de prata (CONG et al., 2011). Danos no DNA após exposição a AgNP foram observados em moluscos *Mytilus galloprovincialis* (GOMES et al., 2013), *Scrobicularia*

plano e poliquetas *Hediste diversicolor* (BUFFET et al., 2014). Recentemente, um estudo *in vitro* em uma linhagem celular de peixes (RTG-2) observou que apenas a versão padrão do ensaio cometa alcalino pode não ser suficiente para prever a genotoxicidade de AgNP, já que esses autores observaram um aumento na resposta do cometa apenas quando versões modificadas do ensaio, como para detectar dano oxidativo (hOGG1) e ligação cruzada de DNA (proteínase K), foram aplicadas (KLINGELFUS et al., 2019). Talvez se tivéssemos aplicado esses protocolos alternativos, teríamos detectado danos ao DNA em nossos experimentos. Mais estudos com *P. hawaiiensis* devem ser realizados para elucidar essa hipótese.

AgNP provavelmente é absorvida pelos organismos aquáticos como partículas e, uma vez que essas partículas entram nas células, liberam gradualmente íons de Ag que exercem toxicidade (ARCE FUNCK et al., 2013; POYNTON et al., 2012). AgNP também pode ser ionizada em fluidos corporais ou nos intestinos (HOU et al., 2017). O excesso de íons costuma estar associado a um aumento no estresse oxidativo do corpo, que pode desencadear a genotoxicidade. Acredita-se que, uma vez que o íon de Ag esteja dentro de organismos aquáticos, ele pode ser distribuído de forma diferente entre os tecidos causando toxicidade, já que ele é considerado um potente agente tóxico devido ao seu efeito inibidor sobre enzimas (BIANCHINI et al., 2005). Em crustáceos marinhos, o íon de Ag induziu diversas alterações nas concentrações de íons nos tecidos e intracelulares (BIANCHINI et al., 2005).

VANNUCI-SILVA et al. (2019) mediram a concentração total de Ag na hemolinfa de *P. hawaiiensis* exposto a AgNP e sal de Ag via alimentação após 7, 14 e 28 dias. Eles encontraram, em todos os tempos, concentrações mais altas de prata total em organismos alimentados com AgNP em comparação com sal de Ag. Esses autores especularam que a maior concentração de prata total após AgNP era devido à absorção das partículas pelo intestino e sua distribuição na hemolinfa. Como os autores mediram a prata total, provavelmente a forma Ag^0 , presente em AgNP, foi detectada junto com os íons de Ag liberados. Como nossos experimentos foram realizados em condições semelhantes, comparamos as respostas das concentrações internas de prata total obtidas por VANNUCI-SILVA et al. (2019) em 7 e 14 dias com a frequência de micronúcleos observada em nosso estudo em indivíduos alimentados com ração contendo 500mg/kg (concentração medida equivalente ao trabalho) por 5 e 13 dias (Figura 5). A resposta observada na frequência dos micronúcleos foi menor após uma semana de exposição a AgNP em comparação a sal de Ag, apesar de concentrações mais elevadas de prata total na hemolinfa. A frequência de micronúcleos do tratamento com AgNP aumentou após a segunda semana de exposição,

ficando semelhante às respostas obtidas para sal de Ag. Nossa hipótese é que o íon Ag é o agente mutagênico em ambos os tratamentos, pois na forma de sal, esses íons são imediatamente liberados, causando um efeito mutagênico que pode ser observado precocemente (Figura 5). Porém, no caso de AgNP, os íons são liberados gradativamente, explicando o retardo da resposta mutagênica (Figura 5).

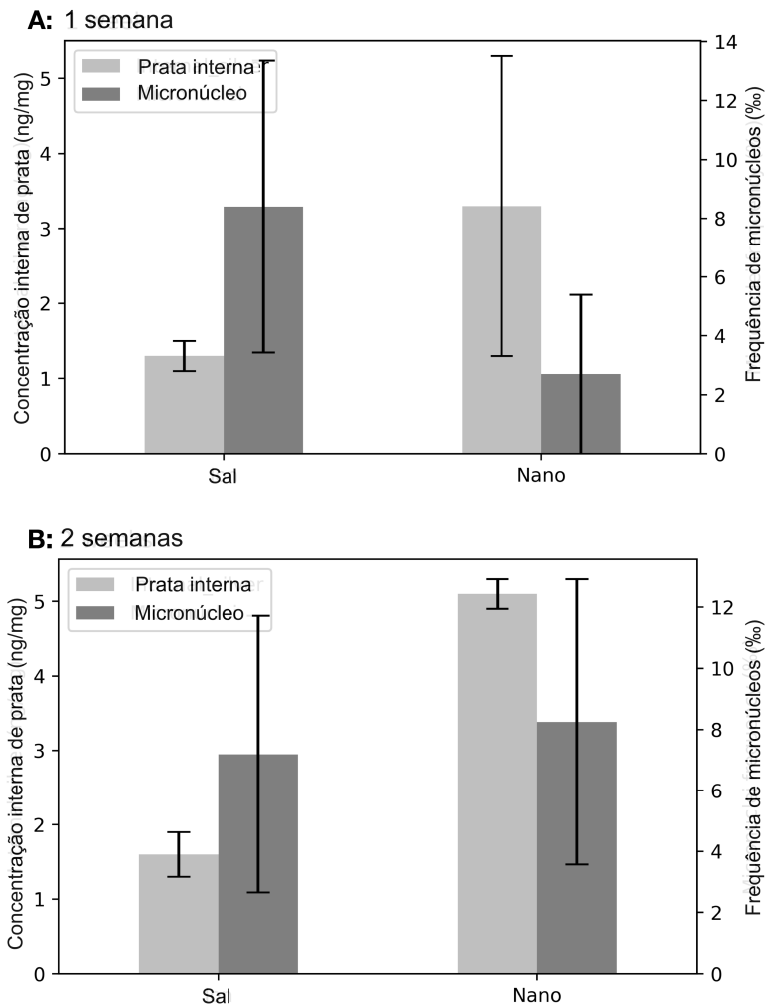


Figura 5: Comparação entre frequência de micronúcleos e concentração interna de prata (dados de Vannuci-Silva et al (2019)) de *Parhyale hawaiensis* exposto a duas formas de prata (sal e nanopartículas) por uma (A) e duas semanas (B).

Neste estudo, os protocolos dos ensaios do cometa e de micronúcleo foram otimizados para um anfípode marinho tropical, como *P. hawaiensis*, o que foi confirmado por diversos experimentos utilizando controles positivos. Nosso estudo mostra que tanto AgNP quanto sal de Ag causam um efeito mutagênico medido por meio de micronúcleos, porém não foi detectada genotoxicidade causada por eles quando a versão padrão do ensaio cometa alcalino

foi aplicada. AgNP leva mais tempo para exercer seu efeito mutagênico no anfípode marinho tropical *P. hawaiiensis* exposto via alimentação em comparação a sal de Ag. Nosso estudo confirma *Parhyale hawaiiensis* como um bom modelo em ecogenotoxicologia.

Referências

- ALE, A.; LIBERATORI, G.; VANNUCCINI, M. L.; BERGAMI, E.; ANCORA, S.; MARIOTTI, G.; BIANCHI, N.; GALDOPÓRPOA, J. M.; DESIMONE, M. F.; CAZENAVE, J.; CORSI, I. Exposure to a nanosilver-enabled consumer product results in similar accumulation and toxicity of silver nanoparticles in the marine mussel *Mytilus galloprovincialis*. **Aquatic Toxicology**, v. 211, p. 46–56, 2019.
- AN, H. J.; SARKHEIL, M.; PARK, H. S.; YU, I. J.; JOHARI, S. A. Comparative toxicity of silver nanoparticles (AgNPs) and silver nanowires (AgNWs) on saltwater microcrustacean, *Artemia salina*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 218, p. 62–69, 2019.
- ARCE FUNCK, J.; DANGER, M.; GISMONDI, E.; COSSU-LEGUILLE, C.; GUÉROLD, F.; FELTEN, V. Behavioural and physiological responses of *Gammarus fossarum* (Crustacea Amphipoda) exposed to silver. **Aquatic Toxicology**, v. 142–143, p. 73–84, 2013.
- ARTAL, M. C.; SANTOS, A. Dos; HENRY, T. B.; UMBUZEIRO, G. de A. Development of an acute toxicity test with the tropical marine amphipod *Parhyale hawaiiensis*. **Ecotoxicology**, v. 27, n. 2, p. 103–108, 2018.
- BIANCHINI, A.; PLAYLE, R. C.; WOOD, C. M.; WALSH, P. J. Mechanism of acute silver toxicity in marine invertebrates. **Aquatic Toxicology**, v. 72, n. 1- 2 SPEC. ISS., p. 67–82, 2005.
- BOLOGNESI, C.; HAYASHI, M. Micronucleus assay in aquatic animals. **Mutagenesis**, v. 26, p. 205–213, 2011.
- BUFFET, P. E.; ZALOUK-VERGNOUX, A.; CHÂTEL, A.; BERTHET, B.; MÉTAIS, I.; PERREIN-ETTAJANI, H.; POIRIER, L.; LUNA-ACOSTA, A.; THOMAS-GUYON, H.; RISSO-DE FAVERNEY, C.; GUIBBOLINI, M.; GILLILAND, D.; VALSAMI-JONES, E.; MOUNEYRAC, C. A marine mesocosm study on the environmental fate of silver nanoparticles and toxicity effects on two endobenthic species: The ragworm *Hediste diversicolor* and the bivalve mollusc *Scrobicularia plana*. **Science of the Total Environment**, v. 470–471, p. 1151–1159, 2014.
- COLLINS, A. R.; OSCOZ, A. A.; BRUNBORG, G.; GAIVÃO, I.; GIOVANNELLI, L.; KRUSZEWSKI, M.; SMITH, C. C.; ŠTĚTINA, R. The comet assay: Topical issues. **Mutagenesis**, v. 23, n. 3, p. 143–151, 2008.
- CONG, Y.; BANTA, G. T.; SELCK, H.; BERHANU, D.; VALSAMI-JONES, E.; FORBES, V. E. Toxic effects and bioaccumulation of nano-, micron- and ionic-Ag in the polychaete, *Nereis diversicolor*. **Aquatic Toxicology**, v. 105, n. 3–4, p. 403–411, 2011.
- DAI, L.; SYBERG, K.; BANTA, G. T.; SELCK, H.; FORBES, V. E. Effects, uptake, and depuration kinetics of silver oxide and copper oxide nanoparticles in a marine deposit feeder, *Macoma balthica*. **ACS Sustainable Chemistry and Engineering**, v. 1, n. 7, p. 760–767, 2013.

DE MARCHI, L.; COPPOLA, F.; SOARES, A. M. V. M.; PRETTI, C.; MONSERRAT, J. M.; TORRE, C. Della; FREITAS, R. Engineered nanomaterials: from their properties and applications, to their toxicity towards marine bivalves in a changing environment. **Environmental Research**, v. 178, p. 108683, 2019.

DEMIR, E.; VALES, G.; KAYA, B.; CREUS, A.; MARCOS, R. Genotoxic analysis of silver nanoparticles in *Drosophila*. **Nanotoxicology**, v. 5, n. 3, p. 417–424, 2011.

DIEHL, O. J.; ASSANO, P. K.; DA COSTA, T. R. G.; OLIVEIRA, R.; MARQUES-SOUZA, H.; UMBUZEIRO, G. de A. Antenna regeneration as an ecotoxicological endpoint in a marine amphipod: a proof of concept using dimethyl sulfoxide and diflubenzuron. **Ecotoxicology**, v. 30, n. 4, p. 751-755, 2021.

DIXON, D. R. Marine invertebrate eco-genotoxicology: a methodological overview. **Mutagenesis**, v. 17, n. 6, p. 495–507, 2002.

DUBEY, P.; MATAI, I.; KUMAR, S. U.; SACHDEV, A.; BHUSHAN, B.; GOPINATH, P. Perturbation of cellular mechanistic system by silver nanoparticle toxicity: cytotoxic, genotoxic and epigenetic potentials. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 221, p. 4–21, 2015.

GAJSKI, G.; ŽEGURA, B.; LADEIRA, C.; POURRUT, B.; DEL BO', C.; NOVAK, M.; SRAMKOVA, M.; MILIĆ, M.; GUTZKOW, K. B.; COSTA, S.; DUSINSKA, M.; BRUNBORG, G.; COLLINS, A. The comet assay in animal models: from bugs to whales – (Part 1 Invertebrates). **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 779, p. 82–113, 2019.

GARCÍA, O.; MANDINA, T.; LAMADRID, A. I.; DIAZ, A.; REMIGIO, A.; GONZALEZ, Y.; PILOTO, J.; GONZALEZ, J. E.; ALVAREZ, A. Sensitivity and variability of visual scoring in the comet assay: Results of an inter-laboratory scoring exercise with the use of silver staining. **Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 556, n. 1–2, p. 25–34, 2004.

GLASS, G. V.; PECKHAM, P. D.; SANDERS, J. R. Consequences of failure to meet assumptions underlying the fixed effects analyses of variance and covariance. **Review of Educational Research**, v. 42, n. 3, p. 237–288, 1972.

GLAZIER, D. S. Amphipoda. In: ELIAS, S. A. (Ed.). **Reference Module in Earth Systems and Environmental Sciences**. Elsevier, 2014. p. 1–49.

GOMES, T.; ARAÚJO, O.; PEREIRA, R.; ALMEIDA, A. C.; CRAVO, A.; BEBIANNO, M. J. Genotoxicity of copper oxide and silver nanoparticles in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. **Marine Environmental Research**, v. 84, p. 51–59, 2013.

HAYASHI, M.; SOFUNI, T.; ISHIDATE, M. An application of Acridine Orange fluorescent staining to the micronucleus test. **Mutation Research Letters**, v. 120, n. 4, p. 241–247, 1983.

HOU, J.; ZHOU, Y.; WANG, C.; LI, S.; WANG, X. Toxic effects and molecular mechanism of different types of silver nanoparticles to the aquatic crustacean *Daphnia magna*. **Environmental Science and Technology**, v. 51, n. 21, p. 12868–12878, 2017.

JIANG, H. S.; QIU, X. N.; LI, G. B.; LI, W.; YIN, L. Y. Silver nanoparticles induced accumulation of reactive oxygen species and alteration of antioxidant systems in the aquatic plant *Spirodela polyrhiza*. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 33, n. 6, p. 1398–1405, 2014.

KLINGELFUS, T.; DISNER, G. R.; VOIGT, C. L.; ALLE, L. F.; CESTARI, M. M.; LEME, D. M. Nanomaterials induce DNA-protein crosslink and DNA oxidation: a mechanistic study with RTG-2 fish cell line and comet assay modifications. **Chemosphere**, v. 215, p. 703–709, 2019.

LACAZE, E.; GEFFARD, O.; BONY, S.; DEVAUX, A. Genotoxicity assessment in the amphipod *Gammarus fossarum* by use of the alkaline comet assay. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 700, n. 1–2, p. 32–38, 2010.

LEE, R. F.; STEINERT, S. Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. **Mutation Research - Reviews in Mutation Research**, v. 544, p. 43–64, 2003.

LI, Y.; QIN, T.; INGLE, T.; YAN, J.; HE, W.; YIN, J. J.; CHEN, T. Differential genotoxicity mechanisms of silver nanoparticles and silver ions. **Archives of Toxicology**, v. 91, n. 1, p. 509–519, 2017.

LIM, D.; ROH, J. Y.; EOM, H. J.; CHOI, J. Y.; HYUN, J.; CHOI, J. Oxidative stress-related PMK-1 P38 MAPK activation as a mechanism for toxicity of silver nanoparticles to reproduction in the nematode *Caenorhabditis elegans*. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 585–592, 2012.

LIX, L. M.; KESELMAN, J. C.; KESELMAN, H. J. Consequences of assumption violations revisited: A quantitative review of alternatives to the one-way analysis of variance F test. **Review of Educational Research**, v. 66, n. 4, p. 579–619, 1996.

MAJONE, F.; BELTRAME, C.; BRUNETTI, R. Frequencies of micronuclei detected on *Mytilus galloprovincialis* by different staining techniques after treatment with zinc chloride. **Mutation Research**, v. 209, p. 131–134, 1988.

MASSARSKY, A.; DUPUIS, L.; TAYLOR, J.; EISA-BEYGI, S.; STREK, L.; TRUDEAU, V. L.; MOON, T. W. Assessment of nanosilver toxicity during zebrafish (*Danio rerio*) development. **Chemosphere**, v. 92, p. 59–66, 2013.

MØLLER, P.; AZQUETA, A.; BOUTET-ROBINET, E.; KOPPEN, G.; BONASSI, S.; MILIĆ, M.; GAJSKI, G.; COSTA, S.; TEIXEIRA, J. P.; COSTA PEREIRA, C.; DUSINSKA, M.; GODSCHALK, R.; BRUNBORG, G.; GUTZKOW, K. B.; GIOVANNELLI, L.; COOKE, M. S.; RICHLING, E.; LAFFON, B.; VALDIGLESIAS, V.;

BASARAN, N.; DEL BO', C.; ZEGURA, B.; NOVAK, M.; STOPPER, H.; VODICKA, P.; VODENKOVA, S.; DE ANDRADE, V. M.; SRAMKOVA, M.; GABELOVA, A.; COLLINS, A.; LANGIE, S. A. S. Minimum information for reporting on the comet assay (MIRCA): recommendations for describing comet assay procedures and results. **Nature Protocols**, v. 15, n. 12, p. 3817–3826, 2020.

PATEL, V.; AGRAWAL, Y. Nanosuspension: An approach to enhance solubility of drugs. **Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research**, v. 2, n. 2, p. 81, 2011.

PODLESIŃSKA, W.; DĄBROWSKA, H. Amphipods in estuarine and marine quality assessment – a review. **Oceanologia**, v. 61, n. 2, p. 179–196, 2019.

POOVACHIRANON, S.; BOTO, K.; DUKE, N. Food preference studies and ingestion rate measurements of the mangrove amphipod *Parhyale hawaiiensis* (Dana). **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 98, n. 1–2, p. 129–140, 1986.

POYNTON, H. C.; LAZORCHAK, J. M.; IMPELLITTERI, C. A.; BLALOCK, B. J.; ROGERS, K.; ALLEN, H. J.; LOGUINOV, A.; HECKMAN, J. L.; GOVINDASMAWY, S. Toxicogenomic responses of nanotoxicity in *Daphnia magna* exposed to silver nitrate and coated silver nanoparticles. **Environmental Science and Technology**, v. 46, n. 11, p. 6288–6296, 2012.

POYNTON, H. C.; LAZORCHAK, J. M.; IMPELLITTERI, C. A.; BLALOCK, B.; SMITH, M. E.; STRUEWING, K.; UNRINE, J.; ROOSE, D. Toxicity and transcriptomic analysis in *Hyalella azteca* suggests increased exposure and susceptibility of epibenthic organisms to zinc oxide nanoparticles. **Environmental Science and Technology**, v. 47, n. 16, p. 9453–9460, 2013.

RAMASUBBURAYAN, R.; SUMATHI, S.; PRAKASH, S.; RAMKUMAR, V. S.; TITUS, S.; IMMANUEL, G.; PALAVESAM, A. Synthesis of nano silver by a marine epibiotic bacterium *Bacillus vallismortis* and its potent ecofriendly antifouling properties. **Environmental Nanotechnology, Monitoring and Management**, v. 8, p. 112–120, 2017.

SAM, N.; PALANICHAMY, S.; CHELLAMMAL, S.; KALAISELVI, P.; SUBRAMANIAN, G. Antifouling effects of silver nano particles synthesized from tropical seaweeds. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 4, n. 4, p. 1029–1042, 2015.

SHARMA, A.; TALUKDER, G. Effects of metals on chromosomes of higher organisms. **Environmental Mutagenesis**, v. 9, n. 2, p. 191–226, 1987.

SINGH, N. P.; MCCOY, T.; TICE, R. R.; SCHNEIDER, E. L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, v. 175, p. 184–191, 1988.

TREVIZANI, T. H.; FIGUEIRA, R. C. L.; RIBEIRO, A. P.; THEOPHILO, C. Y. S.; MAJER, A. P.; PETTI, M. A. V.; CORBISIER, T. N.; MONTONE, R. C. Bioaccumulation of heavy

metals in marine organisms and sediments from Admiralty Bay, King George Island, Antarctica. **Marine Pollution Bulletin**, v. 106, n. 1–2, p. 366–371, 2016.

