

**WILLIAN REINA JOVIANO**

**Parâmetros da imunidade inata celular e expressão gênica de metalotioneínas como biomarcadores de chumbo (Pb) no siri-azul *Callinectes danae* Smith, 1869.**

Dissertação apresentada ao Programa de Biologia de Sistemas do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

**SÃO PAULO**

**2020**

WILLIAN REINA JOVIANO

PARÂMETROS DA IMUNIDADE INATA CELULAR E EXPRESSÃO  
GÊNICA DE METALOTIONEÍNAS COMO BIOMARCADORES DE  
CHUMBO (Pb) NO SIRI-AZUL *Callinectes danae* Smith, 1869.

Dissertação apresentada ao Programa  
de Pós-Graduação em Biologia de  
Sistemas do Instituto de Ciências  
Biomédicas da Universidade de São  
Paulo, para obtenção do Título de  
Mestre em Ciências.

Área de concentração: Biologia Celular e Tecidual.

Orientador: Prof<sup>o</sup> Dr. José Roberto Machado Cunha da Silva.

Coorientador: Dr<sup>a</sup>. Isabella Cristina da Costa Leal Bordon.

VERSÃO CORRIGIDA

SÃO PAULO

2020

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)  
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica  
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Reina Joviano, Willian  
Parâmetros da imunidade inata celular e expressão  
gênica de metalotioneínas como biomarcadores de  
chumbo (Pb) no siri-azul *Callinectes danae* Smith,  
1869 / Willian Reina Joviano; orientador José  
Roberto Machado Cunha da Silva; coorientador  
Isabella Cristina da Costa Leal Bordon. -- São  
Paulo, 2020.  
64 p.

Dissertação (Mestrado) ) -- Universidade de São  
Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Ecotoxicologia. 2. Biomonitoramento de  
Estuários. 3. Chumbo. 4. *Callinectes danae*. 5.  
Metalotioneínas. I. Roberto Machado Cunha da Silva,  
José, orientador. II. Cristina da Costa Leal  
Bordon, Isabella, coorientador. III. Título.

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

---

Candidato: Willian Reina Joviano

Título da Dissertação/Tese: Parâmetros da imunidade inata celular e expressão gênica de metalotioneínas como biomarcadores de chumbo (Pb) no siri-azul *Callinectes danae* Smith, 1869.

Orientador: Prof. Dr. José Roberto Machado Cunha da Silva

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação, de Mestrado/  
Tese de Doutorado em sessão pública realizada a \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_\_\_, considerou  
o candidato:

Aprovado    Reprovado

Examinador (a): Assinatura: .....

Nome: .....

Instituição: .....

Examinador (a): Assinatura: .....

Nome: .....

Instituição: .....

Examinador (a): Assinatura: .....

Nome: .....

Instituição: .....

Presidente : Assinatura: .....

Nome: .....

Instituição: .....

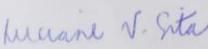


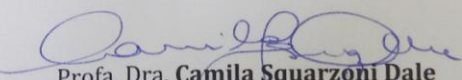
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508-000  
Comissão de Ética em Pesquisa - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

## CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB nº 897/2017 referente ao projeto intitulado: "*Avaliação de parâmetros da imunidade inata e alterações histológicas do siri azul, Callinectes danae Smith, 1869 (Crustácea, Portunidae), após a exposição ao chumbo (Pb)*" sob a responsabilidade de *William Reina Joviano* e orientação do(a) Prof.(a) Dr.(a) *José Roberto Machado Cunha da Silva*, do Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento, foi analisado pela **CEUA** - Comissão de Ética no Uso de Animais e pelo **CEPSH** - Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos, tendo sido deliberado que o referido projeto não utilizará animais que estejam sob a égide da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, nem envolverá procedimentos regulados pela Resolução CONEP nº 466 de 2012.

São Paulo, 21 de agosto de 2017.

  
Prof. Dra. **Luciane Valéria Sita**  
Coordenadora CEUA ICB/USP

  
Prof. Dra. **Camila Squarzoni Dale**  
Coordenadora CEPSH ICB/USP

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais, irmãos e família, por todo apoio e afeto, por nunca desistirem, sempre me incentivarem e me levantarem nos momentos mais difíceis. Sem vocês não sou ninguém! E também pelo “paitrocínio” nestes tempos de bolsa, se hoje cheguei até aqui foi porque vocês me ajudaram. Amo vocês, mais do que tudo.

Ao Professor Dr. José Roberto Machado Cunha da Silva, meu orientador e professor, muito obrigado por me acolher, pela confiança, pelos conselhos e por todos os cafés e ensinamentos que me proporcionou, espero ter atendido as expectativas, muito obrigado!

À minha co-orientadora Isabella Cristina da Costa Leal Bordon, muito obrigado pela confiança, pelos conselhos, pelo carinho, e por lá no começo me acolher e compartilhar sua linha de pesquisa e ceder toda estrutura necessária para que este projeto acontecesse.

Ao Dr. Andrews Krupinski Emerenciano, se prepara que esse parágrafo é seu. Muito obrigado por sempre confiar, me incentivar e desafiar, desde o começo de tudo até o final. Não sei o que seria desse projeto sem você, basicamente você tem participação em todas as técnicas utilizadas nesse mestrado (rs). Obrigado por toda essa estrada (e foi longa, hein!), onde você foi meu amigo, meu conselheiro, meu parceiro pra qualquer hora (e experimentos) e meu professor. Se hoje cheguei onde cheguei, foi por sua causa! Poderia dissertar por linhas e linhas que mesmo assim não conseguiria expressar minha gratidão, novamente, muito obrigado parceira!

Desde a iniciação científica passando pelas mais altas presepadas e aventuras, Letícia Palmeira Pinto, muito obrigado por sempre me acompanhar, sempre me ajudar e apoiar nos momentos mais difíceis. Tenho sorte de ter você ao meu lado.

Ainda que o mar não esteja pra marisco, ou que os ventos de coleta não estejam ao nosso favor, sei que poderei contar com o ombro da Amanda Ribeiro Rosa pra chorar! Muito obrigado por toda ajuda, pelas madrugadas em claro trabalhando, pelas risadas e por todo carinho.

Felipe da Costa Souza, meu mestre Jedi, muito obrigado pelos ensinamentos, pelo apoio nas horas difíceis e as melhores risadas, nos melhores momentos. Graças a você fiz as pazes com a biomol, obrigado!

Ao Felipe Norton, muito obrigado por todo apoio, risadas, aventuras em Cananéia e os mais insanos campos de opiliões, valeu parceira!

Minha maravilhosa padawan Thaís Almeida Godoy, muito obrigado pela ajuda, risadas, caçadas pokémons e momentos mais que especiais no laboratório.

À Joana Mona, por me incentivar no começo de tudo, por todos os ensinamentos e por sempre me estimular a crescer, obrigado!

Ao pessoal mais incrível, maravilhoso e fantástico da Universidade de São Paulo: Cecília Magalhães, Guilherme Gatti, Douglas Amaral, Camila Neves, Guilherme Rabelo, Marlene, Marley. Cara, vocês são sensacionais, vou sentir saudades dos nossos cafés, dos nossos almoços e das mais insanas reuniões pra jogar conversa fora. Muito obrigado por tudo!

Ao professor Dr. Luís Fernando Marques e a Dra. Elisa Bergami pelas experiências incríveis na Antártica, vocês são minha inspiração como pesquisador.

À professora Dra. Déborah Inês Teixeira Fávaro, muito obrigado pelas análises de Pb, por toda contribuição nessas etapas, espero ter atendido as expectativas!

Ao pessoal da Base de Cananéia, Sr. Evandro e Leandro, muito obrigado por todo apoio em campo e pela troca de experiências, vocês são incríveis!

Ao pessoal do Cebimar, Alex e Emerson, muito obrigado por tudo! Sem vocês não sei como terminaria esse mestrado.

Aos meus amigos que me aturaram nos momentos de ansiedade e me apoiaram por todas as etapas deste trabalho: Renato de Oliveira, Cintia Matos, Everton Bertaglia, William Santana, Thiago Oliveira. O apoio de vocês foi essencial.

Ao Alfonso, *in memoriam*, onde quer que você esteja... Não me esqueci de você!

Ao CNPq pela bolsa concedida nestes dois anos de muito trabalho, obrigado!

Por último e muito importante! A todos os siris-azuis utilizados nesse projeto, espero ter contribuído para a conservação e preservação dos estuários e manguezais, fazendo jus aos sacrifícios. Muito obrigado!

Peço desculpas se esqueci de citar alguém, final de mestrado vocês sabem como é! Muito obrigado por todos que me ajudaram, meu nome vai como autor, mas, o trabalho, é com todos!



*"Viver é arriscar tudo. Caso contrário, você é apenas um pedaço inerte de moléculas montadas aleatoriamente à deriva, onde o universo te sopra."*

- Rick Sanchez

JOVIANO, W. R. Parâmetros da imunidade inata celular e expressão gênica de metalotioneínas como biomarcadores de chumbo (Pb) no siri-azul *Callinectes danae* Smith, 1869. Dissertação (Mestrado em Biologia de Sistemas: Biologia Celular, Tecidual e Desenvolvimento) - Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

Metais como o chumbo (Pb) podem constituir uma fonte de poluição ambiental difusa de difícil controle e remediação. Espécies cosmopolitas como os siris-azuis do gênero *Callinectes* sp. podem ser empregados para indicar a disponibilidade de contaminantes no ambiente. Diferentes autores verificaram a presença de metais em *Callinectes* sp., todavia, biomarcadores moleculares e imunológicos referentes à exposição destes metais tem recebido pouca atenção, principalmente para espécie-alvo deste estudo, o *Callinectes danae*. Diante disso, o presente trabalho teve por objetivo avaliar os efeitos deletérios do Pb na resposta imune celular e molecular em *Callinectes danae*. Para tanto, foi realizada caracterização dos hemócitos circulantes presentes na hemolinfa como parâmetro imunológico inicial; experimentos de exposição *in vivo* a 2 µg/mL de Pb por 24h, 48h e 96h em indivíduos coletados em Cananéia, para avaliar parâmetros como: Quantificação total de Pb no hepatopâncreas, brânquias e músculos, por espectrômetro de absorção atômica; contagem diferencial de hemócitos por citometria de fluxo; contagem total de hemócitos em câmara de Neubauer; viabilidade celular dos hemócitos circulantes e avaliação da expressão gênica de metalotioneínas (MTCu-II; MTCd-I e MTCd-II) por RT-qPCR no hepatopâncreas. Além disso, foram realizados experimentos *in vitro* e avaliado a atividade fagocítica após exposições a 0; 50; 100; 250; 500; 1000 ng/mL de Pb, por 1h, em siris-azuis coletados no complexo estuarino de Cananéia e na Baía do Araçá em São Sebastião. Os resultados demonstraram que a espécie alvo do presente estudo possui três populações de hemócitos, sendo estas: Granulócitos, semigranulócitos e hialinócitos. A contagem total e diferencial dos hemócitos variou consideravelmente entre os indivíduos, o que inviabilizou a utilização deste parâmetro como um biomarcador. Os ensaios de viabilidade celular apresentaram redução dos hemócitos vivos apenas em 96h de exposição. A bioacumulação de Pb foi estatisticamente significativa em todos tecidos amostrados, principalmente nas brânquias, onde houve aumento em 48h e redução em 96h. A expressão gênica de MTCu-II e MTCd-I não apresentaram diferenças nos períodos avaliados. Apenas

MTCd-II foi regulada positivamente em 48h seguido de redução em 96h, indicando que a isoforma de metalotioneína a ser escolhida é uma variável a ser considerada e que possivelmente apenas esta isoforma consiga interagir com uma possível contaminação com Pb. Os experimentos de fagocitose *in vitro* apresentaram um curva decrescente com relação ao aumento das concentrações de Pb, em ambos locais de coleta, sugerindo uma resposta dose-dependente e demonstrando que a atividade fagocítica é uma forte candidata para posteriores estudos de monitoramento ambiental frente contaminações de Pb. Para tanto, mais estudos de aprofundamento nestes biomarcadores, diretamente no ambiente, devem ser conduzidos.

**Palavras-chave:** Ecotoxicologia, Biomonitoramento, Chumbo, *Callinectes danae*.

JOVIANO, W. R. Cellular innate immunity parameters and metallothionein gene expression as lead (Pb) biomarkers in blue crab *Callinectes danae* Smith, 1869. Master's degree dissertation (Master's degree in Systems Biology: Cell, Tissue and Development Biology) - Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

Metals such as lead (Pb) can be a source of diffuse environmental pollution that is difficult to control and remediate. Cosmopolitan species such as blue crabs of the genus *Callinectes sp.* can be used to indicate the availability of contaminants in the environment. Different authors have verified the presence of metals in *Callinectes sp.* however, molecular and immunological biomarkers regarding the exposure of these metals have received little attention, especially for the target species of this study, *Callinectes danae*. Therefore, the present work aimed to evaluate the deleterious effects of Pb on cellular and molecular immune responses in *Callinectes danae*, to find new tools for environmental biomonitoring of estuaries. For this, a characterization of circulating hemocytes present in hemolymph was performed as the initial immunological parameter; In vivo exposure experiments using 2 µg/mL Pb for 24h, 48h and 96h in individuals collected in Cananéia, to evaluate parameters such as: total quantification of Pb in hepatopancreas, gills and muscles by atomic absorption spectrometer; Differential hemocyte count by flow cytometry; Total hemocyte count in neubauer chamber; Cell viability of circulating hemocytes and evaluation of metallothionein gene expression (MTCu-II; MTCd-I and MTCd-II) in hepatopancreas by RT-qPCR. In addition, in vitro experiments were performed and phagocytic activity was evaluated after exposure to 0; 50; 100; 250; 500; 1000 ng/mL Pb for 1h in blue crabs collected in Cananéia and Araçá Bay. The results showed that the target species of the present study has three populations of hemocytes: Granulocytes, semigranulocytes and hyalinocytes. The total and differential hemocyte count varied considerably among individuals, which made the use of this parameter as a biomarker unfeasible. Cell viability assays showed reduction of living hemocytes only at 96h of exposure. Pb bioaccumulation was statistically significant in all tissues sampled, especially in the gills, where there was an increase at 48h and a decrease at 96h. The gene expression of TCM-II and TCM-I showed no differences in the evaluated periods. Only MTCd-II was up-regulated at 48h followed by a down-regulation at 96h, indicating that the metallothionein isoform to be chosen is a variable to be considered and that possibly only this isoform can interact with a possible Pb contamination. In vitro phagocytosis experiments showed a decreasing curve regarding the increase of Pb concentrations in both collection sites, suggesting a dose dependent response and demonstrating that phagocytic activity is a strong candidate for environmental monitoring work against Pb contamination.

Keywords: Ecotoxicology, Biomonitoring, Lead, *Callinectes danae*.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Anatomia externa de indivíduo macho do siri-azul *Callinectes danae*. Circulo vermelho evidencia o local de coleta da hemolinfa (entre as articulações do último par de pereiópodes)..... 26
- Figura 2: Locais de coleta dos siris-azuis (*Callinectes danae*). A: Região sul do complexo estuarino lagunar de Cananéia-Iguape (25°03'01.2"s 47°55'50.9"w). B: Baía do Araçá - São Sebastião (23°48'52.2"s 45°24'17.0"w). Ponto cinza e círculo vermelho indicam a área utilizada para coleta..... 32
- Figura 3: Viabilidade celular dos hemócitos do siri-azul (*Callinectes danae*) utilizando microscopia de luz, com contraste de fase. Marcador de viabilidade celular, diacetato de fluoresceína (FDA), indicando células vivas. Marcador de mortalidade celular, iodeto de propídeo (IP), indicando o núcleo células mortas. Barra de escala: 20 µm... 35
- Figura 4: Hemócitos do siris-azul (*Callinectes danae*) depositados sobre lâmina de vidro e imediatamente fotografados. A: contraste de fase. B: contraste de fase com filtro verde. Setas azuis indicam hialinócitos. Setas amarelas indicam semigranulócitos. Setas vermelhas indicam granulócitos. Aumento de 40 x. Barra escala: 20 µm..... 39
- Figura 5: Hemócitos do siris-azul (*Callinectes danae*) obtidos com citospin e fixados com paraformaldeído 4%. Imagens do canto superior obtidas em microscopia com contraste de fase. Setas brancas indicam hemócitos, no aumento de 40 x. Barra de escala: 20 µm. Imagens do cano inferior foram obtidas com microscopia confocal, no aumento de 100 x. Barra de escala: 10 µm. FALO: Marcação de faloidina, evidencia filamentos citoplasmáticos de actina em tons de verde; DAPI: Marcação de dapi, evidencia núcleo em tons de azul. .... 40
- Figura 6: Hemócitos do siri-azul (*Callinectes danae*), obtidos com citospin e corados com H.E. GC: Granulócitos. SGC: Semigranulócitos. HC: Hialinócitos. Aumento de 40x. Barra de escala: 20 µm..... 40
- Figura 7: Bioacumulação total de Pb no hepatopâncreas, músculo e brânquias, após exposição de 2 µg/mL de Pb em 24h, 48h e 96h. Dados estão apresentados em médias ± desvio padrão. Linha azul: Grupos controles. Linha vermelha: Grupos expostos a 2 µg/mL de Pb. .... 42
- Figura 8: Citometria de fluxo evidenciando a proporção das populações de hemócitos encontrados na hemolinfa do siri-azul *Callinectes danae*, após exposição a 2 µg/mL de Pb por 24h, 48h e 96h. Valores apresentados em média ± desvio padrão (dados normalizados para Δ resposta). A: Grupo 24h. B: Grupo 48h. C: Grupo 96h. D: Citometria de fluxo dos grupos controle, evidenciando as populações de hemócitos considerando tamanho (SSC-A) e complexidade intracelular (FSC-A)..... 43

- Figura 9: Contagem total de hemócitos por mL, presentes na hemolinfa do siri-azul (*Callinectes danae*). C: Grupos controle. Pb: Grupos expostos a 2 µg/mL de Pb. Valores apresentados em médias ± desvio padrão..... 44
- Figura 10: Viabilidade celular dos hemócitos circulantes do siri-azul (*Callinectes danae*). C: Grupos controle. Pb: Grupos expostos a 2 µg/mL de Pb. Valores de porcentagem apresentados em médias ± desvio padrão..... 45
- Figura 11: Expressão gênica relativa (EGR) de metalotioneínas (MTCu-II, MTCd-I e MTCd-II). C: Grupos controle. Pb: Grupos expostos a 2 µg/mL de Pb. Valores de EGR apresentados em médias ± desvio padrão. (\*\*) Indica diferença estatística  $p < 0,005$ . ... 46
- Figura 12: Fagocitose *in vitro* do siri-azul (*Callinectes danae*). Hialinócito com levedura internalizada corada com a técnica de Rosenfeld. A: Hialinócito em microscopia de luz, levedura internalizada levemente corada em vermelho. B: Hialinócito em contraste de fase, levedura internalizada fortemente corada em vermelho. .... 47
- Figura 13: Capacidade fagocítica (%) dos grupos controles de siris-azuis (*Callinectes danae*), coletados em Cananéia e na baía do Araçá - São Sebastião. Valores de porcentagem apresentados em médias ± desvio padrão. .... 47
- Figura 14: Capacidade fagocítica de siris azuis (*Callinectes danae*) coletados na baía do Araçá - São Sebastião e Cananéia, após exposições à diferentes concentrações de Pb, por 1h. Valores de porcentagem apresentados em médias ± desvio padrão. (\*)  $p < 0,05$ ; (\*\*)  $p < 0,005$ ; (\*\*\*)  $p < 0,0005$ ; (\*\*\*\*)  $p < 0,00005$ ..... 48
- Figura 15: Comparação da capacidade fagocítica de siris azuis (*Callinectes danae*) coletados na baía do Araçá – São Sebastião e Cananéia, após exposições a diferentes concentrações de Pb, por 1h. Valores de porcentagem apresentados em médias ± desvio padrão. (\*)  $p < 0,05$ ; (\*\*)  $p < 0,005$ ..... 48

