

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE (ICBS)  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: FISILOGIA

LEONARDO AIRTON RESSEL SIMÕES

**EFEITOS DO TRATAMENTO COM DOSES SUBLETAIS DE TRIBUTILESTANHO  
(TBT) SOBRE O METABOLISMO DO SIRI AZUL *Callinectes sapidus***

Porto Alegre

2020

LEONARDO AIRTON RESSEL SIMÕES

**EFEITOS DO TRATAMENTO COM DOSES SUBLETAIS DE TRIBUTILESTANHO  
(TBT) SOBRE O METABOLISMO DO SIRI AZUL *Callinectes sapidus***

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Mestre em Fisiologia.

Orientadora: Dr<sup>a</sup> Anapaula Sommer Vinagre

Porto Alegre

2020

## DEDICATÓRIA

Dedico essa dissertação aos meus pais Elena Ressel e Airton Simões pela paciência e por me apoiarem a seguir a carreira acadêmica e a Dr<sup>a</sup> Thaís Dalzochio por me apresentar a ecotoxicologia, me ensinar e me fazer apaixonado por essa linha de pesquisa.

## **AGRADECIMENTOS**

Gostaria de agradecer principalmente a minha Mãe Elena, por todo o apoio desde o início, da ideia de me formar e seguir para o mestrado, de estar sempre estudando. Agradecer ao meu Pai Airton que sempre me ajudou e me deu força mesmo que de longe, aos meus irmãos Michael, Michele e Jarbas por confiarem, investirem e apostarem nas minhas escolhas sobre o meu futuro. A toda minha família, ressaltando meus primos Áureo, Júnior, Vanessa e Jardene por me darem força e seguir a minha vida profissional e vibrarem comigo todas as conquistas.

A minha magnífica orientadora professora Anapaula que me deu a oportunidade de realizar o mestrado em fisiologia na UFRGS, abrindo as portas do LaMEC e dando a oportunidade de fazer parte desse grupo. Sou muito grato por me possibilitar a trabalhar e desenvolver um projeto unindo duas linhas de pesquisa que tenho um grande amor que é a fisiologia e a ecotoxicologia. Agradecer também por todos os ensinamentos sobre fisiologia endócrina, comparada, o siri azul, por sempre estar disposta, por me ajudar como aluno, como amigo e muitas vezes sendo como uma mãe, me escutando a desabafar e me cuidando. Obrigado por todo o carinho e paciência nesses dois anos.

Agradecer também aos meus colegas Silvia e Silvio que estiveram comigo durante todo o mestrado, estudamos muito juntos, nos ajudamos durante o curso todo e hoje podemos comemorar nosso esforço. Ao meu “co” Éverton e a Maíza por inúmeras vezes terem sido as pessoas me ajudaram e me apoiaram quando as coisas não estavam andando como planejado. A Pós Doc Mariana que foi uma luz que apareceu para me auxiliar e me passar muito aprendizado além de se tornar uma amiga para todas as horas. Um agradecimento especial aos alunos de iniciação científica Vitória, Renata, Fernanda e Mateus que foram grandes parcerias e muito importantes nessa etapa.

Agradecer aos meus amigos Tiago, Thiago, Guilherme, Bruna, Bárbara, Ana, Thomas, Matheus, Alessandra, meus pai e mãe de coração Tiago e Francine que muito me apoiaram e estiveram presentes em todos os momentos nesses dois anos. Agradecer por sempre me compreenderem, ajudar, me animar, por me mostrarem que tenho capacidade e não me deixarem desanimar. Minha amiga Dr<sup>a</sup> Thaís que é um

exemplo de profissional e que segue, mesmo de longe me ensinando muito como ser uma pessoa de caráter pessoal e profissional.

Aos meus colegas Eduardo, Amanda, Isadora e Marjoriane por serem meu porto seguro desde o dia da seleção do mestrado e por não terem deixado eu desistir ou desacreditar do meu potencial. Principalmente a Isa e a Marjo que estavam diariamente do meu lado tendo paciência comigo, me ensinando, me acalmando, me ajudando no laboratório, tornando essa caminhada mais leve e me recebendo sempre de braços abertos e cheio de amor.

Por fim, agradecer ao professor Dr. Jones Bernardes Graceli e seu aluno Charles Santos da Costa, do Laboratório de Endocrinologia e Toxicologia Celular da Universidade Federal do Espírito Santo pela sua colaboração no projeto. Ao professor Dr. Gilberto Fillmann e sua equipe, do Laboratório de Microcontaminantes Orgânicos e Ecotoxicologia Aquática (CONECO), Instituto de Oceanografia, da Universidade Federal do Rio Grande (FURG) pela análise da presença de TBT. E aos demais colegas, professores e a toda a equipe técnica do Laboratório de Metabolismo e Endocrinologia Comparada (LAMEC) e do departamento de fisiologia que estavam sempre dispostos a me ajudar e me ensinar para que eu pudesse concluir essa etapa com segurança sobre o trabalho que realizei.

## RESUMO

O tributilestanho (TBT) é um composto organoestânico utilizado na pintura dos cascos de embarcações para evitar o processo de bioincrustação. Grandes quantidades de TBT têm sido liberadas nos ambientes aquáticos indiretamente através de resíduos de cascos de navios. Estudos demonstram suas ações como disruptor endócrino, causando alterações no metabolismo e na reprodução em organismos expostos. Crustáceos podem se contaminar com TBT através das brânquias ou pela ingestão de alimentos contaminados. O siri azul *Callinectes sapidus* é uma espécie bentônica encontrada em águas oceânicas ou estuarinas, com importância ecológica e socioeconômica. O objetivo desse estudo foi analisar os efeitos da exposição aguda a concentrações subletais de TBT no metabolismo de *C. sapidus*. Siris machos e fêmeas (n= 57) foram coletados em Tramandaí, RS, transportados ao laboratório onde foram aclimatados por 7 dias sob condições controladas. Após, os siris foram transferidos para beckers (2L) e mantidos individualmente, e subdivididos em três tratamentos, controle (sem TBT), TBT [100 ng/L] e TBT [1000 ng/L], sendo expostos por 48 horas e 96 horas. Após o período experimental, os animais foram crioadestesiados para a coleta de hemolinfa e amostras de tecidos. Nas amostras de hemolinfa foram analisados os níveis de glicose, colesterol, triglicerídeos, lactato e proteínas totais, por técnicas colorimétricas. Nas amostras de hepatopâncreas, músculo do quelípede, coração e brânquias foram determinadas as concentrações de glicogênio, de proteínas e a lipoperoxidação. A análise estatística foi realizada através do teste de ANOVA em duas vias para os dados paramétricos ou de Kruskal-Wallis para os dados não paramétricos. As diferenças foram consideradas significativas quando  $P < 0,05$ . Nas amostras de hemolinfa não ocorreram diferenças significativas nos níveis de glicose, colesterol e triglicerídeos. O lactato hemolinfático reduziu ( $P < 0,05$ ) no grupo controle 96 horas em relação às 48 horas. Os animais expostos a 1000 ng/L por 96 horas apresentaram um aumento ( $P < 0,05$ ) de proteínas totais em relação aos animais controle 96 horas. As concentrações de glicogênio no hepatopâncreas e nas brânquias não modificaram, enquanto no coração dos siris expostos à 1000 ng/L por 96 horas houve um aumento em relação aos animais expostos às concentrações de 100 ( $P < 0,05$ ) e 1000 ng/L ( $P < 0,05$ ) às 48 horas. As concentrações de proteínas totais no

hepatopâncreas, músculo e brânquias posteriores não modificaram, enquanto nas brânquias anteriores ocorreu uma diminuição ( $P < 0,05$ ) às 48 horas em relação às 96 horas. Não foram verificadas diferenças significativas na lipoperoxidação no hepatopâncreas e nas brânquias posteriores, enquanto nas brânquias anteriores, ocorreu um aumento de lipoperoxidação às 48 horas em relação às 96 horas ( $P < 0,05$ ). As brânquias anteriores, possivelmente devido às suas características morfológicas e funcionais, foi o tecido que apresentou alterações no metabolismo de proteínas e danos oxidativos em lipídeos. Os resultados obtidos sugerem que o siri *C. sapidus* possui mecanismos metabólicos que lhe permitem manter a homeostase energética relativamente estável frente à exposição aguda ao TBT nas doses de 100 e 1000 ng/L por até 96h. Contudo, mais estudos precisam ser realizados para melhor compreensão do risco deste contaminante para os ambientes aquáticos.

**Palavras-chave:** *Callinectes sapidus*; tributilestanho; disruptor endócrino; metabolismo; estresse oxidativo.

## ABSTRACT

Tributyltin (TBT) is an organotin compound widely used as antifouling agent in ship paint formulations to resist the settlement of organisms in ship hulls. Aquatic pollution resulting from its usage has been of great concern due to its bioaccumulation potential, persistence in sediment and highly toxic effects on non-target aquatic life. Despite efforts to reduce its use, considerable levels of TBT are still detected in marine ecosystems exceeding toxicity level. TBT is an endocrine disruptor that can impact the metabolism and reproduction of aquatic vertebrates and invertebrates. The blue crab *Callinectes sapidus* is an economically and ecologically important decapod crustacean that naturally occurs in estuarine environments. This study was developed to evaluate the effects of an acute exposure to sublethal doses of TBT on the metabolism of the blue crab. After 7 days of acclimation to laboratory conditions, the crabs (n= 57) were transferred to individual cages and divided in 3 groups: control, TBT [100 ng/L] and TBT [1000 ng/L] and exposed for 48 and 96 hours. At the end of the experimental period, the crabs were chilled on ice for 15 minutes to collect hemolymph and tissues samples. The levels of glucose, lactate, cholesterol, triglycerides and total proteins were determined in the hemolymph samples using colorimetric techniques. The concentration of glycogen, proteins and lipoperoxidation was analyzed in hepatopancreas, anterior and posterior gills, heart and muscles samples. Parametric results were analyzed by two-way ANOVA and non-parametric data by Kruskal-Wallis test. The differences were considered significant when  $P < 0.05$ . The levels of glucose, cholesterol and triglycerides in the hemolymph did not modify, while lactate levels reduced in the control group after 96h ( $P < 0.05$ ). Protein levels in the hemolymph of TBT 1000 ng/L group increased at 96h in relation to control ( $P < 0.05$ ). The concentration of glycogen in hepatopancreas, muscle and gills did not modify, while an increase occurred in the heart of the 1000 ng/L group at 96h in relation to the same group at 48h ( $P < 0.05$ ). Protein concentration in hepatopancreas, muscle and posterior gills did not alter whereas in anterior gills, a reduction occurred at 48h ( $P < 0.05$ ). Lipoperoxidation levels in hepatopancreas and posterior gills did not alter whereas in anterior gills, an increase occurred at 48h ( $P < 0.05$ ). Because of its morphological and physiological features, anterior gills were the tissue mostly affected by TBT. Therefore, it seems that the blue crab can maintain



energetic homeostasis at least for 96h of TBT exposure. However, more studies are necessary to fully understand the mechanisms of TBT action on the intermediary metabolism of the blue crab.

**Keywords:** *Callinectes sapidus*; tributyltin; endocrine disruption, metabolism; oxidative stress.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Local de coleta de <i>C. sapidus</i> em Tramandaí (RS).....	25
Figura 2 - Principais órgãos internos de um caranguejo.....	28
Figura 3 - Concentração de metabólitos na hemolinfa de <i>C. sapidus</i> expostos ao TBT nas concentrações de 100 e 1000 ng/L.....	33
Figura 4 - Concentração de glicogênio nos tecidos de <i>C. sapidus</i> expostos ao TBT nas concentrações de 100 e 1000 ng/L.....	35
Figura 5 - Concentração de proteínas totais nos tecidos de <i>C. sapidus</i> expostos ao TBT nas concentrações de 100 e 1000 ng/L.....	36
Figura 6 - Concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) nos tecidos de <i>C. sapidus</i> expostos ao TBT nas concentrações de 100 e 1000 ng/L.....	38

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	11
1.1 COMPOSTOS ORGANOESTÂNICOS.....	11
1.2 ESTRESSE OXIDATIVO.....	15
1.3 EFEITOS DOS COMPOSTOS ORGANOESTÂNICOS EM CRUSTÁCEOS.....	18
1.4 SIRI AZUL.....	20
<b>2 HIPÓTESE E OBJETIVOS</b> .....	23
2.1 HIPÓTESE.....	23
2.2 OBJETIVO GERAL.....	23
2.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	23
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	24
3.1 COLETA E MANUTENÇÃO DOS ANIMAIS.....	24
3.2 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS.....	26
<b>3.2.1 Exposição</b> .....	26
<b>3.2.2 Dissecção</b> .....	26
3.3 ANÁLISES BIOQUÍMICAS.....	28
<b>3.3.1 Concentração de metabólicos hemolinfáticos</b> .....	28
<b>3.3.2 Concentração de glicogênio nos tecidos</b> .....	29
<b>3.3.3 Concentração de proteínas nos tecidos</b> .....	30
<b>3.3.4 Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)</b> .....	30
3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	30
<b>4 RESULTADOS</b> .....	32
4.1 CONCENTRAÇÃO DE METABÓLICOS HEMOLINFÁTICOS.....	32
4.2 CONCENTRAÇÃO DE GLICOGÊNIO NOS TECIDOS.....	34
4.3 CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS NOS TECIDOS.....	34
4.4 SUBSTÂNCIAS REATIVAS AO ÁCIDO TIOBARBITÚRICO (TBARS).....	37
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	39
<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	45
<b>7 PERSPECTIVAS</b> .....	46
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	47

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 COMPOSTOS ORGANOESTÂNICOS

Compostos organoestânicos (OTs) são caracterizados pela ligação covalente entre estanho (Sn) e cadeias orgânicas (HOCH et al., 2001). As principais espécies de OTs, os compostos butilestânicos (BTs) e fenilestânicos (PTs) são muito utilizados como inseticidas, fungicidas, na indústria de PVC, catalizadores industriais e na pintura dos cascos de navios para evitar a incrustação por cracas, mexilhões e algas (CRISTALE et al. 2012; GAO et al., 2017; FANG et al., 2017).