UDROIU, I. The micronucleus test for aquatic toxicology. In: SVENSSON, E. P. (Ed.). **Aquatic Toxicology Research Focus**. Nova Science Publisher, 2007. p. 1–16.

VACCHI, F. I.; SANTOS, A. Dos; ARTAL, M. C.; MAGALHÃES, G. R.; VENDEMIATTI, J. A. d. S.; UMBUZEIRO, G. de A. *Parhyale hawaiiensis* as a promising alternative organism for monitoring acute toxicity of sediments under the influence of submarine outfalls. **Marine Pollution Bulletin**, v. 149, p. 37–39, 2019.

VANNUCI-SILVA, M.; CADORE, S.; HENRY, T. B.; UMBUZEIRO, G. Higher silver bioavailability after nanoparticle dietary exposure in marine amphipods. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 38, n. 4, p. 806–810, 2019.

VANNUCI-SILVA, M.; DA SILVA, E. D. N.; ARTAL, M. C.; DOS SANTOS, A.; SILVA, F.; UMBUZEIRO, G. A.; CADORE, S. GFAAS and ICP-MS determination of Ag and Cu in the haemolymph of a millimetric marine crustacean (*Parhyale hawaiiensis*) as a tool in ecotoxicology. **Atomic Spectroscopy**, v. 39, n. 2, p. 67–74, 2018.

YANG, J. L.; LI, Y. F.; LIANG, X.; GUO, X. P.; DING, D. W.; ZHANG, D.; ZHOU, S.; BAO, W. Y.; BELLOU, N.; DOBRETSOV, S. Silver nanoparticles impact biofilm communities and mussel settlement. **Scientific Reports**, v. 6, p. 1–9, 2016.

Anexo I

Tabela A1: Viabilidade de hemócitos de *Parhyale hawaiiensis* preservados em água do mar artificial, tampão de Kenny e tampão de fosfato salino (n = 6 organismos).

Solução	Viabilidade (%)	Erro padrão
Água do mar reconstituída	98,84	0,16
Tampão salino de Kenny	82,98	2,68
Tampão fosfato salino	88,11	0,80

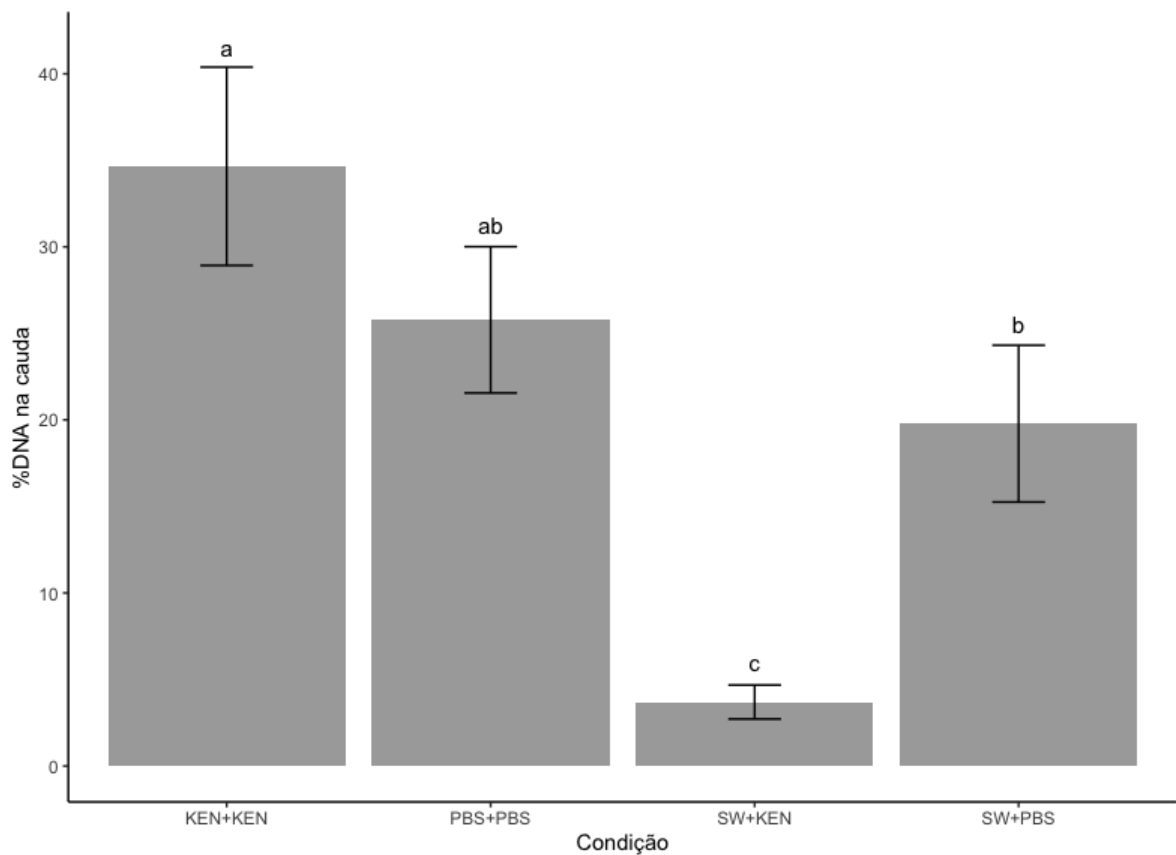


Figura A1: Níveis basais do ensaio cometa realizado em hemócitos de *Parhyale hawaiiensis*. PBS+PBS, KEN+KEN representam o ensaio cometa realizado com o mesmo tampão para preservar as células e preparar o gel de agarose de baixo ponto de fusão (tampão fosfato salino e tampão salino de Kenny, respectivamente). SW+PBS e SW+KEN representam o ensaio cometa realizado utilizando água do mar reconstituída para preservar as células e tampão fosfato salino ou tampão salino de Kenny para preparar o gel de agarose de baixo ponto de fusão. %DNA na cauda está apresentada como média ± erro padrão e letras diferentes indicam diferenças estatísticas significativas (n = 16 lâminas).

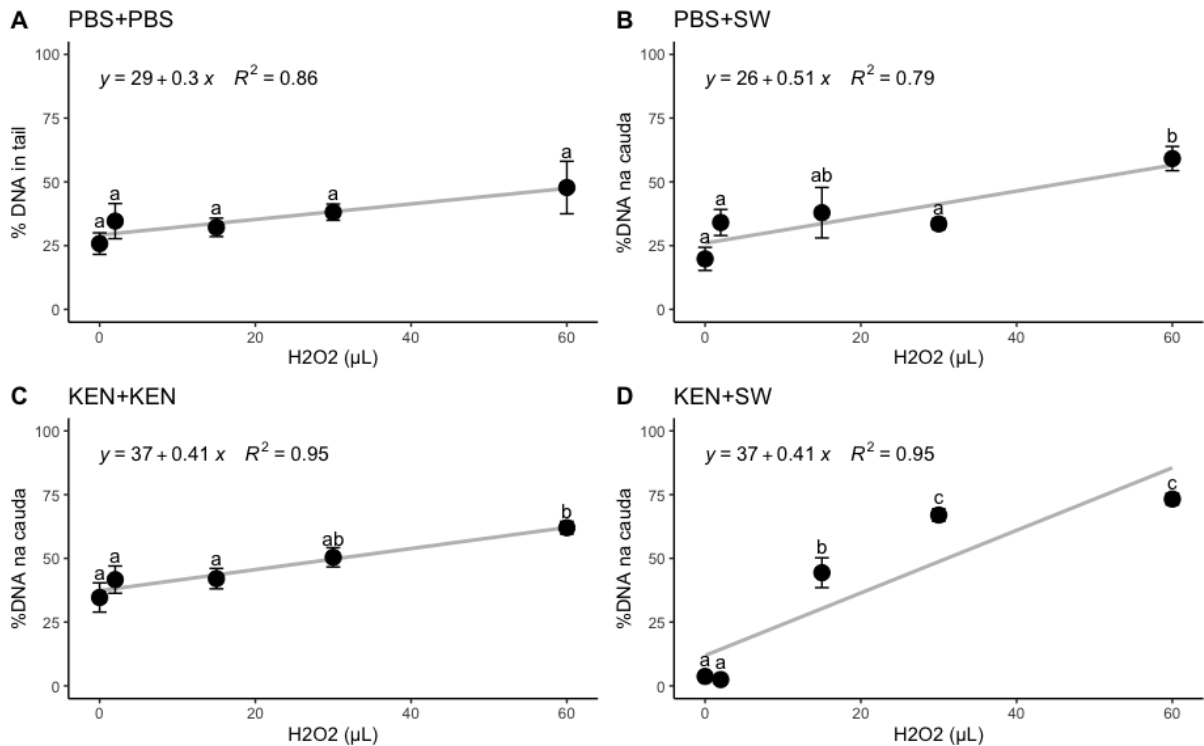


Figura A2: Controle positivo *in vitro* do ensaio cometa realizado com hemócitos de *Parhyale hawaiensis* expostos a H₂O₂. O ensaio foi realizado nas seguintes condições: A: tampão fosfato salino para preservação das células e preparação do gel de agarose; B: água do mar reconstituída para preservação das células e tampão fosfato salino para preparação do gel de agarose; C: tampão salino de Kenny para preservar as células e preparar gel de agarose; D: água do mar reconstituída para preservar as células e tampão salino de Kenny para preparar o gel de agarose. %DNA na cauda está apresentada como média ± erro padrão e letras diferentes indicam diferenças estatísticas significativas entre cada condição (n = 6 lâminas para cada concentração).

Capítulo II

Avaliação de efeitos reprodutivos em anfípodas marinhas expostas a aditivos de plástico

Botelho, M. T.¹; Green-Ojo, B.²; Umbuzeiro, G. de A.³; Gomes, V.¹; Ford, A. T.²

¹Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil

²Institute of Marine Sciences, University of Portsmouth, Portsmouth, Reino Unido

³Faculdade de Tecnologia, Universidade de Campinas, Limeira, Brasil

Resumo

O plástico como lixo marinho vem se destacando como um importante poluente ambiental há alguns anos, porém pouca atenção tem sido dada a compostos que podem ser liberados quando o plástico atinge o ambiente marinho. Ésteres ftálicos, que são utilizados como aditivos de plástico e migram facilmente para o ambiente aquático, devido à ausência de uma ligação química entre os dois, vêm chamando a atenção de especialistas por causa da sua alta toxicidade e potencial de ação como disruptor endócrino, mesmo em baixas concentrações. Os anfípodes são um grupo de invertebrados com grande importância para a estrutura e funcionamento das comunidades costeiras, além de serem bons modelos para estudos de ecotoxicologia. Neste estudo, foram avaliados os efeitos dos ftalatos mais utilizados na confecção de plásticos, di-(2-etilexil) ftalato (DEHP) e o dibutil ftalato (DBP), na reprodução de anfípodes machos *Echinogammarus marinus*. Para isso, os anfípodes foram expostos em laboratório a diferentes concentrações (0; 0,5; 5; 50; 500; 5000 μ g/L) de DEHP e DBP por 14 dias, sendo utilizados 15 indivíduos para cada condição. Ao final do período de exposição, os testículos foram removidos para a contagem dos espermatozóides. Durante o experimento, a mortalidade e a muda foram contabilizadas diariamente. DBP apresentou uma maior mortalidade que DEHP, principalmente nas concentrações mais altas 500 e 5000 μ g/L. Com relação à muda, DEHP apresentou um maior potencial para alterar esse processo, apresentando uma indução significativa da muda em duas concentrações (5 e 500 μ g/L); já com DBP poucos organismos realizaram mudas. Em relação à reprodução, houve uma diminuição significativa na contagem dos espermatozóides de anfípodes expostos a concentrações mais altas de DBP (50 e 500 μ g/L), já com DEHP não foi observado um efeito significativo. Ftalatos utilizados como aditivos de plástico, como DBP e DEHP, são potenciais fontes de impactos para organismos marinhos e precisam ser mais bem monitorados no ambiente. Neste estudo foi observada uma alta mortalidade e alteração de marcadores reprodutivos, que podem levar a impactos populacionais, após exposição dos anfípodes a DBP e também uma alteração no processo de muda dos anfípodes expostos a DEHP em concentrações ambientalmente relevantes, destacando a importância de monitoramento desses compostos que já se encontram no ambiente.

1 Introdução

Plásticos são amplamente utilizados no mundo atual em diversos setores, com mais de dez milhões de toneladas deste material sendo descartadas e entrando no ecossistema marinho todos os anos (LI et al., 2020). Dentre os diversos impactos que o descarte de plástico pode causar no ambiente, estão os efeitos adversos dos aditivos de plástico, como plastificantes, retardantes de chama e antioxidantes. Os ésteres ftálicos são parte do grupo dos plastificantes e recentemente têm chamado a atenção da comunidade científica, devido ao seu potencial impacto no ambiente e na saúde pública (QIAN et al., 2020). Esses compostos são adicionados ao plástico com o objetivo de aumentar sua plasticidade, maleabilidade e flexibilidade, estando presentes em revestimentos de parede, cosméticos, dispositivos médicos, materiais de embalagem de alimentos, recipientes de água, aparelhos, luvas e brinquedos infantis (QIAN et al., 2020; XU et al., 2020).

Ftalatos de plástico são conhecidos por suas propriedades de disrupção endócrina mesmo em baixas concentrações, podendo ocasionar problemas na reprodução, incluindo danos aos espermatozoides, puberdade prematura nas fêmeas, anomalias no sistema reprodutivo e infertilidade (GAO et al., 2018; SUN et al., 2020). Eles também ocasionaram anomalias de desenvolvimento, como escoliose congênita, enrolamento intestinal incompleto, más formações cardíacas e oculares (QIAN et al., 2020) e alterações no comportamento (XU et al., 2020). Em organismos aquáticos, efeitos adversos no crescimento, reprodução e danos fisiológicos foram observados (LI et al., 2020). Além disso, esses compostos possuem um potencial carcinogênico e natureza teratogênica, mutagênica e hepatotóxica (SUN et al., 2020; YU et al., 2020).

Os ftalatos podem entrar no ecossistema aquático por meio de descarte impróprio de resíduos sólidos, descartes de indústrias e vazamento de plásticos PVC (PALUSELLI et al., 2019; PU et al., 2020). Um dos principais problemas dos ftalatos é que, por não serem quimicamente ligados ao plástico, eles podem ser facilmente liberados em água ou solo, já sendo encontrados em outros ambientes, como lodo, poeira e ar (QIAN et al., 2020). A ligação entre os plásticos e os ftalatos é normalmente por pontes de hidrogênio ou força de van der Waals, por isso eles conseguem migrar facilmente para o ambiente (LI et al., 2020). Ao entrarem no ambiente aquático, os ftalatos são suscetíveis à hidrólise, porém a baixas taxas (SHEN et al., 2019); como exemplo, a meia vida de foto-oxidação na água do dibutil ftalato (DBP) é de 144 dias e sua meia vida de biodegradação em águas superficiais naturais é de 1 a 14 dias (SHEN et al., 2019). Além disso, alguns ftalatos, como DBP, são conhecidos

por sua estrutura química estável, de cadeia longa e dificilmente destruídos por métodos convencionais, aumentando a chance de contaminação ambiental (YU et al., 2020).

Di-(2-etilexil) ftalato (DEHP) e o dibutil ftalato (DBP) estão entre os ftalatos mais utilizados na confecção do plástico. Esses dois compostos predominam dentre os ftalatos encontrados em resíduos domésticos e lixiviados de aterro e sedimento (QIAN et al., 2020). Devido a alta toxicidade desses compostos, importantes agências reguladoras, como Environmental Protection Agency (EPA) nos Estados Unidos e State Environmental Protection Administration (SEPA) na China, já os classificaram como poluentes ambientais prioritários (PU et al., 2020; SUN et al., 2020).

Por serem disruptores endócrinos, diversos ftalatos, como DBP e DEHP, já foram relacionados a efeitos adversos na reprodução de organismos aquáticos (SRUTHI; RAIBEEMOL; CHITRA, 2020; YE et al., 2014). Avaliações de diferentes características dos espermatozoides, como sua quantidade, são boas variáveis para avaliar o impacto que diferentes compostos podem causar nos processos reprodutivos (HARLIOĞLU; FARHADI; GÜR, 2018). Os efeitos de DEHP e DBP na reprodução de anfípodas ainda não são completamente conhecidos, apesar de já existirem estudos demonstrando que esses compostos afetam o comportamento (THURÉN; WOIN, 1991), atividade enzimática e histologia das brânquias (YILDIRIM; AK; SAMASAS, 2021). Estudos com contagem de espermatozoides são importantes para avaliar possíveis impactos futuros nas populações. Baixas contagens de espermatozoides foram associadas com uma diminuição do número de ovos fertilizados e, conseqüentemente, menores ninhadas (DUNN et al., 2006), indicando um potencial impacto nas populações a longo prazo. Além disso, estudos de modelagem indicaram que reduções no número de espermatozoides abaixo de certos níveis podem impactar a densidade da população, podendo levá-la ao colapso (FORD; MARTINS; DUNN, 2012).

Anfípodas são considerados bons candidatos como organismos modelo e estão sendo utilizados com sucesso na ecotoxicologia por décadas (PODLESÍNSKA; DĄBROWSKA, 2019). Esse grupo é essencial na estrutura do ecossistema aquático, ocupando diferentes níveis tróficos e servindo como alimentos para peixes e aves (GLAZIER, 2014). *Echinogammarus marinus*, uma espécie bastante abundante em comunidades costeiras do noroeste do Oceano Atlântico, tem uma grande importância na estrutura e funcionamento das comunidades do entremarés, sendo um predador ativo para outros invertebrados e também uma importante presa para aves pernaltas (MARTINS; LEITE; CONSTANTINO, 2014). Esta espécie é também bastante utilizada em estudos de ecotoxicologia (BOSSUS et al., 2014; VANNUCI-SILVA et al., 2019; YANG; KILLE; FORD, 2008).

O objetivo deste trabalho foi investigar possíveis efeitos dos ftalatos mais utilizados como aditivos de plástico (DEHP e DBP) na reprodução de anfípodes machos *E. marinus*. Para quantificação dos efeitos, foi utilizada a contagem de espermatozóides após a exposição a diferentes concentrações dos compostos por 14 dias.

2 Metodologia

Exemplares de *E. marinus* foram coletados manualmente na região entremarés de Langstone Harbour, Inglaterra (50,789624 e -1,042419), durante a maré baixa. Os organismos foram transportados para o laboratório em baldes contendo água do mar do local de coleta. No laboratório, machos e fêmeas foram diferenciados em estereomicroscópio pela observação de gnatópodes proporcionalmente maiores nos machos e diferenças na estrutura das cerdas do télson: os machos possuem uma cobertura fina de cerdas por todo o télson, enquanto as fêmeas possuem uma menor quantidade de cerdas que se distribui agregada em tufo. A presença de parasitas internos (trematódeos) também foi avaliada ao estereomicroscópio e anfípodes parasitados foram descartados. Os machos foram separados e aclimatados em incubadora a 10°C, 24h no escuro e água do mar reconstituída (salinidade 33) com aeração constante por 2 semanas antes do experimento (KÖHLER et al., 2018). Pedacos de alga *Ascophyllum nodosum* foram adicionados no recipiente para serem utilizados como substrato e alimento (MARTINS; LEITE; CONSTANTINO, 2014).

Após o período de aclimação, os machos foram expostos individualmente por duas semanas às seguintes concentrações nominais de DEHP e DBP em água do mar reconstituída: 0; 0,5; 5; 50; 500; 5000µg/L. Essas concentrações foram escolhidas baseadas em estudos prévios das concentrações no ambiente e exposições de laboratório (ENVIRONMENTAL AGENCY, 2021; JUNG et al., 2020; THURÉN; WOIN, 1991). As soluções de cada concentração foram obtidas a partir de uma diluição em série da solução estoque de 5mg/L do composto em água do mar reconstituída. Em cada condição experimental, 15 indivíduos foram utilizados. Durante o experimento, trocas de água foram realizadas a cada 3 dias para garantir que os níveis de concentração do composto permanecessem estáveis e que a água estivesse oxigenada. As condições de temperatura, salinidade e fotoperíodo foram as mesmas do período de aclimação. Mortalidade e muda foram observadas diariamente.