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1: Parâmetros morfométricos dos siris-azuis *Callinectes danae* coletados para os experimentos *in vivo* e *in vitro*. Dados de peso (g), largura da carapaça sem os espinhos (cm), comprimento da carapaça (cm) e número de indivíduos utilizados (*n*) por experimento. Dados apresentados em médias  $\pm$  desvio padrão. .... 32
- Tabela 2: Concentrações médias de Pb presentes nos tecidos após exposição de 24h, 48h e 98h. B: brânquias; H: hepatopâncreas; M: músculos; <LD: abaixo dos níveis de detecção; grupo C: grupos controle; Pb: grupos expostos a 2  $\mu\text{g/mL}$  de Pb. Valores de uma mesma coluna com letras diferentes indicam diferenças significativas (Teste de Tukey,  $p < 0,05$ )..... 41
- Tabela 3: Contagem diferencial de hemócitos circulantes do *C. danae*. HC: hialinócitos; SGC: semigranulócitos; GC: granulócitos. Dados apresentados com as médias das porcentagens obtidas  $\pm$  desvio padrão..... 43

## LISTA DE ABREVIATURAS

|         |   |
|---------|---|
| ACD-B   | Anticoagulante Ácido Citrato Dextrose – Solução B         |
| AMF     | Água do Mar Filtrada                                      |
| CONAMA  | Conselho Nacional do Meio Ambiente                        |
| EDTA    | Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético                        |
| EROS    | Espécies Reativas de Oxigênio                             |
| FDA-IP  | Solução de Diacetato de Fluoresceína e Iodeto de Propídeo |
| GC      | Granulócitos  |
| HC      | Hialinócitos  |
| ICMBio  | Instituto Chico Mendes da Biodiversidade                  |
| MT      | Metalotioneínas   |
| MTCu-II | Metalotioneínas Cobre-específicas-II,                     |
| MTCd-I  | Metalotioneínas Cádmio-específicas-I                      |
| MTCd-II | Metalotioneínas Cádmio-específicas-II                     |
| RT-qPCR | PCR quantitativo em Tempo Real                            |
| SGC     | Semigranulócito   |



## SUMÁRIO

|       |   |    |
|-------|---|----|
| 1     | Introdução.....   | 19 |
| 1.1   | Estuários e manguezais .....  | 19 |
| 1.2   | Degradação ambiental .....  | 21 |
| 1.3   | Poluentes metálicos: Chumbo (Pb) .....  | 22 |
| 1.4   | Siris-azuis ( <i>Callinectes danae</i> ) .....  | 25 |
| 1.5   | Imunidade inata celular dos crustáceos.....   | 26 |
| 1.6   | Fagocitose.....   | 27 |
| 1.7   | Metalotioneínas .....   | 28 |
| 2     | Objetivo .....  | 30 |
| 2.1   | Objetivos específicos .....   | 30 |
| 3     | Materiais e Métodos.....  | 31 |
| 3.1   | Coletas de siris-azuis ( <i>Callinectes danae</i> ) .....   | 31 |
| 3.2   | Coleta de hemolinfa.....  | 32 |
| 3.3   | Caracterizações dos hemócitos circulantes .....   | 33 |
| 3.4   | Experimentos de exposição <i>in vivo</i> .....  | 33 |
| 3.4.1 | Delineamento experimental .....   | 33 |
| 3.3.2 | Contagem total de hemócitos circulantes e viabilidade celular .....   | 34 |
| 3.3.3 | Contagem diferencial de hemócitos .....   | 35 |
| 3.3.4 | Bioacumulação total de Pb .....   | 35 |
| 3.3.5 | Expressão gênica de metalotioneínas Cobre-específicas-II, metalotioneínas<br>Cádmio-específicas-I e metalotioneínas Cádmio-específicas-II no hepatopâncreas. .... | 36 |
| 3.4   | Experimentos de Fagocitose <i>in vitro</i> .....  | 37 |
| 3.4.1 | Exposição dos hemócitos circulantes ao chumbo .....   | 37 |
| 3.5   | Análise estatística .....   | 38 |
| 4     | Resultados.....   | 39 |
| 4.1   | Caracterizações dos hemócitos circulantes.....  | 39 |
| 4.2   | Experimentos de exposição <i>in vivo</i> .....  | 41 |
| 4.2.1 | Bioacumulação total de chumbo .....   | 41 |
| 4.2.2 | Contagem diferencial de hemócitos .....   | 42 |
| 4.2.3 | Contagem total de hemócitos circulantes.....  | 43 |
| 4.2.4 | Viabilidade celular dos hemócitos circulantes .....   | 44 |
| 4.2.5 | Expressão gênica de metalotioneínas no hepatopâncreas: Isoformas MTCd-I,<br>MTCd-II e MTCu-II.....  | 45 |
| 4.3   | Experimentos de fagocitose <i>in vitro</i> .....  | 46 |

|  |    |
|--|----|
| 5 Discussão .....                                    | 49 |
| 5.1 Caracterizações dos hemócitos circulantes .....  | 49 |
| 5.2 Experimentos de exposição <i>in vivo</i> .....   | 49 |
| 5.3 Experimentos de fagocitose <i>in vitro</i> ..... | 53 |
| 6 Conclusão.....                                     | 56 |
| Referências .....                                    | 57 |

## 1 Introdução

### 1.1 Estuários e manguezais

Estuários são ambientes de transição entre os sistemas aquáticos de água doce e marinha, possuem água salobra, com salinidade que varia diariamente em função das marés, precipitações e sazonalidades fluviais (SCHAEFFER-NOVELLI, 1991). Possuem uma característica distinta de receber aporte sedimentar e nutrientes, tanto marinhos como fluviais (LUGO; SNEDAKER, 1974; SCHAEFFER-NOVELLI, 1995). São nestes ambientes que encontramos um dos mais produtivos biomas tropicais e sub-tropicais, os manguezais (SCHAEFFER-NOVELLI, 1987; 1989; 2002; TWILLEY *et al.*, 1996).

Manguezais são importantes sequestradores e estocadores de carbono na biomassa e no solo, da mesma ordem de grandeza de florestas tropicais úmidas (POR, 1994). Característico de regiões estuarinas, este bioma é reconhecido por possuir uma fitofisionomia distinta, composta por espécies arbóreas, halófitas facultativas, popularmente chamadas de “mangues”, adaptadas para sobrevivência em ambientes banhados por água salobra ou salgada, baixa disponibilidade de oxigênio e sedimento inconsolidado (SCHAEFFER-NOVELLI, 1995; TWILLEY *et al.*, 1997). As raízes aéreas presentes nestas plantas possuem pneumatóforos, que permitem a respiração em sedimentos quase anóxicos. Além disso, a estrutura aérea destas raízes consegue reter sedimentos de forma tão eficiente ao ponto de reduzirem o fluxo de entrada das águas marinhas, o que garante estabilidade e proteção contra erosão nas zonas costeiras (POR, 1994; MAITI e CHOWDHURY, 2013). Os mangues, por possuírem estas características, podem ser encontrados onde possuem seu melhor desenvolvimento, nas zonas tropical e intertropical, distribuídos por toda amplitude alcançada pelas marés de sizígia (POR, 1994; SCHAEFFER-NOVELLI, 1995; TWILLEY *et al.*, 1997; WOLFF *et al.*, 2000; PINHEIRO *et al.*, 2008; TRAMONTE, 2014).

Ecologicamente, os manguezais são essenciais para o ecossistema marinho, servindo de berçário e fornecendo condições essenciais como: abrigo, proteção e rica oferta de alimento para os primeiros estágios de desenvolvimento de diversas espécies marinhas, muitas, de importância econômica, tais como os robalos, tainhas, camarões e algumas espécies de sardinhas (POR, 1994; LAEGDSGAARD

e JOHNSON, 1995; SCHAEFFER-NOVELLI, 1995; MAITI e CHOWDHURY, 2013). Devido sua abundância, a importância das regiões estuarinas vai muito além das razões ecológicas, os manguezais também são importantíssimos financeiramente (COSTANZA et al., 1997). No Brasil, antes da invasão portuguesa, haviam diversas tribos indígenas que habitavam estas regiões. Fragmentos carbonizados de lenho de *Avicennia* sp. (mangue-preto), foram encontrados em sambaquis de aproximadamente 4900 anos, sugerindo que estas comunidades se estabeleciam em ambientes de restinga e manguezal, usufruindo de seus recursos (SCHEEL-YBERT et al., 2009). Desde a chegada dos portugueses até 1530, a colonização portuguesa se restringiu a regiões próximas de manguezais (feitorias), onde foi possível realizar intensas exportações de corantes obtidos de madeiras como o pau-brasil, e das árvores de mangue, na qual são encontradas valiosas quantidades de taninos em suas cascas. Além disso, estas regiões favoreceram o estabelecimento de pequenos povoados, permitidos graças à rica oferta de alimento provido pela pesca de peixes, crustáceos e moluscos (PETRONE, 1970). Durante a colonização, a partir do século XVI, os europeus já exploravam grandes quantidades de lenha, carvão, taninos, pescados e sal, importantes, economicamente, para os portugueses, já que estes eram recursos valiosos para o bom funcionamento dos engenhos de açúcar (PETRONE, 1970; PENTEADO, 1970; ADAS, 1976). Atualmente, além de espécies economicamente importantes no Brasil utilizarem este ambiente como berçário, comunidades caiçaras utilizam de seus recursos naturais como fonte de renda direta ou indireta, destacando também sua importância e seu papel socioeconômico (SCHAEFFER-NOVELLI, 1995; TWILLEY et al., 1997; WOLFF et al., 2000; PINHEIRO et al., 2008; TRAMONTE, 2014). Os bens e serviços prestados à humanidade por 16 diferentes biomas da biosfera foi estimado em US\$33 trilhões por ano. Os manguezais encontram-se entre os que mais fornecem bens e serviços, totalizando US\$1.6 bilhões por ano, US\$10 mil por hectare (COSTANZA et al., 1997).

Ambientes como os manguezais possuem a característica de reter sedimentos, e uma alta capacidade de reter metais, provenientes das águas das marés, rios de água doce e escoamento de águas pluviais (SILVA et al., 1990; TAM; WONG, 2000; PREDA; COX, 2002; ZHOU, 2010; LEWIS et al., 2013; HOOK et al., 2014). A construção de rodovias e aterros, sem levar em conta o livre intercâmbio hídrico necessário, é nociva aos manguezais, que, junto com a expansão

desordenada, urbana e industrial, fazem com que diversos poluentes sejam incorporados no ambiente e na teia alimentar, em concentrações além dos limites, tornando-se tóxicos, e constituindo uma fonte de poluição ambiental difusa e difícil de ser controlada (POR, 1994; LEWIS *et al.*, 2013; MAITI e CHOWDHURY, 2013).

### *1.2 Degradação ambiental*

Assim como em outros locais, a influência antrópica tem afetado os manguezais brasileiros. A expansão portuária, esgotos sem tratamento, carcinicultura (cultivo de camarões, comumente realizado em regiões estuarinas), o crescimento urbano e a expansão industrial no geral são apenas alguns dos fatores responsáveis pela degradação destes biomas (LEWIS *et al.*, 2013; MAITI e CHOWDHURY, 2013; HOOK *et al.*, 2014). Desde a revolução industrial, diversos avanços tecnológicos têm contribuído para exploração de recursos naturais e o desenvolvimento da qualidade de vida da espécie humana. O crescimento exponencial da população exige grande quantidade de recursos, o que por sua vez, sobrecarrega os sistemas ecológicos (HOGARTH, 2007; UCHIYAMA, 2016; OZCAN *et al.*, 2019).

Ozcan e colaboradores (2019) discutem a relação entre o crescimento econômico, o consumo de energia e a degradação ambiental, demonstrando que o crescimento econômico interage diretamente com o meio ambiente, se o consumo de energia do país for exacerbado e, principalmente, se for obtido por combustíveis fósseis (como no Brasil). Embora o crescimento econômico possa causar danos ambientais, um país economicamente desenvolvido pode melhorar sua situação ambiental com aquisição de novas tecnologias de produção e serviços ecológicos. Entretanto, a perda de recursos ambientais finitos pode ser catastrófica, se considerarmos diferentes biomas e suas interações com o solo, o clima e a fauna residente, tais como os manguezais (UCHIYAMA, 2016; OZCAN *et al.*, 2019).

Uma vez que os recursos naturais finitos são utilizados, o meio ambiente fica comprometido, por outro lado, isto pode fortalecer a economia de um país. O caminho para um bom desenvolvimento deve considerar não a troca, mas a coexistência do crescimento econômico e urbano com o meio ambiente, ainda que pareça utópico, se as políticas ambientais forem aplicadas apropriadamente e os

recursos ambientais finitos, respeitados, a interdependência do crescimento econômico e a degradação ambiental poderiam ocorrer de forma harmônica, com o uso de tecnologias e meios de produção menos agressivos (UCHIYAMA, 2016; OZCAN *et al.*, 2019). Lima e Rueda (2018) relacionaram a rápida expansão urbana do estado de São Paulo com o clima, onde foi possível relacionar a redução da precipitação com o aumento da temperatura ao longo dos anos, indicando que a degradação ambiental proporcionada pela expansão urbana, pode afetar o microclima da cidade, reduzindo, de certa forma, a qualidade de vida de seus habitantes. Além de problemas com o clima, a expansão urbana, quando má organizada, pode contribuir para degradação ambiental, com descartes inadequados de resíduos, que introduzem, cada vez mais, poluentes ao meio ambiente, podendo constituir fontes difusas de poluição, de difícil controle e remediação (HOGARTH, 2007).

A resolução do CONAMA Nº 001/1986 considera “impacto ambiental”, como qualquer alteração das propriedades físicas, químicas e biológicas do meio ambiente, causada por qualquer forma de matéria ou energia resultante das atividades humanas que, direta ou indiretamente, afetam:

- I – A saúde, a segurança e o bem-estar da população;
- II – As atividades sociais e econômicas;
- III – A biota;
- IV – As condições estéticas e sanitárias do meio ambiente;
- V – A qualidade dos recursos ambientais.

A legislação brasileira, referente a impactos ambientais, é bem vista em todo mundo, entretanto, a fiscalização nem sempre é eficaz para o cumprimento destas leis, e mais estudos que verifiquem a real situação da biota.

### *1.3 Poluentes metálicos: Chumbo (Pb)*

Os metais estão naturalmente presentes no ambiente marinho, em concentrações que não afetam o ciclo de vida da fauna, conhecidos como metais-traço. Alguns, como o Manganês, Zinco, Cobre, Bromo e Selênio são, inclusive, de

importância biológica para diversas funções fisiológicas, porém, o descarte incorreto de produtos contendo estes metais pode elevar as concentrações presentes no ambiente, tornando sua presença tóxica e prejudicial (PEIJNENBURG; JAGER, 2003; HOGARTH, 2007; LEWIS *et al.*, 2013; MAITI e CHOWDHURY, 2013).

O chumbo, do latim *plumbum* (Pb), é um metal sem função biológica e altamente persistente na natureza quando comparado com outros metais. É um elemento metálico tóxico, mesmo em pequenas quantidades (SINGH *et al.*, 2018). É macio, maleável e pobre condutor de eletricidade. Possui coloração branco-azulada, e acinzentada quando exposto ao ar (ICZ, 2019). Considerando suas propriedades, o Pb é comumente utilizado na construção civil, em baterias, munição para armamentos, na medicina é empregada para proteção contra raios-X, e forma parte de ligas metálicas para produção de soldas, fusíveis, revestimentos de cabos elétricos, materiais antifricção, metais de tipografia, como peso de redes de pesca, em pigmentos de tintas etc. Suspeita-se que o chumbo é utilizado por, pelo menos, 7000 anos, uma vez que é um metal de fácil extração, comum, altamente maleável, por ser dúctil e ter baixo ponto de fusão (327°C). Tais características fizeram do Pb, um metal importante para diversas sociedades ao longo do tempo (ICZ, 2019; SINGH *et al.*, 2018; MARTÍN, 2018).

Na Roma antiga, o chumbo era comumente utilizado em diversos objetos e hábitos diários. Era comum a ingestão de alimentos e bebidas contaminadas com Pb. A fervura do vinho era realizada em recipientes feitos de Pb, formando o acetato de chumbo (conhecido como “o açúcar do chumbo”), que ajudava na preservação, inibindo a ação e crescimento de microorganismos, além de reduzir acidez do vinho, fato este, comum na aristocracia amante do vinho (MARTÍN, 2018). As mulheres egípcias utilizavam a galena (PbS) como cosmético, objetivando escurecer os olhos. Tanto mesopotâmicos como romanos utilizavam talheres e pratos confeccionados por Pb, além dos encanamentos romanos, que por muito tempo, foi uma fonte de contaminação, fato este, que causava, o que, na época, era conhecido como “saturnismo”, que nada mais é do que a contaminação com elevados níveis de Pb no organismo. Diversos imperadores romanos foram descritos portando algum dos sintomas proporcionados pelo saturnismo (MARTÍN, 2018). A partir de 1922, o Pb na forma de Chumbo Tetraetila começou a ser misturado na gasolina, melhorando o desempenho de motores automobilísticos, conferindo-lhes maior potência e maior economia (LANDRIGAN, 2002). Entretanto, a contaminação por Pb cresceu em

níveis alarmantes, principalmente entre os funcionários que trabalhavam no preparo desta mistura. Desde então, os EUA tiveram que intervir mudando esta prática (LANDRIGAN, 2002).

Naturalmente, o Pb pode ser encontrado em rochas como a galena (PbS), entre as fontes antropológicas deste metal, podem ser incluídas atividades industriais, combustão de petróleo, baterias, cerâmicas, produção de tintas e diversos processos de mineração (PATRA *et al.*, 2011; SINGH *et al.*, 2018). Os meios de exposição ao Pb incluem o ar, água, solo e via teia alimentar, abrangendo amplamente os sistemas biológicos (LEVIN; GOLDBERG, 2000; MITRA *et al.*, 2017; SINGH *et al.*, 2018). Já foram observados efeitos extremamente danosos ao organismo humano quando exposto ao Pb, como por exemplo anemias (danos na biossíntese de hemoglobina), falhas renais (danos no processo de filtragem do sangue), infertilidade masculina (danos aos espermatozoides), e diversos efeitos neurotóxicos, como redução de aprendizado em crianças, mudanças comportamentais (agressão, impulsividade e hipersensibilidade), dentre diversas outras alterações deletérias em neurônios do sistema nervoso central (HAMMOND, 1977; ICZ, 2019; SINGH *et al.*, 2018).

Episódios de contaminação ambiental têm recebido muita atenção, principalmente se considerarmos o aumento da presença de poluentes, cada vez mais abundantes na natureza. Estratégias que possam prever, mitigar ou quantificar impactos ambientais têm recebido grande atenção em diversos países. Entre estas estratégias, destacamos o biomonitoramento ambiental (MAIA *et al.*, 2006; CONTI, 2008).