A incrustação biológica marinha, geralmente denominada bioincrustação marinha, pode ser definida como o acúmulo de microrganismos, plantas e animais aquáticos em superfícies naturais e artificiais, imersas ou submersas na água do mar (YEBRA et al., 2004; SCHULTZ et al., 2011). No caso de cascos de navios, a bioincrustação causa um aumento na resistência ao atrito, devido à rugosidade gerada, ocasionando um aumento de peso, redução da velocidade e perda de manobrabilidade, o que leva ao aumento no consumo de combustível resultando em uma maior emissão de compostos nocivos (RASCIO, 2000; CHAMP, 2000). Devido a isso, são incorporadas substâncias tóxicas, incluindo o tributilestanho (TBT), em matriz de tinta que gradualmente liberta o biocida da camada superficial para impedir o assentamento. Porém, o uso generalizado de tóxicos em tintas anti-incrustantes resultou em altos níveis de contaminação no meio ambiente e levantou preocupações sobre seus efeitos nas comunidades marinhas com o passar do tempo (ALZIEU et al., 1986; KONSTANTINOU & ALBANIS, 2004).

Em consequência desse uso, grandes quantidades de OTs têm sido liberadas em ecossistemas aquáticos, tanto diretamente a partir do descarte industrial, como indiretamente, através de resíduos de cascos de navios (LAGERSTRÖM et al., 2017). Ambientes estuarinos são comumente afetados pelas atividades humanas, recebendo efluentes sanitários e de pesticidas, derramamentos acidentais de produtos químicos como óleo de petróleo e dejetos resultantes do tráfico de embarcações como os OTs

(ARTIFON et al., 2016; BATISTA et al., 2016). Os OTs estão entre os compostos mais tóxicos introduzidos em ecossistemas aquáticos por atividades antropogênicas, pois além de apresentarem atividade neurotóxica, imunotóxica e genotóxica, estudos em animais selvagens e de laboratório demonstram suas ações como potentes disruptores endócrinos, causando alterações metabólicas e no sistema reprodutor (GRACELI et al., 2013; ARAÚJO et al., 2018; BERTO-JÚNIOR et al., 2018; MARQUES et al., 2018; NUNES-SILVA et al., 2018; SILVA et al., 2018; RONCONI et al., 2018; VOGT et al., 2018).

Os efeitos do TBT, um dos principais anti-incrustantes utilizados em tintas de cascos de navios, em organismos não alvos tornaram-se aparentes no final da década de 1970. A partir deste período começou a ser observado que o número de ostras estava sofrendo grandes quedas devido à redução do seu crescimento, anomalias no desenvolvimento larval e malformação de concha afetando esses animais, sendo assim, em 1982, a França proibiu a aplicação de tintas anti-incrustantes à base de TBT em navios com menos de 25 metros (TERLIZZI et al., 2001). Logo após, o *imposex*, que é um desequilíbrio hormonal nas fêmeas de gastrópodes e bivalves, o que induz o desenvolvimento dos órgãos sexuais masculinos levando à masculinização de fêmeas, começou a ser descrito (STANGE et al., 2012; MARTINOVIĆ et al., 2016). Atualmente esse fenômeno já foi descrito em mais de 200 espécies de moluscos e acredita-se ser causado, pelo menos em parte, por interação com o receptor retinóide-X (RXR, do inglês *retinoid X receptor*) já identificado como outro efeito negativo da contaminação (CHAMP & PUGH, 1987; PARK et al., 2016; LAGADIC et al., 2018). Em consequência, surgiram restrições à utilização de TBT em pequenas embarcações no Reino Unido (1987), EUA (1988), Canadá (1989), Austrália (1989) e UE (1989) (CHAMP, 2000; LE MAIRE et al., 2009; MARTINOVIĆ et al., 2016).

O TBT é um contaminante em sistemas aquáticos presente em todo o mundo e pode ser encontrado no ambiente em concentrações na faixa de indetectável em áreas de oceano aberto, para 17 ng/L em estuários e até 100 ng/L em portos (FENT, 1996). Portanto, a presença de *imposex* em gastrópodes tem sido utilizada como bioindicador da contaminação ambiental por OTs (CASTRO et al., 2012; ARTIFON et al., 2016;

MACIEL et al., 2018). Além de imposex, no bivalve *Lamellidens marginalis*, a exposição ao TBTCl de forma aguda, resultou na diminuição gradual de glicogênio nas brânquias, gônadas e glândulas digestivas à medida que o período de exposição aumentava (24, 48, 72 e 96 horas) (JAGTAP, 2018).

A Organização Marítima Internacional (IMO, do inglês *International Maritime Organization*) determinou pela convenção internacional para o controle de substâncias anti-incrustantes a proibição da aplicação de TBT em todos os navios após 1º de janeiro de 2003 e exigiu sua ausência como revestimento ativo em todos os navios após 1º de janeiro de 2008 (IMO, 2001). Apesar do uso de TBT ter sido banido, altos níveis ainda podem ser encontrados na água, no sedimento e em animais (FANG et al., 2017; LAGERSTRÖM et al., 2017). Estudos recentes na Europa revelaram que altos níveis de OTs ainda estão sendo liberados para ambientes aquáticos, provenientes do descarte de água usada para lavar embarcações, camadas antigas de tinta dos cascos ou velhos navios abandonados (LAGERSTRÖM et al., 2017; LARANJEIRO et al., 2018; SCHØYEN et al., 2019).

Na América do Sul, somente o Brasil e a Argentina possuem restrições legais quanto ao uso de OTs (ARTIFON et al., 2016, BATISTA et al., 2016). No Brasil, o uso de OTs foi proibido pela Marinha em 2007 (DPC, 2007) e pelo Senado Federal em 2010 (decreto 797/2010). Entretanto, altos níveis de OTs foram recentemente detectados em Pernambuco, Bahia, Paraná, São Paulo, Rio de Janeiro e Espírito Santo (CASTRO et al., 2012; SANT'ANNA et al., 2014; ARTIFON et al., 2016; MACIEL et al., 2018). Portanto, mesmo com as autoridades locais atuando para controlar o uso de tintas anti-incrustantes baseadas em OTs, esses compostos ainda estão presentes em áreas como portos comerciais, marinas e estaleiros brasileiros. Estes achados mostram a necessidade de estudos para avaliar a contaminação e os danos causados devido à poluição com OTs usando modelos biológicos.

O TBT tende a se acumular no sedimento e está presente na interface sedimento-água. Invertebrados bentônicos como moluscos, ascídios e crustáceos decápodes, entram em contato com este contaminante através da água pela respiração e pela alimentação de animais contaminados e, ocasionalmente, ingerindo também o sedimento. Assim como no sedimento, o TBT pode se acumular nos tecidos dos

animais, processo conhecido como bioacumulação, que ocorre quando a taxa de ingestão excede a de excreção (RAND & PETROCELLI, 1985; RUBIO-FRANCHINI & RICO-MARTÍNEZ, 2011). Esse processo interfere nas redes alimentares, podendo causar danos ao ambiente e à saúde humana (JADHAV et al., 2011; GOMES et al., 2014; PODRATZ et al., 2014; SANT'ANNA et al., 2014; LEE et al., 2016). Nos organismos aquáticos, o grau de bioacumulação depende da dinâmica da cadeia alimentar, disponibilidade e persistência de substâncias tóxicas na água e, principalmente, das propriedades químicas e físicas das substâncias tóxicas (RAND & PETROCELLI, 1985; RUBIO-FRANCHINI & RICO-MARTÍNEZ, 2011).

O TBT, assim como os metais, pode ser potencialmente transferido para níveis tróficos mais altos de teias alimentares aquáticas, estendendo seus efeitos adversos aos seres humanos que consomem frutos do mar contaminados, processo conhecido como biomagnificação (SPIEGEL, 2002). A biomagnificação ocorre em consequência de um aumento na concentração de traços de um composto ou substância através de pelo menos dois níveis tróficos em uma cadeia alimentar (BARWICK & MAHER, 2003).

Efeitos subletais do TBT em moluscos adultos ocorreram em concentrações em torno de 2 ng/L enquanto que os crustáceos são afetados em valores mais altos – em torno de 500 ng/L, o que pode indicar que crustáceos contaminados por TBT no ambiente estão expostos a valores altos do contaminante (FENT, 1996; OBERDÖSTER et al., 1998). Peixes e mamíferos marinhos também podem se contaminar pela água ou pela ingestão de alimento – invertebrados – contaminados (PODRATZ et al., 2015; LEE et al., 2016; ARAÚJO et al., 2018; MARQUES et al., 2018). Portanto, o consumo de frutos do mar (peixes e invertebrados) contaminados pode causar sérios riscos à saúde humana (SANTOS et al., 2009; PODRATZ et al., 2014; LEE et al., 2016). O limite de segurança estabelecido pela *European Food Safety Authority* é de 250 ng/kg/dia de TBT. No entanto, concentrações superiores foram detectadas em animais expostos a esse composto, conforme reportado em estudo realizado em Pernambuco, onde moluscos comestíveis apresentaram cerca de 542 ng Sn/g (MACIEL et al., 2018).

Os OTs são reconhecidos como potentes agentes disruptores endócrinos, (CHAMP & PUGH, 1987; STANGE et al., 2012; MARTINOVIĆ et al., 2016; PARK et al., 2016; LAGADIC et al., 2018). Os efeitos de desregulação endócrina podem ocorrer em

diferentes níveis fisiológicos: a) alterando (inibindo ou estimulando) a secreção de hormônios, efeito relacionado a mecanismos que controlam a liberação de hormônios das células endócrinas e a síntese desses hormônios; b) interferindo na interação hormônio-receptor, onde o disruptor endócrino pode atuar como agonista ou antagonista pela ligação direta a um receptor hormonal ou indiretamente, interferindo nos mecanismos em qualquer etapa da via de transdução de um hormônio, alterando seu efeito final; c) modificando o metabolismo dos hormônios circulantes, aumentando ou diminuindo sua taxa de excreção e/ou biotransformação no hepatopâncreas ou outros órgãos (RODRÍGUEZ et al., 2007).

## 1.2 ESTRESSE OXIDATIVO

As espécies reativas de oxigênio (EROs) são produzidas como subproduto da atividade mitocondrial apresentando papel fisiológico na sinalização celular e sendo mantidas em equilíbrio homeostático por mecanismos pró- e antioxidantes (BELLANTI et al., 2013; KANDER et al., 2017). O estresse oxidativo ocorre quando a produção de EROs excede a capacidade das defesas antioxidantes celulares de remover essas espécies tóxicas (LIMÓN-PACHECO & GONSEBATT, 2009; KALYANARAMAN, 2013).

Um radical livre é definido como uma molécula com um ou mais elétrons não emparelhados em uma camada de valência mais externa. As EROs podem ser radicais livres derivados do  $N_2$  como o óxido nítrico ( $\bullet NO$ ) ou do  $O_2$  como os radicais superóxido ( $O_2\bullet$ ) e hidroxila ( $\bullet OH$ ). O peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) também é considerado uma ERO, porém não é um radical, mas um precursor de radicais livres (FRANCO et al., 2009; KALYANARAMAN, 2013).

Os organismos vivos possuem um potencial de se defender das EROs através do sistema de antioxidantes que podem ser ou não enzimáticos, mas ambos apresentam função de evitar que esses radicais livres causem efeitos deletérios ao organismo (LUSHCHAK, 2011). O sistema antioxidante enzimático inclui as enzimas catalase (CAT) e glutationala peroxidase (GPx) que catalisam a reação de peróxidos orgânicos e inorgânicos como o  $H_2O_2$  a  $H_2O$  e  $O_2$ , e a enzima superóxido dismutase



(SOD) que catalisa a remoção de  $O_2^{\bullet-}$  gerando  $H_2O_2$  como produto final da dismutação (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2005; LIMÓN-PACHECO & GONSEBATT, 2009; LI et al., 2016). Os antioxidantes não enzimáticos, incluindo a vitamina A (retinol), vitamina C e vitamina E, entre outras moléculas (ácido úrico, melatonina, glutatona), também contribuem para o sistema de defesa antioxidante. A vitamina C é potente agente de eliminação de radicais na fase aquosa do citoplasma, enquanto formas lipossolúveis, como as vitaminas A e E, atuam como antioxidantes em ambientes lipídicos (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2005).

Quando a homeostase redox é então rompida, o que pode ocorrer devido a fatores ambientais como exposição à radiação ionizante, metais, pesticidas, compostos orgânicos tóxicos e certos fármacos, estabelece-se um estado pró-oxidante, levando a danos em proteínas, lipídeos e ao DNA (KANDER et al., 2017).

Os agrotóxicos, como pode ser considerado o TBT, incluem os inseticidas, herbicidas, fungicidas e possuem finalidade de eliminar organismos indesejáveis de plantas e animais. Estes são capazes de induzir o estresse oxidativo através de mecanismos como, aumento do nível de EROS, alteração do metabolismo celular, inativação de antioxidantes e enzimas associadas, interferir nos processos de fornecimento de energia e modificar os processos vitais essenciais como transcrição e tradução. Salienta-se que muitos desses efeitos também podem ser causados pela contaminação por metais (REGOLI, 2001; LUSHCHAK, 2011).

O dano celular mais frequente causado pelas EROs é chamado de peroxidação lipídica (LPO), resultante da sua reação com lipídios para produzir peróxidos lipídicos. A LPO é considerada um dos principais biomarcadores do estresse oxidativo, pois os lipídios são facilmente danificados pelas EROs em muitos organismos, principalmente os aquáticos (LUSHCHAK 2011; LESSER, 2011). Neste contexto, os organismos aquáticos podem servir como modelos na investigação de processos básicos de danos e proteção celular por EROs, desenvolvimento de lesões nos tecidos e consequências fisiológicas seguidas, como doenças e envelhecimento (LUSHCHAK, 2011).