Ao final das duas semanas de exposição, os organismos foram anestesiados por alguns segundos até pararem de se mover em solução de óleo de cravo para dissecação. Esta solução de óleo de cravo foi preparada a partir de uma alíquota de 80µL da solução estoque diluída em 25mL de água do mar; a solução estoque era composta de 3,7mL de óleo de cravo 100%

em 16,6mL de álcool 100%. Os organismos foram, então, pesados e dissecados em esteromicroscópio para a remoção dos testículos. Primeiramente, a extremidade posterior do corpo foi fixada com uma pinça e a cabeça juntamente com todo o trato digestório foram removidos puxando-se lentamente com outra pinça. Em seguida, o organismo foi posicionado com a parte ventral para cima e um corte foi realizado da parte anterior para a posterior, tornando possível, com auxílio de uma pinça fina, abrir o corpo do organismo e observar seu interior. Os testículos foram então visualizados nos dois lados na região do central do corpo, eles possuem uma coloração branca brilhante quando estão cheios de espermatozoides (Figura 1).

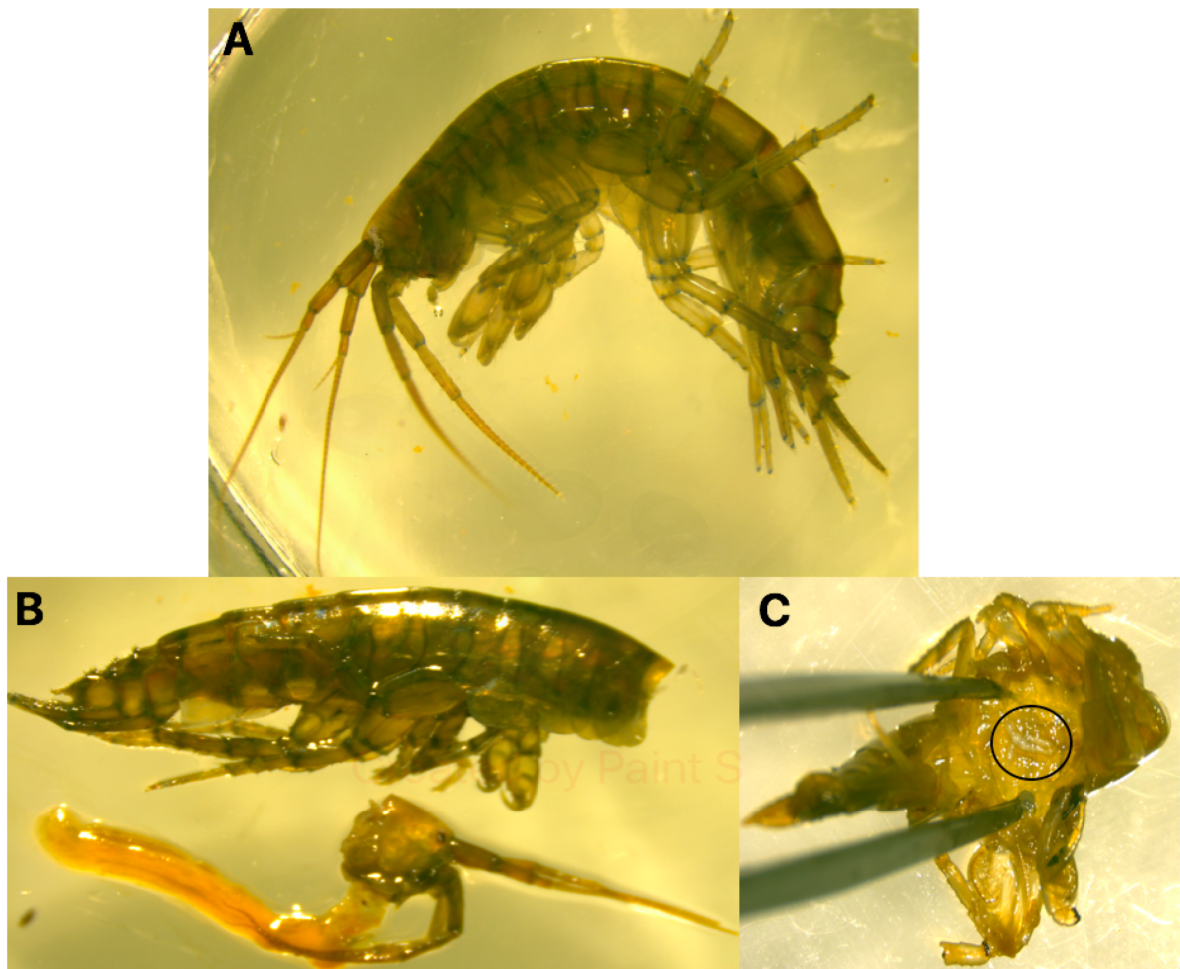


Figura 1: Macho de *Echinogammarus marinus* (A) e o processo de dissecção para a remoção dos testículos: primeiramente a cabeça e o trato digestório devem ser removidos (B) e em seguida um corte na região ventral é realizado permitindo visualizar os testículos, destacado em um círculo preto (C). Quando cheios de esperma os testículos apresentam uma coloração branca brilhante.

Após a dissecação, os testículos foram colocados em uma lâmina de vidro côncava com 30 μ L de PBS e, com o auxílio de pinças finas, os testículos foram dilacerados para liberar os espermatozóides. Essa suspensão foi transferida para um *vial* com 30 μ L de PBS previamente pesado. O *vial* foi homogeneizado e, novamente, pesado para estimar o volume da solução final de espermatozóides, sendo assumido que a densidade da solução é igual à densidade da água (1g/mL) (YANG, 2011). Os *vials* foram armazenados no gelo até o final das dissecações. A suspensão celular foi então colocada em câmara de Neubauer para a contagem de espermatozóides. Foram contadas 3 câmaras para cada indivíduo e, em cada câmara, foram escolhidos aleatoriamente 3 quadrantes para computar o número de células. Uma média da contagem das três réplicas foi realizada para calcular o número de espermatozóides contados de cada organismo e o número total de espermatozóides por organismo foi calculado multiplicando a contagem pelo volume total da suspensão celular (YANG; KILLE; FORD, 2008).

Os dados da contagem de espermatozóides estão apresentados de duas maneiras diferentes: transformados pela raiz quarta ou divididos pelo peso do organismo. Duas análises estatísticas foram realizadas, ANCOVA com os dados transformados pela raiz quarta e ANOVA para os dados divididos pelo peso. Resíduos foram analisados quanto à normalidade pelo Teste de Shapiro-Wilk e homogeneidade de variâncias pelo Teste de Levene, eles não apresentaram uma distribuição normal, porém eram homogêneos quanto à variância. ANCOVA e ANOVA são testes robustos em distribuições não normais com homogeneidade de variâncias (GLASS; PECKHAM; SANDERS, 1972; RHEINHEIMER; PENFIELD, 2001). Na ANCOVA, o peso do organismo foi utilizado como covariável para avaliar o efeito das concentrações na contagem de espermatozóides transformada pela raiz quarta. Na ANOVA com a contagem de espermatozóides normalizada pelo peso, foi avaliado o efeito das diferentes concentrações de DEHP e DBP. As mudas, nas diferentes concentrações do experimento, foram comparadas utilizando o modelo binário logístico de regressão e a mortalidade cumulativa foi comparada com o controle utilizando o teste de Kolmogorov-Smirnov.

3 Resultados e discussão

Recentemente, os ftalatos utilizados como aditivos de plástico têm recebido uma maior atenção da comunidade científica e também das agências ambientais dos governos, devido ao seu potencial impacto ambiental. Em 2012, a *Environmental Protection Agency* dos Estados Unidos lançou um plano de ação na tentativa de regulamentar o uso e gerenciar

possíveis impactos ambientais dos ftalatos (USEPA, 2012). A partir de 2008, a Agência Ambiental do Reino Unido incluiu análises de DEHP no monitoramento de determinados pontos de coleta e, a partir de 2016, áreas estuarinas e marinhas foram incluídas entre esses pontos. Áreas de drenagem superficial apresentaram as concentrações mais altas de DEHP (com valores muito altos, ultrapassando $600\mu\text{g/L}$) em relação a outros tipos de ambientes avaliados (Figura 2A). Em áreas classificadas como marinhas, as concentrações foram constantemente baixas (Figura 2B), porém, em áreas estuarinas, essas concentrações foram um pouco mais elevadas e há pontos no estuário do Rio Severn na fronteira entre a Inglaterra e o País de Gales, próximo a Bristol e Cardiff, com concentrações em torno de 5 e $8\mu\text{g/L}$ (Figura 2C). A escolha das concentrações do experimento foram baseadas nas concentrações de áreas do Reino Unido, por ser o local onde os organismos utilizados foram coletados. No Brasil, a Resolução CONAMA 420/2009 foi alterada em 2013 para regulamentar as concentrações máximas permitidas de DEHP e DBP em solos e águas subterrâneas (CONAMA, 2013).

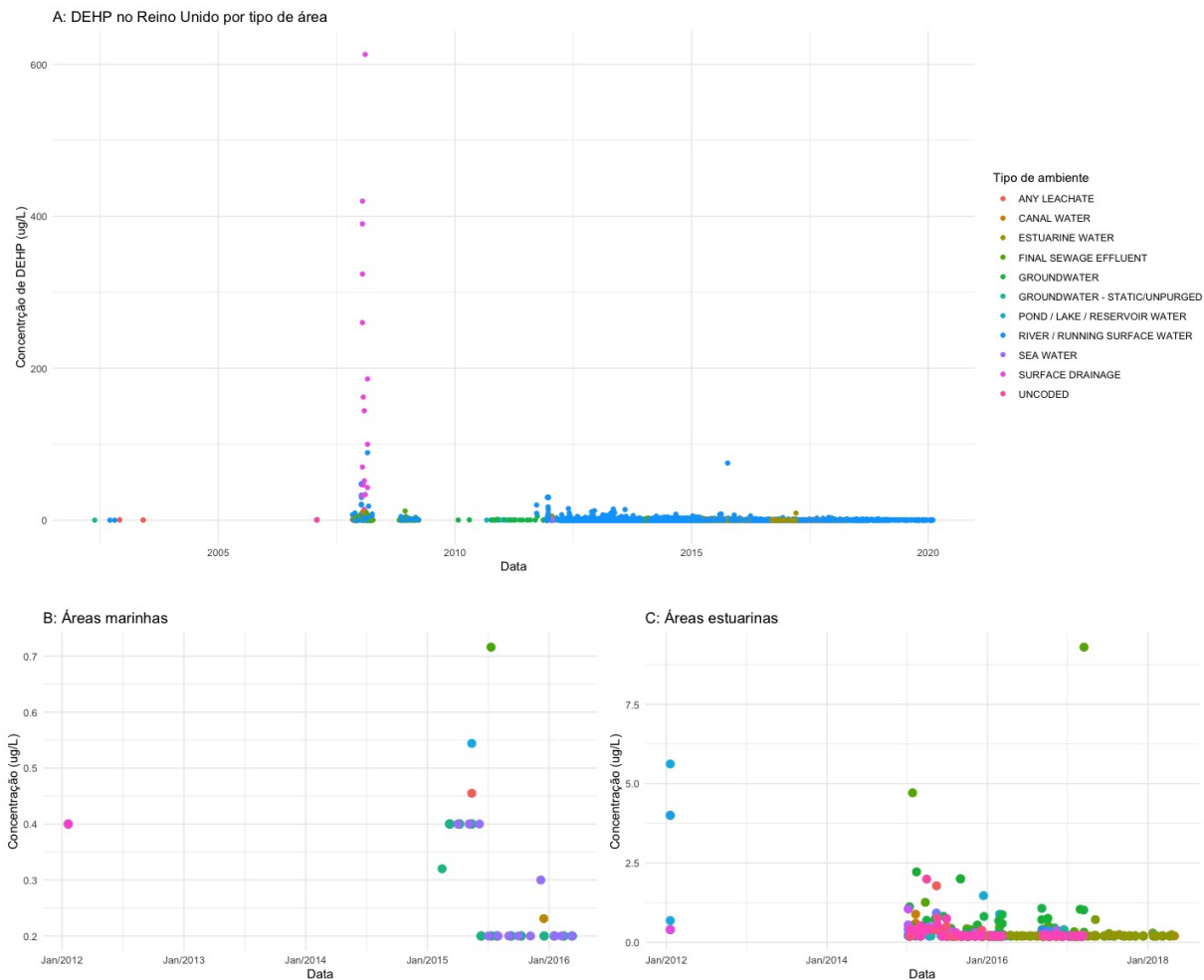


Figura 2: Concentração de DEHP encontrada no Reino Unido medidas pela Agência Ambiental: dados de diferentes tipos de ambiente (A), áreas marinhas (B) e áreas estuarinas (C). Diferentes cores nos gráficos B e C representam diferentes locais de coleta. Os dados estão disponibilizados no site da Agência Ambiental do Reino Unido (ENVIRONMENTAL AGENCY, 2021).

Após a exposição, foi observada mortalidade apenas em anfípodas expostas a DBP (Tabela 1). Todos os indivíduos expostos à concentração mais alta de DBP ($5000\mu\text{g/L}$) foram encontrados mortos em até 6 dias de exposição e 60% dos organismos expostos a segunda concentração mais alta ($500\mu\text{g/L}$) morreram até o final do experimento. A mortalidade nessas duas concentrações foram significativamente maiores da observada no controle (teste de Kolmogorov-Smirnov; $500\mu\text{g/L}$: $D = 0,57$, $p = 0,02$; $5000\mu\text{g/L}$: $D = 0,93$, $p = 1,14 \times 10^{-5}$). Já na exposição a DEHP, não foi observada nenhuma mortalidade ao longo do experimento (Tabela 1). Este resultado está de acordo com o encontrado na literatura, já que o DBP normalmente é reportado como mais tóxico que o DEHP. Comparando seis diferentes ftalatos aos quais larvas de peixe zebra foram expostas, a maior mortalidade foi encontrada quando as larvas foram expostas a DBP e DEHP foi considerado o segundo ftalato menos tóxico (PU et

al., 2020). Larvas do camarão *Palaemonetes pugio* também apresentaram a mesma tendência, sendo DBP mais tóxico seguido de dimetil ftalato (DMP) e DEHP (LAUGHLIN et al., 1978).

Tabela 1: Mortalidade observada em *Echinogammarus marinus* expostos a diferentes concentrações de DEHP e DBP por 14 dias.

Concentração	Mortalidade (%)	
	DEHP	DBP
0	0	20
0,5	0	13,3
5	0	26,7
50	0	13,3
500	0	60
5000	0	100

DEHP afetou significativamente o processo de muda dos anfípodes, já que um maior número de anfípodes expostos a DEHP realizaram a muda em relação aos do controle (Tabela 2). Segundo o modelo logístico binário, houve uma indução significativa no número de mudas nas concentrações de 5 e 500µg/L, mostrando um aumento na taxa de realização das mudas, e uma redução significativa nos organismos da condição controle (modelo logístico binário de regressão, $p = 0,03$). Comparando com o grupo controle da exposição, DBP não apresentou um efeito significativo na muda e menos organismos realizaram o processo em relação a DEHP (Tabela 2).

Tabela 2: Porcentagem de anfípodes *Echinogammarus marinus* expostos a diferentes concentrações de DEHP e DBP que realizaram muda durante os 14 dias de exposição.

Concentração	Mudas realizadas (%)	
	DEHP	DBP
0	13,3	6,7
0,5	33,3	20,0
5	53,3	13,3
50	40,0	20,0
500	53,3	0,0
5000	40,0	-

Os ftalatos utilizados na confecção do plástico são conhecidos como disruptores endócrinos, portanto o processo de muda pode ser afetado por eles. Os crustáceos periodicamente trocam seu exoesqueleto, em um processo chamado de muda ou ecdise, para crescer e se desenvolver (ZOU, 2020). Além disso, em anfípodes fêmeas o ciclo de muda é altamente relacionado com a maturação ovacitária (SHEADER, 1983). O processo de muda tem recentemente atraído a atenção de pesquisadores, devido a um possível impacto de contaminantes ambientais sobre ele. A muda em crustáceos é regulada pelo hormônio ecdiesteróide da muda, produzido pela glândula de muda no órgão Y, e pelo hormônio inibidor da muda (MIH), um peptídeo da glândula complexa do órgão X (ZOU, 2020). Vários compostos demonstraram capacidade de interromper o processo de muda em crustáceos, incluindo o dietil ftalato (DEP), sendo que a maioria deles apresentou efeito inibitório (ZOU, 2020). Um composto que perturba esse processo pode atuar alterando os ecdiesteróides circulantes, por meio de alterações na ecdisteroidogênese nos órgãos Y e/ou no metabolismo e excreção desses hormônios, ou pode atuar diretamente nas células epidérmicas, interferindo na sinalização do ecdiesteróide, resultando em alterações na expressão de genes regulados pelos hormônios da muda (ZOU, 2020). Neste estudo, um número significativamente maior de anfípodes expostos a 5 e 500µg/L de DEHP passaram pelo processo de muda em relação aos anfípodes do controle. O caranguejo *Macrophthalmus japonicus* mostrou uma indução significativa na expressão do mRNA do receptor de ecdisona após a exposição a DEHP (PARK; KIM; KWAK, 2019). Esses resultados demonstraram um potencial efeito de DEHP para perturbar o processo de muda em crustáceos. Por sua vez, as baixas taxas de muda de *E. marinus* registradas após exposição a DBP neste estudo podem ser relacionadas à alta mortalidade observada neste experimento, não sendo possível avaliar seu impacto no processo de muda. Apesar de as consequências de alterações no ciclo de muda em crustáceos ainda serem pouco relacionadas a impactos maiores no organismo, é um marcador que merece atenção principalmente devido a grande interligação entre o processo de muda e o ciclo reprodutivo das fêmeas (SHEADER, 1983) e por indicarem alterações hormonais.

Na exposição a DEHP, o peso dos machos foi uma covariável significativa (ANCOVA, $F = 5,27$, $p = 0,02$) e a concentração de DEHP não afetou significativamente a contagem de espermatozóides (ANCOVA, $F = 0,43$, $p = 0,82$; e ANOVA, $F = 0,34$, $p = 0,88$) (Figura 3A). Porém, é possível observar uma tendência de diminuição da contagem de espermatozóides em organismos expostos a DEHP em relação aos do controle (Figura 4A). A alta variabilidade individual desse parâmetro pode auxiliar a explicar o porquê do resultado não estatisticamente significativo.

Já na exposição a DBP, o peso dos machos foi uma covariável significativa (ANCOVA, $F = 6,73$, $p = 0,013$) e a concentração de DBP também teve um efeito significativo (ANCOVA, $F = 3,14$, $p = 0,023$; e ANOVA, $F = 4,23$, $p = 0.005$) (Figura 3B). Na análise ANCOVA, a raiz quarta da contagem dos espermatozóides dos organismos expostos a $50\mu\text{g/L}$ foi menor do que a do grupo controle. Na análise ANOVA, as contagens de espermatozóides divididas pelo peso de anfípedes expostos a 50 e $500\mu\text{g/L}$ foram menores do que dos organismos do grupo controle (Figura 4B).