O biomonitoramento ambiental (uso de organismos para identificação de alterações da qualidade ambiental) tem sido aprimorado nas últimas décadas (CONTI, 2008; HOOK *et al.*, 2014). Espécies cosmopolitas, que possam refletir o estado do ambiente em que vivem (bioindicadores), podem indicar a disponibilidade de contaminantes em função do tempo e dos locais de estudo (CONTI, 2008). Além disso, o uso de biomarcadores, que de acordo com Hook e colaboradores (2014), são alterações bioquímicas e teciduais indicadoras de alterações fisiológicas, podem evidenciar a presença e efeitos de determinados poluentes (SMIT *et al.*, 2009; HOOK *et al.*, 2014), sendo de grande importância o aprofundamento e conhecimento de alterações fisiológicas, com potencial biomarcador, frente a esses poluentes. No caso de ambientes como os estuários, diversos animais, de ampla ocorrência,



podem ser utilizados como bioindicadores, tais como os siris-azuis, que são abordados em diversos estudos na investigação de contaminação por metais, como realizado em *Callinectes* ssp. por Andrade e colaboradores (2011), Rossi (2009), Reichmuth e colaboradores (2010), Jop e colaboradores (1999), e, especificamente, com a espécie *Callinectes danae*, como feito por Harris e Santos (2000), Virga e colaboradores (2007), Virga e Geraldo (2008), Bordon e colaboradores (2012a), Bordon e colaboradores (2012b); Bordon, 2014; Bordon e colaboradores (2016); Lavradas e colaboradores (2014).

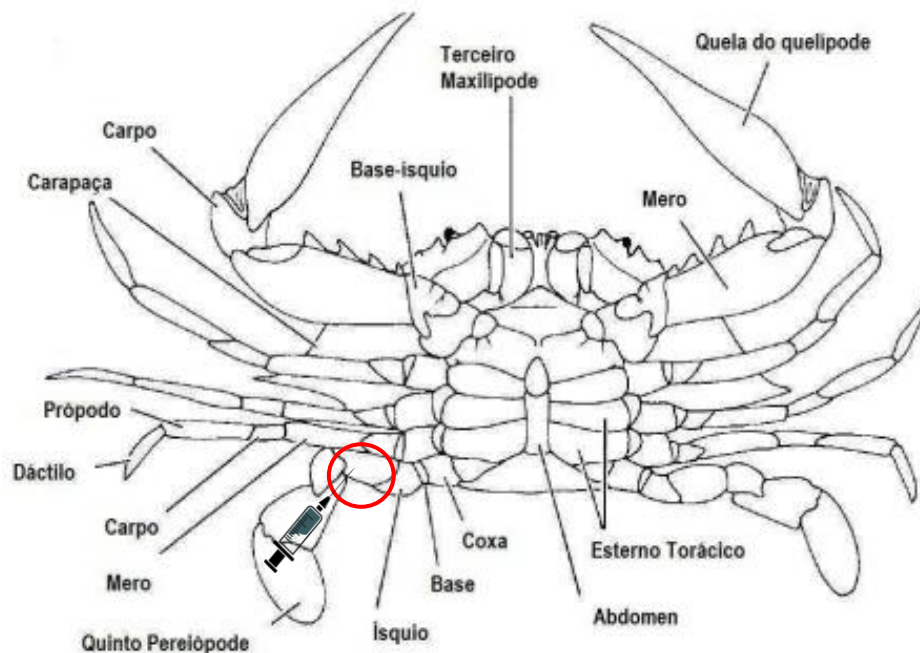
#### 1.4 Siris-azuis (*Callinectes danae*)

Entre os animais afetados, os crustáceos podem facilmente incorporar substâncias contaminantes, sendo considerados pelo Litterbase (2018), uns dos grupos animais mais afetados pela poluição marinha. Dentre eles, o gênero *Callinectes* sp. (Crustacea - Portunidae), abriga as espécies popularmente conhecidas como “siris-azuis”. São animais típicos de regiões estuarinas e amplamente distribuídos em regiões tropicais e subtropicais, além de possuir extrema importância ecológica por serem bentônicos, detritívoros e onívoros oportunistas, servindo também como um elo na teia trófica por serem tanto predadores como presas. Os siris da família Portunidae, que inclui as espécies do gênero *Callinectes*, possuem carapaça ovalada e achatada dorso-ventralmente com presença de espinhos, dois pares de patas modificadas denominadas quelípodes (com formato de pinças), quatro pares de patas denominados pereiópodes, onde o último par, por ser achatado, é utilizado para natação (HICKMAN *et al.*, 2004; BRUSCA; BRUSCA, 2011).

A espécie *Callinectes danae* Smith, 1869 (Figura 1), distribui-se por todo Atlântico ocidental, apresentando grande tolerância à salinidade, ocupando áreas estuarinas e de mar aberto, da região entre-marés até 75 m de profundidade (MELO, 1996). Possuem dimorfismo sexual (formato do abdome), e as fêmeas possuem comportamentos específicos quanto à migração para áreas marinhas, de modo a permitir a eclosão dos ovos. Por este motivo, machos foram escolhidos como biomonitores em áreas estuarinas (BORDON *et al.*, 2016). Devido sua biologia, os siris-azuis estão diretamente em contato com metais disponíveis no ambiente (água,

solo e teia trófica), podendo assim, serem considerados ótimos bioindicadores de alterações ambientais (em estuários), (VIRNSTEIN, 1979; JOHNSON, 1980; LAUGHLIN, 1982; WILLIAMS *et al.*, 1994; MELLO, 1996; PERKINS-VISSER *et al.*, 1996; CLARK *et al.*, 1999; RINDERHAGEN *et al.*, 2000; HINES, 2007; LAVRADAS, 2014).

Figura 1: Anatomia externa de indivíduo macho do siri-azul *Callinectes danae*. Circulo vermelho evidencia o local de coleta da hemolinfa (Entre as articulações do último par de pereiópodes).



Fonte: Brusca; Brusca, 2011.

### 1.5 Imunidade inata celular dos crustáceos

Os animais invertebrados, no geral, possuem apenas imunidade inata, não possuindo anticorpos específicos e células de memória, que compõem a imunidade adaptativa dos vertebrados (BAUCHAU, 1981). O mesmo se aplica aos crustáceos decapodas, que possuem um sistema circulatório do tipo aberto, por onde circula a hemolinfa composta pela fração celular (hemócitos), e a fração acelular (plasma), onde estão dissolvidos os fatores humorais (BAUCHAU, 1981; RATCLIFFE, 1985; BACHERE *et al.*, 1995; JOHANSSON, 2000).

A imunidade inata, mediada por células, foi bastante estudada em diversas espécies de crustáceos, onde foram observadas grandes diferenças na morfologia e

função dos diferentes tipos celulares. Para a Classe *decapoda*, três principais tipos celulares já foram descritos. Os hemócitos podem ser classificados de acordo com sua morfologia, sendo subdivididos em: hialinócitos (HC), semi-granulócitos (SGC) e granulócitos (GC). Estas células têm origem no tecido hematopoiético, presente próximo ao estômago cardíaco, onde também é sintetizado o pigmento responsável pelo transporte dos gases necessários para respiração, a hemocianina (JOHANSSON, 2000; CLARE; LUMB, 1994).

Diversos autores caracterizaram os hemócitos presentes em decapodas, onde é possível observar diferenças, na morfologia e função, de acordo com a espécie estudada. A proporção celular (HC, SGC e GC) da hemolinfa é frequentemente utilizada como índice de condição fisiológica de crustáceos e, portanto, fornecem informações importantes sobre a homeostase dos indivíduos (CLARE; LUMB, 1994; HARDY; DEPLEDGE, 1999; JOHANSSON, 2000). Detalhes da hematologia de crustáceos, incluindo a função de cada tipo de célula, divergem de espécie para espécie, e foram descritos por alguns autores (BACHAU, 1981; RATCLIFFE *et al.*, 1985, BACHERE *et al.*, 1995). Desta forma, avaliar e identificar qualquer alteração na resposta imunológica dos hemócitos, poderá fornecer dados importantes referentes à imunidade inata mediada por células nestes animais.

### 1.6 Fagocitose

Entre as principais funções dos hemócitos, podemos destacar a fagocitose, comumente abordada como principal função dos semigranulócitos e hialinócitos. A fagocitose, pode ser definida como o processo pelos quais partículas, geralmente maiores que 0,5  $\mu\text{m}$  de diâmetro, são englobadas (MAY; MACHESKY, 2001). As funções desse processo são diversas: remoção de células em apoptose, remodelamento tecidual e defesa imune com a eliminação de microrganismos e partículas estranhas ao organismo (YUTIN *et al.*, 2009). É um processo complexo e dinâmico, que pode ser didaticamente dividido em três fases: reconhecimento, captura e degradação da partícula, além de ser um processo filogeneticamente conservado (FLANNAGAN *et al.*, 2012). Durante esse processo, células especializadas são responsáveis por englobar partículas estranhas ao organismo e

transportá-las do meio extracelular para vacúolos intracelulares (fagolisossomos), onde são então, degradadas (HENRICKS; EESTERMANS, 1986).

A capacidade destrutiva impressionante desempenhada pelo fagolisossomo é atribuída à atividade combinada de vários efetores, incluindo enzimas hidrolíticas, oxidantes e peptídeos catiônicos (FLANNAGAN *et al.*, 2012). Além disso, geralmente tem a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) e, em alguns tipos celulares, como neutrófilos em mamíferos, tem a liberação de peptídeos antimicrobianos que contribuem, juntamente com os outros efetores para a morte e degradação do microrganismo fagocitado (SWANSON *et al.*, 2010). Considerando que estuários e manguezais são ambientes ricos em matéria orgânica e bactérias decompositoras, os processos de fagocitose nos crustáceos têm grande importância, pois constitui uma barreira de proteção que, uma vez reduzida, deixa os organismos susceptíveis a bactérias e patógenos. Compreender como este processo ocorre em cada espécie, e como os poluentes afetam seu funcionamento pode ser uma importante ferramenta para o monitoramento da saúde da fauna.

### 1.7 Metalotioneínas

Dentre as proteínas com potencial biomarcador de metais essenciais e não-essenciais, as metalotioneínas (MT) são comumente utilizadas. São proteínas ricas em cisteínas, envolvidas na homeostase e desintoxicação de metais de baixo peso molecular (MARGOSHES; VALLEE, 1957; NORDBERG, 1998; KAGI, 1993; JENNY *et al.*, 2004; JENNY *et al.*, 2006; SUTHERLAND; STILLMAN, 2011). Segundo Engel e Brouwer (1987; 1991), as MTs podem ser moduladas de acordo com ciclo de mudas, sazonalidade, tamanho e sexo, mas também são expressas na presença elevada de metais como Cobre, Cádmio e Zinco, conforme demonstram trabalhos em decapodas (PEDERSEN *et al.*, 1997; LEGRAS *et al.*, 2000; MOUNEYRAC *et al.*, 2001; MARTINS; BIANCHINI, 2009; LAVRADAS *et al.*, 2014). Entretanto, poucos estudos relatam a expressão gênica de MTs após a exposição de Pb em crustáceos, embora essa interação já tenha sido observada em peixes, conforme descrito por Kim e Kang (2017), onde observaram aumento da expressão gênica de MTs, conforme aumento da concentração de Pb, sugerindo assim, uma correlação direta de sua expressão com o aumento da concentração de Pb.

Syring e colaboradores (2000) identificaram três isoformas de metalotioneínas no siri-azul *Callinectes sapidus*, e pesquisaram a especificidade destas MTs com o Cadmio-Cd (metal não essencial), o Cobre-Cu e o Zinco-Zn (metais essenciais). Neste estudo, a isoforma por nós chamada, de MTCd-I, foi descrita como específica, ou seja, foi modulada, pela presença de Zn, Cd e Cu. A MTCd-II foi específica para Zn e Cd, e a MTCu-II, específica para Cu, apenas. Recentemente, Bordon e colaboradores (2018), demonstraram indução de MTs totais após contaminação de Pb por água, alimentação e água + alimentação, entretanto, não foi identificada a isoforma específica modulada pela presença de Pb.

Diversos trabalhos verificaram a presença de metais em *Callinectes* sp. (VIRGA, 2006; VIRGA *et al.*, 2007; BORDON *et al.*, 2012a, 2012b, 2016). Todavia, aspectos imunológicos e moleculares referentes à exposição destes metais têm recebido pouca atenção, principalmente para espécie alvo deste estudo, *C. danae*. Identificar alterações fisiológicas influenciadas pela contaminação de metais como o Pb, pode fornecer dados valiosos sobre a dinâmica de detoxificação deste metal, abrindo oportunidades de novos campos de estudo, na busca de novas ferramentas para pesquisas no monitoramento da saúde da fauna. Considerando, uma vez que, o ambiente esteja contaminado com baixas concentrações de determinados metais, não necessariamente a fauna encontra-se saudável.

Desta forma, entender os efeitos do Pb em diferentes parâmetros nestes animais no ambiente laboratorial, contribui não só para melhor compreensão do impacto nesta espécie, mas também com novas ferramentas para o monitoramento ambiental de estuários, utilizando diferentes biomarcadores.

## 2 Objetivo

Investigar os efeitos fisiológicos da contaminação por chumbo em diferentes níveis de complexidade celular.

### 2.1 Objetivos específicos

- A) Verificar possíveis efeitos da contaminação por chumbo, em exposições *in vivo* na:
- I. Imunidade inata celular;
  - II. Bioacumulação de Pb nas brânquias, hepatopâncreas e músculos;
  - III. Expressão gênica de metalotioneínas nas brânquias, hepatopâncreas e músculos.
- B) Verificar possíveis efeitos da contaminação por chumbo nos hemócitos circulantes presentes na hemolinfa, por meio de exposições *in vitro*.

### 3 Materiais e Métodos

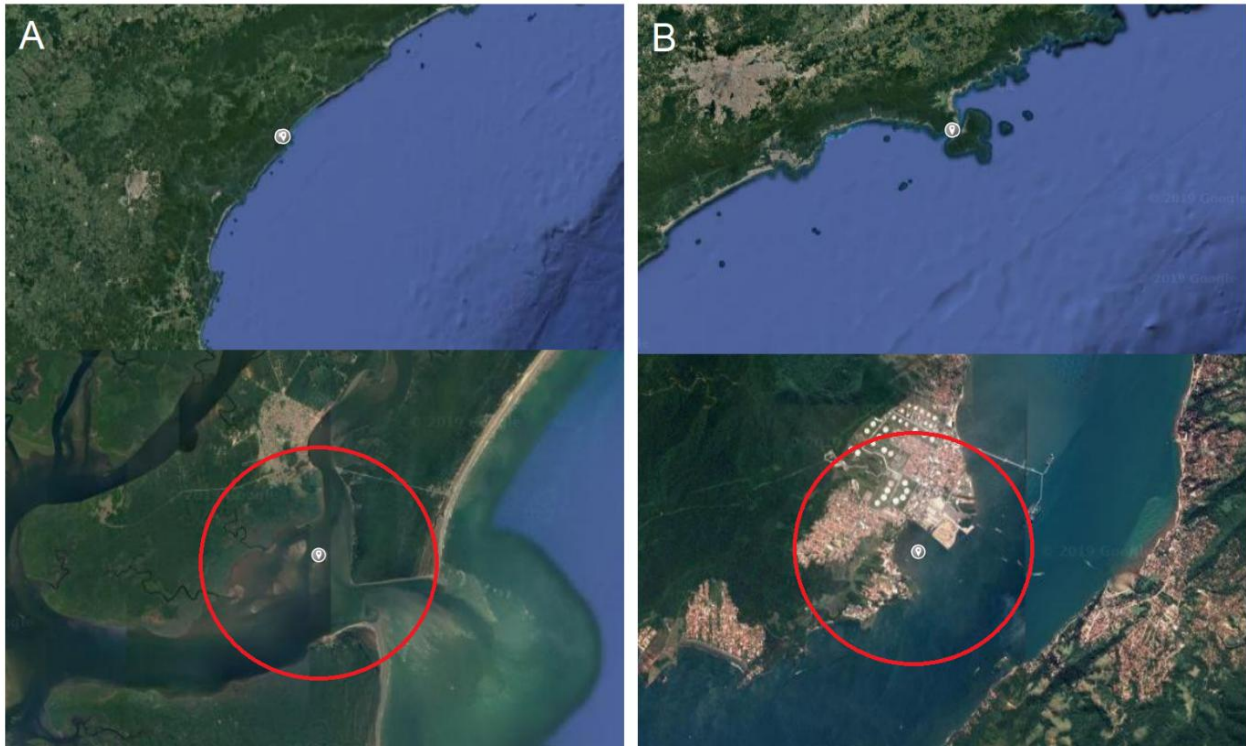
#### 3.1 Coletas de siris-azuis (*Callinectes danae*)

De acordo com a autorização concedida pelo ICMBio (nº 59883-4), siris-azuis da espécie *C. danae* foram coletados (Figura 2), utilizando redes de arrasto e armadilhas, na porção sul de Cananéia – SP (25°03'01.2"S - 47°55'50.9"W), considerada pelo ICMBio, como área de proteção ambiental, abrangendo os municípios de Cananéia, Iguape e Peruíbe. Para comparação dos dados obtidos com os experimentos *in vitro*, dos animais coletados em Cananéia, foi escolhido um segundo local de coleta, a baía do Araçá em São Sebastião – SP (23°48'52.2"S 45°24'17.0"W), uma vez que, além de ser um dos últimos locais remanescentes de manguezal do litoral norte do estado de São Paulo, apresenta diversas influências antrópicas, tais como três emissários de esgoto submarino, um porto comercial e o maior terminal de petróleo do Brasil (Pereira, *et al.*, 2009; Muniz *et al.*, 2015; Kim *et al.*, 2018).

Indivíduos adultos (machos) foram coletados no período da intermuda, identificados, medidos e pesados (Tabela 1), de acordo com os manuais de identificação propostos por Melo (1996) e Willians (1974). Todos os indivíduos foram transportados vivos até o biotério de animais aquáticos do Laboratório de Histofisiologia Evolutiva do ICB – USP.

Os animais utilizados nos experimentos de exposição *in vivo* foram mantidos em aquários individualizados, preenchidos com 5 L de água artificialmente salinizada, provida de um tanque estoque de 500 L (Salinidade: 25,0 ± 1,0 ppm; pH: 7,5 ± 0,5; Temperatura: 25,0 ± 4,0°C), cujo conteúdo foi previamente analisado quanto a presença basal de Pb (<LD; LD = 0,003 µg/mL). Os animais utilizados nos experimentos de exposição *in vitro*, foram mantidos em tanque de 500 L, com água do mar fornecida pelo CEBIMAR – USP (Salinidade: 35,0 ± 0,5 ppm; pH: 7,9 ± 0,2; Temperatura: 25,0 ± 2,0°C). Ao serem condicionados em laboratório, todos os animais permaneceram em aclimatação por 5 dias.

Figura 2: Locais de coleta dos siris-azuis (*Callinectes danae*). A: Região sul do complexo estuarino lagunar de Cananéia-Iguape (25°03'01.2"S 47°55'50.9"W). B: Baía do Araçá - São Sebastião (23°48'52.2"S 45°24'17.0"W). Ponto cinza e círculo vermelho indicam a área utilizada para coleta.



Fonte: Google Maps, acesso em jan. 2020.