A exposição a pesticidas e outros contaminantes causam estresse oxidativo em crustáceos (DUTRA et al., 2008; 2009; 2011; NEGRO et al., 2019). Quando o caranguejo de água doce *Zichiopsis collastinensis* foi exposto a clorpirifós, um pesticida

organofosforado, nas concentrações de 0,1 e 0,5 µg/L, e avaliado em quatro intervalos de um tempo total de 96 horas, desenvolveu diminuição da atividade da enzima glutathione S-transferase (GST) e o aumento da concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nas brânquias e alterações nos níveis de GST, CAT e SOD e aumento na concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no hepatopâncreas (NEGRO et al., 2019). O camarão *Austinopecten edulis*, quando exposto ao cádmio nas concentrações de 0,5 e 5mg/kg por 96 horas, apresentou diminuição da atividade das enzimas SOD, CAT e GPx conforme o aumento da concentração de cádmio e com o tempo de exposição no hepatopâncreas, brânquias e músculo, assim como danos de peroxidação lipídica nas concentrações mais altas (DAS et al., 2019). Após exposição do camarão *Exopalaemon carinicauda* ao naftaleno por quatro dias a seis concentrações diferentes, foi observado aumento na atividade das enzimas CAT, SOD, GPx e GST no cefalotórax em doses intermediárias enquanto que nas concentrações mais altas o estresse restringia a atividade dessas enzimas (ALI & LIU, 2013).

O aumento da LPO é um dos principais contribuintes para a perda da função celular em situações de estresse oxidativo e a sua determinação foi empregada com sucesso em animais aquáticos para indicar estresse oxidativo induzido por contaminantes orgânicos, incluindo pesticidas organofosforados (MONSERRAT et al., 2007; LAVARÍAS et al., 2013). No estudo realizado por Rossbach et al. (2017), que expuseram o caranguejo *Carcinus maenas* a doses subletais de cobre (Cu), apresentou um aumento da LPO nas brânquias anteriores após 4 dias de exposição, não havendo alteração nas brânquias posteriores e hepatopâncreas. Quando avaliada a LPO nas brânquias e no hepatopâncreas de siris *C. amnicola* capturados de diferentes pontos de água contaminada por efluentes industriais, foi observado um menor dano oxidativo significativo nos animais coletados do ponto considerado controle em relação aos demais locais, assim como para o hepatopâncreas (JEROME et al., 2017). A exposição dos anfípodas *Hyalella curvispina*, *H. pleocuta* e *H. castroi* ao *carbofuran*, aumentou a lipoperoxidação (DUTRA et al., 2008). O mesmo aconteceu após a exposição de *H. castroi* ao herbicida Roundup® (princípio ativo - glifosato) por 7 dias nas concentrações de 0,36, 0,52, 1,08 e 2,16 mg/L (DUTRA et al., 2011).

### 1.3 EFEITOS DOS COMPOSTOS ORGANOESTÂNICOS EM CRUSTÁCEOS

Em crustáceos, a contaminação por TBT pode ocorrer através da difusão da água pelas brânquias, pelo contato com o sedimento ou pela ingestão de alimentos contaminados, por exemplo, os moluscos gastrópodes (LEE, 1989). As brânquias são um dos pontos de entrada para substâncias nocivas, pois representam um grande sistema de órgãos adsorventes (REICHMUTH et al., 2010). O hepatopâncreas exerce funções de fígado, tecido adiposo e pâncreas sendo o principal órgão responsável pela absorção e armazenamento de nutrientes, biotransformação de xenobióticos, síntese e secreção de enzimas digestivas, e pode ser danificado por ser um local de armazenamento de substâncias tóxicas (VINAGRE & DA SILVA 2002; REICHMUTH et al., 2010; VOGT et al., 2018). O hepatopâncreas possui enzimas da família citocromo P450 (CYP) que, assim como no fígado dos vertebrados, realiza as reações de biotransformação em fase I e II sendo capaz de metabolizar TBT formando dibutilestanho (DBT) e monobutilestanho (MBT) (LEE, 1989; LEE, 1996; JAMES, 1990).

Após quatro dias da alimentação com camarões contaminados com TBT, foi verificado aumento na concentração de TBT no músculo do siri *Callinectes sapidus*, enquanto que os níveis de DBT e MBT se elevaram após 8 e 12 dias, respectivamente, demonstrando a sua capacidade de bioacumulação e a metabolização de TBT (RICE et al., 1989). Em outro estudo no qual os siris receberam alimento contaminado com TBT, o hepatopâncreas foi o tecido que apresentou maior contaminação (VANNUCI-SILVA et al., 2013). Em outros crustáceos como o caranguejo ermitão *Clibanarius vittatus*, a assimilação de uma única dose de TBT na comida foi maior do que na água, e os níveis do TBT nos tecidos (*pool*) diminuiu progressivamente ao longo de 15 dias (SANT'ANNA et al., 2012). Nesse mesmo estudo, também foi detectado DBT, indicando a metabolização de TBT. Já em outro estudo, o tratamento de *C. sapidus* alimentados com carne de peixe contaminada nas concentrações de 125, 250 e 500 µg/kg de TBT por 16 dias diminuiu a atividade da CYP450 no hepatopâncreas (OBERDÖRSTER et al., 1998).

Em crustáceos, o hepatopâncreas é o principal órgão de síntese e estocagem de glicogênio, lipídeos e proteínas (ANTUNES et al., 2010; JIMENZES & KINSEY, 2015).

Além do hepatopâncreas, o músculo, as brânquias e as gônadas também possuem reservas energéticas que são mobilizadas de forma tecido-específica conforme o estado nutricional ou o tipo de estresse em que o animal se encontra (DE OLIVEIRA et al., 2005; FERNANDES et al., 2018; JIMENZES & KINSEY, 2015; VINAGRE; Da SILVA, 2002). No lagostim *Macrobrachium rosenbergii*, o tratamento crônico (90 dias) com TBT (10, 100 e 1000 ng/L) dissolvido na água, diminuiu as concentrações de glicogênio, lipídeos e proteínas no hepatopâncreas (REVATHI et al., 2019). Após a exposição aguda (24, 48, 72 e 96 horas) ao TBTCI dissolvido na água, a concentração de glicogênio nas gônadas, brânquias, músculo e hepatopâncreas do lagostim *Macrobrachium kistnensis* diminuíram gradualmente (KHARAT et al., 2009).

No copépode *Daphnia magna*, a exposição ao TBT causou morte associada ao processo de ecdise (muda) (WANG et al., 2011). A administração simultânea de TBT e 20-hidroxiecdisona – o hormônio da muda em crustáceos –, resultou em ecdise prematura e morte, caracterizando a toxicidade dessa associação (WANG et al., 2011). O RXR forma heterodímeros com muitos receptores nucleares e, nos crustáceos, se associa ao receptor de ecdisona (EcR, do inglês *ecdysone receptor*) (LE BLANC et al., 2007; WANG & LE BLANC, 2009; SUN et al., 2014). Em estudo *in silico* foi demonstrado que o TBT se liga ao RXR do caranguejo *Crangon crangon*, alterando a expressão de vários genes (VERHAEGEN et al., 2011). Em mamíferos e peixes, o TBT também se liga ao RXR, interferindo na sua associação a outros receptores nucleares como o *peroxisome proliferator-activated receptor*  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) e alterando a expressão de genes envolvidos na xenoproteção, homeostase lipídica e desenvolvimento (BERTULOSO et al., 2015, BERTO-JÚNIOR et al., 2018; MARQUES et al., 2018). Em outro estudo com *D. magna*, a administração de 0,036 ou 0,36  $\mu\text{g/L}$  de TBT na água, aumentou os níveis de triglicerídeos, ésteres de colesterol e fosfocolinas em gotas lipídicas e alterou a expressão de muitos genes, incluindo o RXR, sugerindo efeito obesogênico (JORDÃO et al., 2015).

Os animais exibem uma variedade de respostas ao estresse quando seus sistemas fisiológicos regulados são estendidos além da faixa normal e essa falha da resposta homeostática pode levar ao aumento de distúrbios fisiológicos (FANJUL-MOLES, 2006). Entre essas respostas, o estresse ambiental e a exposição a poluentes

pode ocasionar um aumento na secreção de hormônio hiperglicemiante de crustáceos (CHH) (RODRÍGUEZ et al., 2007; WEBSTER et al., 2012) e na produção de proteínas de choque térmico (HSPs, do inglês *Heat Shock Proteins*) (CHANG, 2005). Em vertebrados, a hiperglicemia é considerada uma resposta secundária ao aumento nos níveis de catecolaminas e corticosteroides (FABBRI; MOON, 2016; MASSARSKY; TRUDEAU; MOON, 2011). Crustáceos também desenvolvem hiperglicemia em situações estressantes, a qual pode ser desencadeada por aumento em monoaminas e/ou no hormônio hiperglicemiante de crustáceos (CHH) (CHUNG; ZMORA, 2008; MODEL et al., 2019; WEBSTER; KELLER; DIRCKSEN, 2012). No caranguejo *Oziotelphusa senex senex*, a injeção de 10 µmoles dos organoestênicos *tripalmitin*, *fentin* ou *fenbutatin* causou hiperglicemia (NAGARAJU, 2011). As proteínas de choque térmico (HSPs, do inglês *Heat Schock Proteins*) foram assim denominadas por serem induzidas pelo choque térmico, porém sabe-se que estas proteínas estão envolvidas na resposta a vários tipos de estresse e estão presentes em todos os grupos de animais (CASCELLA et al., 2015; COTTIN et al., 2015). Além de alterações na temperatura, diferentes tipos de estresse ambientais, tais como alterações na salinidade e exposição a metais, desencadeiam uma rápida resposta ao choque térmico (*heat shock response*, HSR) em crustáceos, aumentando a expressão gênica de HSPs (FERNANDES et al., 2018; VOGT et al., 2018). A exposição ao TBT aumentou de forma dose dependente a expressão proteica de HSP60 em *C. sapidus*, avaliado por imunohistoquímica (OBERDÖRSTER; RITTSCHOF; MCCLELLAN-GREEN, 1998).

#### 1.4. SIRI AZUL

No Brasil, os siris-azuis pertencentes ao gênero *Callinectes* são ecologicamente importantes, devido aos nichos que esses organismos ocupam e à sua contribuição para a reciclagem de matéria orgânica em ambientes marinhos e estuarinos (BORDON et al., 2018). O siri azul *Callinectes sapidus* (Rathbun, 1896) é um decápode pertencente do táxon Brachyura, conhecidos como os caranguejos verdadeiros. Os braquiúros são encontrados na maioria dos habitats bentônicos marinhos, sendo

poucas espécies de água doce, apresentam corpo deprimido e curto, o que o torna mais largo que longo, o primeiro par de pereópodes (quelípode) possui uma pinça preênsil, enquanto os outros pereópodes apresentam função de locomoção. Nos decápodes da família Portunidae, que inclui os caranguejos nadadores ou siris, assim como o *C. sapidus*, o último par de pereópodes é largo, achatado distalmente e semelhante a remos, o que os permite o movimento de natação (RUPPERT et al., 2005).

O *C. sapidus* ocorre naturalmente na costa leste do Oceano Atlântico desde a Nova Escócia (Canadá) até o norte da Argentina (MELO, 1999; CESAR et al., 2003). É uma espécie bentônica, encontrada em lagoas, águas oceânicas ou estuarinas de até 90m de profundidade, sendo mais abundante em locais de profundidade até 35m, em substratos arenosos e lamacentos, com ou sem vegetação (WILLIAMS, 1974; MIZEREK et al., 2011). Apresenta hábito alimentar generalista oportunista, alimentando-se de invertebrados bentônicos (bivalves, poliquetas, outros crustáceos), carcaças de animais, plantas e sedimento (ingestão ocasional geralmente associada à ingestão de poliquetas) (WILLIAMS, 1974; OLIVEIRA et al., 2006). Portanto, é considerado um predador bentônico chave, por controlar a abundância de outras espécies bentônicas em ambientes estuarinos (OLIVEIRA et al., 2006). O *C. sapidus* é uma espécie bem adaptada ao ambiente estuarino, apresentando grande tolerância a variações de salinidade (encontrado desde águas doces até lagoas hipersalinas no México), temperatura e tensão de oxigênio (WILLIAMS, 1974; STOVER et al., 2013).

Além de sua grande importância ecológica, muitos crustáceos decápodes apresentam grande valor comercial e nutritivo, devido ao sabor agradável e por sua carne apresentar grande valor comercial na culinária mundial (LEBLANC et al., 2007). O esforço pesqueiro nos Estados Unidos em 2016 foi de 74.000 toneladas segundo o *National Oceanic and Atmospheric Administration* (NOAA, 2016). Embora a pesca do siri seja feita principalmente de forma artesanal no Brasil, o *C. sapidus* é a principal espécie de siri comercializada no país (IGARASHI, 2009; MENDONÇA et al., 2010; BORTOLOTTI, 2011).

Os bioensaios desempenham um papel importante no fornecimento de informações sobre o impacto de contaminantes ambientais emergentes nos organismos

aquáticos assim como para o monitoramento da qualidade da água. A avaliação dos efeitos agudos e crônicos do TBT em laboratório é importante para a compreensão da potencial toxicidade do TBT para populações de peixes e outros animais marinhos (KIM et al., 2018). Os crustáceos decápodes e microcrustáceos são considerados excelentes modelos animais para estudos dos efeitos ecológicos e toxicológicos de xenobióticos (SANT'ANNA et al., 2012; AGUIRRE-MARTÍNEZ et al., 2013; SUN et al., 2014).