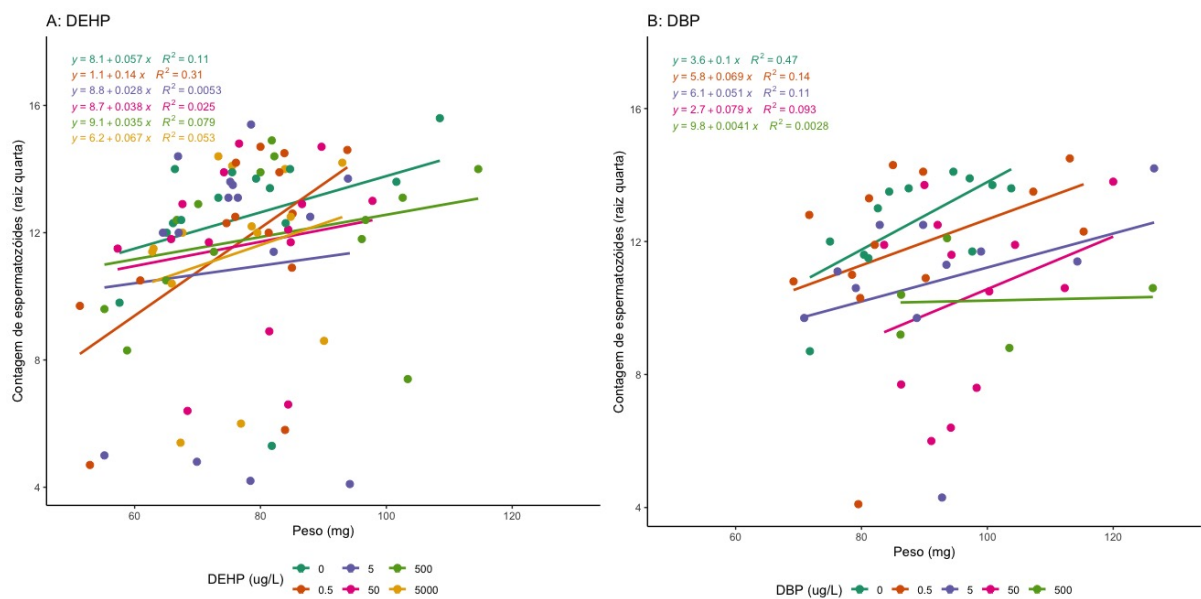


Figura 3: Relação entre a contagem de espermatozóides e o peso de machos de *Echinogammarus marinus* expostos a diferentes concentrações de DEHP (A) e DBP (B) por 14 dias.

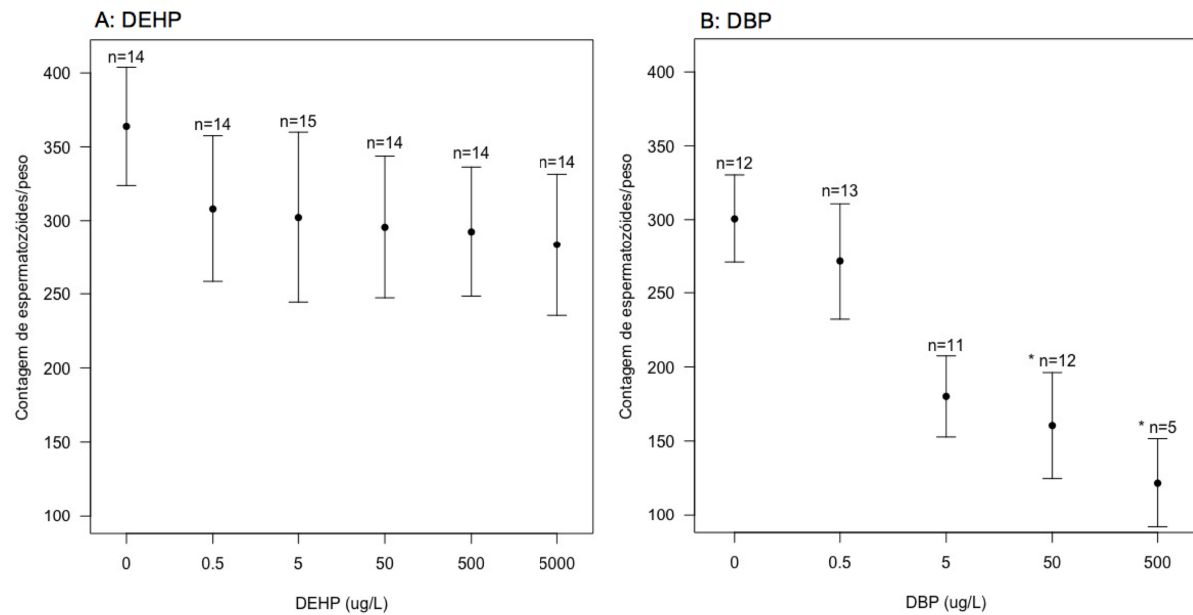


Figura 4: Médias da contagem de espermatozóides divididas pelos pesos de machos de *Echinogammarus marinus* expostos a diferentes concentrações de DEHP (A) e DBP (B) por 14 dias. As barras de erro indicam o erro padrão, n o número amostral e * grupos significativamente diferentes do controle.

Tanto DBP como DEHP já foram associados a efeitos adversos na reprodução de organismos de laboratório e a distúrbios na função normal dos espermatozóides em humanos (GAO et al., 2019). Análises histológicas nos testículos de peixes *Pseudotropheus maculatus* mostraram uma redução ou ausência de espermatozóides após 4 dias de exposição a DBP e após 15 dias de exposição a esse composto foram observadas espermatogônias desorganizadas e espermatócitos sem espermatozóides no lúmen dos túbulos seminíferos (SRUTHI; RAIBEEMOL; CHITRA, 2020). Nesse mesmo estudo, também foi relatado que os peixes expostos a DBP apresentaram uma significativa diminuição no peso dos testículos, motilidade, viabilidade e contagem dos espermatozóides (SRUTHI; RAIBEEMOL; CHITRA, 2020). Peixes arco-íris australiano (*Melanotaenia fluviatilus*) expostos a altas concentrações de DBP apresentaram alterações testiculares, como ocorrência de células com vacúolos, corpos celulares apoptóticos, fibrose intersticial e desenvolvimento assíncrono com declínio significativo na proporção de espermatozóides (BHATIA et al., 2014). Além disso, peixes zebras adultos mostraram um atraso na gametogênese após exposição a DBP (XU et al., 2014). Os resultados deste estudo com *E. marinus*, demonstrando que anfípodas expostas a DBP tiveram uma redução da contagem de espermatozóides, estão de acordo com esses resultados da literatura e complementam a hipótese de que DBP pode afetar a reprodução de espécies aquáticas. Impactos na reprodução são importantes de serem estudados, pois podem

afetar diretamente o nível populacional; como exemplo, reduções na contagem de espermatozoides foram relacionadas a um decréscimo da população em estudos de modelagem (FORD; MARTINS; DUNN, 2012). Apesar de previamente associado a efeitos reprodutivos adversos, como diminuição na produção de ovos de copépodes (HEINDLER et al., 2017), atraso da primeira reprodução em crustáceos (JUNG et al., 2020), alterações histológicas em testículos e ovários de peixes (YE et al., 2014) e redução do número de espermatozoides em peixes-zebra (UREN-WEBSTER et al., 2010), neste estudo nenhum efeito significativo de DEHP foi identificado na contagem de espermatozoides de *E. marinus*.

4 Conclusão

Neste trabalho, DBP apresentou maiores taxas de mortalidade em *E. marinus* que DEHP. Além disso, DBP reduziu significativamente as contagens de espermatozoides em relação ao controle negativo. Em contrapartida, DEHP aparentou ter um maior potencial de afetar o processo de muda dos anfípodes, indicando uma possível alteração hormonal nos organismos. Ftalatos de plástico, como DBP e DEHP, são potenciais fontes de impactos para organismos marinhos e precisam ser mais bem monitorados no ambiente.

Referências

- BHATIA, H.; KUMAR, A.; OGINO, Y.; GREGG, A.; CHAPMAN, J.; MCLAUGHLIN, M. J.; IGUCHI, T. Di-n-butyl phthalate causes estrogenic effects in adult male Murray rainbowfish (*Melanotaenia fluviatilis*). **Aquatic Toxicology**, v. 149, p. 103–115, 2014.
- BOSSUS, M. C.; GULER, Y. Z.; SHORT, S. J.; MORRISON, E. R. Behavioural and transcriptional changes in the amphipod *Echinogammarus marinus* exposed to two antidepressants, fluoxetine and sertraline. **Aquatic Toxicology**, v. 151, p. 46–56, 2014.
- CONAMA. **Resolução 420/2009**. 2013. Disponível em: <<https://www.ibama.gov.br/component/legislacao/?view=legislacao&legislacao=115509>>.
- DUNN, A. M.; ANDREWS, T.; INGREY, H.; RILEY, J.; WEDELL, N. Strategic sperm allocation under parasitic sex-ratio distortion. **Biology Letters**, v. 2, n. 1, p. 78–80, 2006.
- ENVIRONMENTAL AGENCY, U. **Water Quality Data**. 2021. Disponível em: <<https://environment.data.gov.uk/water-quality/view/landing>>.
- FORD, A. T.; MARTINS, I.; DUNN, A. M. Insights into sperm-fertilisation relationships in the Arthropoda with ecological significance modelled in an amphipod. **Invertebrate Reproduction & Development**, v. 56, n. 1, p. 50–56, 2012.
- GAO, D.; LI, Z.; WANG, H.; LIANG, H. An overview of phthalate acid ester pollution in China over the last decade: Environmental occurrence and human exposure. **Science of The Total Environment**, v. 645, p. 1400–1409, 2018.
- GAO, X.; LI, J.; WANG, X.; ZHOU, J.; FAN, B.; LI, W.; LIU, Z. Exposure and ecological risk of phthalate esters in the Taihu Lake basin, China. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 171, p. 564–570, 2019.
- GLASS, G. V.; PECKHAM, P. D.; SANDERS, J. R. Consequences of failure to meet assumptions underlying the fixed effects analyses of variance and covariance. **Review of Educational Research**, v. 42, n. 3, p. 237–288, 1972.
- GLAZIER, D. S. Amphipoda. In: ELIAS, S. A. (Ed.). **Reference Module in Earth Systems and Environmental Sciences**. Elsevier, 2014. p. 1–49.
- HARLIOĞLU, M. M.; FARHADI, A.; GÜR, S. Determination of sperm quality in decapod crustaceans. **Aquaculture**, v. 490, p. 185–193, 2018.
- HEINDLER, F. M.; ALAJMI, F.; HUERLIMANN, R.; ZENG, C.; NEWMAN, S. J.; VAMVOUNIS, G.; VAN HERWERDEN, L. Toxic effects of polyethylene terephthalate microparticles and Di(2-ethylhexyl)phthalate on the calanoid copepod, *Parvocalanus crassirostris*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 141, p. 298–305, 2017.
- JUNG, J. W.; KANG, J. S.; CHOI, J.; PARK, J. W. Chronic toxicity of endocrine disrupting chemicals used in plastic products in Korean resident species: Implications for aquatic ecological risk assessment. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 192, p. 110309, 2020.

- KOHLER, S. A.; PARKER, M. O.; FORD, A. T. Species-specific behaviours in amphipods highlight the need for understanding baseline behaviours in ecotoxicology. **Aquatic Toxicology**, v. 202, p. 173-180, 2018.
- LAUGHLIN, R. B.; NEFF, J. M.; HRUNG, Y. C.; GOODWIN, T. C.; GIAM, C. S. The effects of three phthalate esters on the larval development of the grass shrimp *Palaemonetes pugio* (Holthuis). **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 9, n. 3, p. 323–336, 1978.
- LI, Z.; YI, X.; ZHOU, H.; CHI, T.; LI, W.; YANG, K. Combined effect of polystyrene microplastics and dibutyl phthalate on the microalgae *Chlorella pyrenoidosa*. **Environmental Pollution**, v. 257, p. 113604, 2020.
- MARTINS, I.; LEITE, N.; CONSTANTINO, E. Consumption and feeding preference of *Echinogammarus marinus* on two different algae: *Fucus vesiculosus* and *Ulva intestinalis*. **Journal of Sea Research**, v. 85, p. 443–446, 2014.
- PALUSELLI, A.; FAUVELLE, V.; GALGANI, F.; SEMPÉRÉ, R. Phthalate release from plastic fragments and degradation in seawater. **Environmental Science and Technology**, v. 53, p. 166–175, 2019.
- PARK, K.; KIM, W. S.; KWAK, I. S. Characterization and transcriptional response of ecdysone receptor gene in the mud crab *Macrophthalmus japonicus*: Effects of osmotic stress and endocrine disrupting chemicals. **Ocean Science Journal**, v. 54, n. 4, p. 611–620, 2019.
- PODLESIŃSKA, W.; DĄBROWSKA, H. Amphipods in estuarine and marine quality assessment – a review. **Oceanologia**, v. 61, n. 2, p. 179–196, 2019.
- PU, S.-Y.; HAMID, N.; REN, Y.-W.; PEI, D.-S. Effects of phthalate acid esters on zebrafish larvae: development and skeletal morphogenesis. **Chemosphere**, v. 246, p. 125808, 2020.
- QIAN, L.; LIU, J.; LIN, Z.; CHEN, X.; YUAN, L.; SHEN, G.; YANG, W.; WANG, D.; HUANG, Y.; PANG, S.; MU, X.; WANG, C.; LI, Y. Evaluation of the spinal effects of phthalates in a zebrafish embryo assay. **Chemosphere**, v. 249, p. 126144, 2020.
- RHEINHEIMER, D. C.; PENFIELD, D. A. The effects of type I error rate and power of the ANCOVA F test and selected alternatives under nonnormality and variance heterogeneity. **Journal of Experimental Education**, v. 69, n. 4, p. 373–391, 2001.
- SHEADER, M. The reproductive biology and ecology of *Gammarus duebeni* (Crustacea: Amphipoda) in Southern England. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, v. 58, p. 585–596, 1983.
- SHEN, C.; WEI, J.; WANG, T.; WANG, Y. Acute toxicity and responses of antioxidant systems to dibutyl phthalate in neonate and adult *Daphnia magna*. **PeerJ**, v. 2019, n. 3, 2019.
- SRUTHI, M.; RAIBEEMOL, K. P.; CHITRA, K. C. Involvement of dibutyl phthalate on male reproductive toxicity in the freshwater fish *Pseudotroplus maculatus* (Bloch, 1795). **Journal of Applied Aquaculture**, p. 1–25, 2020.

SUN, J.; WEI, B.; MEI, Q.; AN, Z.; WANG, X.; HAN, D.; XIE, J.; ZHAN, J.; ZHANG, Q.; WANG, W.; HE, M. Theoretical investigation on the degradation of dibutyl phthalate initiated by OH and SO₄⁻ in aqueous solution: mechanism, kinetics and ecotoxicity assessment. **Chemical Engineering Journal**, v. 382, p. 122791, 2020.

THURÉN, A.; WOIN, P. Effects of phthalate esters on the locomotor activity of the freshwater amphipod *Gammarus pulex*. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 46, p. 159–166, 1991.

UREN-WEBSTER, T. M.; LEWIS, C.; FILBY, A. L.; PAULL, G. C.; SANTOS, E. M. Mechanisms of toxicity of di(2-ethylhexyl) phthalate on the reproductive health of male zebrafish. **Aquatic Toxicology**, v. 99, p. 360–369, 2010.

USEPA. **Phthalates Action Plan - U.S. Environmental Protection Agency**. U.S. Environmental Protection Agency. Disponível em: <https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-09/documents/phthalates_actionplan_revised_2012-03-14.pdf>.

VANNUCI-SILVA, M.; KOHLER, S.; UMBUZEIRO, G. de A.; FORD, A. T. Behavioural effects on marine amphipods exposed to silver ions and silver nanoparticles. **Environmental Pollution**, v. 252, p. 1051–1058, 2019.

XU, N.; CHEN, P.; LIU, L.; ZENG, Y.; ZHOU, H.; LI, S. Effects of combined exposure to 17 α -ethynylestradiol and dibutyl phthalate on the growth and reproduction of adult male zebrafish (*Danio rerio*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 107, p. 61–70, 2014.

XU, Z.; XIONG, X.; ZHAO, Y.; XIANG, W.; WU, C. Pollutants delivered every day: phthalates in plastic express packaging bags and their leaching potential. **Journal of Hazardous Materials**, v. 384, p. 121282, 2020.

YANG, G. **Intersexuality and Endocrine Disruption in the Amphipod *Echinogammarus marinus* – From Genes to Physiology**. 2011. University of Aberdeen, 2011.

YANG, G.; KILLE, P.; FORD, A. T. Infertility in a marine crustacean: Have we been ignoring pollution impacts on male invertebrates? **Aquatic Toxicology**, v. 88, p. 81–87, 2008.

YE, T.; KANG, M.; HUANG, Q.; FANG, C.; CHEN, Y.; SHEN, H.; DONG, S. Exposure to DEHP and MEHP from hatching to adulthood causes reproductive dysfunction and endocrine disruption in marine medaka (*Oryzias melastigma*). **Aquatic Toxicology**, v. 146, p. 115–126, 2014.

YILDIRIM, N. C.; AK, T. P.; SAMASAS, O. Toxicological effects of di-(2-ethylhexyl) phthalate in *Gammarus pulex*: a biochemical and histopathological assessment. **Environmental Science and Pollution Research**, 2021.

YU, H.; WANG, L.; LIN, Y.; LIU, W.; TUYIRINGIRE, D.; JIAO, Y.; ZHANG, L.; MENG, Q.; ZHANG, Y. Complete metabolic study by dibutyl phthalate degrading *Pseudomonas* sp. DNB-S1. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 194, p. 110378, 2020.

ZOU, E. Invisible endocrine disruption and its mechanisms: A current review. **General and Comparative Endocrinology**, v. 293, p. 113470, 2020.

Capítulo III

Relações incomuns entre o tamanho e a contagem de espermatozóides em um anfípode marinho costeiro indicam uma deficiência reprodutiva por agentes tóxicos desconhecidos

Botelho, M. T.¹; Fuller, N.²; Vannuci-Silva, M.³; Yang, G.²; Richardson, K.²; Ford, A. T.²

¹Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil

²Institute of Marine Sciences, University of Portsmouth, Portsmouth, Reino Unido

³Instituto de Biologia, Universidade de Campinas, Campinas, Brasil

Publicado em Aquatic Toxicology, v. 233, p. 105793, 2021.

<https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2021.105793>

Resumo

A quantidade e qualidade de espermatozóides são marcadores relevantes com claras ligações com as dinâmicas populacionais. Anfípodes são reconhecidos como bons modelos para a toxicologia ambiental. Apesar disso, estudos sobre a fertilidade dos machos em invertebrados são raros em programas de monitoramento. O objetivo deste estudo foi comparar a quantidade/qualidade dos espermatozóides de anfípodes *Echinogammarus marinus* coletados em cinco locais do Reino Unido com diferentes qualidades de água. Como os anfípodes de uma área de proteção ambiental (Langstone Harbour, Inglaterra) apresentaram baixas contagens de espermatozóides e ausência de relação entre a contagem dos espermatozóides e o peso dos organismos, foi também realizada uma comparação entre dados desse local ao longo de uma década para determinar a significância temporal dessa descoberta. Uma coleta complementar para avaliar um marcador reprodutivo das fêmeas também foi realizada neste local. Curiosamente, machos de Langstone Harbour apresentaram consistentemente baixas contagens de espermatozóides, comparáveis a de locais altamente industrializados, e também as fêmeas apresentaram um baixo número de ovos. Anfípodes coletados em todos os locais avaliados, exceto Langstone Harbour, apresentaram correlações positivas e significativas entre a contagem dos espermatozóides e o peso dos organismos. Langstone Harbour possui diversos status de proteção, nacionais e internacionais, para a vida marinha e aves, porém os resultados deste estudo indicam que a população de *E. marinus*, uma importante fonte de alimentação de aves pernaltas, possivelmente está sendo impactada por estressores reprodutivos ainda desconhecidos. Esses estressores podem estar relacionados a escoamento agrícola, lixiviado de aterros históricos e/ou efluentes de transbordamentos de águas pluviais. Este estudo destaca a importância de explorar marcadores reprodutivos, como a quantidade/qualidade de espermatozóides, em programas de monitoramento marinho.

1 Introdução

A reprodução é um processo vital para a manutenção da integridade das populações e do ecossistema, sendo a fertilização dos gametas um passo fundamental para o sucesso reprodutivo. Os espermatozoides são células especializadas, utilizadas para transferir informações genéticas dos machos para os ovos. Sua qualidade depende de diversos fatores, como nutrição dos organismos e outras condições ambientais (LEWIS; FORD, 2012). A qualidade dos espermatozoides é essencial para uma fertilização bem sucedida e pode ser avaliada de diversas formas, como número, viabilidade e motilidade de espermatozoides, tamanho e energia do espermatóforo, reação acrossômica, melanização e taxa de ausência de espermatóforos (HARLIOĞLU; FARHADI; GÜR, 2018).