Tabela 1: Parâmetros morfométricos dos siris-azuis (*Callinectes danae*) coletados para os experimentos *in vivo* e *in vitro*. Dados de peso (g), largura da carapaça sem os espinhos (cm), comprimento da carapaça (cm), e número de indivíduos utilizados por experimento (*n*). Dados apresentados em médias  $\pm$  desvio padrão.

| Experimentos de exposição ao Pb | Peso (g)          | Largura S/E (cm) | Comprimento (cm) | <i>n</i> |
|---------------------------------|-------------------|------------------|------------------|----------|
| <i>In vitro</i>                 | 75,38 $\pm$ 22,13 | 8,18 $\pm$ 1,02  | 4,83 $\pm$ 0,42  | 27       |
| <i>In vivo</i>                  | 81,64 $\pm$ 13,58 | 8,38 $\pm$ 0,53  | 4,86 $\pm$ 0,44  | 77       |

### 3.2 Coleta de hemolinfa

A hemolinfa dos indivíduos foi coletada entre as articulações dos últimos pares de pereópodes (Figura 1). Para isso, foram utilizadas seringas de 1 mL, contendo anticoagulante ACD-B, livre de EDTA (4,8 g/L de ácido cítrico, 13,2 g/L de citrato de sódio, 14,7 g/L de dextrose, 1,2 g/L de cloreto de sódio) na proporção 1:1, conforme indicado por Zhou (2018). Imediatamente após extração, a hemolinfa foi centrifugada a 700 G, 4,0°C, por 10 min.

Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado, e os hemócitos, ressuspensos em água do mar filtrada a 0,2  $\mu$ m (AMF).



### 3.3 Caracterizações dos hemócitos circulantes

Uma vez que, a maioria das referências disponíveis sobre a identificação de hemócitos é referente a outras espécies de decápodes, e que há uma lacuna da caracterização destas células, especificamente para espécie *C. danae*, decidimos definir como um dos objetivos do presente trabalho, a diferenciação morfológica das células circulantes da hemolinfa, a proporção de cada tipo celular e a sua capacidade fagocítica.

Para a montagem das lâminas, 100 µL de hemolinfa foi depositada no citospin modelo Fanem 3400, centrifugada a 700 G por 10 min e fixadas com paraformaldeído 4%. Posteriormente, as lâminas foram coradas com as técnicas de H.E. (Hematoxilina e Eosina) e Faloidina + DAPI, para análises sob microscopia de luz e fluorescência. Lâminas também foram feitas sem o uso de citospin para visualização a fresco com contraste de fase.

Para caracterização das populações de hemócitos, foram utilizados parâmetros como a presença ou ausência de grânulos, morfologia, afinidade por corantes (hematoxilina e eosina) e tamanho relativo entre o núcleo e citoplasma. Os dados obtidos foram comparados com o descrito na literatura para espécies filogeneticamente próximas.

### 3.4 Experimentos de exposição *in vivo*

#### 3.4.1 Delineamento experimental

As exposições *in vivo* ao Pb foram divididas em dois experimentos, de acordo com a abordagem das análises realizadas. O experimento 1, foi feito em cooperação com o projeto FAPESP nº 2014/01576-6, abordando análises de bioacumulação total de Pb e expressão gênica de metalotioneínas (n=4), e o experimento 2, foi para análises dos hemócitos circulantes (n=3).

Os siris-azuis coletados permaneceram 5 dias em aclimatação, com renovação total da água, e alimentação com 1 g de camarão, em dias alternados. Tanto água como alimento, foram previamente analisados quanto a presença basal

de Pb pelo Laboratório de Absorção Atômica do LAN/IPEN-USP. Após este período, os animais foram distribuídos em diferentes grupos experimentais.

Considerando publicações recentes de Bordon e colaboradores (2018), e a resolução nº 357 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA 347/2005), foi escolhida a concentração de 2 µg/mL de Pb para os ensaios de exposição *in vivo*, considerando uma condição de impacto, sem letalidade. Para tanto, foi utilizada solução ultrapura padrão de Pb (Perkin/Elmer) com a concentração inicial de 10000 µg/mL e posteriormente diluída na água dos aquários para concentração final de 2 µg/mL. Foram utilizados grupos de diferentes tempos de exposição: 24h, 48h e 96h, com seus respectivos controles.

Como método de controle das diluições realizadas e para conhecimento das concentrações reais de Pb presentes na água, 4 aquários foram analisados por espectrometria de absorção atômica, no período de 0h. Os dados em média ± desvio padrão das concentrações de Pb foram 1,999 ± 0,097 µg/mL, evidenciando a precisão das diluições realizadas.

Ao término dos experimentos, os animais, mantidos em gelo a 4,0°C, foram sacrificados e amostras das brânquias, hepatopâncreas, músculos e hemolinfa, foram coletadas para análises.

Todos os materiais e líquidos contaminados com Pb foram devidamente destinados ao descarte correto, conforme definido pela Comissão de Segurança Química do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

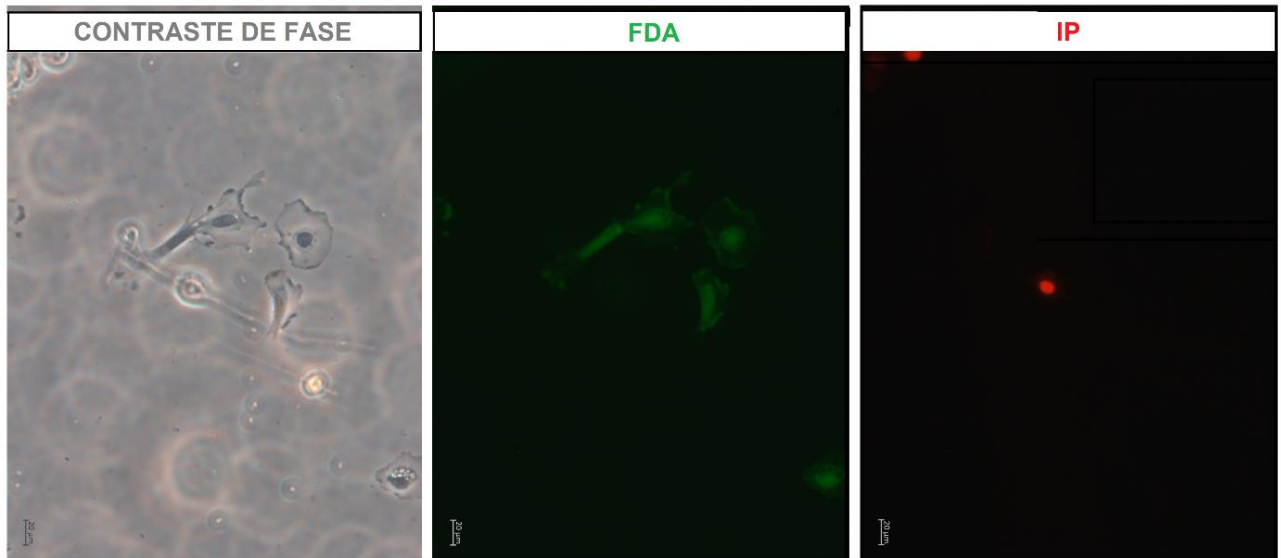
### 3.3.2 Contagem total de hemócitos circulantes e viabilidade celular

Foi preparada uma solução com diacetato de fluoresceína (5 mg/mL) e iodeto de propídeo (2 mg/mL) diluídos em AMF (FDA+IP), para identificação das células vivas (FITC) e mortas (Rhod), com auxílio do microscópio de fluorescência Zeiss standard 25 – com fluorescência e filtro U-MWU.

Após coletada, a hemolinfa foi adicionada à solução de FDA+IP na proporção 1:1, e analisada em câmara de Neubauer para contagem total de hemócitos circulantes, considerando a proporção de hemócitos vivos e mortos por mL (Figura 3), de acordo com a fórmula abaixo:

$$\frac{\text{N}^\circ \text{ Hemócitos} \times \text{Fator de diluição} \times 10000}{\text{N}^\circ \text{ Quadrantes contados}}$$

Figura 3: Viabilidade celular dos hemócitos do siri-azul (*Callinectes danae*) utilizando microscopia de luz, com contraste de fase. Marcador de viabilidade celular, diacetato de fluoresceína (FDA), indicando células vivas. Marcador de mortalidade celular, iodeto de propídeo (IP), indicando o núcleo células mortas. Barra de escala: 20  $\mu$ m.



### 3.3.3 Contagem diferencial de hemócitos

A contagem diferencial das populações de hemócitos, após exposição ao Pb, foi realizada por citometria de fluxo, onde  $1 \times 10^5$  hemócitos foram centrifugados à 200 G, 4,0°C, por 10 min. O sobrenadante foi descartado, e os hemócitos, ressuspensos em paraformaldeído 4%. Posteriormente, os hemócitos foram analisados com o citômetro Guava c6plus, considerando tamanho e complexidade intracelular. Como método complementar para o conhecimento das populações de hemócitos presentes na hemolinfa, foi realizado também, contagem diferencial de hemócitos fixados e corados com H.E. de 10 indivíduos controle, na qual 100 células foram diferencialmente contabilizadas com auxílio do microscópio Zeiss standard 25.

### 3.3.4 Bioacumulação total de Pb

Após as exposições ao chumbo, brânquias, hepatopâncreas e músculos foram coletados (1 g de cada tecido) e digeridos em mistura ácida (10 mL de HNO<sub>3</sub>). Para isso, foi utilizado o sistema de micro-ondas (CEM Corporation, modelo MARS 6). Após resfriamento, os extratos foram transferidos para frascos, e o volume completado para 10 mL com água Milli-Q, a 18 MΩ.cm, em 25°C. O Pb foi

mensurado com uso de espectrômetro de absorção atômica com forno de grafite Perkin Elmer (modelo Analyst 800), do Laboratório de Absorção Atômica do LAN/IPEN-USP. A validação dos métodos foi realizada através de análise de material de referência certificado (Musseltissue - NIST 2976). O limite de detecção (LD) foi calculado de acordo com a equação descrita em INMETRO (2011):

$$LD = \text{média} + t(n-1; 1-\alpha) \times DP$$

Média = média de concentrações medidas em 7 brancos

t = valor de t de Student de acordo com os graus de liberdade (n-1) e  $\alpha = 0,05$

DP = desvio padrão das concentrações medidas em 7 brancos

### 3.3.5 Expressão gênica de metalotioneínas Cobre-específicas-II, metalotioneínas Cádmio-específicas-I e metalotioneínas Cádmio-específicas-II no hepatopâncreas.

O RNAm total do hepatopâncreas foi extraído pela técnica de trizol, e quantificado de acordo com o método adaptado descrito por Gao e colaboradores (2012). O cDNA foi obtido através de transcrição reversa, utilizado o Kit High-Capacity cDNA (AppliedBiosystems).

Uma vez que as sequências genéticas e das proteínas de MTCu-II, MTCd-I e MTCd-II ainda não estavam disponíveis para *C. danae*, foi inicialmente assumida a conservação e homologia com *Callinectes sapidus*, cujas sequências completas estão depositadas no National Center for Biotechnology (NCBI). Deste modo, os primers degenerados para estas MTs foram desenhados com base nas sequências depositadas para *C. sapidus* (SYRING *et al.*, 2000). A especificidade dos produtos foi determinada após reação de RT-PCR, através do peso molecular esperado das bandas em corrida eletroforética. As bandas específicas foram então purificadas com PureLink Kit (Invitrogen), de acordo com as especificações do fabricante. Uma vez purificado, o produto da reação foi sequenciado por meio do sequenciamento de Sangers.

As sequências resultantes corresponderam com as regiões codificantes para *C. danae*, com sua autenticidade confirmada, após comparação com as sequências disponíveis para *C. sapidus* no NCBI. Uma vez identificadas, essas sequências

foram utilizadas para o desenho de primers específicos para *C. danae*. Como controle endógeno foram utilizados primers para  $\beta$ -actina existentes para *C. danae*.

|                 |   |
|-----------------|---|
| CuMTII          | Sense – GTAATTGCACCACCTGTCC<br>Antisense – CTTCATTGGGCATGGGCT     |
| CdMTI           | Sense – TTCTTGCTGCCCAAAGTAGAC<br>Antisense – TGATGGACAGTCAAGGTCAG |
| CuMTII          | Sense – GACAGGGTGTAAGTGCAAGTC<br>Antisense – ACTCCTCCTTGCTAC AC   |
| $\beta$ -Actina | Sense – TCTCTTCCAGCCTTCCTTCC<br>Antisense – GGTGATTCCTTCTGCATCCTG |

O PCR quantitativo em tempo real (qPCR) foi realizado de acordo com descrito por Mao e colaboradores (2012), e utilizou-se o reagente Fast SYBR® Green PCR Master Mix (AppliedBiosystems). A expressão gênica relativa foi calculada pelo  $\Delta\Delta CT$  conforme descrito por Livak e Schmittgen (2001).

### 3.4 Experimentos de Fagocitose *in vitro*

#### 3.4.1 Exposição dos hemócitos circulantes ao chumbo

Para os experimentos de fagocitose *in vitro* (n=4), a hemolinfa de três indivíduos foi coletada e depositada em tubos de 50 mL, mantidos em gelo a 4,0°C. Uma diluição foi realizada para contagem de hemócitos por mL em câmara de Neubauer. Após contagem, o volume presente nos tubos de coleta foi ajustado para concentração desejada de  $5 \times 10^4$  hemócitos por mL.

Os hemócitos foram transferidos para placa de 24 poços, contendo volume final de 1 mL. A placa foi incubada em ambiente escuro por 30 min a 25,0°C, para adesão celular. Após este período, o meio foi trocado por AMF contendo as seguintes concentrações de chumbo: 0, 50, 100, 250, 500 e 1000 ng/mL. As placas foram incubadas novamente, em ambiente escuro, por 1h a 25,0°C.

Após o período de exposição, o meio de cultura contendo as concentrações de Pb, foi trocado por AMF contendo  $5 \times 10^5$  leveduras *Saccharomyces cerevisiae* (proporção de 10 leveduras para cada hemócito) e incubadas novamente em ambiente escuro, por 1h, a 25,0°C, para realização da fagocitose. Após este período, os hemócitos foram fixados em paraformaldeído 4% e corados com a técnica de Rosenfeld, para visualização das leveduras fagocitadas.

Para avaliação da capacidade fagocítica, foram contabilizados 100 hemócitos diferenciados quanto a presença/ausência de leveduras internalizadas em seu citoplasma, utilizando a fórmula abaixo:

$$\text{Capacidade Fagocítica (\%)}: \frac{\text{n}^\circ \text{ de Hemócitos fagocitando}}{\text{n}^\circ \text{ de Hemócitos totais}}$$

### 3.5 Análise estatística

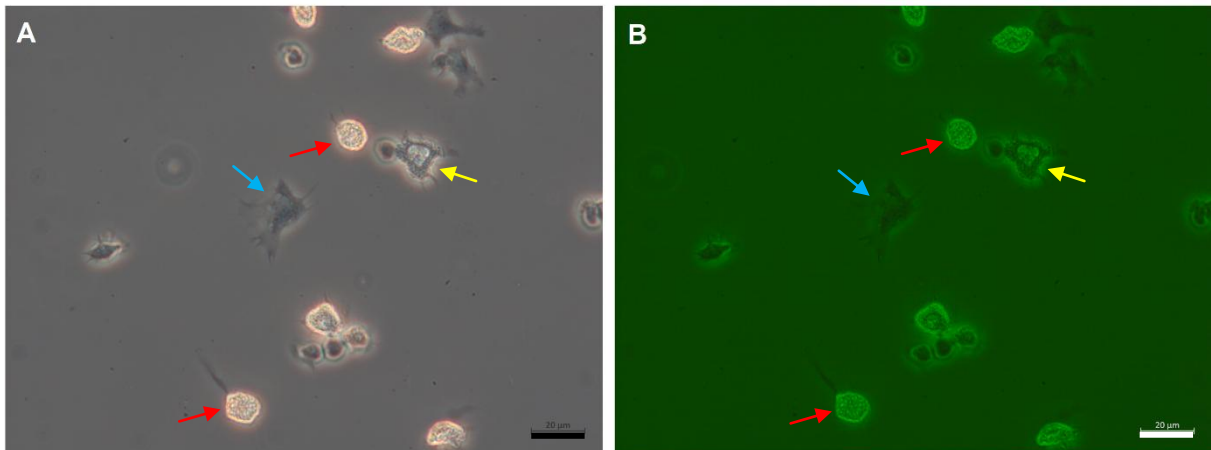
Parâmetros estatísticos descritivos (média, desvio padrão e distribuição de frequência) foram calculados para verificação da dispersão dos dados e tendência central. Para cada variável dos experimentos *in vivo*, aplicou-se ANOVA de 2 fatores (tempo x exposição) com pós-teste de Tukey. O teste t-Student foi aplicado para avaliar o tratamento em cada tempo, separadamente. Os ensaios de fagocitose *in vitro* foram analisados com ANOVA de 1 fator e testes t-Student. Resultados foram considerados significativos quando o valor de  $\alpha \leq 0,05$ .

## 4 Resultados

### 4.1 Caracterizações dos hemócitos circulantes

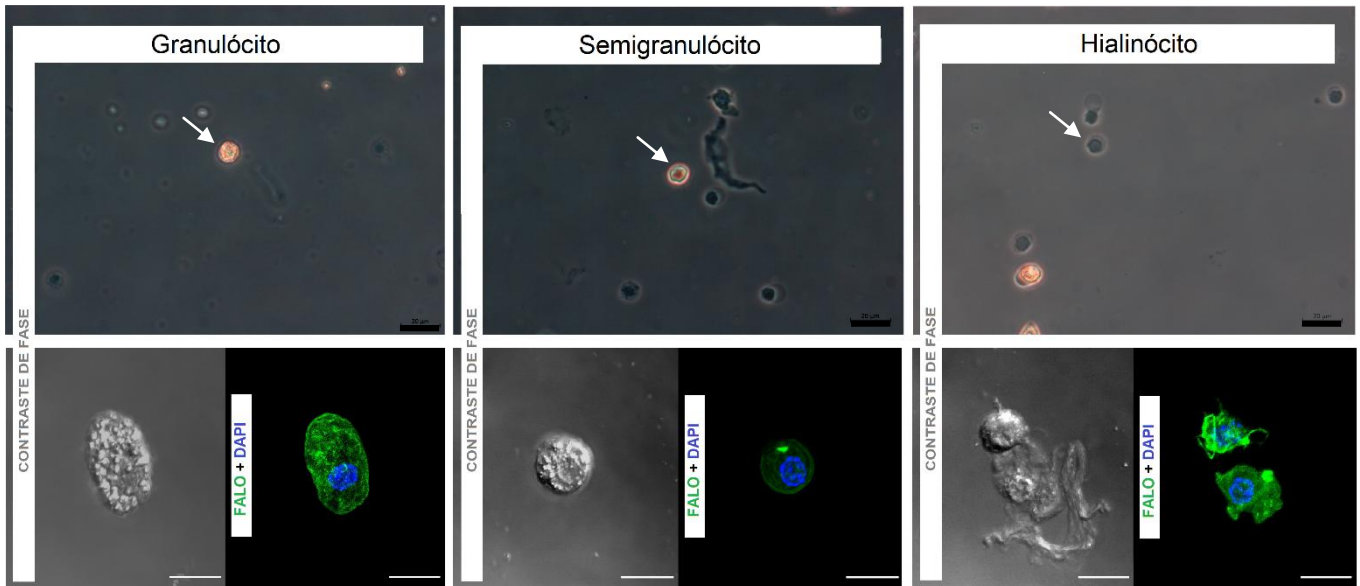
Na microscopia com contraste de fase, foi possível observar três populações predominantes de hemócitos, de acordo com a refringência da luz, observada pela presença ou ausência de grânulos (Figura 4).

Figura 4: Hemócitos do siris-azul (*Callinectes danae*) depositados sobre lâmina de vidro e imediatamente fotografados. A: contraste de fase. B: contraste de fase com filtro verde. Setas azuis indicam hialinócitos; setas amarelas indicam semigranulócitos; setas vermelhas indicam granulócitos. Aumento de 40 X. Barra escala: 20  $\mu\text{m}$ .