Tendo em vista que a contaminação por OTs ainda está presente em áreas portuárias estuarinas e a importância ecológica e socioeconômica do *C. sapidus*, a identificação de seus efeitos sobre o siris azul visa não somente à identificação dos efeitos tóxicos sobre esse animal, como também à identificação de possíveis efeitos para a população humana que consome a carne de siris, seja para subsistência e/ou fins turísticos/ comerciais. Ademais, é de grande relevância para o Brasil, o entendimento dos prejuízos à saúde causados pelo consumo de alimentos marinhos contaminados. Não obstante, a possível ecotoxicidade *per se* pode representar um agravo para a saúde pública, tendo em vista que, a faixa territorial mais populosa do Brasil é a litorânea, aumentando ainda mais a possibilidade de exposição a algum xenobiótico como os OTs. Finalmente, os resultados obtidos a partir de estudos com o *C. sapidus* poderão contribuir para o desenvolvimento de novas estratégias de manejo e pesca sustentável dessa espécie tão importante no litoral brasileiro.

## 2 HIPÓTESE E OBJETIVOS

### 2.1 HIPÓTESE

Considerando que TBT apresenta efeitos neurotóxicos, imunotóxicos e genotóxicos em vertebrados, e que ainda são pouco conhecidos os seus efeitos em crustáceos, pretende-se investigar a hipótese de que a exposição aguda a doses subletais de TBT pode causar alterações no metabolismo intermediário e na homeostase oxidativa no siri *C. sapidus*.

### 2.2 OBJETIVOS GERAIS

Verificar os efeitos do tratamento agudo com doses subletais de TBT sobre o metabolismo intermediário e homeostase oxidativa em siris *C. sapidus*.

### 2.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Investigar os efeitos do tratamento agudo com TBT nas concentrações de 100 e 1000 ng/L por 48 e 96 horas sobre:

- Os metabólitos na hemolinfa: glicose, lactato, colesterol, triglicerídeos e proteínas totais;
- A concentração de glicogênio no hepatopâncreas, músculo, coração e brânquias;
- A concentração de proteínas no hepatopâncreas, músculo, coração e brânquias;
- A peroxidação lipídica (TBARS) no hepatopâncreas, músculo e brânquias.



### 3 MATERIAL E MÉTODOS

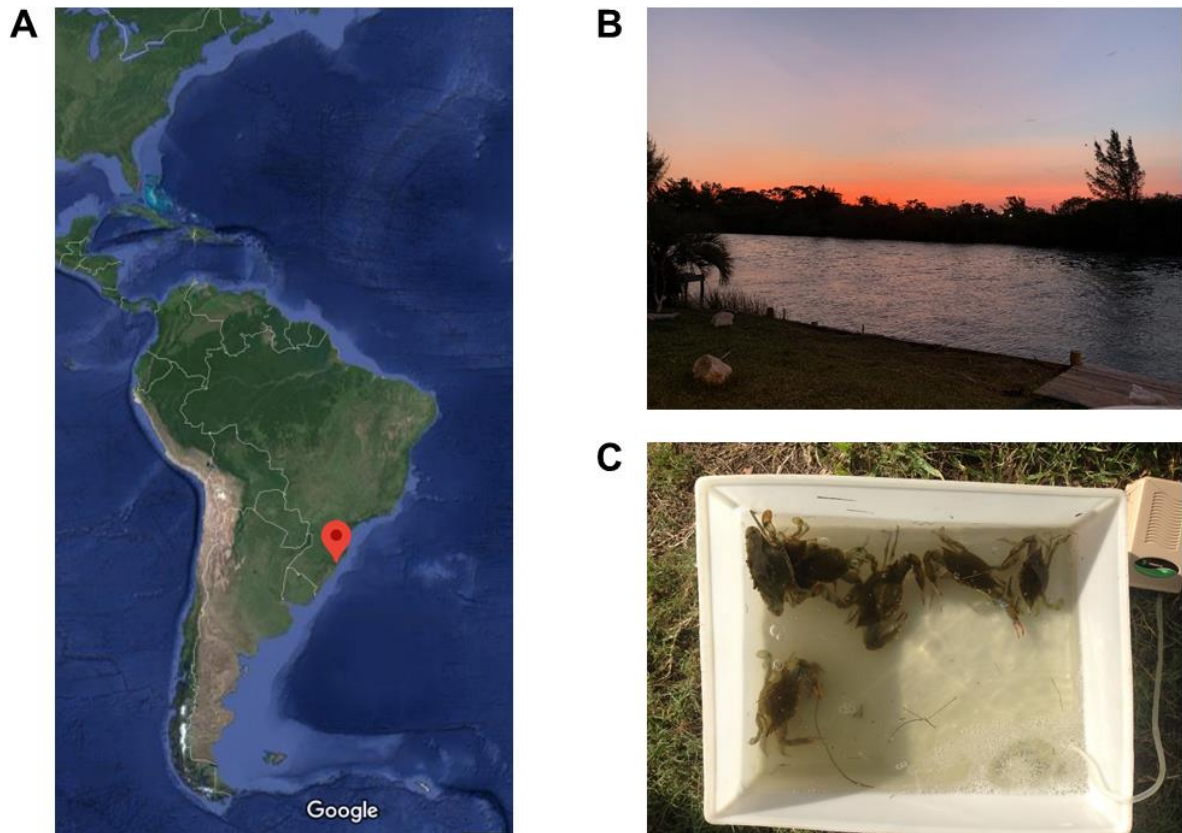
#### 3.1 COLETA E MANUTENÇÃO DOS ANIMAIS

Por se tratar de um projeto de pesquisa com invertebrados, o envio à análise pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) foi desnecessário. De qualquer modo, todos os procedimentos experimentais realizados seguiram a legislação vigente e as normas do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) para captura e utilização de invertebrados nativos. A professora orientadora e o aluno do projeto possuem licença (SISBIO – 65698) para coleta e utilização de crustáceos decápodes em projetos de pesquisa científica e prestam relatórios anuais ao IBAMA, referentes ao número de animais capturados.

Para definição do ponto de coleta dos animais para os experimentos, amostras de sedimento e de espécimes foram coletas e enviadas à equipe do professor Dr. Gilberto Fillmann, do Laboratório de Microcontaminantes Orgânicos e Ecotoxicologia Aquática (CONECO), Instituto de Oceanografia, da Universidade Federal do Rio Grande (FURG) para análise da presença de TBT. Após o recebimento dos resultados negativos para as amostras de sedimento e dos animais, foi estabelecido o local como ponto de coleta.

Siris machos e fêmeas (n= 57) foram coletados nos meses de janeiro a março de 2019 na margem leste da Lagoa de Tramandaí (29°59'26.1"S 50°10'43.3"W) (figura 1), no município de Tramandaí, Rio Grande do Sul. Os animais foram capturados no período da tarde e à noite com rede tipo "coca" com isca para crustáceos. Em seguida, os animais foram transportados em caixas plásticas com água do próprio local e aeração ao Laboratório de Metabolismo e Endocrinologia Comparada (LAMEC) na UFRGS.

Figura 1. Local de coleta de *C. sapidus* em Tramandaí (RS).



A) Distribuição de *C. sapidus* ao longo do oceano Atlântico e indicação do ponto de coleta (Google maps: acesso em 13 de março de 2020). B) Local de coleta. C) Exemplos de *C. sapidus* em condições de transporte para o laboratório.

No LAMEC os animais foram acondicionados em tanque com capacidade para 2000 L com aeração constante e bombas de oxigênio com filtro, onde foram aclimatados pelo período de setes dias. Durante o período de aclimação, os siris foram alimentados com lula a cada dois dias, a salinidade da água foi mantida em 10‰, a temperatura foi mantida em  $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$  e fotoperíodo natural. A salinidade da água para o período de aclimação e durante o experimento foi definida a partir da média dos valores de salinidade detectados em duas expedições anteriores ao início da coleta dos animais para o experimento.

## 3.2 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

### 3.2.1 Exposição

Após os sete dias de aclimatação dos siris ao LAMEC, animais em fase de intermuda (DRACH & TCHERNIGOVTZEFF, 1967) foram selecionados para a exposição. Os siris foram divididos em três grupos para cada período de exposição, sendo os grupos expostos por 48 horas na concentração de 100 ng/L de TBTCI (*Tributyltin chloride* T50202 Aldrich, 96% pureza) (n= 10), 1000ng/L de TBT (n= 10) e o controle (n= 10), e 96 horas de exposição nas mesmas concentrações, 100 ng/L de TBT (n= 10), 1000 ng/L de TBT (n= 10) e o controle (n= 7). A diluição do TBT foi realizada conforme descrito por PERANANDAM et al. (2014). Os experimentos foram repetidos 3 vezes para obtenção do “n” amostral. O “n” de siris por grupo experimental foi definido conforme metodologia já descrita em outros trabalhos com crustáceos (INOHARA et al., 2015; RANI et al., 2015; GOMES et al., 2019). Os grupos controles foram expostos a água sem TBTCI nos respectivos tempos. Os animais foram acondicionados individualmente em copos de Becker de 2000 mL contendo 1 L de água salobra a 10‰, com aeração constante, sendo que a alimentação dos animais foi suspensa durante o período de exposição.

As concentrações de TBTCI foram escolhidas através da literatura previamente publicada, atribuindo os valores de concentrações encontrados no ambiente marinho e estuarino e de doses subletais consideradas pela literatura capaz de causar possíveis danos a decápodes (FENT, 1996; OBERDÖSTER et al., 1998).

### 3.2.2 Dissecção

Ao final dos períodos de exposição, os siris foram crioeutanasiados, em banho de gelo por 10 a 15 minutos, essa variação foi devido ao tamanho do animal. Os animais pesavam  $48 \pm 4,73$  g, com comprimento total de  $4,5 \pm 0,11$  cm e largura da

carapaça de  $8,9 \pm 0,23$  cm (média dos dados  $\pm$  erro padrão). Os valores da média de peso, largura e comprimento por grupo estão na tabela 1. Após a eutanásia do animal, foi realizada primeiramente a coleta da amostra de hemolinfa utilizando seringas descartáveis de 1 mL com adição de 10  $\mu$ L de Oxalato de Potássio 8% para cada 100  $\mu$ L de hemolinfa para evitar a coagulação. Após a coleta, as amostras de hemolinfa foram transferidas para microtubos com capacidade de 1,5 mL com fundo cônico e congeladas a  $-20$  °C até o dia da dosagem. Os seguintes parâmetros foram analisados nas amostras de hemolinfa: níveis de glicose, lactato, colesterol total, triglicerídeos e proteínas totais.

**Tabela 1 - Informações morfométricas de *C. sapidus***

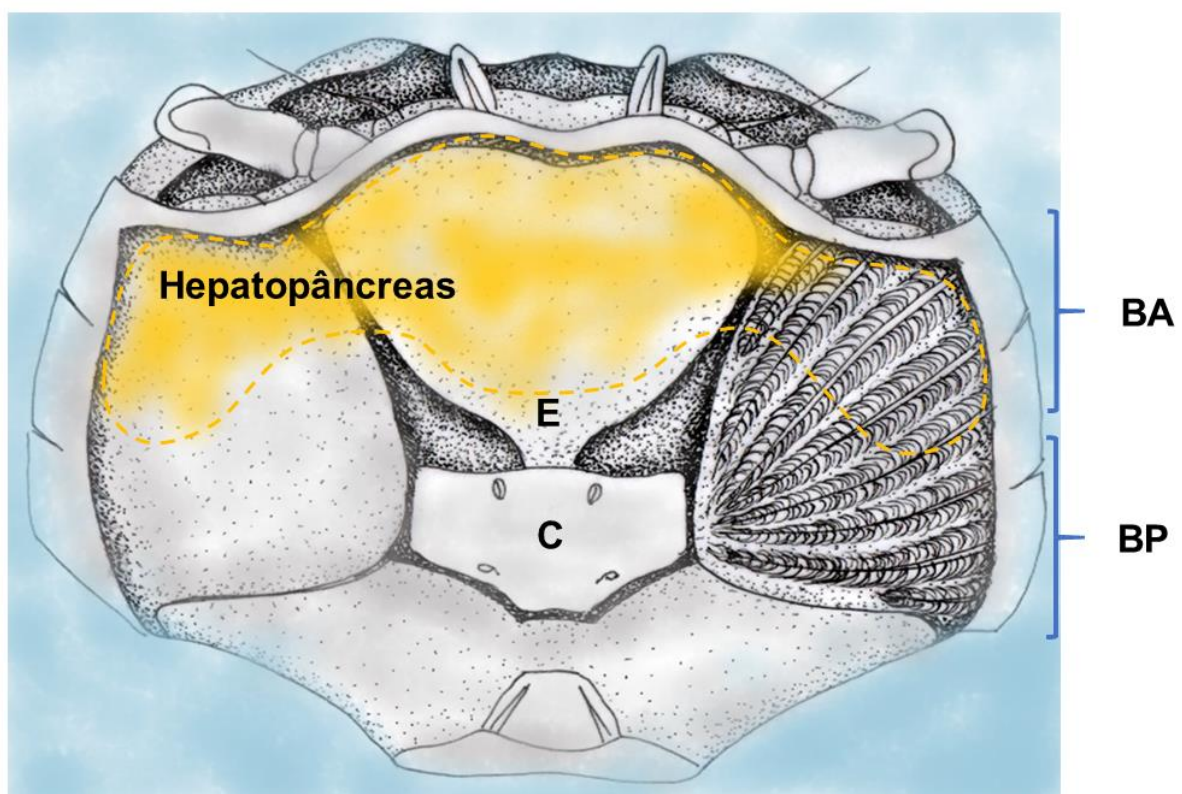
<b>Grupo</b>	<b>n</b>	<b>Peso (g)</b>	<b>Largura (cm)</b>	<b>Comprimento (cm)</b>
Controle 48 horas	10	$43 \pm 51,32$	$9 \pm 1,16$	$4,4 \pm 2,45$
TBT [100] 48 horas	10	$39 \pm 24,14$	$8,25 \pm 0,85$	$4,05 \pm 1,45$
TBT [1000] 48 horas	10	$45,5 \pm 15,58$	$8,6 \pm 0,50$	$4,4 \pm 0,99$
Controle 96 horas	7	$49 \pm 58,56$	$8,4 \pm 1,23$	$4,3 \pm 2,65$
TBT [100] 96 horas	10	$43 \pm 28,85$	$8,65 \pm 0,67$	$4,25 \pm 1,60$
TBT [1000] 96 horas	10	$57,5 \pm 27,67$	$4,6 \pm 0,61$	$9,45 \pm 1,55$

Dados expressos em média dos dados  $\pm$  desvio padrão. Fonte: Elaborado pelo autor.