A contagem e concentração dos espermatozoides são os parâmetros mais mensurados para avaliar a qualidade dos espermatozoides em mamíferos (RAVANOS et al., 2018), insetos (STROBL et al., 2019) e invertebrados marinhos (HARLIOĞLU; FARHADI; GÜR, 2018). Relações positivas entre o tamanho dos indivíduos e a contagem de espermatozoides já são conhecidas em insetos, nos quais machos maiores possuem mais espermatozoides, porém essas relações podem variar conforme o ambiente em que vivem (STROBL et al., 2019). Assim como nos insetos, diversos crustáceos machos maiores tendem a produzir uma quantidade significativamente maior de espermatozoides em relação a machos menores (PERALTA-MARTÍNEZ et al., 2019; RODRÍGUEZ et al., 2007). Já foi observado que machos maiores de anfípodes possuem uma vantagem para emparelhar com fêmeas maiores no processo conhecido como guarda do companheiro (ELWOOD; DICK, 1990), portanto é importante avaliar se esta vantagem é apenas devido ao tamanho do macho ou se os espermatozoides dos machos maiores também possuem uma maior qualidade em relação aos dos machos menores. Correlações positivas entre o tamanho de machos adultos e a contagem de espermatozoides já foram observadas em anfípodes, por exemplo em *Echinogammarus marinus* (YANG; KILLE; FORD, 2008), *Gammarus pulex* (GALIPAUD; GAUTHEY; BOLLACHE, 2011) e *Gammarus duebeni* (ARUNDELL; WEDELL; DUNN, 2014). Porém, nenhuma relação entre esses parâmetros foi observada em *G. duebeni* (DUNN et al., 2006), *G. pulex* (LEMAÎTRE et al., 2009) e *Gammarus roeseli* (COUCHOUX et al., 2018). Até hoje, nenhum estudo avaliou cuidadosamente a relação entre contagem de espermatozoides e o tamanho do indivíduo no contexto da contaminação ambiental.

A viabilidade dos espermatozoides é relacionada à habilidade dessas células de sobreviver por tempo suficiente para fertilizar o óvulo (HOLMAN, 2009). Normalmente, a viabilidade é avaliada com uma combinação de dois corantes fluorescentes, o SYBR-14, que

cora as células vivas em verde, e o iodeto de propídeo, que cora as células mortas em vermelho, sendo a suspensão celular observada em citômetro de fluxo ou microscópio de fluorescência (LEWIS; FORD, 2012). Este é um método rápido e já utilizado há mais de 50 anos em estudos de reprodução e fertilidade de humanos e animais domésticos, porém apenas na última década começou a ser mais utilizado em estudos de ecologia (HOLMAN, 2009). HOLMAN (2009) e GRESS; KELLY (2011) recomendaram sempre associar a viabilidade com o número de espermatozóides para evitar resultados espúrios, já que a técnica em si poderia matar algumas células e, conseqüentemente, reduzir a viabilidade da amostra. Segundo esses autores, uma correlação não linear positiva entre a contagem e a viabilidade dos espermatozóides é normalmente associada a problemas na técnica, então, em casos como esse, a contagem dos espermatozóides deveria ser utilizada como covariável nas análises estatísticas da viabilidade.

Os crustáceos, especialmente os anfípodes, são candidatos ideais como organismos modelo, sendo usados com sucesso na ecotoxicologia por décadas, devido ao seu curto ciclo de vida e capacidade de serem mantidos e se reproduzirem em laboratório (PODLESÍNSKA; DAŁBROWSKA, 2019). Eles são componentes essenciais do ecossistema aquático, porque ocupam diversos níveis tróficos e servem de alimento para peixes e aves (GLAZIER, 2014). *Echinogammarus marinus* é uma das espécies de anfípodes mais abundantes em comunidades costeiras no noroeste do Oceano Atlântico e vivem principalmente associados a assembléias de macroalgas *Fucus* spp (MARTINS; LEITE; CONSTANTINO, 2014). Essa espécie possui uma grande importância na estrutura e funcionamento das comunidades do entremarés, como um predador ativo de outros invertebrados e como uma importante presa para aves pernaltas (MARTINS; LEITE; CONSTANTINO, 2014). *E. marinus* também são potenciais organismos modelos em diversos campos de estudo, como ecologia (MARANHÃO et al., 2001), reprodução (FORD et al., 2003a) e ecotoxicologia (BOSSUS et al., 2014; VANNUCI-SILVA et al., 2019; YANG; KILLE; FORD, 2008).

Observações em anfípodes gamarídeos de zonas temperadas mostram que as fêmeas normalmente produzem diversas ninhadas seguidas nos meses mais quentes (HYNE, 2011). A densidade populacional de *E. marinus* possui uma clara variação sazonal, com picos durante o verão, no sul da Inglaterra (GULER, 2012), Portugal (MARANHÃO et al., 2001) e sudoeste da Holanda (VLASBLOM, 1969), o que pode ser justificado pelo fato de variáveis ambientais, especialmente a temperatura, impactarem o processo reprodutivo dos anfípodes (MARANHÃO et al., 2001). A atividade sexual e o recrutamento das populações do sul da Inglaterra e de Portugal acontecem durante todo o ano, porém, em Portugal, o recrutamento é

mínimo no final do inverno (GULER, 2012; MARANHÃO et al., 2001). Informações sobre os efeitos que contaminantes podem causar na reprodução de anfípodas machos ainda é limitada (LEWIS; FORD, 2012; YANG; KILLE; FORD, 2008). Reduções na contagem de espermatozoides foram observadas após a exposição em laboratório aos seguintes contaminantes: acetato de ciproterona (GISMONDI; FIVET; JOAQUIM-JUSTO, 2017), metoxifeno, piriproxifeno e cádmio (TRAPP et al., 2014). Em estudos de campo na Escócia, anfípodas coletados em região industrializada apresentaram uma redução significativa de 20% dos espermatozoides comparados com anfípodas coletados em regiões de referência (YANG; KILLE; FORD, 2008). Estudos avaliando a viabilidade dos espermatozoides são ainda mais raros, apesar de uma redução da viabilidade ter sido observada após exposição dos anfípodas à radiação ionizante (FULLER; SMITH; FORD, 2019). Baixas contagens e viabilidade de espermatozoides foram relacionadas com uma menor fertilização de óvulos e ninhadas com menor sucesso (DUNN et al., 2006; FULLER; SMITH; FORD, 2019), o que indica um impacto potencial que reduções na qualidade dos espermatozoides podem causar nos níveis populacionais. Estudos de modelagem indicaram que a redução dos espermatozoides abaixo de certos níveis podem gerar impacto nos níveis populacionais (FORD; MARTINS; DUNN, 2012).

O objetivo deste estudo foi comparar as relações entre as contagens de espermatozoides e o peso dos indivíduos, e contagem e viabilidade dos espermatozoides de *E. marinus* coletados no Reino Unido, utilizando dados já publicados e dados prévios ainda não publicados. Devido a uma observação não esperada em anfípodas de uma área protegida no sul da Inglaterra (Langstone Harbour), os conjuntos de dados de uma década dessa região foram comparados para descobrir a significância temporal dessa observação. Para complementar as informações dessa região, dados de número de ovos/embriões de fêmeas foram comparados com resultados da literatura.

2 Metodologia

2.1 Coleta

Os anfípodas *E. marinus* foram manualmente coletados em assembleias de algas na zona entremarés de cinco regiões distintas do Reino Unido (Figura 1). Na Escócia, eles foram coletados em um local industrialmente contaminado (Inverkeithing: 56,025637; -3,385377) e dois locais de referência (Loch Fleet: 57,933809; -4,010696 e Thurso: 58,597759; -3,512685). Na Inglaterra, os organismos foram coletados em Portsmouth Harbour (Tipner: 50,827035; -1,095151) e Langstone Harbour (50,789624; -1,042419). As coletas foram realizadas em

diferentes épocas e estações (Tabela 1). Inverkeithing é caracterizado por altos níveis de PCBs, metais pesados e fibras de papel no sedimento, é uma baía semifechada próxima a uma área de desmonte de navios e uma fábrica de papel (SEPA, 2000). Loch Fleet e Thurso são classificados como Classe A (excelente), segundo o esquema de classificação da qualidade da água costeira. Tipner possui elevadas concentrações de TBT e Irgarol 1051 (ambos agentes anti-incrustantes), devido à pintura de barcos que ocorre há muito tempo na região (ZHOU, 2008). Langstone Harbour teve a qualidade da água classificada como excelente pelo Havant Borough Council durante todos os períodos de coleta, porém essa região possui um legado de contaminantes, como TBT e outros biocidas (COLE et al., 2018), e também recebe descargas regulares de esgoto como águas de transbordamento pluviais em períodos de chuva forte (LANGSTONE HARBOUR BOARD, 2020). Segundo um relatório da Agência Ambiental do Reino Unido, Langstone Harbour é considerada uma área eutrófica desde 1994, mas com uma melhora na classificação da qualidade da água nos censos de 2009, 2011 e 2014, apesar de a cobertura de microalgas oportunistas na área entremarés ainda estar acima do recomendado (ENVIRONMENTAL AGENCY, 2016). As concentrações de nitrogênio são consideradas boas e o nível de oxigênio dissolvido na coluna d'água é alto, porém a qualidade geral do corpo d'água é moderada e a qualidade da água foi reprovada em critérios químicos em 2013, 2014 e 2019 devido a presença de substâncias perigosas prioritárias, como mercúrio e ésteres difenílicos polibromados (PBDE) (ENVIRONMENTAL AGENCY, 2021). Grupos de organismos de Thurso (Thurso/Lab 1 e Thurso/Lab 2) e Langstone Harbour (Langstone Harbour/Lab) foram mantidos em laboratório por um período determinado (Tabela 1) para comparação com os de campo. É esperado que esse período de aclimatação no laboratório longe das fêmeas seria capaz de restaurar os espermatozóides, aumentando sua quantidade.

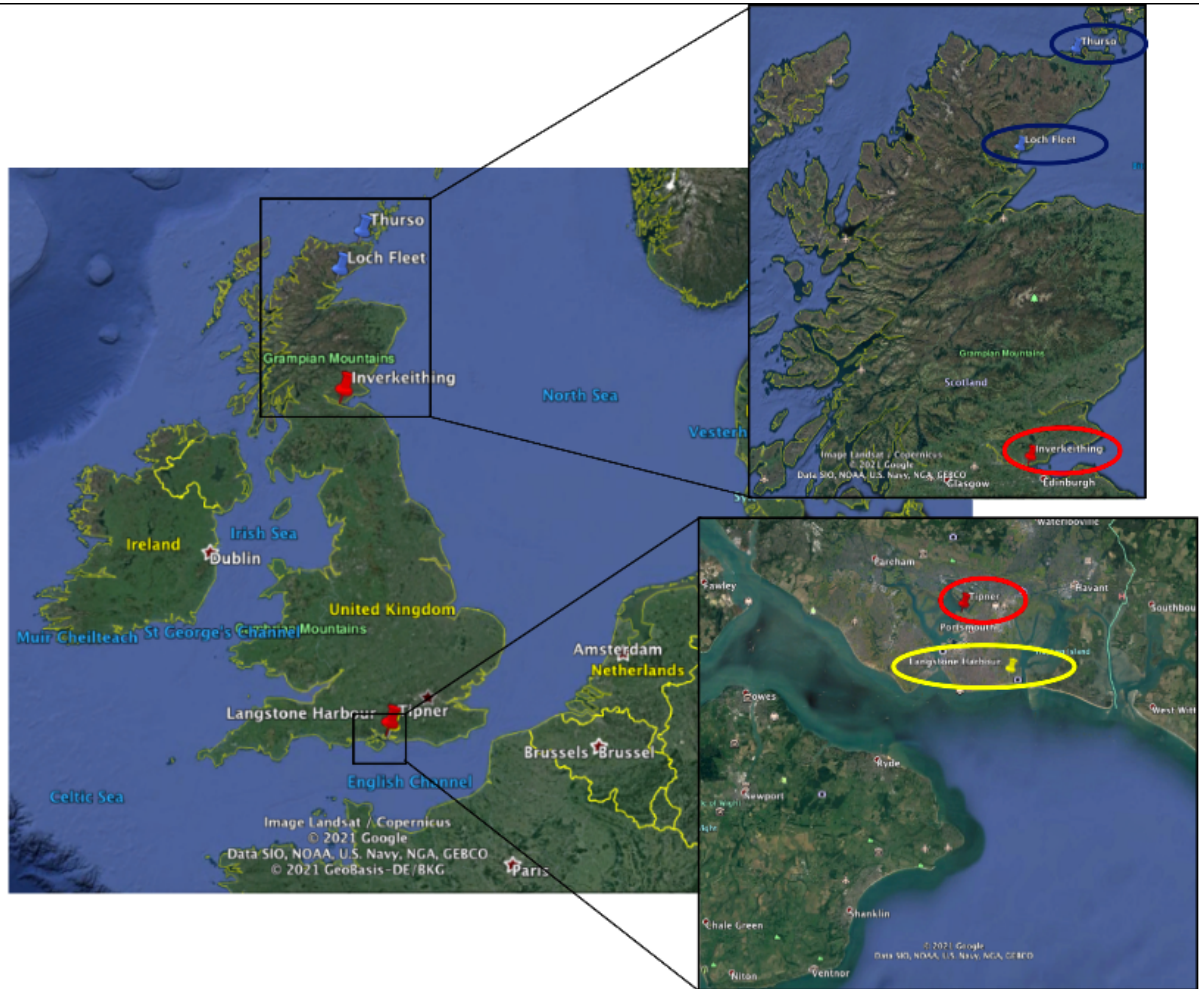


Figura 1: Mapa dos locais de coleta de *Echinogammarus marinus* utilizados neste estudo.

No laboratório, os indivíduos foram classificados quanto ao sexo, utilizando um esteromicroscópio. As principais diferenças observadas foram presença de papila genital e gnatópodes nos machos e diferente padrão de distribuição das cerdas no télson entre os dois sexos (fêmeas apresentam uma distribuição em tufo, enquanto os machos possuem uma distribuição homogênea) (KOHLENER, 2019). Também ao esteromicroscópio, os anfípodas foram visualmente inspecionados quanto à presença de parasitas (trematódeos). A amostragem dos espermatozoides de organismos de campo ocorreu logo após esse processo de inspeção, enquanto os de laboratório foram acondicionados em incubadora para posterior amostragem.

Tabela 1: Amostragens de *Echinogammarus marinus* utilizadas neste estudo.

Local	Data de coleta	Número amostral	Condição	Tempo mantido em laboratório (dias)	Análise	Anestésico	Meio para células
Loch Fleet	Abril/Maio de 2007	47	Campo	-	Contagem dos espermatozóides	Água do mar carbonatada	Água destilada
Thurso	Abril/Maio de 2007	58	Campo	-	Contagem dos espermatozóides	Água do mar carbonatada	Água destilada
Thurso/Lab 1	Abril/Maio de 2007	15	Laboratório	20	Contagem dos espermatozóides	Água do mar carbonatada	Água destilada
Thurso/Lab 2	Novembro de 2008	34	Laboratório	-	Contagem dos espermatozóides	Água do mar carbonatada	Água destilada
Inverkeithing	Abril/Maio de 2007	47	Campo	-	Contagem dos espermatozóides	Água do mar carbonatada	Água destilada
Tipner	Dezembro de 2009	30	Campo	-	Contagem dos espermatozóides	Água do mar carbonatada	Água destilada
Langstone Harbour	Outubro/Dezembro de 2009	58	Campo	-	Contagem dos espermatozóides	Água do mar carbonatada	Água destilada
Langstone Harbour/Lab	Março/Abril de 2012	11	Laboratório	14	Contagem dos espermatozóides	Água do mar carbonatada	PBS
Langstone Harbour/Lab	Outubro de 2015	20	Laboratório	28	Contagem e viabilidade dos espermatozóides	Óleo de cravo	Leibovitz L-15 and HEPES
Langstone Harbour/Lab	Novembro de 2016	21	Laboratório	28	Contagem e viabilidade dos espermatozóides	Óleo de cravo	Leibovitz L-15 and HEPES
Langstone Harbour/Lab	Junho de 2017	11	Laboratório	9	Contagem e viabilidade dos espermatozóides	Óleo de cravo	Leibovitz L-15 and HEPES
Langstone Harbour/Lab	Julho de 2017	10	Laboratório	33	Contagem e viabilidade dos espermatozóides	Óleo de cravo	Leibovitz L-15 and HEPES
Langstone Harbour/Lab	Outubro de 2017	6	Laboratório	9	Contagem e viabilidade dos espermatozóides	Óleo de cravo	Leibovitz L-15 and HEPES
Langstone Harbour/Lab	Novembro de 2017	7	Laboratório	33	Contagem e viabilidade dos espermatozóides	Óleo de cravo	Leibovitz L-15 and HEPES
Langstone Harbour	Outubro de 2020	116	Campo	-	Número de ovos	Óleo de cravo	-

2.2 Contagem e viabilidade dos espermatozóides

A contagem dos espermatozóides de anfípodes amostrados diretamente do campo coletados na Escócia (Thurso, Loch Fleet e Inverkeithing) já foram publicadas em YANG; KILLE; FORD (2008). Os métodos utilizados foram descritos em YANG; KILLE; FORD (2008) e FULLER; SMITH; FORD (2019). Os organismos foram anestesiados em água do

mar carbonatada ou óleo de cravo, conforme descrito na Tabela 1, e, em seguida, pesados em balança analítica. Depois, os indivíduos foram dissecados com o auxílio de pinças e tesouras finas, sendo primeiramente removida a cabeça e o trato digestório, em seguida foi feito um corte ventral que possibilita a abertura do organismo e visualização dos testículos. Os testículos foram retirados e dilacerados em uma lâmina côncava contendo água destilada, PBS ou meio Leibovitz L-15 e HEPES (preparado dissolvendo 23,8mg de HEPES em 10mL de Leibovitz L-15), conforme especificado na Tabela 1. Todo esse procedimento foi realizado ao esteromicroscópio. A suspensão celular resultante foi transferida para um *vial* com a mesma solução da lâmina e previamente pesado. Este *vial* foi novamente pesado para a quantificação do volume de suspensão celular para o cálculo da quantidade de espermatozóides da amostra, sendo assumido que a densidade da suspensão celular é a mesma da água 1g/mL. Os *vials* foram conservados no gelo até o término das disseções.

Para o ensaio de viabilidade celular, 5 μ L de solução de SYBR-14, preparada diluindo 5 μ L de solução estoque 1mM de SYBR[®]14 em 495 μ L de DMSO, foram adicionados a suspensão celular dos espermatozóides e o *vial* foi homogeneizado. Após 2min, 5 μ L de iodeto de propídeo 2,4mM foram adicionados ao *vial*, que foi homogeneizado. Após espera de 2min, a suspensão foi observada ao microscópio de fluorescência utilizando os filtros 340–480nm e 450–490nm para os corantes SYBR-14 e iodeto de propídeo, respectivamente. Células vivas foram identificadas pela coloração vermelha e células mortas foram identificadas pela coloração verde.

As suspensões celulares, coradas para viabilidade ou não, foram adicionadas a uma câmara de Neubauer para a contagem do número de espermatozóides. A contagem foi realizada em triplicatas técnicas para cada organismo. No caso do ensaio de viabilidade celular, foram contadas separadamente células vivas e mortas para o cálculo da viabilidade (% de espermatozóides vivos). A contagem dos espermatozóides dos diferentes organismos foi agrupada conforme a condição (amostrado diretamente do campo ou aclimatado em laboratório) e o local de coleta. Os dados foram transformados pela raiz quarta e também divididos pelo peso do organismo para facilitar a comparação entre os diferentes locais.

ANCOVA unilateral foi utilizada para comparar a contagem de espermatozóides dos diferentes locais, utilizando o peso como covariável. O teste de correlação de Pearson também foi aplicado para avaliar a correlação entre a contagem de espermatozóides e o peso dos organismos de cada local de coleta. Os dados de Langstone Harbor foram comparados separadamente utilizando ANCOVA unilateral para avaliar as contagens de espermatozóides nos diferentes anos de coleta, usando o peso do organismo como covariável. Outra ANCOVA

unilateral também foi empregada para avaliar as contagens de espermatozóides nos diferentes meses de coleta em 2009 e 2016, também utilizando o peso do organismo como covariável. A viabilidade dos espermatozóides foi avaliada com ANCOVA unilateral comparando os períodos de coleta, utilizando a contagem de espermatozóides como covariável. Para todos os testes estatísticos, os resíduos foram testados quanto à normalidade com o teste de Shapiro-Wilk. Os resíduos não tiveram uma distribuição normal apenas quando os dados de todos os locais foram agrupados; no entanto, ANCOVA é considerada um teste robusto em distribuições não normais (RHEINHEIMER; PENFIELD, 2001).