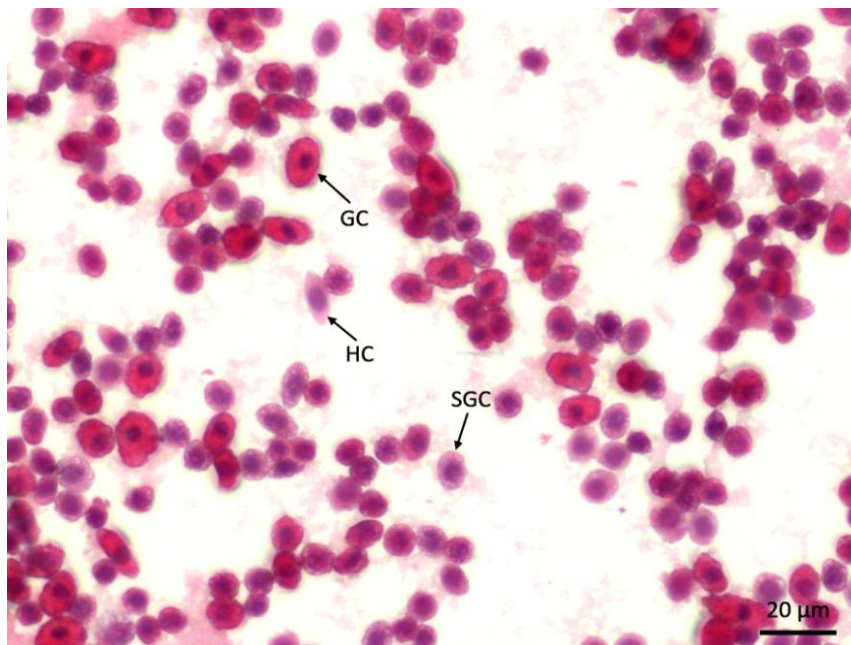
As marcações fluorescentes para faloidina e DAPI (Figura 5) evidenciaram o mesmo padrão; (granulócitos - GC): Células com amplo citoplasma, em formato ovóide e abundância de grânulos, cobrindo o próprio núcleo; (semigranulócitos - SGC): Células frequentemente observadas emitindo filopódios, com presença de grânulos, em menor quantidade e menos refringentes sob microscopia de luz; (hialinócitos - HC): Células arredondadas, com ausência de grânulos, pouca quantidade de citoplasma e núcleo abundante, comumente observada emitindo filopódios.

Figura 5: Hemócitos do siris-azul (*Callinectes danae*) obtidos com citospin e fixados com paraformaldeído 4%. Imagens do canto superior obtidas em microscopia com contraste de fase. Setas brancas indicam hemócitos, no aumento de 40 X. Barra de escala: 20  $\mu$ m. Imagens do canto inferior foram obtidas com microscopia confocal, no aumento de 100 X. Barra de escala: 10  $\mu$ m. FALO: Marcação de faloidina, evidencia filamentos citoplasmáticos de actina em tons de verde; DAPI: Marcação de dapi, evidencia núcleo em tons de azul.



A técnica de H.E. (Figura 6) foi a que melhor diferenciou as três populações. A coloração evidenciou os grânulos eosinofílicos presentes no citoplasma dos GC, presentes, em grande quantidade. Os grânulos visualmente em menor quantidade e menos corados dos SGC, e a ausência de grânulos e núcleo cobrindo quase toda área celular dos HC.

Figura 6: Hemócitos do siris-azul (*Callinectes danae*), obtidos com citospin e corados com H.E. GC: Granulócitos. SGC: Semigranulócitos. HC: Hialinócitos. Aumento de 40X. Barra de escala: 20  $\mu$ m.





## 4.2 Experimentos de exposição *in vivo*

### 4.2.1 Bioacumulação total de chumbo

Os valores em médias de concentração de Pb nos grupos controles e expostos, por tecido, estão na tabela 2.

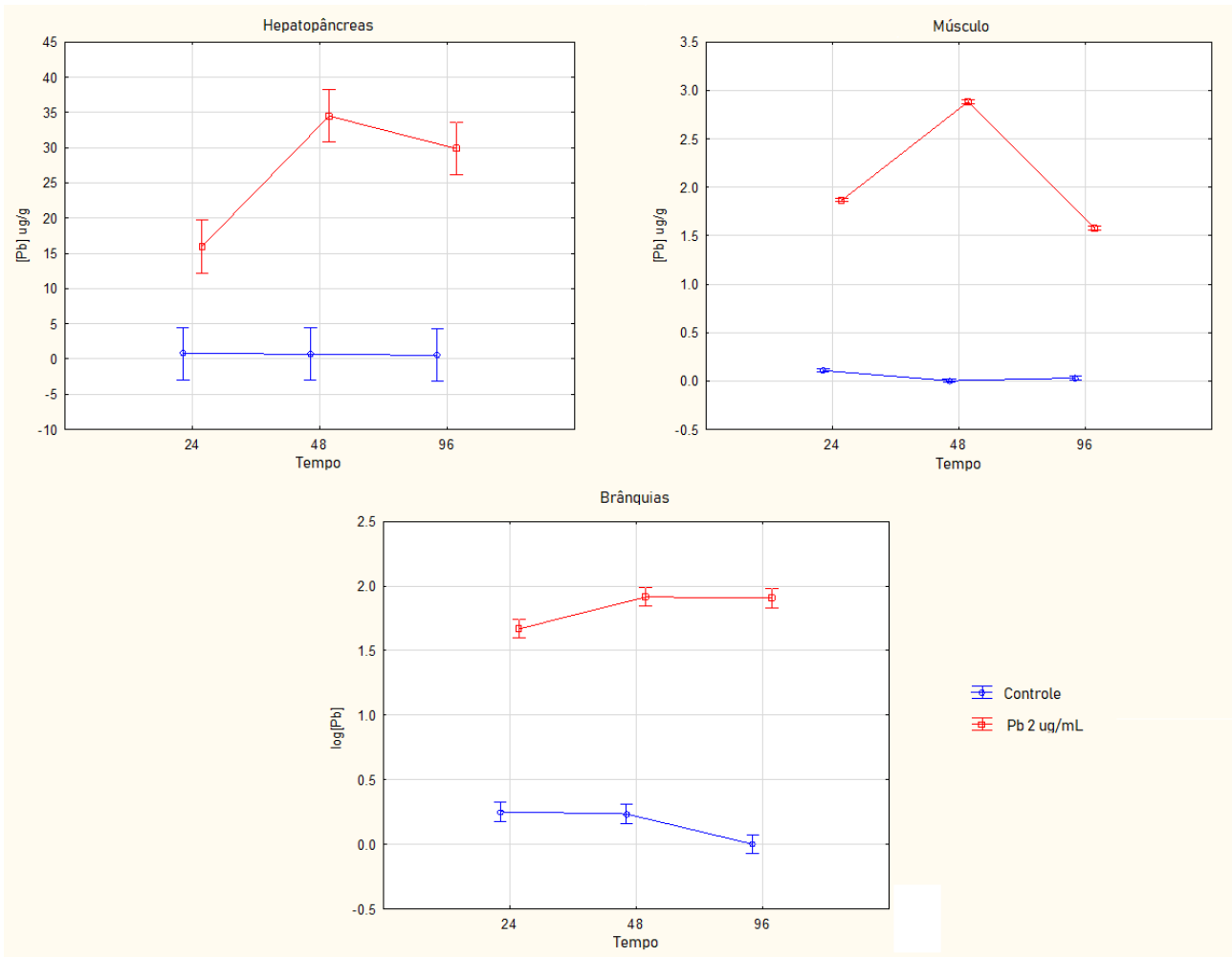
Tabela 2: Concentrações médias de Pb presentes nos tecidos após exposição de 24h, 48h e 96h. B: brânquias; H: hepatopâncreas; M: músculos; <LD: Abaixo dos níveis de detecção; Grupo C: Grupos controle; Pb: Grupos expostos a 2 µg/mL de Pb. Valores de uma mesma coluna com letras diferentes indicam diferenças significativas (teste de Tukey,  $p < 0,05$ ).

| Tratamento | B ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) | H ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) | M ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) |
|------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| C24        | 0,9 <sup>a</sup>           | 1,0 <sup>a</sup>           | 0,1 <sup>a</sup>           |
| Pb24       | 46,1 <sup>d</sup>          | 16,0 <sup>b</sup>          | 1,9 <sup>b</sup>           |
| C48        | 0,9 <sup>a</sup>           | 0,7 <sup>a</sup>           | <LD                        |
| Pb48       | 85,1 <sup>d</sup>          | 34,5 <sup>c</sup>          | 2,9 <sup>c</sup>           |
| C96        | <LD                        | 0,5 <sup>a</sup>           | 0,03 <sup>a</sup>          |
| Pb96       | 82,8 <sup>b</sup>          | 29,9 <sup>b,c</sup>        | 1,6 <sup>b,c</sup>         |

Para brânquias, os dados foram transformados em  $\log(x+1)$  para atender a premissa de normalidade. A ANOVA de 2 fatores, detectou interação tempo x tratamento para este tecido em 48h e 96h. Já para hepatopâncreas e músculos, também houve diferenças significativas. Os músculos apresentaram um aumento em até 48h de exposição, e redução em 96h.

As brânquias foram os tecidos que mais acumularam Pb, seguido do hepatopâncreas, e dos músculos, tecido este, que apresentou as menores concentrações. Todos os tecidos analisados seguiram uma tendência de maior acumulação em 48h, seguido de uma queda em 96h, como mostrado na figura 7.

Figura 7: Bioacumulação total de Pb no hepatopâncreas, músculo e brânquias, após exposição de 2 µg/mL de Pb em 24h, 48h e 96h. Dados estão apresentados em médias ± desvio padrão. Linha azul: grupos controles. Linha vermelha: grupos expostos a 2 µg/mL de Pb.



#### 4.2.2 Contagem diferencial de hemócitos

As três populações de hemócitos foram identificadas por citometria de fluxo, considerando tamanho e complexidade intracelular. De acordo com a figura 8, é possível observar que o gate 2 (61,50%), abriga a população mais numerosa, os SGC, seguida do gate 1 (20,79%), dos HC, e do gate 3 (10,53%), os GC.

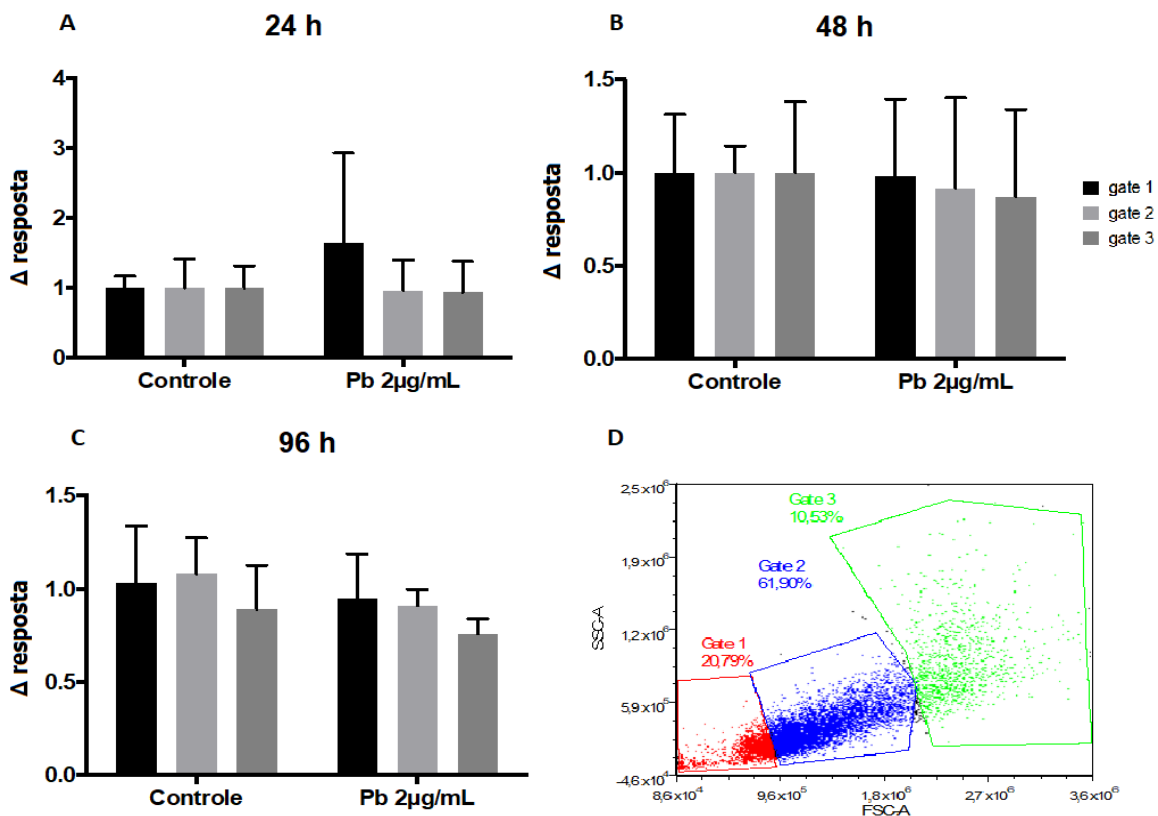
A proporção obtida com a citometria de fluxo corroborou com os resultados da contagem diferencial realizada em microscopia de luz, conforme mostrado na tabela 3. Em resumo, a proporção de hemócitos presentes na hemolinfa para espécie *C. danae*, foi de SGC > HC > GC.

Tabela 3: Contagem diferencial de hemócitos circulantes do *C. danae*. HC: hialinócitos; SGC: semigranulócitos; GC: granulócitos. Dados apresentados com as médias das porcentagens obtidas  $\pm$  desvio padrão.

| Hemócito | Contagem diferencial (%) |
|----------|--------------------------|
| HC       | 13,84 $\pm$ 3,60         |
| SGC      | 63,47 $\pm$ 4,20         |
| GC       | 22,69 $\pm$ 1,76         |

Referente as exposições ao Pb, as proporções populacionais de hemócitos variaram consideravelmente de indivíduo para indivíduo. Para tanto, os dados foram normalizados para 1 ( $\Delta$  resposta) de forma a poder compará-los. O teste ANOVA de dois fatores não encontrou diferenças estatísticas entre os grupos de tratamento.

Figura 8: Citometria de fluxo evidenciando a proporção das populações de hemócitos encontrados na hemolinfa do siri-azul (*Callinectes danae*), após exposição a 2  $\mu\text{g/mL}$  de Pb por 24h, 48h e 96h. Valores apresentados em média  $\pm$  desvio padrão (Dados normalizados para  $\Delta$  resposta). A: grupo 24h; B: Grupo 48h; C grupo 96h; D: Citometria de fluxo dos grupos controle, evidenciando as populações de hemócitos considerando tamanho (SSC-A) e complexidade intracelular (FSC-A).

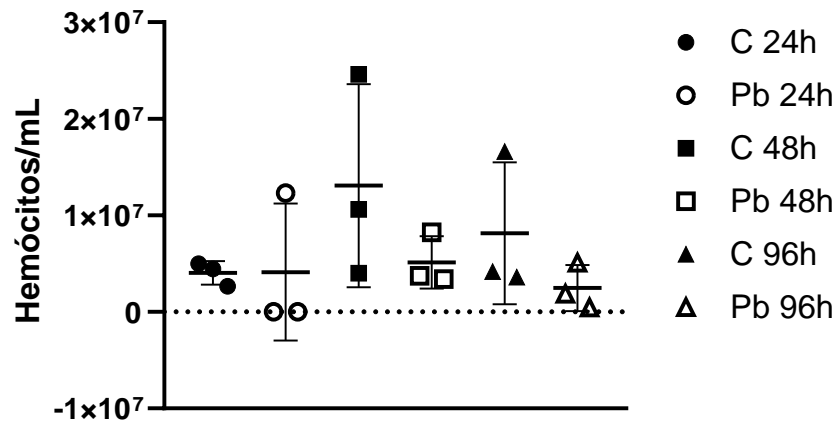


#### 4.2.3 Contagem total de hemócitos circulantes

De modo geral, a contagem total de hemócitos circundantes variou consideravelmente entre os indivíduos de mesmo grupo, não sendo encontradas

diferenças estatísticas. Os dados estão apresentados na figura 9, e corroboram com a variação observada pela citometria de fluxo.

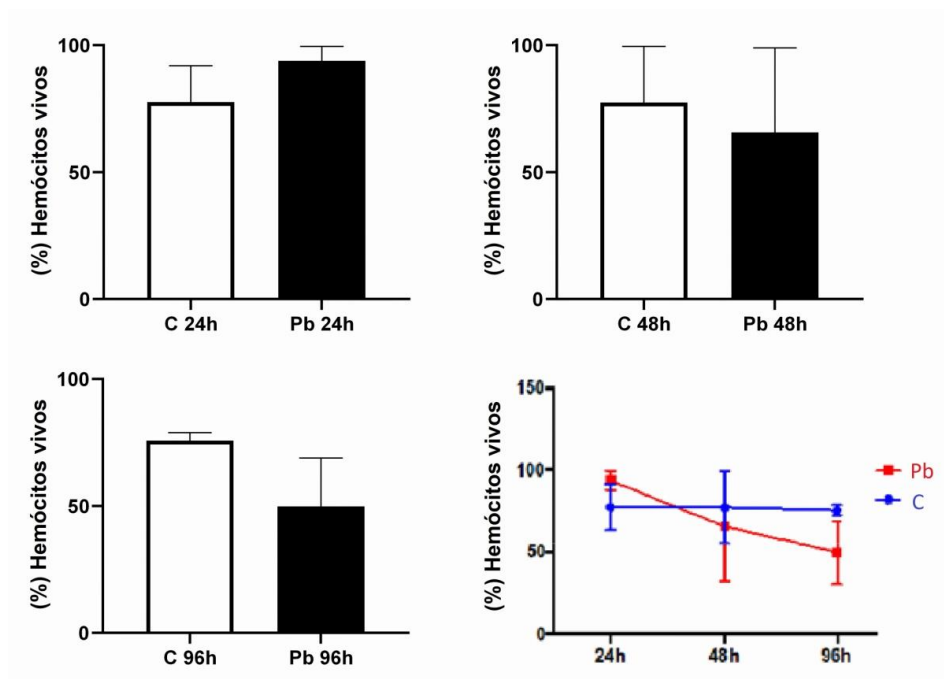
Figura 9: Contagem total de hemócitos por mL, presentes na hemolinfa do siri-azul (*Callinectes danae*). C: grupos controle. Pb: grupos expostos a 2 µg/mL de Pb. Valores apresentados em médias ± desvio padrão.



#### 4.2.4 Viabilidade celular dos hemócitos circulantes

Nos ensaios de viabilidade celular (Figura 10), foi observada uma tendência ao aumento de viabilidade celular no grupo exposto ao chumbo por 24h, seguido de uma tendência a redução constante, até 96h ( $p=0,1116$ ). Não foram encontradas diferenças estatísticas.

Figura 10: Viabilidade celular dos hemócitos circulantes do siri-azul (*Callinectes danae*). C: grupos controle. Pb: grupos expostos a 2 µg/mL de Pb. Valores de porcentagem apresentados em médias ± desvio padrão.