Após a coleta da hemolinfa, foi realizada a coleta das amostras de tecidos: hepatopâncreas, músculo do quelípede e brânquias anteriores (1<sup>o</sup> a 4<sup>o</sup> pares) e posteriores (5<sup>o</sup> a 8<sup>o</sup> pares) (figura 2). As brânquias anteriores estão associadas à função das trocas gasosas, enquanto as posteriores estão relacionadas a processos iônicos e osmorregulatórios (PILLER et al., 1995; MARTINS et al., 2011). Nas amostras de hepatopâncreas foram determinadas as concentrações de glicogênio, triglicerídeos e

peroxidação lipídica. No músculo e nas brânquias foram determinadas as concentrações de glicogênio e a peroxidação lipídica (TBARs).

**Figura 2. Principais órgãos internos de um caranguejo.**



Brânquias anteriores (BA), brânquias posteriores (BP), coração (C) e estômago (E). Fonte: elaborada pelo autor.

### 3.3 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

#### 3.3.1 Concentração de metabólitos hemolinfáticos

As amostras de hemolinfa foram preparadas para processamento através de centrifugação por cinco minutos a 3000 RPM. As concentrações de substratos hemolinfáticos, como glicose, lactato, proteínas totais, colesterol total e triglicerídeos,

foram quantificadas por métodos enzimáticos com *kits* comerciais (Labtest Diagnóstica SA) em 10µL de amostra, de acordo com as instruções do fabricante. A leitura das amostras foi realizada em espectrofotômetro com comprimentos de ondas específicos para cada substrato: 1) glicose e triglicerídeos: 505 nm; 2) lactato: 550 nm; 3) proteínas totais: 545 nm; 4) colesterol: 500 nm. Os resultados de glicose, triglicerídeos, lactato e colesterol foram expressos em miligramas/decilitros de hemolinfa e os de proteínas totais, em gramas/decilitro de hemolinfa.

### **3.3.2 Concentração de glicogênio nos tecidos**

A extração e quantificação de glicogênio dos tecidos foi adaptada em nosso laboratório (PELLEGRINO et al., 2008; INOHARA et al., 2015) a partir das técnicas de Van Handel (1965) e de Geary et al. (1981). Amostras de tecidos foram depositadas em tubos de 15 mL contendo 0,5 mL de KOH 30% e submetidas à digestão em banho fervente por 60 minutos. Para precipitação do glicogênio, foram adicionados 50 µL de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> saturado e 1 mL de álcool etílico 96% e, em seguida, centrifugadas por dez minutos a 2000 RPM. Após, os tubos foram invertidos e o sobrenadante descartado. O glicogênio foi ressuspenso com 0,5 mL de água destilada e foi adicionado 1 mL de álcool etílico 96% para que fosse centrifugado novamente por dez minutos a 2000 RPM. Os tubos foram invertidos e o sobrenadante descartado. Para a hidrólise ácida do glicogênio, este foi ressuspenso com 0,5 mL de água destilada e em novos tubos, essa suspensão foi diluída trinta vezes e foram acrescentados 0,3 mL de HCl 4N para novo banho fervente por mais 60 minutos. Em seguida, após as amostras esfriarem, estas foram neutralizadas com 0,3 mL Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 2M. Após a hidrólise ácida, a glicose resultante foi quantificada pelo método enzimático da glicose-oxidase com o *Kit* Glicose Liquiform (Labtest Diagnóstica SA) em 10 µL de amostra. A leitura das amostras foi realizada em espectrofotômetro com comprimento de onda de 505 nm. Uma curva padrão de glicogênio (1 mg/mL) foi utilizada como fator de calibração e os resultados foram expressos em miligramas de glicogênio/grama de tecido.

### **3.3.3 Concentração de proteínas nos tecidos**

A concentração de proteínas nos tecidos foi medida pelo método descrito por LOWRY et al. (1951) e utilizada para determinação da lipoperoxidação pela técnica de TBARS.

### **3.3.4. Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)**

A peroxidação lipídica (LPO) foi avaliada medindo-se o nível de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), conforme a técnica de Buege & Aust (1978). As amostras de tecido (50 mg) foram adicionadas a microtubos de 2 mL, após foi adicionado  $\pm$  200-300  $\mu$ L de tampão de extração (tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,4) com um inibidor de protease para homogeneização do tecido. Em seguida foi completado o volume com 1 mL de tampão, misturado com auxílio do vórtex e 200  $\mu$ L do homogenato foi transferido para novo microtubo e adicionado 200  $\mu$ L da solução de Ácido Tiobarbitúrico (TBA) 1% e 100  $\mu$ L de ácido fosfórico 7% e misturado no vórtex. Os tubos foram aquecidos entre 95 a 100 °C por 15 minutos em banho fervente e, em seguida, coberto com gelo por 5 minutos. Foi então adicionado 1 mL de butanol, misturado no vórtex e centrifugado a 2000 RPM a 4 °C por 5 minutos. A leitura das amostras foi realizada em espectrofotômetro com comprimento de onda de 532nm. Os valores finais de TBARS foram expressos em nM/mg de proteína usando um coeficiente de extinção de 156 mM/cm (HERMES-LIMA et al., 1995).

## **3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Os resultados foram submetidos ao teste de homogeneidade de Levene no programa SPSS (*Statistical Package for Social Sciences*) e de normalidade de Komolgorov-Smirnov no programa GraphPad Prisma 6. Posteriormente, foi realizada a análise de variância (ANOVA) em duas vias (parâmetros fixos: concentração; tempo e

interação entre concentração e tempo) seguido do pós teste de Tukey para os dados paramétricos ou o teste de Kruskal-Wallis seguido do pós teste de Dunn para os dados não paramétricos. Os resultados paramétricos foram expressos em média  $\pm$  erro padrão enquanto os não paramétricos foram expressos como mediana  $\pm$  intervalo interquartil (10-90). Para os testes estatísticos foi utilizado o programa GraphPad Prisma 6. As diferenças foram consideradas significativas quando  $P < 0,05$ . Análises estatísticas para verificar diferença entre os sexos foram realizadas, porém não apresentaram diferenças significativas.

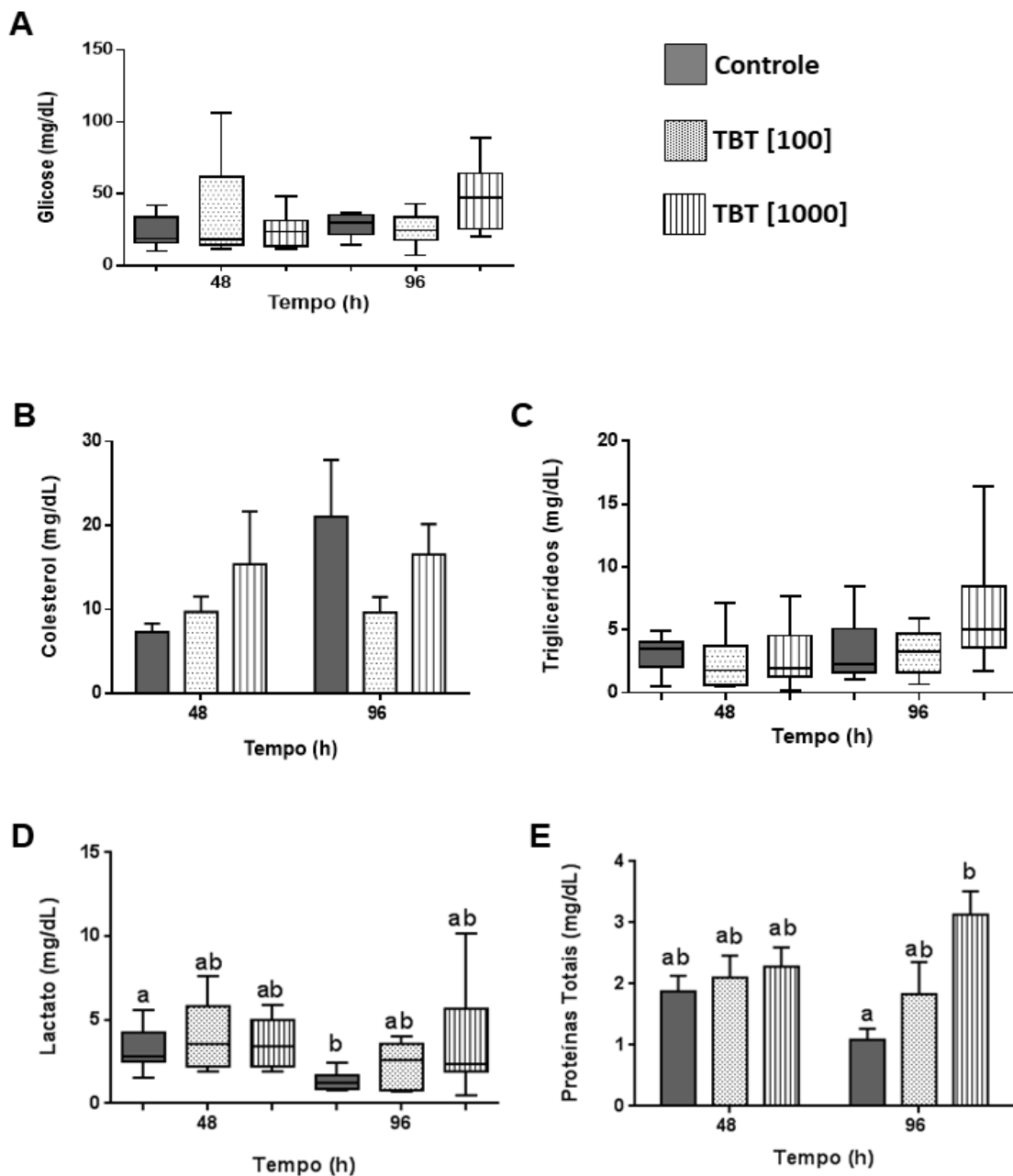


## 4 RESULTADOS

### 4.1 CONCENTRAÇÃO DE METABÓLITOS HEMOLINFÁTICOS

Os níveis de glicose na hemolinfa dos animais expostos (Figura 3A), foram mais altos nas concentrações de 100 ng/L TBTCI no tempo de 48 horas e na concentração de 1000 ng/L TBTCI no tempo de 96 horas, porém estas diferenças não foram significativas em relação ao grupo controle. Os níveis de colesterol na hemolinfa dos animais expostos às doses de 100 e 1000 ng/L no tempo de 48 horas (Figura 3B) foram semelhantes aos níveis de colesterol nas mesmas concentrações após 96 horas de exposição. Os triglicerídeos (Figura 3C) apresentaram níveis semelhantes entre todos os grupos, com exceção do grupo 1000 ng/L TBTCI do tempo de 96 horas, que apresentou o valor mais alto, porém não significativo. Os níveis de lactato (Figura 3D) na hemolinfa dos animais controle no tempo de 96 horas de exposição reduziram 40% ( $P < 0,05$ ) em relação ao mesmo grupo às 48 horas. Nos demais grupos, os níveis de lactato na hemolinfa foram intermediários em relação aos obtidos no grupo controle às 48 e 96 horas, não apresentando diferença significativa entre os grupos do mesmo período e não variando em relação ao tempo de exposição. Os níveis de proteínas totais (Figura 3E) elevaram-se 50% ( $P < 0,05$ ) nos animais expostos à concentração de 1000 ng/L TBTCI no tempo de 96 horas de exposição em relação aos animais controle do mesmo período. O aumento nos níveis de proteínas no tempo de 96 horas foi gradual do grupo controle para as concentrações 100 e 1000 ng/L TBTCI, porém o grupo na concentração de 100 ng/L TBTCI não diferiu significativamente do grupo controle. Os níveis de proteínas totais no grupo 48 horas foram similares entre o grupo controle e as concentrações de 100 e 1000 ng/L TBTCI, não apresentando diferenças significativas.

Figura 3. Concentração de metabólitos na hemolinfa de *C. sapidus* expostos ao TBT nas concentrações de 100 e 1000 ng/L.



A) Glicose B) Colesterol Total C) Triglicerídeos D) Lactato E) Proteínas Totais. Letras diferentes indicam diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) entre cada grupo experimental. Os valores representam média  $\pm$  erro padrão ou mediana  $\pm$  intervalo interquartil (10 - 90).