2.3 Número de ovos

Fêmeas coletadas em Langstone Harbour em 2020 ($n = 116$) foram anestesiadas em solução de óleo de cravo, pesadas e, em estereomicroscópio, os ovos foram removidos com o auxílio de uma pipeta fina de vidro. Os embriões foram contados e classificados conforme seu estágio como descrito em SHEADER; CHIA (1970). Os estágios embrionários foram agrupados como iniciais (estágios 1 a 3) e avançados (estágios 4 e 5), como recomendado por FORD et al. (2003a), para facilitar a comparação com a literatura. Todos os embriões foram classificados em até dois dias após a coleta para evitar desenvolvimento dos mesmos em condições de laboratório. O número de ovos foi normalizado pelo peso individual.

3 Resultados

A contagem dos espermatozóides e a relação entre esta e o peso dos organismos foi comparada entre anfípodas coletados em diferentes locais do Reino Unido (Figura 2A). Diferenças significativas foram detectadas entre os diferentes locais e a covariável peso dos organismos também foi significativa (ANCOVA, $F = 32,992$, $DFn = 7$, $DFd = 366$, $p = 1,75 \times 10^{-35}$ and $F = 55,758$, $DFn = 1$, $DFd = 366$, $p = 6,06 \times 10^{-13}$, respectivamente), indicando uma forte relação entre as duas variáveis. Uma análise de multi-comparação (método de Bonferroni) separou os diferentes locais em três grupos significativamente diferentes baseado na contagem de espermatozóides. O primeiro grupo, com contagens de espermatozóides significativamente menores, incluiu Inverkeithing, Tipner, duas áreas de desmanche de navios consideradas industrialmente poluídas, e, estranhamente, Langstone Harbour, área de conservação ambiental (organismos do campo e mantidos em laboratório). O segundo grupo, com contagens de espermatozóides intermediárias, foi composto por Loch Fleet e Thurso, locais considerados como de referência na Escócia. Já o terceiro grupo apresentou uma contagem de espermatozóides significativamente maior e incluiu os grupos de anfípodas

mantidos no laboratório que foram coletados em Thurso. A contagem de espermatozóides dividida pelo peso individual diminuiu 70% ao comparar anfípodes de campo de Langstone Harbour em relação a Thurso (Figura 3). Comparando organismos dessas localidades, mas mantidos no laboratório, essa diminuição foi entre 67 e 74% (Figura 3).

Anfípodes coletados em Langstone Harbour, amostrados diretamente do campo e mantidos em laboratório por um período, não apresentaram uma clara relação entre a contagem de espermatozóides e o peso dos organismos (Figura 2A), porém os outros locais de coleta apresentaram uma correlação positiva e significativa entre essas duas variáveis, indicando que machos maiores apresentam maiores contagens de espermatozóides (Tabela 2). Além de anfípodes de Langstone Harbour, apenas Thurso/Lab 1 não apresentou uma correlação significativa entre as duas variáveis, mas isso pode ser explicado pelo pequeno número amostral desse grupo ($n = 15$) comparado com os outros locais (Loch Fleet $n = 47$, Thurso $n = 58$, Inverkeithing $n = 47$, Langstone Harbour $n = 58$, Langstone Harbour/Lab $n = 84$, Tipner $n = 30$, Thurso/Lab 2 $n = 34$).

A contagem de espermatozóides nos diferentes períodos de coleta de anfípodes em Langstone Harbour foi comparada para avaliar a significância temporal dessas observações (Figura 2B). Foram observadas diferenças significativas entre os diferentes anos de coleta (ANCOVA, $F = 4,273$, $DFn = 1$, $DFd = 141$, $p = 0,041$), porém o peso dos organismos não foi uma covariável significativa (ANCOVA, $F = 3,739$, $DFn = 1$, $DFd = 141$, $p = 0,055$). Os diferentes anos de coleta foram separados em 3 grupos estaticamente diferentes entre si: o primeiro grupo, com as menores contagens de espermatozóides, incluiu os anos de 2009 e 2015; o segundo grupo foi composto apenas por 2012, que apresentou a maior contagem de espermatozóides, apesar de esses valores ainda serem inferiores aos de anfípodes coletados em locais de referência na Escócia; e o terceiro grupo, com valores intermediários da contagem de espermatozóides, inclui os anos de 2016 e 2017.

Tabela 2: Correlação de Pearson analisando a contagem de espermatozoides e o peso de *Echinogammarus marinus* coletados em diferentes localidades do Reino Unido.

Local de coleta	Correlação de Pearson		
	t.test	df	p
Loch Fleet	5,3115	45	$3,24 \times 10^{-6}$
Thurso	4,3325	56	$6,18 \times 10^{-5}$
Inverkeithing	5,5274	45	$1,56 \times 10^{-6}$
Thurso/Lab. 1	0,72724	13	0,48
Thurso/Lab. 2	4,6323	32	$5,77 \times 10^{-5}$
Tipner	4,2062	28	0,000241
Langstone Harbour	-0,75066	56	0,456
Langstone Harbour/Lab.	0,96308	84	0,3383

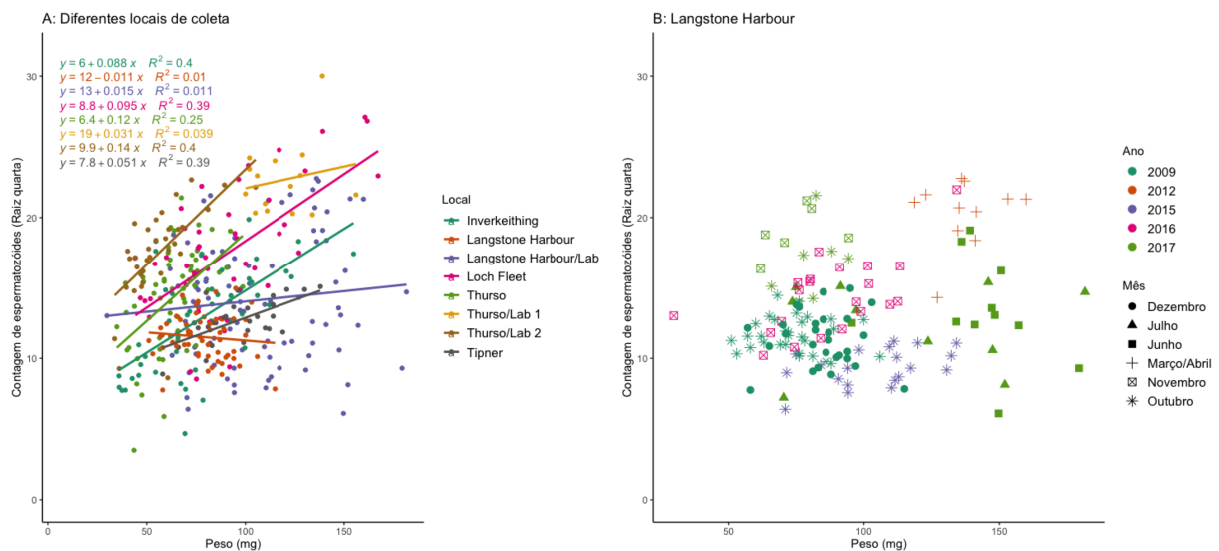


Figura 2: Relação entre a contagem dos espermatozoides e o peso de *Echinogammarus marinus*: A: coletados em diferentes regiões do Reino Unido (para os resultados da correlação de Pearson ver Tabela 3); B: coletados em Langstone Harbour em diferentes períodos, sendo anfípodes de 2009 amostrados diretamente do campo e anfípodes coletados em 2012, 2015, 2016 e 2017 mantidos em laboratório por um período de tempo (informações sobre o tempo disponíveis na Tabela 1).

O período do ano em que a coleta foi realizada pareceu interferir na contagem dos espermatozoides (Figura 2B). Por esse motivo, foi realizada uma comparação entre os meses e a contagem dos espermatozoides dos anos 2009 e 2017, já que estes anos possuíam uma quantidade de dados suficientes em diferentes meses para a comparação. Em 2009, a

covariável peso dos organismos não apresentou significância estatística (ANCOVA, $F = 0,237$, $DFn = 1$, $DFd = 55$, $p = 0,628$) e os meses comparados (outubro e dezembro) apresentaram contagens de espermatozóides similares sem diferença estatística (ANCOVA, $F = 0,245$, $DFn = 1$, $DFd = 55$, $p = 0,622$). Em 2017, o peso também não foi uma covariável significativa estatisticamente (ANCOVA, $F = 0,069$, $DFn = 1$, $DFd = 29$, $p = 0,794$), porém houve diferença estatística entre os diferentes meses (ANCOVA, $F = 3,464$, $DFn = 3$, $DFd = 29$, $p = 0,029$). Em novembro, os anfípodes apresentaram contagem de espermatozóides significativamente maior do que os coletados em julho. Não houve diferença estatística entre os outros meses de coleta (junho e outubro).

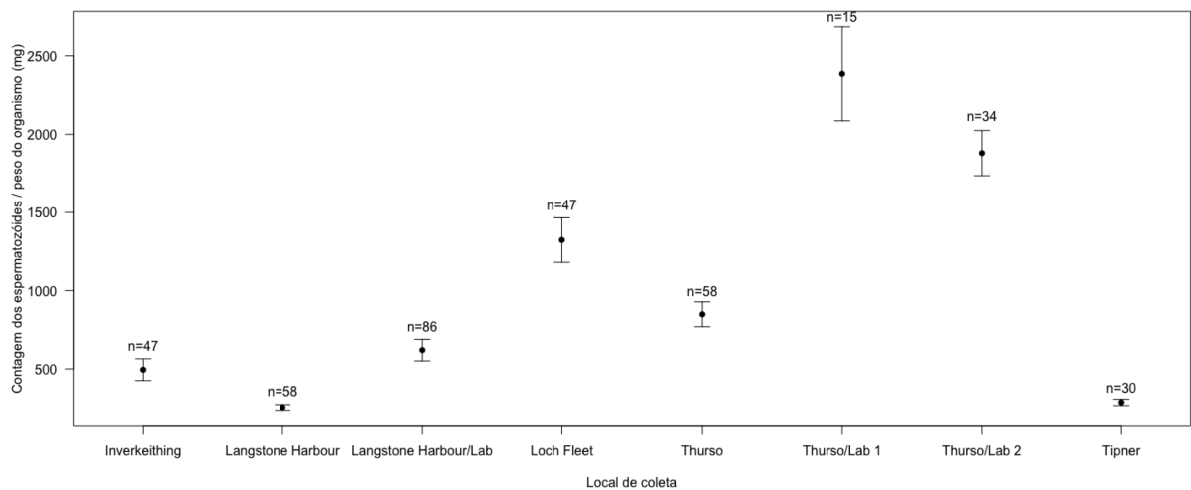


Figura 3: Média \pm erro padrão de contagem de espermatozóides dividida pelo peso do organismo de *Echinogammarus marinus* coletados em diferentes locais do Reino Unido. Grupos com adição do termo “Lab” ao nome foram mantidos em laboratório por um período (para maiores informações sobre o período de manutenção no laboratório consultar Tabela 1).

A viabilidade dos espermatozóides foi analisada apenas em anfípodes coletados em Langstone Harbour em 2015, 2016 e 2017 (Figura 4). Foi observada uma redução significativa da viabilidade dos espermatozóides em 2017 comparada à observada em 2015 e 2016 (ANCOVA, $F = 65,372$, $DFn = 1$, $DFd = 71$, $p < 0,05$). A covariável contagem de espermatozóides não foi significativa na análise (ANCOVA, $F = 3,969$, $DFn = 1$, $DFd = 71$, $p > 0,05$). É interessante destacar que, em 2015 e 2016, os espermatozóides apresentaram viabilidade alta, mesmo quando a contagem dos mesmos foi baixa (Figura 4).

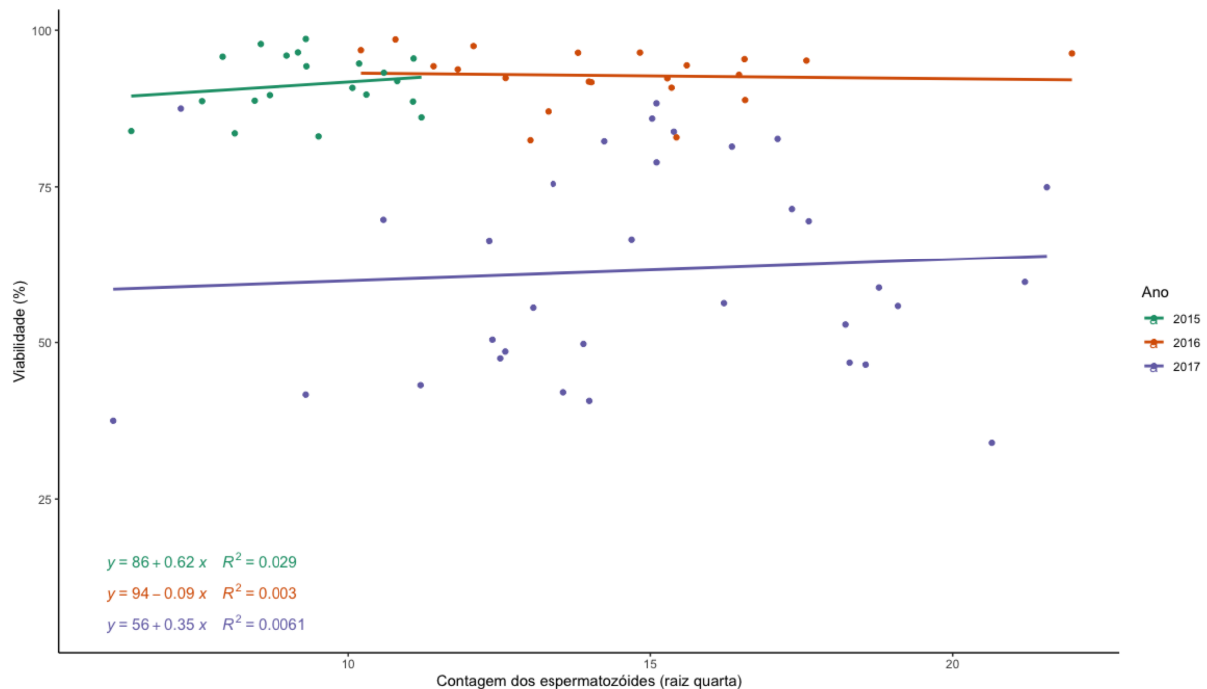


Figura 4: Relação entre a viabilidade e a contagem de espermatozoides de anfípodes *Echinogammarus marinus* coletados em Langstone Harbour, Inglaterra, em diferentes períodos.

Anfípodes coletados em Langstone Harbour apresentaram em média 18,55, 14,77 e 17,04 ovos em estágios iniciais, avançados e totais (soma de ambos os estágios). Foram encontrados, em média, 6,15 juvenis que já haviam eclodido do ovo, mas permaneciam no marsúpio da fêmea (Tabela 3). Também foi calculado o número de ovos dividido pelo peso da fêmea, para facilitar a comparação com a literatura; nesse caso os valores encontrados foram 0,39, 0,28, 0,35 e 0,13 para ovos em estágios iniciais, avançados, totais e juvenis que eclodiram do ovo e permaneceram no marsúpio, respectivamente (Tabela 3).

Tabela 3: Número de ovos de *Echinogammarus marinus* coletados em Langstone Harbour.

Estágio	Número de ovos		Número de ovos / peso da fêmea		Volume do ovo Média
	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão	
Inicial	18,55	7,98	0,39	0,21	21,45
Avançado	14,77	5,98	0,28	0,10	9,39
Total (inicial + avançado)	17,04	7,42	0,35	0,18	18,58
Juvenis eclodidos que permaneceram no marsúpio	6,15	5,61	0,13	0,12	-

4 Discussão

Neste estudo, foi avaliada a contagem de espermatozóides de anfípodas marinhas *E. marinus* coletados em diferentes regiões da Escócia e Inglaterra, incluindo locais de referência e locais considerados poluídos. Também foi analisada a relação entre a contagem de espermatozóides e o peso individual, e entre a viabilidade e a contagem dos espermatozóides, já que essas relações ainda são pouco exploradas na literatura e o conhecimento sobre elas é limitado.

Uma correlação positiva e significativa foi encontrada em todos os locais de coleta e organismos mantidos em laboratório, com exceção dos grupos de Langstone Harbour e Thurso/Lab 1. Os locais mais contaminados (Inverkeithing e Tipner) apresentaram as contagens de espermatozóides mais baixas. No entanto, também foram observados em anfípodas de Langstone Harbour valores baixos similares aos de regiões contaminadas, apesar de ser uma área com diversos status de proteção nacional e internacional. Conforme esperado, os organismos mantidos em laboratório apresentaram uma contagem de espermatozóides mais alta do que os amostrados diretamente do campo, devido ao período de abstinência sem as fêmeas. É importante destacar que em Langstone Harbour não foi observada uma relação entre a contagem de espermatozóides e o peso dos organismos independente do ano ou mês de coleta, o que acreditamos ser incomum, já que houve uma correlação positiva e significativa em todos os outros locais de coleta. Embora não se possa descartar que a falta dessa relação e a baixa contagem de espermatozóides em *E. marinus* de Langstone Harbor possam estar relacionadas a fatores ecológicos, como uma população mais ativamente reprodutiva ou diferenças genéticas entre diferentes populações, propomos que essas características observadas devem estar relacionadas a variáveis físico-químicas. A comparação entre os locais de coleta corrobora com essa hipótese, uma vez que anfípodas de Langstone Harbor amostrados em campo e mantidos em laboratório (ou seja, separados das fêmeas) tinham contagens de espermatozóides semelhantes a locais conhecidos como contaminados (Inverkeithing e Tipner) e significativamente mais baixas que os de locais de referência na Escócia. O número de ovos de fêmeas coletadas em Langstone Harbor também foi baixo em comparação aos de locais de referência e semelhantes aos registrados anteriormente em local contaminado, Inverkeithing (FORD et al., 2003b).

Organismos coletados em Tipner, no sul da Inglaterra, também apresentaram baixa contagem de espermatozóides, provavelmente devido a uma variedade de poluentes históricos dessa região, uma vez que este local tem um legado de contaminação devido à atividade náutica, principalmente pintura de barcos (ZHOU, 2008). Curiosamente, as duas regiões que

apresentaram baixas contagens de espermatozóides nesse estudo, Inverkeithing e Tipner, são estaleiros de desmonte de barcos. Anfípodos mantidos em laboratório da Inglaterra e da Escócia apresentaram contagens de espermatozóides aproximadamente 30% mais altas do que aquelas de anfípodos amostrados diretamente do campo de seus respectivos locais de coleta. Os organismos mantidos em laboratório permaneceram separados das fêmeas, para que tivessem tempo suficiente para restaurar seus níveis de espermatozóides, o que pode explicar as contagens mais altas. Os anfípodos normalmente levam de 6 a 12 dias para repor os espermatozóides (COUCHOUX et al., 2018; LEMAÎTRE et al., 2009).