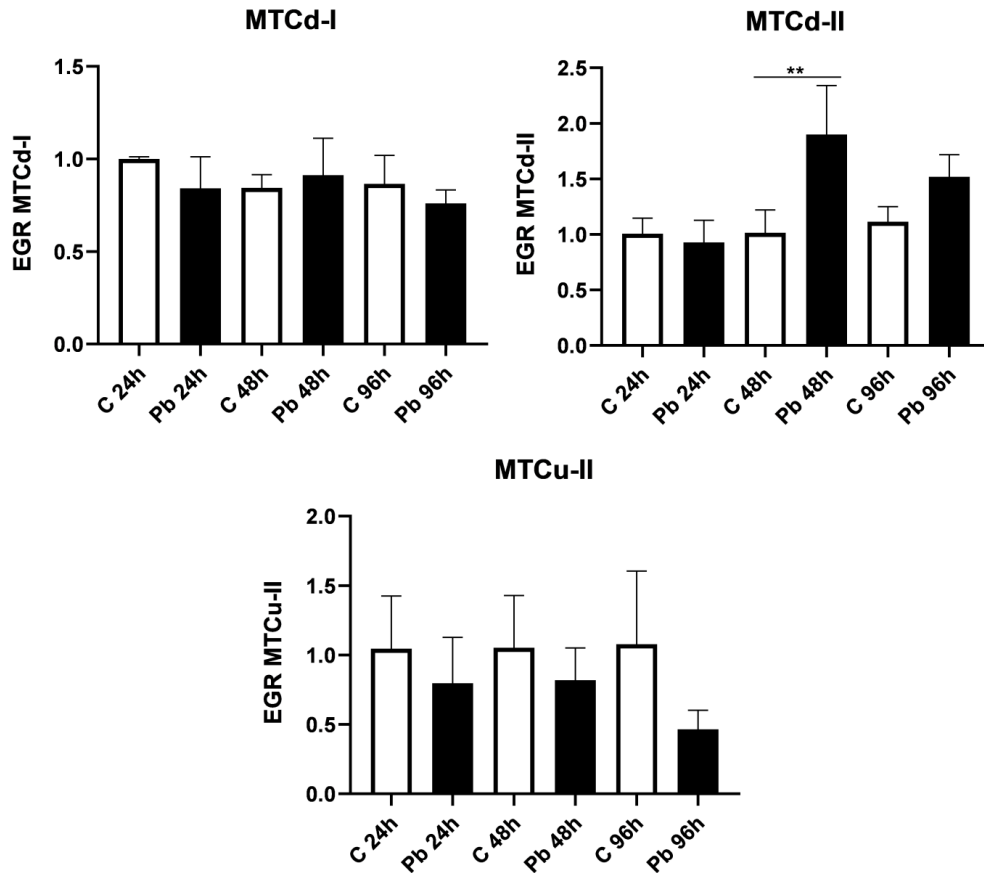


#### 4.2.5 Expressão gênica de metalotioneínas no hepatopâncreas: Isoformas MTCd-I, MTCd-II e MTCu-II

Conforme mostrado na figura 11, a expressão gênica das isoformas MTCd-I e MTCu-II não apresentaram diferenças estatísticas em relação às concentrações de Pb. MTCu-II variou consideravelmente entre os grupos, embora não seja possível estabelecer algum padrão ocasionado pela exposição.

A expressão gênica da isoforma MTCd-II foi a que melhor representou uma interação com os grupos expostos. Quando comparamos os grupos contaminados com seus respectivos controles, foi possível observar um aumento significativo em 48h ( $p=0,0022$ ), seguido de uma queda, até níveis basais, em 96h. Além disso, a ANOVA de duas vias detectou interação entre o tempo e exposição ( $p=0,0004$ ), comprovando os efeitos da exposição de 2 µg/mL de Pb em 48h, na expressão gênica relativa de MTCd-II.

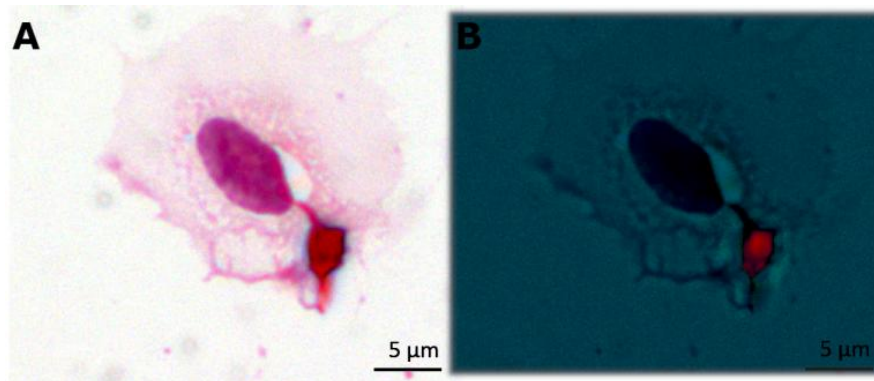
Figura 11: Expressão gênica relativa (EGR) de metalotioneínas (MTCu-II, MTCd-I e MTCd-II). C: grupos controle. Pb: grupos expostos a 2 µg/mL de Pb. Valores de EGR apresentados em médias ± desvio padrão. (\*\*) indica diferença estatística  $p < 0,005$ .



#### 4.3 Experimentos de fagocitose *in vitro*

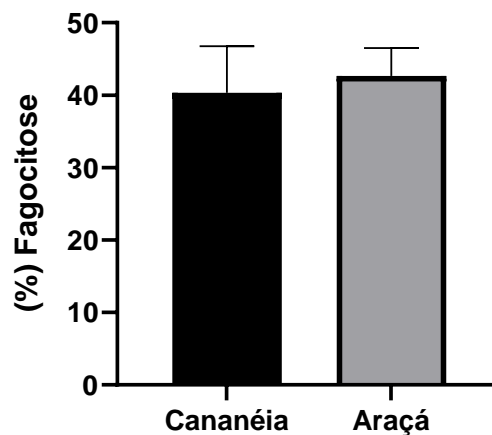
A figura 12 exemplifica a eficiência do método utilizado. É possível observar um hialinócito com uma levedura internalizada, fortemente corada pela técnica de Rosenfeld, em seu citoplasma. Todas as fagocitoses consideraram a coloração da levedura em microscopia de luz e com contraste de fase, e quando estas foram observadas no mesmo plano que o núcleo do hemócito (que não apresenta coloração em contraste de fase).

Figura 12: Fagocitose *in vitro* do siri-azul (*Callinectes danae*). Hialinócito com levedura internalizada corada com a técnica de Rosenfeld. A: Hialinócito em microscopia de luz, levedura internalizada levemente corada em vermelho. B: Hialinócito em contraste de fase, levedura internalizada fortemente corada em vermelho.



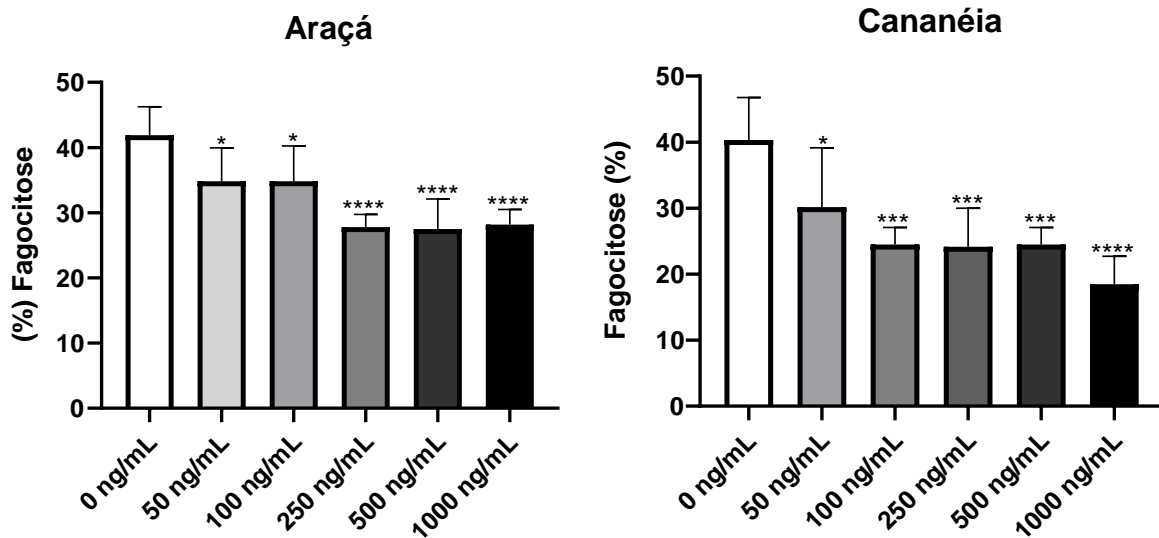
A capacidade fagocítica dos grupos controles dos siris coletados em Cananéia e na Baía do Araçá – São Sebastião, não apresentaram diferenças estatísticas (Figura 13), a média de fagocitose fúngica dos hemócitos do siri-azul (*C. danae*), foi de 41,73% ± 4,96.

Figura 13: Capacidade fagocítica (%) dos grupos controles de siris-azuis (*Callinectes danae*), coletados em Cananéia e na baía do Araçá - São Sebastião. Valores de porcentagem apresentados em médias ± desvio padrão.



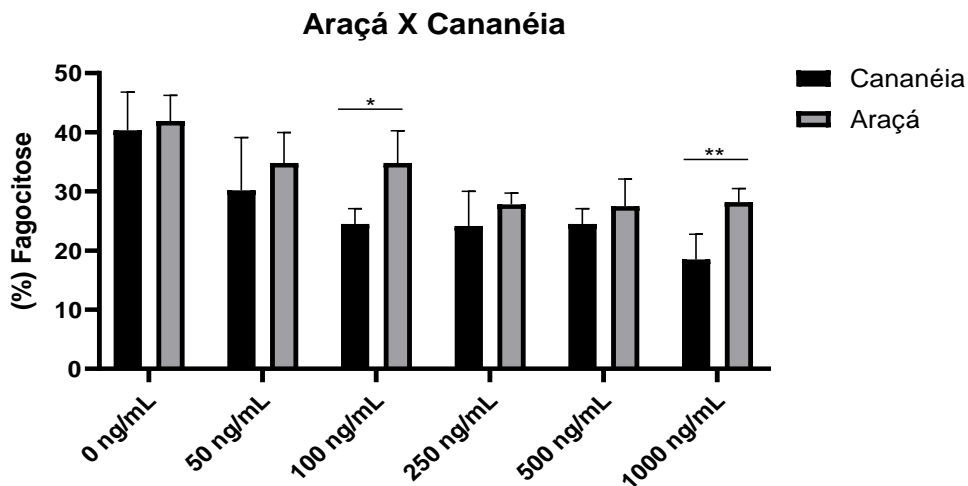
Ambos locais de coleta apresentaram o mesmo padrão ocasionado pelo Pb, uma curva decrescente de hemócitos fagocitando leveduras, de acordo com o aumento da concentração de Pb. Houve diferenças estatisticamente significativas em todas as concentrações utilizadas, evidenciando efeito biológico até nas mínimas concentrações, conforme observado na figura 14.

Figura 14: Capacidade fagocítica de siris azuis (*Callinectes danae*) coletados na baía do Araçá - São Sebastião e em Cananéia, após exposições a diferentes concentrações de Pb, por 1h. Valores de porcentagem apresentados em médias  $\pm$  desvio padrão. (\*)  $p < 0,05$ ; (\*\*)  $p < 0,005$ ; (\*\*\*)  $p < 0,0005$ ; (\*\*\*\*)  $p < 0,00005$ .



Embora a tendência da redução de capacidade fagocítica tenha sido semelhante nos dois locais estudados, quando comparamos as concentrações de ambos os locais de coleta, observamos diferenças apenas em 100 ng/mL ( $p=0,001$ ) e 1000 ng/mL ( $p=0,0006$ ), conforme mostrado na figura 15. As demais concentrações não apresentaram diferenças, sugerindo que a resposta da capacidade fagocítica seguiu a mesma tendência com os animais de Cananéia e da Baía do Araçá – São Sebastião.

Figura 15: Comparação da capacidade fagocítica de siris azuis (*Callinectes danae*) coletados na baía do Araçá – São Sebastião e em Cananéia, após exposições a diferentes concentrações de Pb, por 1h. Valores de porcentagem apresentados em médias  $\pm$  desvio padrão. (\*)  $p < 0,05$ ; (\*\*)  $p < 0,005$ .





## 5 Discussão

### 5.1 Caracterizações dos hemócitos circulantes

Os hemócitos circulantes de *C. danae* conferem com diversas características observadas na literatura para outros decápodes. As três populações de hemócitos: granulócitos, semigranulócitos e hialinócitos, são descritos na literatura, com morfologias semelhantes aos observados no presente estudo. Zhou e colaboradores (2018) fazem uma descrição dos hemócitos de *Scylla paramamosain*, que conferem com os nossos resultados, inclusive, nas proporções, sendo: semigranulócitos mais abundantes, seguido dos hialinócitos e granulócitos.

Clare e Lumb (1994) identificaram os hemócitos do siri-azul *Callinectes sapidus*, mostrando os mesmos padrões morfológicos aqui abordados. Matozzo e Marin (2010) fazem uma caracterização em *Carcinus aestuarii*, corroborando com nossos dados e os trabalhos abordados. No qual os granulócitos possuem maior tamanho e complexidade intracelular, grânulos em abundância e altamente refringentes em microscopia de fase; os semigranulócitos, com grânulos em menor abundância e menor tamanho celular; e os hialinócitos, com menor tamanho e ausência total de grânulos. Sunjian e colaboradores (2014) observaram o mesmo em *Eriocheir sinensis*, entretanto, a população de hialinócitos foi a mais abundante, sendo HC > SGC > GC.

Podemos inferir que os padrões morfológicos de hemócitos entre os decápodes sejam semelhantes, diferindo, apenas, em abundância das populações e funções relativas, uma vez que existem divergências entre a porcentagem de fagocitose de semigranulócitos e hialinócitos.

### 5.2 Experimentos de exposição *in vivo*

Nos tempos propostos, foi observado maior bioacumulação de chumbo nas brânquias em relação aos demais tecidos analisados, o que corrobora com o estudo de Bordon e colaboradores (2018), no qual foi observado bioacumulação de Pb em 7 e 14 dias. Não existiam, até o presente momento, dados que reportassem a dinâmica da bioacumulação de Pb na espécie *C. danae*, nos tempos de exposição por nós utilizados (24h, 48h e 96h).

Çoğun e colaboradores (2017) quantificaram a presença de Cu, Zn, Cd e Pb nas brânquias, hepatopâncreas e músculos de siris-azuis (*C. sapidus*) coletados na Baía de Mersin (Turquia), Xu e colaboradores (2019) realizaram exposições a diferentes concentrações de Pb no caranguejo *Charybdis japonica*. Ambos os estudos fornecem dados que corroboram fortemente com o observado neste trabalho, onde excepcionalmente o Pb, acumulou de forma mais significativa nas brânquias, em relação ao hepatopâncreas, com baixas concentrações nos músculos. Interessantemente, os demais metais estudados por Çoğun e colaboradores (2017) seguiram outro padrão, acumularam-se em maiores concentrações no hepatopâncreas, em relação às brânquias.

Este padrão de acumulação, sugere que as brânquias parecem ser o principal órgão a acumular Pb, diferente de outros metais, podendo estar intimamente relacionada com o processo de detoxificação deste metal. No hepatopâncreas, a bioacumulação de Pb já foi relatada por Vogt (1994), em camarões *Penaeus monodon*, no qual o Pb foi acumulado em grânulos, depositados em vacúolos, causando alterações histológicas diversas, sendo parcialmente excretados com o passar do tempo.

Segundo Rainbow (1988; 2006; 2007), os metais absorvidos pelas brânquias podem ser transferidos para os demais órgãos quando suas concentrações forem presentes em excesso. Considerando as propriedades do Pb, nossos dados sugerem que as brânquias são fortes alvos para trabalhos de monitoramento ambiental, corroborando com trabalhos recentemente publicados.

Visando compreender a dinâmica de acumulação e detoxificação do Pb, utilizamos como método, a avaliação da expressão gênica relativa de 3 isoformas de metalotioneínas. Estas proteínas são as principais mediadoras do processo de detoxificação de metais. Bordon (2018), realizou a quantificação da atividade de MTs totais e observou aumento após exposições de Pb (0,5 µg/mL e 2 µg/mL) por 7 e 14 dias. Nossos resultados demonstraram que nem todas isoformas são diretamente moduladas quando o organismo é exposto ao Pb, pelo menos, nas concentrações e tempos aqui abordados.

No hepatopâncreas, apenas a isoforma MTCd-II apresentou modulação, um aumento em 48h, que decresce até 96h, voltando, aparentemente, próximo aos níveis basais. Segundo Syring e colaboradores (2000), as MTCu-II em *C. sapidus* estão envolvidas especificamente na homeostase do cobre associada à síntese e a

degradação da hemocianina, processo importantíssimo para fisiologia dos crustáceos, talvez, por isso, foi observada grandes variações na expressão gênica entre os grupos estudados, sem demonstrar interação específica com o Pb.

As MTCd-I e MTCd-II são MTs específicas para o metabolismo do Zn em *C. sapidus*, entretanto, estas são significativamente moduladas quando o organismo é exposto ao Cd. Os resultados aqui apresentados, mostram que a expressão de MTCu-II e MTCd-I não é alterada na presença de Pb nos tempos e concentrações utilizados. O transporte intracelular de metais ocorre de maneira diferente de acordo com o tecido e o metal estudado. A isoforma MTCd-II tem participação durante este processo no hepatopâncreas, quando o organismo é exposto por 48h, entretanto, esta isoforma não parece atuar de maneira específica, conforme observado por Syring e colaboradores (2000), quando a exposição é realizada com Cd. Ortega e colaboradores (2016), também observaram que os níveis de MTs totais em *Ucides cordatus*, são significativamente aumentados quando o ambiente está contaminado com altos níveis de Cd, sugerindo que estas isoformas podem atuar de maneira específica para determinados metais não essenciais, como o Cd, e que podem ser mediadoras nos processos de transporte e detoxificação de outros, conforme observamos com MTCd-II e o Pb.

Xu e colaboradores (2019), ao estudarem uma isoforma de MT frente exposições de Pb no caranguejo *Charybdis japonica*, observaram um pico de expressão em 12h e 24h, seguido de declínio até 96h. Como biomarcador de Pb, nossos dados sugerem que a isoforma de MT a ser avaliada, deve ser uma variável a ser considerada, embora não observamos modulação na EGR das isoformas MTCd-I e MTCu-II, isso não necessariamente indica que as proteínas serão transcritas, e que participarão ativamente no transporte/detoxificação do Pb, mas que as mesmas não atuam em relação à expressão gênica de maneira significativa, pelo menos, nos períodos de tempo aqui abordados. Para isoforma MTCd-II, os dados de EGR evidenciaram uma modulação significativa, que pode estar relacionada com os processos de transporte e detoxificação do Pb. Nossos resultados, com a metodologia de exposição proposta, trazem dados sobre a dinâmica de detoxificação em curto períodos de tempo, especificamente 24h, 48h e 96h, no qual é observado um aumento em 48h, com redução em 96h.

Quando comparamos o padrão da EGR da isoforma MTCd-II (Figura 11), com as concentrações totais de Pb no hepatopâncreas (Figura 7), podemos observar uma

tendência semelhante dos dados, um pico de aumento em 48h, seguido de declínio em 96h. É difícil, com estes dados, estabelecer uma relação de causa e consequência, mas, a EGR da isoforma MTCd-II atua neste processo e pode fornecer, com mais estudos, detalhes sobre como ocorre a dinâmica de detoxificação do Pb nestes organismos, e como esse processo ocorre quando organismo é exposto a diferentes concentrações e períodos de tempo.