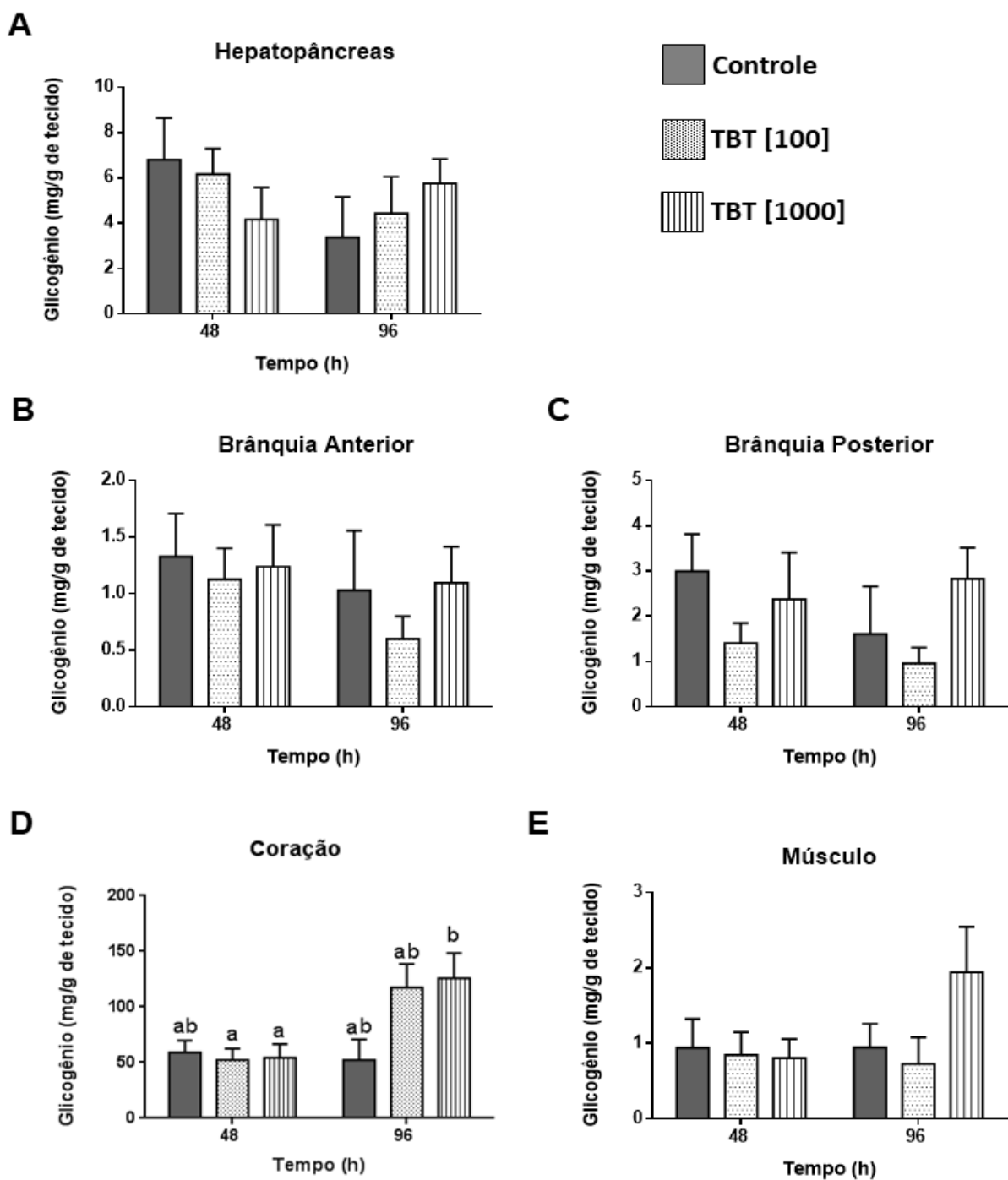
## 4.2 CONCENTRAÇÃO DE GLICOGÊNIO NOS TECIDOS

A concentração de glicogênio no hepatopâncreas (Figura 4A) não apresentou diferenças significativas entre os tratamentos. Tanto nas brânquias anteriores como nas brânquias posteriores (Figura 4B e 4C), não foram observadas diferenças significativas na concentração de glicogênio após a exposição ao TBT. A concentração de glicogênio no coração (Figura 4D) dos *C. sapidus* expostos à concentração de 1000 ng/L TBTCI por 96 horas elevou-se 44% e 46% em relação aos animais expostos às concentrações de 100 ( $P < 0,05$ ) e 1000 ng/L ( $P < 0,05$ ) por 48 horas, respectivamente. No músculo (Figura 4E), não foram observadas diferenças significativas na concentração de glicogênio entre os grupos, apesar do aumento em 50% no grupo exposto por 96 horas à concentração de 1000 ng/L TBTCI em relação ao controle.

## 4.3 CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS NOS TECIDOS

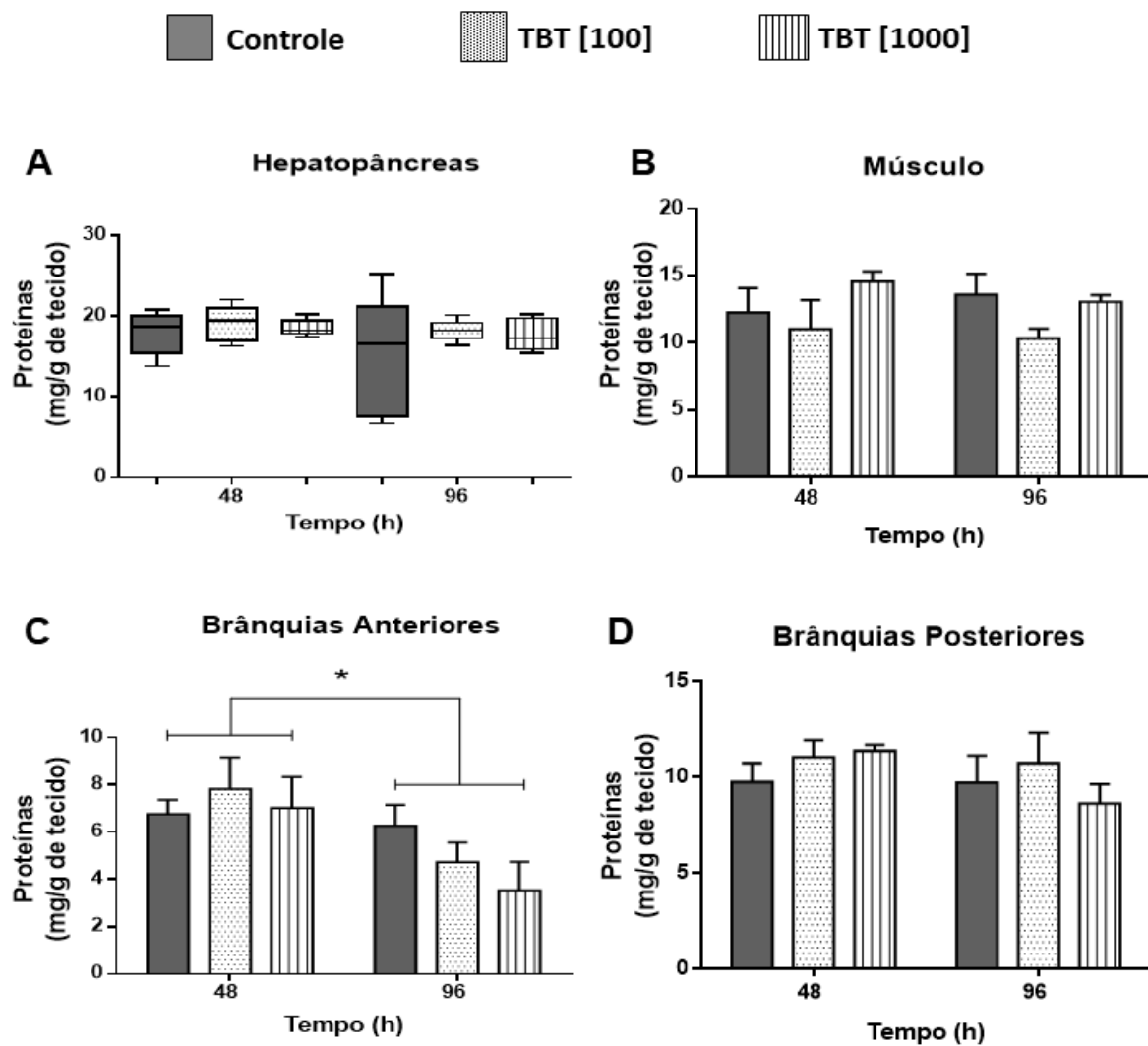
As concentrações de proteínas (Figura 5) no hepatopâncreas (5A), no músculo (5B) e nas brânquias posteriores (5D) não apresentaram diferenças significativas após a exposição ao TBT por 48 ou 96 horas. Nas brânquias anteriores (5C) foi possível observar uma diminuição na concentração de proteínas em relação ao tempo. No geral, as concentrações de proteínas foram significativamente maiores nos animais expostos ao tempo de 48 horas quando comparados com os grupos expostos por 96 horas ( $P < 0,05$ ).

Figura 4. Concentração de glicogênio nos tecidos de *C. sapidus* expostos ao TBT nas concentrações 100 e 1000 ng/L.



A) Hepatopâncreas B) Brânquias Anteriores C) Brânquias Posteriores D) Coração E) Músculo. Os valores representam média  $\pm$  erro padrão ou mediana  $\pm$  intervalo interquartil (10 - 90). Letras diferentes indicam diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) entre cada grupo experimental.

Figura 5. Concentração de proteínas totais nos tecidos de *C. sapidus* expostos ao TBT nas concentrações 100 e 1000 ng/L.

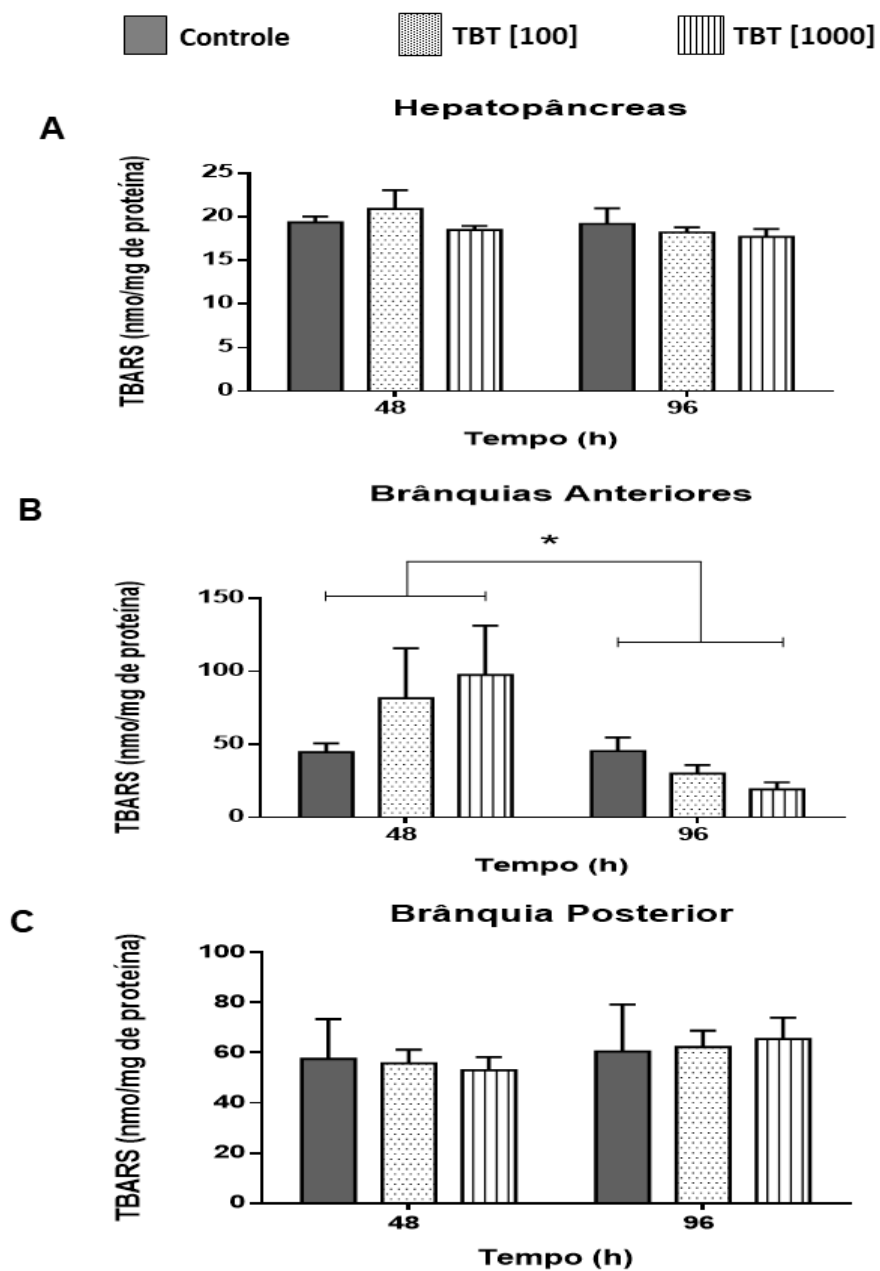


A) Hepatopâncreas B) Músculo C) Brânquias Anteriores D) Brânquias Posteriores. Os valores representam média  $\pm$  erro padrão ou mediana  $\pm$  intervalo interquartil (10 - 90). \*: diferença significativa ( $P < 0,05$ ) entre os tempos.

#### 4.4 SUBSTÂNCIAS REATIVAS AO ÁCIDO TIOBARBITÚRICO (TBARS)

A LPO – avaliada pelos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) –, no hepatopâncreas (Figura 6A) e nas brânquias posteriores (6C) dos siris não apresentou diferenças significativas nos animais expostos a diferentes tempos e a diferentes concentrações do TBTCI. Nas brânquias anteriores (6B), os níveis de LPO foram significativamente mais altos ( $P < 0,05$ ) em siris expostos por 48 horas independentemente das concentrações de TBTCI testadas em relação aos grupos expostos por 96 horas. Apesar de ter ocorrido um aumento de 46% e de 55% nos níveis de LPO nos grupos 100 e 1000 ng/L TBTCI em relação ao controle às 48 horas de exposição, respectivamente, essa variação não foi significativa.

Figura 6: Concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) nos tecidos de *C. sapidus* expostos ao TBT nas concentrações 100 e 1000 ng/L.