Langstone Harbour é protegida pelo governo britânico, sendo considerada uma área de interesse científico especial (SSSI) e uma área especial de conservação (SAC). Além disso, possui status de importância para observação de aves atribuído pela Convenção Internacional de Importância das Áreas Alagadas em Ramsar (BAILY et al., 2002). Sua área inclui as conurbações de Portsmouth, Havant e Hayling Island; a bacia hidrográfica superior é principalmente constituída de terra arável, com áreas de floresta, terras agrícolas e cultivadas, e a bacia hidrográfica inferior é significativamente mais urbanizada, com áreas industriais e comerciais (ENVIRONMENTAL AGENCY, 2016). Langstone Harbour possui um legado de poluentes históricos, como TBT e outros biocidas (COLE et al., 2018), devido à pintura de barcos com tintas anti-incrustantes (EL-SHENAWY et al., 2010), e, atualmente, ainda recebe descargas frequentes de uma mistura de água de chuva com esgoto não tratado em períodos de precipitações intensas (LANGSTONE HARBOUR BOARD, 2020). Efluentes de esgoto são normalmente considerados os responsáveis pelo excesso de compostos nitrogenados e fosfatados nas áreas costeiras (TAYLOR, 1999); essa condição pode levar a *blooms* de algas ou surgimento de tapetes de macroalgas, impactando o oxigênio disponível e, conseqüentemente, os organismos locais (BAILY et al., 2002; MAIER et al., 2009; TAYLOR, 1999). Condições eutróficas em Langstone Harbour já eram observadas em 1981 (MONTGOMERY; SOULSBY, 1981) e desde então essa área recebeu várias classificações alertando quanto aos altos níveis de nutrientes (LEAF; CHATTERJEE, 1999; MAIER et al., 2009). Censos de 2009, 2011 e 2014 indicaram uma melhora na classificação da água da região e uma diminuição na cobertura de macroalgas oportunistas da zona entremarés, porém, de forma geral, os dados ainda mostravam uma alta concentração de nutrientes especialmente no inverno (ENVIRONMENTAL AGENCY, 2016). Além disso, há a possibilidade de a região também ser impactada por material lixiviado de aterros antigos. O local onde foi realizada a coleta de *E. marinus* está situado próximo a um antigo aterro de descartes navais que contém amianto e metais pesados, como chumbo, mercúrio, zinco e cádmio (WALTON;

HIGGINS, 1998). Essa região atualmente é uma marina de barcos e os possíveis impactos desse aterro na região costeira ainda são desconhecidos. Entre 2013 e 2019, a avaliação geral do corpo d'água de Langstone Harbour foi classificada como moderada e a qualidade da água foi reprovada em aspectos químicos em 2013, 2014 e 2019, devido à presença de substâncias perigosas prioritárias, como éteres difenílicos polibromados (PBDE) e mercúrio (ENVIRONMENTAL AGENCY, 2021). Portanto, organismos de Langstone Harbour estão expostos durante todos seus estágios de vida a diferentes compostos químicos.

Essas condições podem indicar uma possível causa para as baixas contagens de espermatozóides e ovos, similares às de Inverkeithing e Tipner, e a ausência de uma relação entre a contagem de espermatozóides e o peso do organismo, embora essa ausência de relação não tenha sido observada nos outros locais. Em espécies aquáticas, foi demonstrado que uma variedade de contaminantes afetam adversamente a contagem ou a viabilidade dos espermatozóides. Em anfípodas, diminuições na contagem de espermatozóides foram observadas após exposições a pesticidas e metais em estudos de laboratório (TRAPP et al., 2014; GISMONDI; FIVET; JOAQUIM-JUSTO, 2017). Portanto, seria difícil identificar um estressor específico neste estágio ou descartar outros fatores ecológicos neste estágio. O camarão (*Machobrachium nipponense*) exposto à hipóxia mostrou diminuição significativa do peso testicular e integridade da membrana do espermatozóide e um aumento significativo da taxa de apoptose em espermátides (SUN; CHEN; HU, 2020). Carpas (*Cyprinus carpio*) expostas a altas concentrações de nitrito e nitrato apresentaram uma diminuição significativa da motilidade dos espermatozóides (EPLER et al., 2000) e contagens de espermatozóides mais baixas quando cultivadas em tanques eutróficos (BIENIARZ et al., 1996). Peixes-mosquito (*Gambusia holbrooki*) apresentaram redução na contagem de espermatozóides com o aumento da concentração de nitrato, o que foi relacionado ao aumento da apoptose dos espermatozóides em diferentes estágios de desenvolvimento devido à potencial conversão, *in vivo*, de nitrato em nitrito e, posteriormente, em óxido nítrico (EDWARDS; GUILLETTE, 2007).

Os dados obtidos neste trabalho também demonstraram variabilidade sazonal nas contagens de espermatozóides em Langstone Harbour. Anfípodas coletados em julho apresentaram contagens de espermatozóides significativamente menores do que os coletados em novembro, indicando que os meses de coleta devem ser levados em consideração para monitoramentos futuros. Essa variabilidade entre os diferentes meses provavelmente está relacionada a períodos de reprodução mais ativos. Anfípodas gamarídeos de zonas temperadas normalmente produzem sucessivas ninhadas durante os meses mais quentes (HYNE, 2011),

portanto, é esperado que machos coletados durante o verão apresentem contagens de espermatozoides menores do que aqueles coletados durante o inverno, devido ao aumento do uso dos espermatozoides para a reprodução. Além disso, na população de *E. marinus* de Langstone Harbour há um predomínio de machos de agosto a novembro e um domínio de fêmeas de abril a julho. GULER et al. (2012) demonstraram que o fotoperíodo influencia na determinação do sexo dessa espécie em condições de laboratório, havendo maior número de machos em ninhadas produzidas em fotoperíodos com dias mais longos e de fêmeas em ninhadas produzidas em dias mais curtos. Portanto, com menos machos em julho, é possível que eles tivessem menos tempo disponível para reestabelecer os níveis de espermatozoides comparados aos de novembro, quando a quantidade de machos na população é maior do que a de fêmeas. Em outros crustáceos, como o caranguejos-ferradura, também houve influência da estação do ano na concentração de espermatozoides; nestes, as concentrações na primavera foram mais elevadas do que no outono (SASSON; JOHNSON; BROCKMANN, 2012).

A viabilidade dos espermatozoides também é muito importante para o processo reprodutivo, uma vez que os espermatozoides precisam estar viáveis para fertilizar os ovos (GALLO; BONI; TOSTI, 2018). A viabilidade dessas células é bastante utilizada em estudos com mamíferos, porém não muito comum em trabalhos com invertebrados marinhos (LEWIS; FORD, 2012). Uma relação entre a viabilidade dos espermatozoides e o número de ovos, já foi observada em *E. marinus*, indicando que espermatozoides com baixa viabilidade podem reduzir a fertilidade das fêmeas (FULLER; SMITH; FORD, 2019). Em anfípodes coletados em Langstone Harbour, não foi observada uma relação entre a contagem e a viabilidade dos espermatozoides e a viabilidade dos espermatozoides pareceu ser relativamente alta, apesar de variável ao longo dos anos. Mais estudos avaliando a variabilidade desse parâmetro em diferentes locais seriam úteis para compreender e estabelecer o que seria considerado um nível basal adequado para a viabilidade dos espermatozoides.

A contagem e viabilidade dos espermatozoides são marcadores relevantes para avaliar os impactos que os machos podem causar na reprodução. Uma redução na contagem de espermatozoides já foi associado a um decréscimo na produção de ovos e na viabilidade dos embriões (LEMAÎTRE et al., 2009). A viabilidade dos espermatozoides também foi associada a uma menor produção de ovos pelas fêmeas (FULLER; SMITH; FORD, 2019). Além disso, as previsões de um modelo com anfípodes indicam que um menor número de espermatozoides é capaz de reduzir as ninhadas produzidas, impactando tamanho da população e, conseqüentemente com o tempo, levando ao colapso da mesma (FORD; MARTINS; DUNN, 2012). Os anfípodes coletados em Langstone Harbor e mantidos em

laboratório por um período de tempo não foram capazes de atingir contagens de espermatozóides similares aos de locais de referência. A baixa contagem de espermatozóides e o número de ovos de *E. marinus* coletados em Langstone Harbor devem ser monitorados, pois a longo prazo podem afetar as densidades e o vigor geral dessa população. Se este for o caso, é provável que os impactos sejam repassados para aves pernaltas e vida marinha, já que os anfípodas são uma importante fonte de alimento para a comunidade do entre-marés (MARTINS; LEITE; CONSTANTINO, 2014). Em Langstone Harbor, a densidade populacional de *E. marinus* foi estimada entre 5,8 a 97 indivíduos/m² dependendo do mês de coleta (GULER, 2012). No entanto, em populações mais ao sul no estuário do Mondego (Portugal), a densidade populacional desta espécie é consideravelmente maior (100 a 600 indivíduos/m² dependendo na época de coleta) (MARANHÃO et al., 2001). Se as baixas contagens de espermatozóides e as baixas densidades populacionais estão atualmente associadas, não se sabe, mas esta é uma questão importante para uma investigação mais aprofundada. Embora os agentes causais para esses índices incomuns observados não tenham sido identificados, este estudo destacou a importância de avaliar a quantidade e qualidade dos espermatozóides no monitoramento ambiental.

Referências

- ARUNDELL, K. L.; WEDELL, N.; DUNN, A. M. Perceived risk of sperm competition affects sperm investment in a mate-guarding amphipod. **Animal Behaviour**, v. 87, p. 231–238, 2014.
- BAILY, B.; PEARSON, A.; COLLIER, P.; FONTANA, D. Mapping the intertidal vegetation of the harbours of southern England for water quality management. **Journal of Coastal Conservation**, v. 8, p. 77–86, 2002.
- BIENIARZ, K.; EPLER, P.; SOKOLOWSKA-MIKOLAJCZYK, M.; CHYB, J.; POPEK, W. Carp reproduction in highly eutrophic pond conditions. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 57, p. 842–848, 1996.
- BOSSUS, M. C.; GULER, Y. Z.; SHORT, S. J.; MORRISON, E. R. Behavioural and transcriptional changes in the amphipod *Echinogammarus marinus* exposed to two antidepressants, fluoxetine and sertraline. **Aquatic Toxicology**, v. 151, p. 46–56, 2014.
- COLE, R. F.; MILLS, G. A.; HALE, M. S.; PARKER, R.; BOLAM, T.; TEASDALE, P. R.; BENNETT, W. W.; FONES, G. R. Development and evaluation of a new diffusive gradients in thin-films technique for measuring organotin compounds in coastal sediment pore water. **Talanta**, v. 178, p. 670–678, 2018.
- COUCHOUX, C.; DECHAUME-MONCHARMONT, F. X.; RIGAUD, T.; BOLLACHE, L. Male *Gammarus roeseli* provide smaller ejaculates to females infected with vertically transmitted microsporidian parasites. **Animal Behaviour**, v. 137, p. 179–185, 2018.
- DUNN, A. M.; ANDREWS, T.; INGREY, H.; RILEY, J.; WEDELL, N. Strategic sperm allocation under parasitic sex-ratio distortion. **Biology Letters**, v. 2, n. 1, p. 78–80, 2006.
- EDWARDS, T. M.; GUILLETTE, L. J. Reproductive characteristics of male mosquitofish (*Gambusia holbrooki*) from nitrate-contaminated springs in Florida. **Aquatic Toxicology**, v. 85, p. 40–47, 2007.
- EL-SHENAWY, N.; NABIL, Z.; ABDEL-NABI, I.; GREENWOOD, R. Comparing the passive and active sampling devices with biomonitoring of pollutants in Langstone and Portsmouth Harbour, UK. **Journal of Environmental Science and Technology**, v. 3, n. 1, p. 1–17, 2010.
- ELWOOD, R. W.; DICK, J. T. A. The amorous *Gammarus*: the relationship between precopula duration and size-assortative mating in *G. pulex*. **Animal Behaviour**, v. 39, n. 5, p. 828–833, 1990.
- ENVIRONMENTAL AGENCY, U.K. **Nitrate vulnerable zone (NVZ) designation 2017 – Eutrophic Waters (Estuaries and Coastal Waters) - Portsmouth Harbour, Langstone Harour and Chichester Harbour**. 2016. Disponível em: <<http://apps.environment-agency.gov.uk/wiyby/141443.aspx>>.
- ENVIRONMENTAL AGENCY, U.K. **Catchment data explorer - Langstone Harbour**. 2021. Disponível em:

<<https://defra-cde-beta.publishmydata.com/catchment-planning/WaterBody/GB580705130000>>.

EPLER, P.; CHYB, J.; KIME, D. E.; SOKOLOWSKA-MIKOLAJCZYK, M. The effects of nitrites (NO_2^-) and nitrates (NO_3^-) on sperm motility of common carp *in vitro*. **Archives of Polish Fisheries**, v. 8, p. 15–24, 2000.

FORD, A. T.; FERNANDES, T. F.; RIDER, S. A.; READ, P. A.; ROBINSON, C. D.; DAVIES, I. M. Reproduction in the amphipod, *Echinogammarus marinus*: A comparison between normal and intersex specimens. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, v. 83, n. 5, p. 937–940, 2003a.

FORD, A. T.; FERNANDES, T. F.; RIDER, S. A.; READ, P. A.; ROBINSON, C. D.; DAVIES, I. M. Measuring sublethal impacts of pollution on reproductive output of marine Crustacea. **Marine Ecology Progress Series**, v. 265, p. 303–309, 2003b.

FORD, A. T.; MARTINS, I.; DUNN, A. M. Insights into sperm-fertilisation relationships in the Arthropoda with ecological significance modelled in an amphipod. **Invertebrate Reproduction & Development**, v. 56, n. 1, p. 50–56, 2012.

FULLER, N.; SMITH, J. T.; FORD, A. T. Impacts of ionising radiation on sperm quality, DNA integrity and post-fertilisation development in marine and freshwater crustaceans. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 186, p. 109764, 2019.

GALIPAUD, M.; GAUTHEY, Z.; BOLLACHE, L. Pairing success and sperm reserve of male *Gammarus pulex* infected by *Cyathocephalus truncatus* (Cestoda: Spathebothriidea). **Parasitology**, v. 138, n. 11, p. 1429–1435, 2011.

GALLO, A.; BONI, R.; TOSTI, E. Sperm viability assessment in marine invertebrates by fluorescent staining and spectrofluorimetry: A promising tool for assessing marine pollution impact. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 147, p. 407–412, 2018.

GISMONDI, E.; FIVET, A.; JOAQUIM-JUSTO, C. Effects of cyproterone acetate and vertically transmitted microsporidia parasite on *Gammarus pulex* sperm production. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, n. 29, p. 23417–23421, 2017.

GLAZIER, D. S. Amphipoda. In: ELIAS, S. A. (Ed.). **Reference Module in Earth Systems and Environmental Sciences**. Elsevier, 2014. p. 1–49.

GRESS, B. E.; KELLY, C. D. Is sperm viability independent of ejaculate size in the house cricket (*Acheta domestica*)? **Canadian Journal of Zoology**, v. 89, n. 12, p. 1231–1236, 2011.

GULER, Y.; SHORT, S.; KILE, P.; FORD, A. T. Integrating field and laboratory evidence for environmental sex determination in the amphipod, *Echinogammarus marinus*. **Marine Biology**, v. 159, n. 12, p. 2885–2890, 2012.

GULER, Y. Z. **Population dynamics and sex-determining mechanisms in the marine amphipod, *Echinogammarus marinus***. 2012. University of Portsmouth, 2012.

- HARLIOĞLU, M. M.; FARHADI, A.; GÜR, S. Determination of sperm quality in decapod crustaceans. **Aquaculture**, v. 490, p. 185–193, 2018.
- HOLMAN, L. Sperm viability staining in ecology and evolution: potential pitfalls. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, v. 63, n. 11, p. 1679–1688, 2009.
- HYNE, R. V. Review of the reproductive biology of amphipods and their endocrine regulation: identification of mechanistic pathways for reproductive toxicants. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 30, n. 12, p. 2647–2657, 2011.
- KOHLER, S. **Using advanced techniques for the development of behavioural assays in ecotoxicology: Assessing the impacts of psychotropic compounds on crustacean behaviour**. 2019. University of Portsmouth, 2019.
- LANGSTONE HARBOUR BOARD. **Water Quality**. 2020. Disponível em: <<https://www.langstoneharbour.org.uk/water-quality>>
- LEAF, S. S.; CHATTERJEE, R. Developing a strategy on eutrophication. **Water Science and Technology**, v. 39, n. 12, p. 307–314, 1999.
- LEMAÎTRE, J.-F.; RIGAUD, T.; CORNET, S.; BOLLACHE, L. Sperm depletion, male mating behaviour and reproductive ‘time-out’ in *Gammarus pulex* (Crustacea, Amphipoda). **Animal Behaviour**, v. 77, n. 1, p. 49–54, 2009.
- LEWIS, C.; FORD, A. T. Infertility in male aquatic invertebrates: a review. **Aquatic Toxicology**, v. 120–121, p. 79–89, 2012.
- MAIER, G.; NIMMO-SMITH, R. J.; GLEGG, G. A.; TAPPIN, A. D.; WORSFOLD, P. J. Estuarine eutrophication in the UK: current incidence and future trends. **Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems**, v. 19, p. 43–56, 2009.
- MARANHÃO, P.; BENGALA, N.; PARDAL, M.; MARQUES, J. C. The influence of environmental factors on the population dynamics, reproductive biology and productivity of *Echinogammarus marinus* Leach (Amphipoda, Gammaridae) in the Mondego estuary (Portugal). **Acta Oecologica**, v. 22, n. 3, p. 139–152, 2001.
- MARTINS, I.; LEITE, N.; CONSTANTINO, E. Consumption and feeding preference of *Echinogammarus marinus* on two different algae: *Fucus vesiculosus* and *Ulva intestinalis*. **Journal of Sea Research**, v. 85, p. 443–446, 2014.
- MONTGOMERY, H. A. C.; SOULSBY, P. G. Effects of eutrophication of the intertidal ecology of Langstone Harbour, U.K., and proposed control measures. **Water Science and Technology**, v. 13, n. 7, p. 287–294, 1981.
- PERALTA-MARTÍNEZ, M. de L. A.; UNZUETA-BUSTAMANTE, M. L.; MONTALDO, H. H.; CABALLERO-ZAMORA, A.; CASTILLO-JUÁREZ, H. Morphometric relationships among spermatophore structures and their association with female fertility in the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Journal of Applied Aquaculture**, v. 31, n. 4, p. 301–308, 2019.

- PODLESIŃSKA, W.; DĄBROWSKA, H. Amphipods in estuarine and marine quality assessment – a review. **Oceanologia**, v. 61, n. 2, p. 179–196, 2019.
- RAVANOS, K.; PETOUSIS, S.; MARGIOULA-SIARKOU, C.; PAPTAEODOROU, A.; PANAGIOTIDIS, Y.; PRAPAS, N.; PRAPAS, Y. Declining sperm counts... or rather not? A mini review. **Obstetrical and Gynecological Survey**, v. 73, n. 10, p. 595–605, 2018.
- RHEINHEIMER, D. C.; PENFIELD, D. A. The effects of type I error rate and power of the ANCOVA F test and selected alternatives under nonnormality and variance heterogeneity. **Journal of Experimental Education**, v. 69, n. 4, p. 373–391, 2001.
- RODRÍGUEZ, S. R.; REGALADO, E. M.; PÉREZ, J. A. C.; PASTÉN, A. N.; IBARRA, R. S. Comparison of some reproductive characteristics of farmed and wild white shrimp males *Litopenaeus vannamei* (Decapoda: Penaeidae). **Revista de Biología Tropical**, v. 55, n. 1, p. 199–206, 2007.
- SASSON, D. A.; JOHNSON, S. L.; BROCKMANN, H. J. The role of age on sperm traits in the American horseshoe crab, *Limulus polyphemus*. **Animal Behaviour**, v. 84, n. 4, p. 975–981, 2012.
- SEPA. **Scottish Environment Protection Agency. Inverkeithing Bay Sediment Quality. Report TW 2/00.**
- SHEADER, M.; CHIA, F. S. Development, fecundity and brooding behaviour of the amphipod, *Marinogammarus obtusatus*. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, v. 50, n. 4, p. 1079–1099, 1970.
- STROBL, V.; STRAUB, L.; BRUCKNER, S.; ALBRECHT, M.; MAITIP, J.; KOLARI, E.; CHANTAWANNAKUL, P.; WILLIAMS, G. R.; NEUMANN, P. Not every sperm counts: Male fertility in solitary bees, *Osmia cornuta*. **PLoS ONE**, v. 14, n. 3, p. 1–17, 2019.
- SUN, S.; CHEN, Y.; HU, R. Aquatic hypoxia disturbs oriental river prawn (*Macrobrachium nipponense*) testicular development: A cross-generational study. **Environmental Pollution**, v. 266, p. 115093, 2020.
- TAYLOR, R. The green tide threat in the UK — a brief overview with particular reference to Langstone Harbour, south coast of England and the Ythan Estuary, east coast of Scotland. **Botanical Journal of Scotland**, v. 51, n. 2, p. 195–203, 1999.
- TRAPP, J.; ARMENGAUD, J.; PIBLE, O.; GAILLARD, J. C.; ABBACI, K.; HABTOUL, Y.; CHAUMOT, A.; GEFFARD, O. Proteomic investigation of male *Gammarus fossarum*, a freshwater crustacean, in response to endocrine disruptors. **Journal of Proteome Research**, v. 14, n. 1, p. 292–303, 2014.
- VANNUCI-SILVA, M.; KOHLER, S.; UMBUZEIRO, G. de A.; FORD, A. T. Behavioural effects on marine amphipods exposed to silver ions and silver nanoparticles. **Environmental Pollution**, v. 252, p. 1051–1058, 2019.