Conforme já citado, foi observado aumento de MTs totais por Bordon (2018), não diferenciando as diferentes isoformas presentes nos organismos, nem qual destas são as principais atuantes. Uma vez que, observamos que existem MTs específicas para metais não essenciais como o Cd, e que não necessariamente são específicas para outros metais não essenciais, como o Pb (MTCd-I), faz-se necessário compreender quais outras isoformas atuam neste processo, suas especificidades e quais outros mecanismos estão envolvidos. Como vimos no presente estudo, tratando-se do hepatopâncreas, a isoforma MTCd-II é uma forte candidata. Estes dados e novos trabalhos podem fornecer dados valiosos que indiquem moléculas e proteínas específicas, para que não só possamos compreender a dinâmica de detoxificação de metais, mas que também possam ser utilizadas como biomarcadoras em trabalhos de monitoramento ambiental, para tanto, mais estudos devem ser conduzidos.

A contagem total e diferencial de hemócitos variou consideravelmente entre os indivíduos. Resultados semelhantes já foram observados para outras espécies, como abordado por Matozzo e Marin (2010) com o caranguejo *Carcinus aestuarii*, onde a variação de hemócitos circulantes foi de 1.04 a 12.21 ( $\times 10^6$ ) células. Diversos outros estudos com decápodos também corroboram com estes resultados, evidenciando intensa variação individual, explicada pela condição fisiológica isolada dos animais (RAVINDRANATH, 1977; TRUSCOTT; WHITE, 1990; JOHANSSON *et al.*, 2000).

A proporção das populações de hemócitos, confere com a caracterização de hemócitos para outras espécies de decápodos, como demonstrado por Zhou e colaboradores (2018) e Matozzo e Marin (2010), onde a maior população encontrada foi de semi-granulócitos, seguida pelos hialinócitos e dos granulócitos. Entretanto, as contagens realizadas não se mostraram eficientes para determinação de um padrão frente às exposições de Pb, nos tempos abordados. Já os ensaios de viabilidade

celular, evidenciaram tendências ao declínio da população de hemócitos vivos presentes na hemolinfa, o que pode afetar a imunidade inata mediada por células.

Em mamíferos, já foi reportado que o Pb causa diversos efeitos deletérios como a anemia (SINGH *et al.*, 2018). Considerando que a hemolinfa dos crustáceos pode transportar metais para outros tecidos (RAINBOW, 1988), é plausível que o Pb possa ter interagido com os hemócitos de forma negativa. Estudos exploram efeitos de metais e outros poluentes em processos de estresse oxidativo em hemócitos (JEROME *et al.*, 2017, VALAVANIDIS *et al.*, 2006). Sabe-se que o Pb afeta severamente enzimas antioxidantes (SINGH *et al.*, 2018), e que em situações extremas, pode causar morte celular. Embora os dados não sejam estatisticamente significativos, podemos inferir que o chumbo interage com a viabilidade dos hemócitos circulantes, e, portanto, afeta o estado de saúde dos mesmos. Mais estudos devem ser realizados, entretanto, esta técnica pode auxiliar em trabalhos de monitoramento ambiental, indicando o estado basal da imunidade inata celular destes animais, o que é essencial para a sua sobrevivência em ambientes estuarinos e de manguezais.

### 5.3 Experimentos de fagocitose *in vitro*

Considerando as diferentes influências antrópicas atuantes nos locais de coleta dos siris-azuis, esperava-se que houvessem diferenças na capacidade fagocítica dos animais coletados em Cananéia e na Baía do Aracá – São Sebastião, porém, a média de fagocitose dos controles não demonstrou isso. O período de aclimação em laboratório, as condições ambientais em que os animais são mantidos, e a alimentação utilizada, são variáveis a serem consideradas, pois uma vez que são retirados de seu habitat natural, e submetidos a longos períodos de aclimação, os animais podem não mais refletir o real estado em que se encontram no ambiente. Sugerimos que, tratando-se da capacidade fagocítica de leveduras, o período de aclimação possa ter influenciado na imunidade inata celular, de forma a estabilizar a capacidade fagocítica em níveis basais de funcionamento. No entanto, mais estudos devem ser conduzidos, com animais coletados e imediatamente submetidos a experimentações, para que esta hipótese seja confirmada.

Em ambos os locais de coleta, observamos uma resposta dos hemócitos conforme aumento das concentrações de Pb no meio de cultura. Estes tiveram sua

capacidade fagocítica reduzida. Já foi relatado que o Pb é causador de anemias, entre outras complicações, que envolvem morte celular ou perda de suas funções (SINGH *et al.*, 2018). Aqui, podemos comprovar que mínimas concentrações de Pb na hemolinfa de siris-azuis, como a de 50 ng/mL, podem reduzir a capacidade de fagocitose destas células e, por sua vez, diminuir a resistência destes animais a patógenos.

Quando comparamos os locais de coleta, observamos que a resposta dos hemócitos frente às concentrações de 100 ng/mL e 1000 ng/mL, diferem. Isso pode estar relacionado a uma resistência imunológica diferente entre os animais, visto que Cananéia faz parte de uma unidade de conservação federal e a baía do Araçá, está sujeita a diversos fatores antrópicos e poluentes. Talvez por não estarem em contato com muitas fontes de contaminação, os animais de Cananéia demonstraram maior sensibilidade ao Pb. Ainda sim, essa hipótese necessita de mais dados, tais como o estado basal de metais do ambiente em que os animais foram coletados, para que se estabeleça uma correlação mais exata da resistência imunológica e habitat.

Diversos trabalhos utilizam a capacidade fagocítica como biomarcadora de metais. Brousseau e colaboradores (1999), relacionaram a viabilidade celular e fagocitose nos hemócitos do bivalve *Mya arenaria*, expostos a metais, onde foi observada uma curva decrescente da fagocitose para os metais Cd, Zn e Hg. Fugère e colaboradores (1996) também observaram resultados semelhantes de fagocitose no oligochaeta *Lumbricus terrestris*, mostrando que a toxicidade de metais, comumente pode afetar o correto funcionamento da imunidade de invertebrados. Truscott e White (1990), verificam a resistência de hemócitos do *Carcinus maenas* ao Cu, Cd e Hg. Ao analisar a quantidade total de células e fagocitose, não observaram mudanças frente às exposições, exceto por uma supressão da fagocitose induzida por Cd, sugerindo que os hemócitos são tolerantes a este tipo de exposição. De fato, neste trabalho, não observamos diferenças significativas nas populações de hemócitos e na quantidade total de células circulantes nos experimentos *in vivo*, mas isso não necessariamente quer dizer que as células encontram-se em correto estado de funcionamento, conforme demonstramos com os ensaios de fagocitose. Para tanto, o metal a ser estudado é uma forte variável, podendo ter diferentes impactos nos hemócitos de crustáceos. Entretanto, até o presente momento, não foram encontrados estudos que relacionem os efeitos do Pb nos hemócitos de *C. danae*.

A exposição de Pb por 1h nas concentrações utilizadas, afetou significativamente a capacidade fagocítica em todas as concentrações. Podemos estipular que a concentração de 1000 ng/mL confere como supressora de 50% da capacidade fagocítica ( $LC_{50}$ ), evidenciando que esta metodologia é eficiente como biomarcadora em laboratório, e que pode ser utilizada como ferramenta nos estudos de monitoramento ambiental, quando as concentrações de Pb presentes na hemolinfa, forem conhecidas. Ao relacionar as concentrações de Pb presentes na hemolinfa e a capacidade fagocítica, temos uma ferramenta capaz de indicar o estado imunológico no qual os animais encontram-se, frente a casos de contaminação por Pb, uma vez que este mecanismo de defesa é importantíssimo para resistência contra patógenos.

## 6 Conclusão

As brânquias foram o tecido que mais bioacumularam Pb, seguido do hepatopâncreas e dos músculos. Seguindo um padrão descrito na literatura, onde excepcionalmente o Pb tende a acumular-se em maior quantidade nas brânquias.

As análises de expressão gênica relativa de MTCu-II e MTCd-I não se mostraram significativas, MTCd-II apresentou aumento em 48h seguido de uma redução, indicando uma modulação e trazendo novos dados sobre a dinâmica de detoxificação do Pb em curtos períodos de exposição.

O perfil celular da hemolinfa variou consideravelmente nos experimentos de exposição *in vivo*. Nos ensaios *in vitro* de fagocitose fúngica, todas as concentrações de Pb utilizadas acarretaram em uma curva decrescente da capacidade fagocítica, indicando um potencial biomarcador em laboratório e uma nova ferramenta a ser considerada pelos trabalhos de biomonitoramento ambiental.



## Referências

ADAS, M. Estudos de geografia do Brasil. *Morena*, 1976. 336p.

ANDRADE, S. F.; MATOS, T. B.; CARVALHO, C. E. V. Variação sazonal de metais pesados em Siris *Callinectes ornatus* (Orsway, 1863) da Lagoa de Iquipará, Brasil. *Rev. Virtual Quim.*, v.3, n.2, p.129-137, 2011.

BACHERE, E.; MIALHE, E.; RODRIGUEZ, J. Identification of defense effectors in the harmolymph of crustaceans with particular reference to the shrimp, *Penaeus japonicus* (Bate): prospects and applications. *Fish Shellfish Immunol.*, v.191, p.3-11, 1995.

BAUCHAU, A. G. *Crustaceans*. In: RATCLIFFE, N. A.; ROWLEY, A. F. eds., Invertebrate blood cells. Academic Press., v.2, p.386-420, 1981.

BORDON, I. C.; EMERENCIANO, A. K.; MELO, J. R. C.; SILVA, J. R. M. C.; FAVARO, D. I. T.; CHOUERI, P. K.; CAMPOS, B. G.; ABESSA, D. M. S. Implications on the Pb bioaccumulation and metallothionein levels due to dietary and waterborne exposures: The *Callinectes danae* case. *Ecotoxicology and environmental safety.*, v.162, p.415-422, 2018.

BORDON, I. C. A. C.; SARKIS, J. E. S.; ANDRADE, N. P.; HORTELLANI, M. A.; FAVARO, D. I. T.; KAKAZU, M. H.; COTRIM, M. E. B.; LAVRADAS, R. T.; MOREIRA, I.; SAINT-PIERRE, T.D. ; HAUSER-DAVIS, R. A. An environmental forensic approach for tropical estuaries based on metal bioaccumulation in tissues of *Callinectes danae*. *Ecotoxicology.*, v.25, p.91-104, 2016.

BORDON, I. C. A. C.; SARKIS, J. E. S.; TOMÁS, A.; SOUZA, M.; SCALCO, A.; LIMA, M., HORTELLANI, M. A. A Preliminary Assessment of Metal Bioaccumulation in the Blue Crab, *Callinectes danae*. from the São Vicente Channel, São Paulo State, Brazil. *Bull. Environ.Contam. Toxicol.*, v.88, p.577–581, 2012a.

BORDON, I. C. A. C.; SARKIS, J. E.; TOMÁS, A. R.; SCALCO, A.; LIMA, M.; HORTELLANI, M. A.; ANDRADE, N. P. Assessment of Metal Concentrations in Muscles of the Blue Crab, *Callinectes danae*, from the Santos Estuarine System. *Bull. Environ.Contam. Toxicol.*, v.89, n.3, p.484-488, 2012b.

BROUSSEAU, P.; PELLERIN, J.; MORIN, Y.; CYR, D.; BLAKLEY, B.; BOERMANS, H.; FOURNIER, M. Flow cytometry as a tool to monitor the disturbance of phagocytosis in the clam *Mya arenaria* hemocytes following *in vitro* exposure to heavy metals. *Toxicology.*, v.142, p.145-456, 2000.

BROUWER, M.; HOEXUM-BROUWER, T.; GRATER, W.; ENGHILD, J. J.; THOGERSEN, I. B. The paradigm that all oxygen-respiring eukaryotes have cytosolic CuZn-superoxide dismutase and that Mn-superoxide dismutase is localized to the mitochondria does not apply to a large group of marine arthropods. *Biochem.*, v.36, p.13381-13388, 1997.

BRUSCA, R. C.; BRUSCA, G. J. *Invertebrados*. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011, 968 p.

CLARE, A. S. LUMB, G. Identification of haemocytes and their role in clotting in the blue crab *Callinectes sapidus*. *Mar. Biol.* v.4 p. 601-610, 1994.

CLARK, M. C.; WOLCOTT, T. G.; WOLCOTT, D. L.; HINES, A. H. Foraging and agonistic activity cooccur in free-ranging blue crabs (*Callinectes sapidus*): observations of animals by ultrasonic telemetry. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, v.233, p.143-160, 1999. Doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0022-0981\(98\)00129-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0022-0981(98)00129-4).

CONAMA 001/1986. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução nº001 de 23 de janeiro de 1986. Disponível em: <http://www2.mma.gov.br/port/conama/res/res86/res0186.html>. Acesso em: 20 dez. 2019.

CONAMA 347/2005. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução nº 357 de 17 de março de 2005. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf> Acesso em: 20 dez. 2019.

CONTI, M. E. *Biological Monitoring: Theory and Applications*. Massachusetts, U.S.A.: WIT Press, 2008.

CORRÊA, J. D.; SILVA, M. R.; SILVA, A. C. B.; LIMA, S. M. A.; MALM, O.; ALLODI, S. Tissue distribution, subcellular localization and endocrine disruption patterns induced by Cr and Mn in the crab *Ucides cordatus*. *Aquat. Toxicol.*, v.73, p.139-154, 2002.

COSTANZA, R.; D'ARGE, R.; GROOT, R.; FARBER, S.; GRASSO, M.; HANNON, B.; LIMBURG, K.; NAEEM, S.; O'NEILL, R. V.; PARUELO, J.; RASKIN, R. G.; SUTTON, P.; VAN DEN BELT, M. The value of the world's ecosystem services and natural capital. *Nature.*, v.387, p.253-260, 1997.

ÇOĞUN, H. Y.; FIRAT, Ö.; AYTEKIN, T.; FIRIDIN, G.; FIRAT, Ö.; VARKAL, H. TEMİZ, Ö.; KARGIN, F. Heavy metals in the Blue Crab (*Callinectes sapidus*) on Mersin Bat, Turkey. *Bull Environ Contam Toxicol.*, v.98, p.824-829, 2017.

ENGEL, D. W.; BROUWER, M. Metal regulation and molting in the blue crab, *Callinectes sapidus*: metallothionein function in metal metabolism. *The Biological Bulletin.*, v.1, p.239-251, 1987.

ENGEL, D. W.; BROUWER, M. Short-Term Metallothionein and Copper Changes in Blue Crabs at Ecdysis. *The Biological Bulletin.*, v.3, p.447-452, 1991.

FLANNAGAN, R. S.; JAUMOILLÉ, V.; GRINSTEIN, S. The cell biology of phagocytosis. *Annual review of pathology.*, v.7, p.61-98, 2012.

FUGÈRE, N.; BROUSSEAU, P.; KRZYSTYNIAK, K.; CODERRE, D.; FOURNIER, M. Heavy metal-specific inhibition of phagocytosis and different in vitro sensitivity of heterogeneous coelomocytes from *Lumbricus terrestris* (Oligochaeta). *Toxicology.*, v.109, p.157-166, 1996.

GAO, A.; WANG, L.; YUAN, H. Expression of metallothionein cDNA in a freshwater crab, *Sinopatamon yangtsekiense*, exposed to cadmium. *Exp. Mol. Pathol.*, v.64, n.3, p.253-258, 2012.

HAMMOND, P. B. Exposure of Humans to Lead. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology.*, v.17, p.197-214, 1977.

HARDY R. D.; DEPLEDGE, M. H. Physiological responses: their measurement and use as environmental biomarkers in ecotoxicology. *Ecotoxicology.*, v.8, p.329-349, 1999.

HARRIS, R. R.; SANTOS, M. C. F. Heavy metal contamination and physiological variability in the Brazilian mangrove crabs *Ucides cordatus* and *Callinectes danae* (Crustacea: Decapoda) *Mar. Biol.*, v.137, n.4, p.691-703, 2000.

HENDRIKS, H. R.; EESTERMANS, I. J. Phagocytosis and lipofuscin accumulation in lymph node macrophages. *Mech Ageing. Dev.*, v.35, n.2, p.1661-167, 1986.

HICKMAN, C. P. JR.; ROBERTS, L. S.; LARSON, A. *Princípios integrados de Zoologia*. 11ª ed, Editora Guanabara Koogan, 2004, 846p.

HINES, A. H. *Ecology of juvenile and adult blue crabs*. In: KENNEDY, V. S.; CRONIN, L. E. *Biology of the Blue Crab*. Maryland Sea Grant College Program, College Park, Maryland, 2007.

HOGARTH, P. J. *The Biology of Mangroves and Seagrasses*. Oxford University press, 2007,273p.

HOOK, S. E.; GALLAGHER, E. P.; BATLEY, G. E. The role of biomarkers in the assessment of aquatic ecosystem health. *Integr. Environ. Assess. Manag.*, v.10, n.3, p.327-341, 2014. DOI: [10.1002 / ieam.1530](https://doi.org/10.1002/ieam.1530)

ICZ – Instituto de Metais Não Ferrosos. Disponível em: <http://www.icz.org.br/chumbo.php>. Acesso em: 20 dez. 2019.

INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia. Orientação sobre Validação de Métodos Analíticos, DOQ-CGCRE-008. INMETRO, 2011.

JENNY, M. J.; RINGWOOD, A. H.; SCHEY, K.; WARR, G. W.; CHAPMAN, R. W. Diversity of metallothioneins in the American oyster, *Crassostrea virginica*, revealed by transcriptomic and proteomic approaches. *Eur. J. Biochem.*, v.271, p.1702-1712, 2004.

JENNY, M. J.; WARR, G. W.; RINGWOOD, A. H.; BALTZEGAR D. A. Regulation of metallothionein genes in the American oyster (*Crassostrea virginica*): ontogeny and differential expression in response to different stressors., *Gene.*, v.379, p.156-165, 2006.

JEROME, F. C.; HASSAN, A.; OMONIYI-ESAN, G. O.; ODUJOKO, O. O. Metal uptake, oxidative stress and histopathological alterations in gills and hepatopancreas of *Callinectes amnicola* exposed to industrial effluent. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v.139, p.179–193, 2017.

JOHANSSON, M. W.; KEYSER, P.; SRITUNYALUCKSANA, K.; SÖDERHÄLL, K. Crustacean haemocyte and haematopoiesis. *Aquaculture*, v.191, p.45-52, 2000.

JOHNSON, P. T. *Histology of the blue crab, Callinectes sapidus: a model for the Decapoda*. Praeger, New York, 1980.

JOP, K. M.; BIEVER, R. C.; HOBERG, J. R.; SHEPHERD, S. P. Analysis of metals in blue crabs, *Callinectes sapidus*, from two connecticut estuaries. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, v.58, p.311-317, 1997.

KAGI, J. H. R. *Evolution, structure and chemical activity of class I metallothioneins: an overview*. In: SUZUKI, K. T.; IMURA, N.; KIMURA, I. (Eds). *Metallothionein III: Biological roles and medical implications*. Birkhauser Verlag Basel, p.29-55, 1993.

KIM, J. H.; KANG, J. C. Effects of sub-chronic exposure to lead (Pb) and ascorbic acid in juvenile rockfish: Antioxidante responses, MT gene expression, and neurotransmitters. *Chemosphere*, v.171, p.520-527, 2017.

KIM, B. S. M.; BÍCEGO, M. C.; TANIGUCHI, S.; SIEGLE, E.; OLIVEIRA, R.; ALCÁNTARA-CARRIÓ, J.; FIGUEIRA, R. C. L. Organic and inorganic contamination in sediments from Araçá Bay, São Sebastião, Brazil. *Ocean & Coastal Management*, v.164, p. 42-51, 2018.