A) Hepatopâncreas B) Brânquias Anteriores C) Brânquias Posteriores. Os valores representam média  $\pm$  erro padrão. \*: diferença significativa ( $P < 0,05$ ) entre os tempos.

## 5 DISCUSSÃO

Os resultados obtidos sugerem que o siri *C. sapidus* possui mecanismos metabólicos que lhe permitem manter a homeostase energética frente à exposição aguda ao TBT nas doses de 100 e 1000 ng/L por até 96 horas. Estudos com exposições agudas revelaram que os decápodes apresentam maior tolerância ao TBT do que os microcrustáceos, a qual pode estar relacionada a uma maior capacidade de metabolização/eliminação do TBT (U´REN, 1983; OBERDÖSTER et al., 1998; TANG et al., 2009; SUN et al., 2015).

Assim como em vertebrados, alterações em metabólitos na hemolinfa de crustáceos podem ser indicativos de que o animal se encontra estressado (MALEV et al., 2010; LORENZON et al., 2007; HERNÁNDEZ-PALOMARES et al., 2018; MODEL et al., 2019). Embora os animais tenham permanecido por até 96 horas em jejum, o tratamento agudo com TBT nas doses de 100 e 1000 ng/L não causou alterações significativas nos níveis de glicose, colesterol e triglicerídeos na hemolinfa de *C. sapidus*. Os níveis de lactato nos animais do grupo controle estavam mais elevados quando expostos por 48 horas, diminuindo às 96 horas, sugerindo a utilização do lactato como fonte de energia, possivelmente para a manutenção da glicemia, às 96 horas. O lactato, o principal produto da via glicolítica em crustáceos, tende a elevar-se na hemolinfa após o exercício (MORRISS et al., 2010; TURNER et al., 2014) ou quando crustáceos são expostos a ambientes hipóxicos ou anóxicos; (MACIEL et al., 2008) ou infecções virais (HERNÁNDEZ-PALOMARES et al., 2018). Quando previamente alimentado com dieta rica em proteínas, o caranguejo *Neohelice granulata* é capaz de converter lactato em glicose pela gliconeogênese no hepatopâncreas constante por até 21 dias de jejum (OLIVEIRA et al., 2004). Em condições de normóxia, foi demonstrado que *N. granulata* pode excretar lactato para a água assim como metabolizá-lo, tanto pela oxidação a CO<sub>2</sub> pelo ciclo de Krebs como pela conversão em glicose via gliconeogênese no músculo mandibular (MACIEL et al., 2008). Em *C. sapidus*, nos grupos tratados com TBT, os níveis de lactato foram mantidos similares aos do grupo controle às 48 horas ao longo de todo o estudo, sugerindo que a exposição ao TBT não alterou a metabolização do lactato.



Assim como o lactato, os níveis de proteínas totais na hemolinfa reduziram nos animais controle às 96 horas, sugerindo a sua utilização como fonte de energia. O caranguejo *N. granulata* por exemplo, é capaz de utilizar aminoácidos como fonte de energia no estado alimentado e em jejum (PELLEGRINO et al., 2013). Nos caranguejos alimentados com dieta rica em proteínas, a conversão de C<sup>14</sup>-leucina em proteínas e a oxidação de C<sup>14</sup>-glicina não são alteradas, enquanto a conversão de C<sup>14</sup>-glicina em lipídeos aumenta após 15 dias de jejum (PELLEGRINO et al., 2013). Nos siris expostos a TBT 1000 ng/L, os níveis de proteínas totais na hemolinfa elevaram-se às 96 horas, sugerindo uma alteração no metabolismo de aminoácidos ou uma resposta compensatória, possivelmente relacionada às enzimas da defesa imunológica inata ou antioxidantes, tais como a pró-fenoloxidase (PPO) ou superóxido dismutase (SOD), respectivamente. A PPO é uma das principais enzimas da defesa imunológica inata em crustáceos (ALVAREZ & CHUNG, 2013). Essa enzima é encontrada inativa na hemolinfa de crustáceos, e precisa ser clivada por enzimas proteolíticas como a tripsina, para ser ativada. Uma vez ativa, a fenoloxidase catalisa a síntese de melanina a partir de dopamina. Essa reação de melanização é fundamental para a exocitose de microrganismos, cicatrização e para o enrijecimento da cutícula após a muda (ALVAREZ & CHUNG, 2013). Além de atuar como antioxidante, a SOD também participa da imunidade inata em invertebrados (CHUNG et al., 2012). Em particular, o siri *C. sapidus* possui quatro isoformas de SOD, expressas de forma ubíqua em todos os tecidos avaliados, incluindo hemolinfa, hepatopancreas, coração e brânquias (CHUNG et al., 2012). Quando *C. sapidus* recebeu injeção de lipossacarídeo LPS, ocorreu indução da expressão de todas isoformas de SOD na hemolinfa, demonstrando sua participação na imunidade inata (CHUNG et al., 2012). Os níveis de EROs, LPO e enzimas antioxidantes na hemolinfa devem ser investigados em futuros estudos sobre os efeitos de TBT em crustáceos. Estudo anterior demonstrou aumento na expressão proteica de HSP60 aumenta em *C. sapidus* após a exposição ao TBT (OBERDÖRSTER; RITTSCHOF; MCCLELLAN-GREEN, 1998). Considerando que além da HSP60, crustáceos também expressam outras isoformas de HSPs como a HSP70 e a HSP90 (VOGT et al., 2018), a exposição ao TBT pode ter aumentado a síntese de todas essas isoformas. Portanto o aumento na síntese de proteínas envolvidas na

resposta ao estresse como as HSPs e de defesa imunológica inata pode ter aumentado temporariamente a concentração de proteínas na hemolinfa.

Por apresentar funções equivalentes ao fígado e ao pâncreas de vertebrados, o hepatopâncreas é considerado o principal órgão responsável pela homeostase energética e biotransformação em crustáceos decápodes (LEE, 1989; LEE, 1996; VINAGRE & DA SILVA, 2002; VOGT et al., 2018). O hepatopâncreas de *C. sapidus* é capaz de aumentar a expressão e a atividade das enzimas da família citocromo P450 (CYP) quando exposto ao TBT, formando DBT e MBT (LEE, 1989; OBERDÖRSTER et al., 1998). A exposição crônica (90 dias) ao TBT reduziu a concentração de glicogênio, lipídios e proteínas totais no hepatopâncreas de *M. rosenbergii* e a exposição aguda reduziu o glicogênio em *M. kistnensis* (KHARAT et al., 2009; REVATHI et al., 2019). No presente estudo, o hepatopâncreas não apresentou variações significativas na concentração de glicogênio e de proteínas totais após o tratamento agudo (48 e 96 horas) com TBT nas doses de 100 e 1000 ng/L. Considerando a capacidade de metabolização de TBT já descrita em *C. sapidus*, não é de surpreender que o tratamento agudo não tenha causado alterações nesses metabólitos. Por se tratar de uma espécie estuarina, capaz de tolerar grandes variações de salinidade e de temperatura, é possível que a atividade detoxificadora de seu hepatopâncreas também seja mais ampla em relação ao processo de contaminação e biotransformação de xenobióticos que a de outras espécies de decápodes de ambientes mais estáveis em termos de variação de salinidade e temperatura, como o ambiente limnítico. Na sequência desse projeto, está prevista a análise da concentração de triglicerídeos, de outros parâmetros de estresse oxidativo e da expressão de genes relacionados ao crescimento como o *RXR* e à resposta ao estresse como a *HSP70* no hepatopâncreas de siris expostos de forma aguda e crônica ao TBT.

Além do hepatopâncreas, o músculo e as gônadas também são considerados locais de armazenamento de glicogênio e de lipídeos, embora em menor concentração (VINAGRE & DA SILVA, 1992; SARAPIO et al., 2017). Essas reservas energéticas são mobilizadas de maneira tecido-específica durante diferentes tipos de estresse, refletindo alterações na homeostase energética que podem ser indicadoras da condição de saúde ou *status* reprodutivo (BUCKUP et al., 2008; ANTUNES et al., 2010;

SARAPIO et al., 2017). Após o tratamento agudo com TBT nas doses de 100 e 1000 ng/L, não foram verificadas variações significativas na concentração de glicogênio e de proteínas totais no músculo do quelípede de *C. sapidus*, enquanto no coração ocorreu aumento do glicogênio. Esse aumento no glicogênio cardíaco possivelmente pode estar relacionado à diminuição respiratória induzida por TBT em *C. sapidus* (OBERDÖRSTER et al., 1998). A exposição aguda a 0,33, 0,26, 0,17 e 0,09 ppm de TBTCI dissolvido na água, reduziu a concentração de glicogênio no músculo do lagostim *M. kistnensis* (KHARAT et al., 2009). Em nossa pesquisa bibliográfica, esse foi o único trabalho anterior que avaliou os efeitos da exposição ao TBT em músculo de crustáceo. No camarão *Litopennaeus vannamei*, por exemplo, a exposição a doses subletais de pesticidas organofosforado, clorpirifós (0,0015 mg/L), diazinon (0,0120 mg/L), metamidofós (1,207 mg/L), metil azinfos (0,0101 mg/L) e metil paration (0,0075 mg/L) por 7 dias reduziu a concentração de glicogênio, triglicerídeos e proteínas musculares, exceto o diazinon (0,0120 mg/L) que não alterou a concentração de glicogênio e proteínas e aumentou a de triglicerídeos (OSUNA-FLORES et al., 2019). Dessa forma, novos estudos são necessários para o esclarecimento dos efeitos do TBT em diferentes tipos de músculo de crustáceos.

Em crustáceos, as brânquias anteriores possuem epitélio respiratório e são associadas à função das trocas gasosas, enquanto brânquias posteriores, formadas por um epitélio espesso e rico em mitocôndrias, são os principais locais de transporte iônico e, portanto, dos processos de osmorregulação (FREIRE et al., 2008; LUQUET et al., 2002; MARTINS et al., 2011). No presente estudo, assim como no hepatopâncreas e no músculo do quelípede, a exposição aguda ao TBT não alterou a concentração de glicogênio em ambas as brânquias. Em *M. kistnensis*, a exposição ao TBT reduziu a concentração de glicogênio nas brânquias (KHARAT et al., 2009). A concentração de proteínas totais nas brânquias posteriores também não foi alterada, porém houve uma redução significativa em relação ao tempo de exposição de cerca de 25% nas brânquias anteriores dos animais expostos por 96 horas em relação às 48 horas. A diminuição do teor de proteínas de crustáceos pode indicar uma adaptação fisiológica para compensar o estresse causado por pesticidas, que para ser superado, os animais necessitam de grandes quantidades de energia, e essa demanda energética poderia

estimular o catabolismo proteico (DUTRA et al., 2011; RIBEIRO et al., 2001). Essa diminuição no teor de proteínas também pode ser devida à formação de lipoproteína, usada para reparar organelas celulares e teciduais danificadas (RAMBABU & RAO, 1994; SANCHO et al., 1998). No trabalho de Oberdörster et al. (1998), a exposição ao TBT por 16 dias diminuiu a taxa respiratória de siris *C. sapidus*. Os autores mencionam que essa redução na taxa respiratória induzida por TBT pode estar relacionada a vários processos, tais como o fato de TBT adsorver às membranas e se associar às proteínas, podendo interferir tanto nos processos de troca gasosas como de transporte, o que poderia ser a causa da mobilização de proteínas totais nas brânquias anteriores. O metabolismo energético das brânquias, incluindo a relação ATP/ADP e a atividade da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase devem ser investigados mais detalhadamente em trabalhos futuros.

A exposição aguda ao TBT, não alterou a lipoperoxidação no hepatopâncreas e nas brânquias posteriores de *C. sapidus*. Nas brânquias anteriores dos animais expostos por 48 horas ao TBT nas concentrações de 100 e 1000 ng/L, houve aumento de 50% em relação ao grupo controle. Porém, após 96 horas, a LPO nos grupos expostos ao TBT retornou a níveis semelhantes ao controle. Esse aumento da LPO às 48 horas, sugere que os siris estejam sofrendo danos à membrana celular possivelmente pela geração de EROs, uma vez que as membranas são constituídas por uma bimatada lipídica contendo lipídios poliinsaturados suscetíveis à peroxidação (JEROME et al., 2017). A redução da LPO após 96 horas poderia estar relacionada à capacidade do siri de se defender dos possíveis danos causados, provavelmente pela ativação de defesas antioxidantes. Esses resultados podem indicar que as brânquias, em especial as anteriores, são um dos primeiros alvos da contaminação por TBT devido a seu contato direto com o meio externo, causando danos as suas funções fisiológicas (HENRY et al., 2012), conforme já descrito anteriormente (OBERDÖRSTER et al., 1998). As brânquias de *Urolophus jamaicensis* (Arraia Amarela) sofreram danos epiteliais após exposição à 0,05 µg/L TBT por 3 horas e a doses superiores a 1 µg/L. Também foi verificado aumento na expressão de HSP70 e heme oxigenase ( $\text{HO}^{-1}$ ), marcadora de lipoperoxidação (DEWIVED & TROMBETTA, 2005). A degradação de membranas por peroxidação lipídica após a exposição ao TBT induz uma rápida perda de função das brânquias que são responsáveis pelas trocas gasosas e pelo equilíbrio

osmótico (DEWIVED & TROMBETTA, 2005). No estudo de Zhang et al. (2017), foi realizada a exposição do peixe *Gobiocypris rarus* às concentrações de 1,0, 10,0 e 100,0 ng/L de TBTCI por 60 dias e a lipoperoxidação no tecido muscular aumentou de maneira dependente da dose, ocorrendo também aumento nos lipídeos totais, triglicerídeos e colesterol no mesmo tecido.