VLASBLOM, A. G. A study of a population of *Marinogammarus marinus* in the Oosterschelde. **Netherlands Journal of Sea Research**, v. 4, n. 3, p. 317–338, 1969.

WALTON, N. R. G.; HIGGINS, A. The legacy of contaminated land in Portsmouth: Its identification and remediation within a socio-political context. In: LERNER, D. N.; WALTON, N. R. G. (Eds.). **Contaminated Land and Groundwater: Future Directions**. London: Geological Society Engineering Geology Special Publications, 1998. p. 29–36.

YANG, G.; KILLE, P.; FORD, A. T. Infertility in a marine crustacean: Have we been ignoring pollution impacts on male invertebrates? **Aquatic Toxicology**, v. 88, p. 81–87, 2008.

ZHOU, J. L. Occurrence and persistence of antifouling biocide Irgarol 1051 and its main metabolite in the coastal waters of Southern England. **Science of the Total Environment**, v. 406, n. 1–2, p. 239–246, 2008.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os protocolos para realização do ensaio cometa e do ensaio de micronúcleos e demais anormalidades nucleares foram otimizados, apresentando baixos níveis de dano em condições controle e uma dose resposta satisfatória após a exposição a agentes genotóxicos de referência. Para o ensaio cometa, é recomendada a utilização de água do mar reconstituída para conservação das lâminas e tampão salino de Kenny para a preparação do gel de agarose de baixo ponto de fusão. Para o micronúcleo, Giemsa é o corante recomendado por produzir preparações permanentes e de boa qualidade. Esses protocolos poderiam ser melhor adaptados para serem aplicados para outros tipos celulares de anfípodes marinhos, como células germinativas e hepatócitos.

Nanopartículas e sal de prata causaram um aumento na frequência de micronúcleos e outras anormalidades nucleares, porém não foi detectado um aumento de danos ao DNA no ensaio cometa. Estudos *in vitro* recentes demonstraram que o ensaio cometa alcalino não é suficiente para detectar danos ao DNA causados pela prata, pois ela atua por via oxidativa e *crosslinking*. Também é interessante destacar que, apesar de outro trabalho do grupo ter detectado uma maior concentração interna de prata com AgNP, a frequência de micronúcleos após uma semana foi maior para sal de Ag e depois de duas semana elas se igualaram. Portanto, acreditamos que a prata nas duas formas é mutagênica devido a ação de íons de Ag e as nanopartículas levam mais tempo para causar mutagenicidade, devido ao tempo necessário para a ionização e liberação dos íons.

Anfípodes coletados do campo e expostos em laboratório a aditivos de plástico também se mostraram uma opção de trabalho para locais onde os cultivos ainda não foram estabelecidos. DBP causou mais mortalidade em *Echinogammarus marinus* do que DEHP. DBP também reduziu significativamente a contagem de espermatozóides de anfípodes expostos a concentrações maiores que 50µg/L. Seria interessante avaliar efeitos de DBP no nível populacional, como por exemplo seus efeitos nas ninhadas das fêmeas. DEHP não afetou a contagem dos espermatozóides, porém induziu significativamente a frequência de mudas nas concentrações de 5 e 500µg/L, indicando uma possível alteração hormonal já que acredita-se que em crustáceos alguns ftalatos, como DEHP, sejam capazes de se ligar a receptores de hormônios relacionados à muda.

A relação entre a contagem dos espermatozóides e o peso dos organismos se mostrou um bom parâmetro para comparação do estado reprodutivo de anfípodes coletados em áreas com diferentes graus de poluição. Conforme o esperado, anfípodes de regiões poluídas apresentaram uma contagem de espermatozóides menor em comparação a locais de

referência. Porém, anfípodes de uma região ambientalmente protegida apresentaram contagens de espermatozoides similares a de regiões poluídas e significativamente menores do que regiões de referência, alertando para uma possível contaminação nesse local. Além disso, anfípodes dessa área de preservação não apresentaram uma relação entre a contagem de espermatozoides e seu peso, contrariando o observado em todos os outros locais amostrados. Esses padrões foram observados em coletas durante diferentes anos e estações, sendo uma observação temporalmente relevante. Essas observações indicam que há necessidade de investigação das fontes de contaminação e ações de controle e prevenção nessa área protegida.

A integridade do material genético e o estado reprodutivo de anfípodes indicam o potencial desse modelo como organismos teste em laboratório e também para indicar contaminação ambiental utilizando organismos coletados em campo. As técnicas utilizadas, como o ensaio cometa, ensaio de micronúcleos e demais anormalidades nucleares e contagem dos espermatozoides, se mostraram eficientes, rápidas e confiáveis para avaliar possíveis impactos de diferentes compostos em anfípodes marinhos.

REFERÊNCIAS

- ARTAL, M. C.; PEREIRA, K. D.; LUCHESSI, A. D.; OKURA, V. K.; HENRY, T. B.; MARQUES-SOUZA, H.; UMBUZEIRO, G. de A. Transcriptome analysis in *Parhyale hawaiiensis* reveal sex-specific responses to AgNP and AgCl exposure. **Environmental Pollution**, v. 260, p. 113963, 2020.
- ARTAL, M. C.; SANTOS, A. Dos; HENRY, T. B.; UMBUZEIRO, G. de A. Development of an acute toxicity test with the tropical marine amphipod *Parhyale hawaiiensis*. **Ecotoxicology**, v. 27, n. 2, p. 103–108, 2018.
- BOLOGNESI, C.; HAYASHI, M. Micronucleus assay in aquatic animals. **Mutagenesis**, v. 26, p. 205–213, 2011.
- BOSSUS, M. C.; GULER, Y. Z.; SHORT, S. J.; MORRISON, E. R. Behavioural and transcriptional changes in the amphipod *Echinogammarus marinus* exposed to two antidepressants, fluoxetine and sertraline. **Aquatic Toxicology**, v. 151, p. 46–56, 2014.
- BROWNE, W. E.; PRICE, A. L.; GERBERDING, M.; PATEL, N. H. Stages of embryonic development in the amphipod crustacean, *Parhyale hawaiiensis*. **Genesis**, v. 42, n. 3, p. 124–149, 2005.
- BRUCK, S.; FORD, A. T. Chronic ingestion of polystyrene microparticles in low doses has no effect on food consumption and growth to the intertidal amphipod *Echinogammarus marinus*? **Environmental Pollution**, v. 233, p. 1125–1130, 2018.
- CABRAL, H.; FONSECA, V.; SOUSA, T.; LEAL, M. C. Synergistic effects of climate change and marine pollution: An overlooked interaction in coastal and estuarine areas. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 16, n. 15, p. 1–17, 2019.
- DAUGHTON, C. G. Non-regulated water contaminants: emerging research. **Environmental Impact Assessment Review**, v. 24, n. 7–8, p. 711–732, 2004.
- DE MARCHI, L.; COPPOLA, F.; SOARES, A. M. V. M.; PRETTI, C.; MONSERRAT, J. M.; TORRE, C. Della; FREITAS, R. Engineered nanomaterials: from their properties and applications, to their toxicity towards marine bivalves in a changing environment. **Environmental Research**, v. 178, p. 108683, 2019.
- DI DONATO, G.; DE MATTHAEIS, E.; RONCI, L.; SETINI, A. Genotoxicity biomarkers in the amphipod *Gammarus elvirae* exposed in vivo to mercury and lead, and basal levels of DNA damage in two cell types. **Chemistry and Ecology**, v. 32, n. 9, p. 843–857, 2016.
- DIXON, D. R. Marine invertebrate eco-genotoxicology: a methodological overview. **Mutagenesis**, v. 17, n. 6, p. 495–507, 2002.
- FORD, A. T.; MARTINS, I.; DUNN, A. M. Insights into sperm-fertilisation relationships in the Arthropoda with ecological significance modelled in an amphipod. **Invertebrate Reproduction & Development**, v. 56, n. 1, p. 50–56, 2012.

FREIXA, A.; ACUÑA, V.; SANCHÍS, J.; FARRÉ, M.; BARCELÓ, D.; SABATER, S. Ecotoxicological effects of carbon based nanomaterials in aquatic organisms. **Science of The Total Environment**, v. 619–620, p. 328–337, 2018.

GAJSKI, G.; ŽEGURA, B.; LADEIRA, C.; POURRUT, B.; DEL BO', C.; NOVAK, M.; SRAMKOVA, M.; MILIĆ, M.; GUTZKOW, K. B.; COSTA, S.; DUSINSKA, M.; BRUNBORG, G.; COLLINS, A. The comet assay in animal models: from bugs to whales – (Part 1 Invertebrates). **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 779, p. 82–113, 2019.

GAO, D.; LI, Z.; WANG, H.; LIANG, H. An overview of phthalate acid ester pollution in China over the last decade: Environmental occurrence and human exposure. **Science of The Total Environment**, v. 645, p. 1400–1409, 2018.

GOLLAPUDI, B. B. An ongoing journey toward a risk-based testing in genetic toxicology. **Current Opinion in Toxicology**, v. 3, p. 71–74, 2017.

GU, Y.-Y.; WEI, Q.; WANG, L.-Y.; ZHANG, Z.-M.; ZHANG, X.-Q.; SUN, A.L.; CHAN, J.; SHI, X.-Z. A comprehensive study of the effects of phthalates on marine mussels: Bioconcentration, enzymatic activities and metabolomics. **Marine Pollution Bulletin**, v. 168, p. 112393, 2021.

HANNIBAL, R. L.; PRICE, A. L.; PATEL, N. H. The functional relationship between ectodermal and mesodermal segmentation in the crustacean, *Parhyale hawaiiensis*. **Developmental Biology**, v. 361, n. 2, p. 427–438, 2012.

ISSARTEL, J.; BOULO, V.; WALLON, S.; GEFFARD, O.; CHARMANTIER, G. Cellular and molecular osmoregulatory responses to cadmium exposure in *Gammarus fossarum* (Crustacea, Amphipoda). **Chemosphere**, v. 81, n. 6, p. 701–710, 2010.

KAO, D.; LAI, A. G.; STAMATAKI, E.; ROSIC, S.; KONSTANTINIDES, N.; JARVIS, E.; DI DONFRANCESCO, A.; POUCHKINA-STANCHEVA, N.; SÉMON, M.; GRILLO, M.; BRUCE, H.; KUMAR, S.; SIWANOWICZ, I.; LE, A.; LEMIRE, A.; EISEN, M. B.; EXTAVOUR, C.; BROWNE, W. E.; WOLFF, C.; AVEROF, M.; PATEL, N. H.; SARKIES, P.; PAVLOPOULOS, A.; ABOOBAKER, A. The genome of the crustacean *Parhyale hawaiiensis*, a model for animal development, regeneration, immunity and lignocellulose digestion. **eLife**, v. 5, p. 1–45, 2016.

KOHLER, S. A.; PARKER, M. O.; FORD, A. T. Shape and size of the arenas affect amphipod behaviours: implications for ecotoxicology. **PeerJ**, v. 6, p. e5271, 2018a.

KOHLER, S. A.; PARKER, M. O.; FORD, A. T. Species-specific behaviours in amphipods highlight the need for understanding baseline behaviours in ecotoxicology. **Aquatic Toxicology**, v. 202, p. 173–180, 2018b.

LEE, R. F.; STEINERT, S. Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. **Mutation Research - Reviews in Mutation Research**, v. 544, p. 43–64, 2003.

- LEMAÎTRE, J.-F.; RIGAUD, T.; CORNET, S.; BOLLACHE, L. Sperm depletion, male mating behaviour and reproductive 'time-out' in *Gammarus pulex* (Crustacea, Amphipoda). **Animal Behaviour**, v. 77, n. 1, p. 49–54, 2009.
- LEWIS, C.; FORD, A. T. Infertility in male aquatic invertebrates: A review. **Aquatic Toxicology**, v. 120–121, p. 79–89, 2012.
- LI, Z.; YI, X.; ZHOU, H.; CHI, T.; LI, W.; YANG, K. Combined effect of polystyrene microplastics and dibutyl phthalate on the microalgae *Chlorella pyrenoidosa*. **Environmental Pollution**, v. 257, p. 113604, 2020.
- MARTINEZ-HARO, M.; ACEVEDO, P.; PAIS-COSTA, A. J.; TAGGART, M. A.; MARTINS, I.; RIBEIRO, R.; MARQUES, J. C. Assessing estuarine quality: a cost-effective *in situ* assay with amphipods. **Environmental Pollution**, v. 212, p. 382–391, 2016.
- MARTINS, I.; LEITE, N.; CONSTANTINO, E. Consumption and feeding preference of *Echinogammarus marinus* on two different algae: *Fucus vesiculosus* and *Ulva intestinalis*. **Journal of Sea Research**, v. 85, p. 443–446, 2014.
- MORTEZAEE, K.; NAJAFI, M.; SAMADIAN, H.; BARABADI, H.; AZARNEZHAD, A.; AHMADI, A. Redox interactions and genotoxicity of metal-based nanoparticles: a comprehensive review. **Chemico-Biological Interactions**, v. 312, p. 108814, 2019.
- NEUPARTH, T.; MARTINS, C.; SANTOS, C. B. de los; COSTA, M. H.; MARTINS, I.; COSTA, P. M.; SANTOS, M. M. Hypocholesterolaemic pharmaceutical simvastatin disrupts reproduction and population growth of the amphipod *Gammarus locusta* at the ng/L range. **Aquatic Toxicology**, v. 155, p. 337–347, 2014.
- OEHLMANN, J.; SCHULTE-OEHLMANN, U.; KLOAS, W.; JAGNYTSCH, O.; LUTZ, I.; KUSK, K. O.; WOLLENBERGER, L.; SANTOS, E. M.; PAULL, G. C.; VANLOOK, K. J. W.; TYLER, C. R. A critical analysis of the biological impacts of plasticizers on wildlife. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 364, n. 1526, p. 2047–2062, 2009.
- OOST, R. Van der; BEYER, J.; VERMEULEN, N. P. E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 13, n. 2, p. 57–149, 2003.
- PALUSELLI, A.; FAUVELLE, V.; GALGANI, F.; SEMPÉRÉ, R. Phthalate release from plastic fragments and degradation in seawater. **Environmental Science and Technology**, v. 53, p. 166–175, 2019.
- PARCHEM, R. J.; POULIN, F.; STUART, A. B.; AMEMIYA, C. T.; PATEL, N. H. BAC library for the amphipod crustacean, *Parhyale hawaiensis*. **Genomics**, v. 95, n. 5, p. 261–267, 2010.
- PODLESIŃSKA, W.; DĄBROWSKA, H. Amphipods in estuarine and marine quality assessment – a review. **Oceanologia**, v. 61, n. 2, p. 179–196, 2019.

- POOVACHIRANON, S.; BOTO, K.; DUKE, N. Food preference studies and ingestion rate measurements of the mangrove amphipod *Parhyale hawaiiensis* (Dana). **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 98, p. 129–140, 1986.
- PU, S.-Y.; HAMID, N.; REN, Y.-W.; PEI, D.-S. Effects of phthalate acid esters on zebrafish larvae: development and skeletal morphogenesis. **Chemosphere**, v. 246, p. 125808, 2020.
- QIAN, L.; LIU, J.; LIN, Z.; CHEN, X.; YUAN, L.; SHEN, G.; YANG, W.; WANG, D.; HUANG, Y.; PANG, S.; MU, X.; WANG, C.; LI, Y. Evaluation of the spinal effects of phthalates in a zebrafish embryo assay. **Chemosphere**, v. 249, p. 126144, 2020.
- REHM, E. J.; HANNIBAL, R. L.; CHAW, R. C.; VARGAS-VILA, M. A.; PATEL, N. H. The crustacean *Parhyale hawaiiensis*: A new model for arthropod development. **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 4, p. 1–10, 2009.
- RONCI, L.; IANNILLI, V.; DE MATTHAEIS, E.; DI DONATO, G.; SETINI, A. Evaluation of genotoxic potential of waters from two Italian rivers in *Gammarus elvirae* (Amphipoda). **Water Environment Research**, v. 87, n. 11, p. 2008–2017, 2015.
- SHEN, C.; WEI, J.; WANG, T.; WANG, Y. Acute toxicity and responses of antioxidant systems to dibutyl phthalate in neonate and adult *Daphnia magna*. **PeerJ**, v. 2019, n. 3, 2019.
- SUN, J.; WEI, B.; MEI, Q.; AN, Z.; WANG, X.; HAN, D.; XIE, J.; ZHAN, J.; ZHANG, Q.; WANG, W.; HE, M. Theoretical investigation on the degradation of dibutyl phthalate initiated by OH and SO₄^{·-} in aqueous solution: mechanism, kinetics and ecotoxicity assessment. **Chemical Engineering Journal**, v. 382, p. 122791, 2020.
- UDROIU, I. The micronucleus test for aquatic toxicology. In: SVENSSON, E. P. (Ed.). **Aquatic Toxicology Research Focus**. Nova Science Publisher, 2007. p. 1–16.
- VACCHI, F. I.; SANTOS, A. Dos; ARTAL, M. C.; MAGALHÃES, G. R.; VENDEMIATTI, J. A. d. S.; UMBUZEIRO, G. de A. *Parhyale hawaiiensis* as a promising alternative organism for monitoring acute toxicity of sediments under the influence of submarine outfalls. **Marine Pollution Bulletin**, v. 149, p. 37–39, 2019.
- VANNUCI-SILVA, M. **Nanopartículas e sais de parta: concentração interna e efeitos comportamentais em afípodos marinhos**. 2018. Universidade Estadual de Campinas, 2018.
- VANNUCI-SILVA, M.; CADORE, S.; HENRY, T. B.; UMBUZEIRO, G. Higher silver bioavailability after nanoparticle dietary exposure in marine amphipods. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 38, n. 4, p. 806–810, 2019.
- VANNUCI-SILVA, M.; DA SILVA, E. D. N.; ARTAL, M. C.; DOS SANTOS, A.; SILVA, F.; UMBUZEIRO, G. D. A.; CADORE, S. GFAAS and ICP-MS determination of Ag and Cu in the haemolymph of a millimetric marine crustacean (*Parhyale hawaiiensis*) as a tool in ecotoxicology. **Atomic Spectroscopy**, v. 39, n. 2, p. 67–74, 2018.

WANG, T.; WEI, J.; WANG, L.; LU, Y.; ZHANG, Q.; WANG, Y. Effect of Dibutyl phthalate on antioxidant parameters and related gene expression in *Daphnia magna*. **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**, v. 227, n. 5, 2019.

WEI, J.; SHEN, Q.; BAN, Y.; WANG, Y.; SHEN, C.; WANG, T.; ZHAO, W.; XIE, X. Characterization of Acute and Chronic Toxicity of DBP to *Daphnia magna*. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 101, n. 2, p. 214–221, 2018.

XU, Z.; XIONG, X.; ZHAO, Y.; XIANG, W.; WU, C. Pollutants delivered every day: phthalates in plastic express packaging bags and their leaching potential. **Journal of Hazardous Materials**, v. 384, p. 121282, 2020.

YANG, G.; KILLE, P.; FORD, A. T. Infertility in a marine crustacean: Have we been ignoring pollution impacts on male invertebrates? **Aquatic Toxicology**, v. 88, p. 81–87, 2008.

YU, H.; WANG, L.; LIN, Y.; LIU, W.; TUYIRINGIRE, D.; JIAO, Y.; ZHANG, L.; MENG, Q.; ZHANG, Y. Complete metabolic study by dibutyl phthalate degrading *Pseudomonas* sp. DNB-S1. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 194, p. 110378, 2020.

ZHANG, W.; XIAO, B.; FANG, T. Chemical transformation of silver nanoparticles in aquatic environments: Mechanism, morphology and toxicity. **Chemosphere**, v. 191, p. 324–334, 2018.