KUMAR, A.; SINGH, N.; PANDEY, R.; GUPTA, V. K.; SHARMA, B. Biochemical and molecular targets of heavy metals and their actions, in biomedical applications of metals. *Springer International Publishing*, p.297–319, 2018.

LANDRIGAN P.J. The worldwide problem of lead in petrol. *Bulletin of World Health Organization*, v.80, n.10, p.768, 2002.

LAUGHLIN, R. A. Feeding habits of the blue crab, *Callinectes sapidus* (Rathbun), in the Apalachicol a estuary, Florida. *Bull. Mar. Sci.*, v.32, p.807–822, 1982.

LAVRADAS, R. T.; HAUSER-DAVIS, R. A.; LAVANDIER, R. C.; ROCHA, C. C.; PIERRE, T. D. S.; SEIXAS, T.; HEHRIG, H. A. Metal, metallothionein and glutathione levels in blue crab (*Callinectes* sp.) specimens from southeastern Brazil. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v.107, p.55-60, 2014.

LAEGDSGAARD, P.; JOHNSON, C. R. Mangrove habitats as nurseries: unique assemblages of juvenile fish in subtropical mangroves in eastern Australia. *Marine Ecology Progress Series*, v.126, p.67-81, 1995.

LEGRAS, S.; MOUNEYRAC, C.; AMIARD, J. C.; AMIARD-TRIQUET, C.; RAINBOW, P. S. Changes in metallothionein concentrations in response to variation in natural factors (salinity, sex, weight) and metal contamination in crabs from a metal-rich estuary. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, v.246, p.259-279, 2000.

LEVIN, S. M.; GOLDBERG, M. Clinical evaluation and management of lead exposed construction workers. *AM. J. Ind. Med.*, v.37, p.23-43, 2000.

LEWIS, M.; PRYOR, R.; WILKING, L. Fate and effects of anthropogenic chemicals in mangrove ecosystems: A review. *Environmental Pollution*, v.159, n.10, p.2328–2346, 2011. Doi:10.1016/j.envpol.2011.04.027

LIMA, G. N.; RUEDA, V. O. M. The urban growth of the metropolitan area of São Paulo and its impact on the climate. *Weather and Climate Extremes*, v.21, p.17-26, 2018.

LITTERBASE: Online portal for marine litter. Disponível em: [http://litterbase.awi.de/interaction\\_graph](http://litterbase.awi.de/interaction_graph). Acesso em: 27 dez. 2019.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C(T)}$  method. *Methods*, v.25, n.4, p.402-408, 2001.

LUGO, A. E.; SNEDAKER, S. C. The ecology of mangroves. *A Ver. Ecol. Syst.*, n.5, p.39-64, 1974.

MAAZOUZI, C.; MASSON, G.; IZQUIERDO, M. S.; PIHAN, J. C. Chronic copper exposure and fatty acid composition of the amphipod *Dikerogammarus villosus*: results from a field study. *Environ Poll.*, v.156, n.1, p.221-226, 2008.

MAHIQUES M. M.; BURONEI L.; FIGUEIRA R. C. L.; LAVENÉRE-WANDERLEY A. A. O.; CAPELLARI B.; ROGACHESKI C. E.; BARROSO C. P.; SANTOS L. A. S.; CORDERO L. M.; CUSSIOLI M. C. Anthropogenic influences in a lagoonal environment: a multiproxy approach at the valo grande mouth, Cananéia-Iguape system. *Braz. j. oceanogr.*, v.57, p.325-337, 2009.

MAIA, C. B.; ALMEIDA, A. C. M.; MOREIRA, F. R. Avaliação do teor de chumbo em mexilhões da espécie *Perna perna* na região metropolitana da cidade do Rio de Janeiro. *J. Braz. Soc. Ecotox.*, v.1, n.2, p.195-198, 2006.

MAITI, S.; CHOWDHURY, A. Effects of Anthropogenic Pollution on Mangrove Biodiversity: A Review. *Journal of Environmental Protection*, v.4, n.2, p.1428-1434, 2013. Doi: 10.4236/jep.2013.412163.

MANDAL, P. K.; MANDAL, A.; AHEARN, G. A. Differential physiological expression of the invertebrate  $2Na^+/1H^+$  antiporter in single epithelial cell type suspensions of lobster hepatopancreas. *J. Exp. Zool.*, v.297, n.1, p.32-44, 2003.

MAO, H.; TAN, F. Q.; WANG, D. H.; ZHU, J. Q.; ZHOU, H.; YANG, W. X. Expression and function analysis of metallothionein in the testis of stone crab *Charybdis japonica* exposed to cadmium. *Aquatic Toxicol.*, v.124, p.11-21, 2015.

MARGOSHES, B. L.; VALLE, J. A cadmium protein from equine kidney cortex. *Journal of the American Chemical Society*, v.79, p.4813-4814, 1957.

MARTÍN, A. A. O saturnismo e a queda do império romano. *Hérodoto*, v.2, n.2, p.460-471, 2018

MARTINS, C. D. G.; BIANCHINI, A. Metallothionein-like proteins in the blue crab *Callinectes sapidus*: effect of water salinity and ions. *Comp. Biochem. Physiol.*, v.152, p.366-371, 2009.

MATOZZO, V.; MARIN, M. G. The role of haemocytes from the crab *Carcinus aestuarii* (Crustacea, Decapoda) in immune responses: A first survey. *Fish & Shellfish Immunology*, v.28, p.534–541, 2010.

MAY, R. C.; MACHESKY, L. M. Phagocytosis and the actin cytoskeleton. *J. Cell Sci.*, v.114, n.6, p.1061-1077, 2001.

MELLO, G. A. S. *Manual de Identificação dos Brachyura (caranguejos e siris) do Litoral Brasileiro*. Plêiade/APESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo. São Paulo, 1996, 604p.

MITRA, P.; SHARMA, S.; PUROHIT, P.; SHARMA, P. Clinical and molecular aspects of lead toxicity: An update. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.*, v.54, p.506-528, 2017.

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

MUNIZ, P.; SILVA, D. A. M.; BÍCEGO, M. C.; BROMBERG, S.; PIRES-VANIN, A. M. S. Sewage contamination in a tropical coastal area (São Sebastião Channel, SP, Brazil). *Marine Pollution Bulletin*, v.99, p.292-300, 2015.

NORDBERG, M. Metallothioneins: historical review and state of knowledge. *Talanta*, v.46, p.243-253, 1998.

ORTEGA, P.; VITORINO, H. A.; MOREIRA, R. G.; PINHEIRO, M. A. A.; ALMEIDA, A. A.; CUSTÓDIO, M. R.; ZANOTTO, F. P. Physiological differences in the crab *Ucides cordatus* from two populations inhabiting mangroves with different levels of cadmium contamination. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v.36, n.2, p.361–371, 2016.

OZCAN, B.; TZEREMES, P. G.; TZEREMES, N. G. Energy consumption, economic growth and environmental degradation in OECD countries, *Economic Modelling*, v.84, p.203-213, 2019.

PATRA, R. C.; RAUTRAY, A. K.; SWARUP, D. Oxidative stress in lead and cadmium toxicity and its amelioration. *Vet. Med. Int.*, p.1-9, 2011.

PEDERSEN, S. N.; LUNDEBYE, A. K.; DEPLEDGE, M. H. Field application of metallothionein and stress protein biomarkers in the shore crab (*Carcinus maenas*) exposed to trace metals. *Aquat. Toxicol.*, v.37, p.183-200, 1997.

PEIJNENBURG, W. J. G. M.; JAGER, T. Monitoring approaches to assess bioaccessibility and bioavailability of metals: matrix issues. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v.56, p.63-77, 2003.

PEREIRA, C. D. S.; ABESSA, D. M. S.; BAINY, A. C. D.; ZARONI, L. P.; GASPARRO, M. R.; BICEGO, M. C.; TANIGUCHI, S.; FURLEY, T. H.; SOUZA, E. C. P. M. Integrated



assessment of multilevel biomarker responses and chemical analysis in mussels from São Sebastião, São Paulo, Brazil. *Environmental Toxicology*, v.26, 462-469, 2009.

PENTEADO, A. R. O homem brasileiro e o meio. *In: AZEVEDO A. Brasil, a terra e o homem.* Companhia editora Nacional, v.2, 1970.

PERKINS-VISSER, E.; WOLCOTT, T. G.; WOLCOTT, D. L. Nurseryrole of seagrassbeds: enhanced growth of juvenile blue crabs, *Callinectes sapidus* (Rathbun) *Mar.Biol. Ecol.*, v.198, p.155–173, 1996.

PETRONE, P. Povoamento e colonização. *In: AZEVEDO A. Brasil a terra e o homem.* Companhia editora Nacional, 1970, v.2.

PINHEIRO, M. A. A.; OLIVEIRA, A. J. F. C.; FONTES, R. F. C. *Introdução ao Panorama Ambiental da Baixada Santista.* *In: OLIVEIRA, A. J. F. C.; PINHEIRO, M. A. A.; FONTES, R. F. C. Panorama Ambiental da Baixada Santista.* 1. ed. São Vicente: Universidade Estadual Paulista, Campus Experimental do Litoral Paulista, 2008.

POR, F. D. *Guia ilustrado do manguezal brasileiro.* Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, 1994, 82 p.

PREDA, M.; Cox, M. E. Trace metal occurrence and distribution in sediments and mangroves, Pumicestone region, southeast Queensland, Australia. *Environment International*, v.28, p.433–449, 2002.

RAINBOW, P. S. *Phylogeny of trace metal accumulation in crustaceans.* *In: LANGTON, W. J.; BEBIANNO, M. J. Metal Metabolism in Aquatic Environments.* Chapman and Hall, London, UK, 1998.

RAINBOW, P. S. Trace metal bioaccumulation: models, metabolic availability and toxicity. *Environ. Int.*, v.33, p.576–582, 2007.

RAINBOW, P. S.; POIRIER, L.; SMITH, B. D.; BRIX, K. V.; LUOMA, S. N. Trophic transfer of trace metals: subcellular compartmentalization in a polychaete and assimilation by a decapod crustacean. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, v.308, p.91–100, 2006.

- RATCLIFFE, N. A.; ROWLEY, A. F.; FITZGERALD, S. W.; RHODES, C. P. Invertebrate immunity: basic concepts and recent advances. *Int. Rev. Cytol.*, v.97, p.183-350, 1985.
- RAVINDRANATH, M. H. The circulating haemocyte population of the mole crab. *Biological bulletin*, v.152, p.415- 423, 1977.
- REICHMUTH, J. M.; WEIS, P.; WEIS, J. S. Bioacumulation and depuration of metals in blue crabs (*Callinectes sapidus* Rathbun) from a contaminated and clean estuary. *Environ. Pollut.*, v.158, p.361-368, 2010.
- RINDERHAGEN, M.; RITTERHOFF, J.; ZAUKI, G. P. Crustaceans as bioindicators. *Biomon. Poll.*, v.9, p.161-194, 2000.
- ROSSI, D. F. Variação sazonal de metais pesados em siri azul (*Callinectes bocourti* A. milne Edwards, 1897) na lagoa de mundaú, Maceió (AL). 2009. Trabalho de conclusão de curso da Universidade Estadual do norte Fluminense. Rio de Janeiro, 2009.
- SCHAEFFER-NOVELLI, Y. *Manguezais brasileiros: região sul-sudeste*. In: Anais do simpósio sobre ecossistemas da costa sul e sudeste: síntese dos conhecimentos, Cananéia, São Paulo. ACIESP, Cananéia, São Paulo. v.1 p.78, 1987.
- SCHAEFFER-NOVELLI, Y. Perfil dos ecossistemas litorâneos brasileiros, com especial ênfase sobre o ecossistema manguezal. *Esp. Inst. Oceanogr.*, v.7, 16p, 1989.
- SCHAEFFER-NOVELLI, Y. *Manguezais brasileiros*. Tese de Livre Docência. Universidade de São Paulo, Instituto Oceanográfico, 1991, 2 vols.
- SCHAEFFER-NOVELLI, Y. Manguezal: Ecossistema entre a Terra e o Mar. São Paulo: *Caribbean Ecological Research*, p.64, 1995.
- SCHAEFFER-NOVELLI, Y. *Manguezal: ecossistema que ultrapassa suas próprias fronteiras*. In: Congresso Nacional de Botânica, Recife, p.34-37, 2002.
- SCHAEFFER-NOVELLI, Y.; CINTRÓN, G. Guia para o estudo de áreas de manguezal, estrutura, função e flora. *Caribbean Ecological Research*. 150 p, 1986.

SCHEEL-YBERT, R.; BIANCHINI, G. F.; DE BLASIS, P. Registro de mangue em um sambaqui de pequeno porte do litoral sul de Santa Catarina, Brasil, a cerca de 4900 anos cal BP, e considerações sobre o processo de ocupação do sítio Encantada-III. *Revista do Museu de Arqueologia e Etnologia*, São Paulo, v.19, p.103-118, 2009.

SILVA, C. A. R.; LACERDA, L. D.; REZENDE, C. E. Heavy metal reservoirs in a red mangrove forest, v.22, p.339–345, 1990.

SINGH, N.; KUMAR, A.; GUPTA, V. K.; SHARMA, B. Biochemical and molecular bases of lead induced toxicity in mammalian systems and possible mitigations. *Chemical research in toxicology*, v. 31, n.10, p.1009-1021, 2018. doi: 10.1021/acs.chemrestox.8b00193

SUNJIAN, L; XU, J.; ZHAO, J.; YIN, N.; LU, B.; LI, S.; LI, S.; CHEN, Y.; XU, H. Classification and phagocytosis of circulating harmocytes in Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) and the effect of extrinsic stimulation on circulating haemocytes *in vivo*. *Fish and Shellfish Immunology*, v.39, n.2, p.415-422, 2014.

SMIT, M. G. D.; BECHMANN, R. K.; HENDRIKS, A. J.; SKADSHEIM, A.; LARSEN, B. K.; BAUSSANT, T.; BAMBER, S.; SANNI, S. Relating biomarkers to whole-organism effects using species sensitivity distributions: A pilot study for marine species exposed to oil. *Environ Toxicol. Chem.*, v.28, p.1104–1109, 2009.

SWANSON, J. A.; BEEMILLER, P.; ZHANG, Y.; MOHAN, S.; LEVINSOHN, E.; GRAETA, I.; ADAM, D. A Cdc42 Activation cycle coordinated by PI 3-Kinase during Fc Receptor-Mediated Phagocytosis. *Molecular Biology of the cell*, v.21, n.3, p.377-498, 2010.

SYRING, R. A.; BROUWER, T. H.; BROUWER, M. Cloning and sequencing of cDNAs encoding for a novel copper-specific metallothionein and two cadmiuminducible metallothioneins from the blue crab *Callinectes sapidus*. *Com. Biochem. Physiol C.*, v.125, n.3, p.325-332, 2000.

SUTHERLAND, D. E.; STILLMAN, M. J. The “magic numbers” of metallothionein. *Metallomics*, v.1, n.5, p.444-463, 2011.

TAM, N. F. Y.; WONG, W. S. Spatial variation of heavy metals in surface sediments of Hong Kong mangrove swamps. *Environmental Pollution*, v.110, p.195–205, 2000.

TRAMONTE, K. M. Estudo da disponibilidade de metais em sedimentos do Sistema Cananéia-Iguape. 2014. Tese de doutorado, Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

TRUSCOTT, R.; WHITE, K. N. The influence of metal and temperature stress on the immune system of crabs. *Functional ecology. New horizons in ecotoxicology*, v.4, n.3, p.455-461, 1990.

TWILLEY, R. R.; POZO, M.; GARCIA, V. H.; RIVERA-MONROY, V. H.; ZAMBRANO, R.; BODERO, A. Litter Dynamics in Riverine Mangrove Forests in the Guayas River Estuary, Ecuador. *Oecologia*, v.111, n.1, p.109-122, 1997.

TWILLEY, R. R.; SNEDAKER, A. S. C.; YÁÑES-ARANCIBIA, A.; MEDINA, E. *Biodiversity and ecosystem processes on tropical estuaries: perspectives of mangrove ecosystems*. In: MOONEY, H. A.; CRUSHMAN, J. H.; MEDINA, E.: *Functional Roles Biodiversity: A global Perspective*, p. 327-370, 1996.

UCHIYAMA, K. Environmental Kuznets Curve Hypothesis and Carbon Dioxide Emissions, Springer Briefs in Economics Development, Bank of Japan Research Series, Springer, 2016, 63p.

VALAVANIDIS, A.; VLAHOGIANNI, T.; DASSENAKIS, M.; SCOULLOS, M. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicology and environmental*, v.64, p.178-189, 2006.

VIRGA, R. H. P. Análise quantitativa de metais pesados (Cd, Cr, Cu, Pb e Zn) em siris azuis do gênero *Callinectes* sp. (Crustacea, Portunidae), provenientes do Rio Cubatão, Cubatão, São Paulo. 2006. Dissertação de Mestrado. Universidade Católica de Santos, Santos, 2006.

VIRGA, R. H. P.; GERALDO, L. P.; SANTOS, F. H. Avaliação de contaminação por metais pesados em amostras de siris azuis. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, v.27, n.4, p.787-792, 2007.

VIRNSTEIN, R. W. Predation on estuarine infauna: Response patterns of component species. *Estuaries and coasts*, v.2, p.69-86, 1979.

VOGT, G.; QUINTIO, E. T. Accumulation and excretion of metal granules in the prawn, *Penaeus monodon*, exposed to water-borne copper, lead, iron and calcium". *Aquat. Toxicol.*, v.28, p.223–241, 1994.

XU, X. H.; MENG, X.; GAN, H. T.; LIU, T. H.; YAO, H. Y.; ZHU, X. Y.; XU, G. C.; XU, J. T. Immune response, MT and HSP70 gene expression, and bioaccumulation induced by lead exposure of the marine crab, *Charybdis japonica*. *Aquatic Toxicology*, v.210, p.98-105, 2019.

WHO - World Health Organization. Biological monitoring of chemical exposure in the workplace – Guidelines. World Health Organization, Geneva, Suíça, 1996.

WILLIAMS, M. J. The swimming crabs of genus *Callinectes* sp.(Decapoda: Portunidae). *Fish. Bull.*, v.72, p.685-789, 1974.

WILLIAMS, T. P.; BUBB, J. M.; LESTER, J. N. Metal accumulation with in salt marsh environments: a review. *Mar. Pollut. Bull.*, v.28, n.5, p.277-290, 1994.

WOLFF, M.; KOCH, V.; ISSAC, V. A Trophic Flow Model of the Caeté Mangrove Estuary (North Brazil) with Considerations for the Sustainable Use of its Resources. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, v.50, p.789–803, 2000.

YUTIN, N.; WOLF, M. Y.; WOLF, Y. I.; KOONIN, E. V. The origins of phagocytosis and eukaryogenesis. *Biology direct*, v.4, n.9, 2009.

ZHOU, Y.; GU, W.; TU, D.; ZHU, Q.; ZHOU, Z.; CHEN, Y.; SHU, M. Hemocytes of the mud crab *Scylla paramamosain*: Cytometric, morphological characterization and involvement in immune responses. *Fish and shellfish immunology*, v.72, p.459-469, 2018.

ZHOU, Y.; ZHAO, B.; PENG, Y.; CHEN, G. Influence of mangrove reforestation on heavy metal accumulation and speciation in intertidal sediments. *Marine pollution Bulletin*, v.60, n.8, p.1319-1324, 2010.