O aumento da lipoperoxidação é um dos principais contribuintes para a perda da função celular em situações de estresse oxidativo e a sua determinação foi empregada com sucesso em animais aquáticos para indicar estresse oxidativo induzido por contaminantes orgânicos, incluindo pesticidas e organofosforados (MONSERRAT et al., 2007; LAVARÍAS et al., 2013). No estudo realizado por Roszbach et al. (2017), que expuseram o caranguejo *Carcinus maenas* a doses subletais de cobre (Cu), apresentou um aumento da lipoperoxidação nas brânquias anteriores após 4 dias de exposição, não havendo alteração nas brânquias posteriores e hepatopâncreas. Quando avaliado a lipoperoxidação nas brânquias e no hepatopâncreas de siris *C. amnicola* capturados de diferentes pontos de água contaminada por efluentes industriais, foi observado um menor dano oxidativo significativo nos animais coletados do ponto considerado controle em relação aos demais locais, assim como para o hepatopâncreas (JEROME et al., 2017).

## 6 CONCLUSÃO

Este é o primeiro estudo a mostrar o efeito da exposição aguda ao TBT sobre o metabolismo intermediário e homeostase oxidativa no siri *C. sapidus*, espécie de crustáceo de grande importância ecológica e socioeconômica. As brânquias anteriores, possivelmente devido às suas características morfológicas e função respiratória, foi o tecido que apresentou alterações no metabolismo de proteínas e danos oxidativos. Possivelmente tais alterações possam estar relacionadas a um maior consumo energético frente ao estresse ocasionado pela exposição ao TBT. Os resultados obtidos sugerem que o siri *C. sapidus* possui mecanismos metabólicos que lhe permitem manter a homeostase energética relativamente estável frente à exposição aguda ao TBT nas doses de 100 e 1000 ng/L por até 96 horas. Contudo, mais estudos precisam ser realizados analisando outros parâmetros para melhor entender o risco deste contaminante para esta espécie e em consequência, aos ambientes aquáticos.

## 7 PERSPECTIVAS

Como proposta para a continuação desse trabalho, pretende-se:

1. Investigar os efeitos da continuação do tratamento *in vivo* com TBT nas doses de 10, 100 e 1000 ng/L, por até 7 dias, sobre:

- O metabolismo de carboidratos na hemolinfa (glicose e lactato) e glicogênio no hepatopâncreas, brânquias e músculo do quelípede;

- O metabolismo de lipídeos na hemolinfa (colesterol e triglicerídeos) e triglicerídeos no hepatopâncreas e gônadas e músculo;

- Os índices hepatossomático e gonadossomático;

- A atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) na hemolinfa, hepatopâncreas, brânquias e músculo;

- Os níveis de  $H_2O_2$  e de proteínas carboniladas na hemolinfa, hepatopâncreas, músculo e brânquias;

- A expressão gênica do hormônio hiperglicemiante de crustáceos (CHH) e da proteína de choque térmico (HSP70) nos pedúnculos oculares;

- A expressão gênica de SOD e de HSP70 no hepatopâncreas, brânquias e músculo.

2. Investigar os efeitos *in vitro* de TBT. Amostras de tecidos (hepatopâncreas, músculo e brânquias) serão incubadas em banho metabólico em presença de TBT (0,1, 1,0, 10,0, e 100 ng/L) para a avaliação dos mecanismos de ação da TBT sobre a lipólise, glicogenólise e oxidação de glicose.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIRRE-MARTÍNEZ, G.V.; DEL VALLS T.A. & MARTÍN-DÍAZ M.L. Identification of bio-markers responsive to chronic exposure to pharmaceuticals in target tissues of *Carcinus maenas*. **Marine Environmental Research** (87–88): 1–11, 2013.
- ALI, S. & LIU, G. Antioxidant enzyme activities in *Exopalaemon carinicauda*, holthuis, 1950, (Decapoda: Palaemonidae) in response to naphthalene. **Advanced Science Letters** 19(12): 3655-3659, 2013.
- ALVAREZ, J. V. & CHUNG, J. S. Cloning of prophenoloxidase from hemocytes of the blue crab, *Callinectes sapidus* and its expression and enzyme activity during the molt cycle. **Fish & Shellfish Immunology** 35(5): 1349-1358, 2013.
- ALZIEU, C. Environmental impact of TBT: the French experience. **Science of the Total Environment** 258(1-2): 99-102, 2000.
- ANTUNES, F.; AMARAL, A. P.; RIBARCKI, F. P.; WIILAND, E. F.; ZANCAN D. M. & VINAGRE A. S. Seasonal variations in the biochemical composition and reproductive cycle of the ghost crab *Ocypode quadrata* (Fabricius, 1787) in Southern Brazil. **Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology** 313:280–91, 2010.
- ARAÚJO, J. F. P.; PODRATZ, P. L.; MERLO, E.; SARMENTO, I. V.; COSTA, C. S.; NIÑO, O. M. S.; GRACELLI, J. B. Organotin exposure and vertebrate reproduction: a review. **Frontiers in endocrinology** 9:64, 2018.
- ARTIFON, V.; CASTRO, I. B.; FILLMANN G. Spatiotemporal appraisal of TBT contamination and imposex along a tropical bay (Todos os Santos Bay, Brazil). **Environmental Science and Pollution Research** 23:16047–55, 2016.
- BATISTA, R. M.; CASTRO, I. B.; FILLMANN, G. Imposex and butyltin contamination still evident in Chile after TBT global ban. **Science of the Total Environment** 566:446–453, 2016.
- BARWICK, M. & MAHER, W. Biotransference and biomagnification of selenium copper, cadmium, zinc, arsenic and lead in a temperate seagrass ecosystem from Lake Macquarie Estuary, NSW, Australia. **Marine Environmental Research** 56(4):471-502, 2003.



- BERTO-JÚNIOR C.; CARVALHO, D. P.; SOARES, P.; MIRANDA-ALVES, L. Tributyltin and Zebrafish: Swimming in Dangerous Water. **Frontiers in endocrinology** 9:152, 2008.
- BERTULOSO, B. D., *et al.* Tributyltin chloride leads to adiposity and impairs metabolic functions in the rat liver and pancreas. **Toxicology letters** 235:45–59, 2015.
- BORDON, I. C.; EMERENCIANO, A. K.; MELO, J. R. C.; DA SILVA, J. R. M. C.; FAVARO, D. I. T.; GUSSO-CHOUERI, P. K.; CAMPOS, B. G.; DE SOUZA, A. D. M. Implications on the Pb bioaccumulation and metallothionein levels due to dietary and waterborne exposures: The *Callinectes danae* case. **Ecotoxicology and environmental safety** 162:415-422, 2018.
- BORTOLOTTO J. **Dinâmica da Pesca Artesanal do siri-azul *Callinectes sapidus* (Rathbun, 1896) no estuário do Tramandaí, Sul do Brasil.** 2011. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Ciências Biológicas) – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.
- BUCKUP, L., *et al.* Seasonal variations in the biochemical composition of the crayfish *Parastacus defossus* (Crustacea, Decapoda) in its natural environment. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology** 149(1):59-67, 2008.
- BUEGE, J. A. & AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods Enzymol.** 52: 302– 310. 1978
- CASTRO, I. B.; ROSSATO, M.; FILLMANN, G. Imposex reduction and residual butyltin contamination in southern Brazilian harbors. **Environmental toxicology and chemistry** 31(5):947–54, 2012.
- CESAR, I. I.; ARMENDÁRIZ, L. C.; OLALLA, N.; TABLADO, A. The blue crab *Callinectes sapidus* Rathbun, 1896 (Decapoda, Portunidae) in the Río de La Plata, Argentina. **Crustaceana** 76(3):377–384, 2013.
- CHAMP, M. A. A review of organotin regulatory strategies, pending actions, related costs and benefits. **Science of the total Environment** 258(1-2):21-71, 2000.
- CHAMP, M. & PUGH, W. Tributyltin antifouling paints: introduction and overview. **OCEANS'87 IEEE** 1296-1308, 1987.

CHUNG, J. S.; WILKINSON, M. C. & WEBSTER, S. G. Amino acid sequences of both isoforms of crustacean hyperglycemic hormone (CHH) and corresponding precursor related peptide in *Cancer pagurus*. **Regulatory Peptides** 77(1-3):17–24, 1998.

CHUNG J. S.; ZMORA, N. Functional studies of crustacean hyperglycemic hormones (CHHs) of the blue crab, *Callinectes sapidus*—the expression and release of CHH in eyestalk and pericardial organ in response to environmental stress. **The FEBS journal** 275(4): 693-704, 2008.

CHUNG, J. S.; BACHVAROFF, T. R.; TRANT, J.; PLACE, A. A second copper zinc superoxide dismutase (CuZnSOD) in the blue crab *Callinectes sapidus*: Cloning and up-regulated expression in the hemocytes after immune challenge. **Fish & shellfish immunology** 32(1):16-25, 2012.

COLTRO, M. L.; DA SILVA, P. R.; VALGAS, A. A. N.; MIGUEL, C.; DE FREITAS, B. S.; OLIVEIRA, G. T. Influence of the Herbicide Facet® on Corticosterone Levels, Plasma Metabolites, and Antioxidant System in the Liver and Muscle of American Bullfrog Tadpoles. **Water, Air, & Soil Pollution** 228(7):241, 2017.

CRISTALE, J. *et al.* Tributyltin in crustacean tissues: analytical performance and validation of method. **Journal of the Brazilian Chemical Society** 23(1):39–45, 2012.

DAS, S.; TSENG, L. C.; CHOU, C.; WANG, L.; SOUISSI, S.; HWANG, J. S. Effects of cadmium exposure on antioxidant enzymes and histological changes in the mud shrimp *Austinopecten edulis* (Crustacea: Decapoda). **Environmental Science and Pollution Research** 26(8):7752-7762, 2019.

DE OLIVEIRA, U. O.; DA ROSA ARAÚJO, A. S.; BELLÓ-KLEIN, A.; DA SILVA, R. S. M.; KUCHARSKI, L. C. Effects of environmental anoxia and different periods of reoxygenation on oxidative balance in gills of the estuarine crab *Chasmagnathus granulata*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology** 140:51–57, 2005.

DEWIVEDI, J. & TROMBETTA, L. D. Acute toxicity and bioaccumulation of tributyltin in tissues of *Urolophus jamaicensis* (yellow stingray). **Journal of Toxicology and Environmental Health Part A** 69(14):1311-1323, 2006.

- DPC 2007. Normas da Autoridade Marítima para o Controle de Sistemas Anti-incrustantes Danosos em Embarcações - NORMAM/23. (Marinha do Brasil, Rio de Janeiro).
- DRACH, P.; TCHERNIGOVITZ, C. Sur le mode de détermination des stades d'intermue et son application générale aux crustacés. **Vie Milieu** 18: 95-609, 1967.
- FABBRI, E. & MOON, T. W. Adrenergic signaling in teleost fish liver, a challenging path. **Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology** 199:74–86, 2016.
- DUTRA, B. K.; FERNANDES, F. A.; OLIVEIRA, G. T. Carbofuran-induced alterations in biochemical composition, lipoperoxidation, and Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase activity of *Hyaella pleoacuta* and *Hyaella curvispina* in bioassays. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology** 147(2):179-188, 2008.
- DUTRA, B. K.; FERNANDES, F. A.; LAUFFER, A. L.; OLIVEIRA, G. T. Carbofuran-induced alterations in the energy metabolism and reproductive behaviors of *Hyaella castroi* (Crustacea, Amphipoda). **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology** 149(4):640-646, 2009.
- DUTRA, B. K.; FERNANDES, F. A.; FAILACE, D. M.; OLIVEIRA, G. T. Effect of Roundup® (glyphosate formulation) in the energy metabolism and reproductive traits of *Hyaella castroi* (Crustacea, Amphipoda, Dogielinotidae). **Ecotoxicology** 20(1):255-263, 2011.
- FANG, L.; XU, C.; LI, J.; BORGGGAARD, O. K.; WANG, D. The importance of environmental factors and matrices in the adsorption, desorption, and toxicity of butyltins: a review. **Environmental Science and Pollution Research** 24(10):9159–73, 2017.
- FANJUL-MOLES, M. L. Biochemical and functional aspects of crustacean hyperglycemic hormone in decapod crustaceans: review and update. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology** 142(3-4):390-400, 2006.
- FENT, K. Ecotoxicology of organotin compounds. **Critical reviews in toxicology** 26(1):1–117, 1996.

FERNANDES, F. A.; DUTRA, B. K.; MOSELE, F.; ARAUJO, A. S. R.; FERREIRA, G. D.; BELLÓ-KLEIN, A.; KUCHARSKI, L. C.; VINAGRE, A. S.; DA SILVA, R. S. M. Redox and metabolic strategies developed by anterior and posterior gills of the crab *Neohelice granulata* after short periods of hypo-or hyper-osmotic stress. **Science of The Total Environment** 639:457-464, 2018.

FRANCO, R.; SÁNCHEZ-OLEA, R.; REYES-REYES, E. M.; PANAYIOTIDIS, M. I. Environmental toxicity, oxidative stress and apoptosis: menage a trois. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis** 674(1-2):3-22, 2009.

FREIRE, C. A.; ONKEN, H. & MCNAMARA, J. C. A structure-function analysis of ion transport in crustacean gills and excretory organs. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology** 151:272–304, 2008.

GAO, J. M.; WU, L.; CHEN, Y. P.; ZHOU, B.; GUO, J. S.; ZHANG, K. Spatiotemporal distribution and risk assessment of organotins in the surface water of the Three Gorges Reservoir Region, China. **Chemosphere** 171:405-14, 2017.

GEARY, D. **European labour protest 1848-1939**. Taylor & Francis, 1981.

GOMES, I. D. L.; LEMOS, M. F. L.; SOARES, A. M. V. M.; DIEZ, S.; BARATA, C.; FARIA, M. Effects of Barcelona harbor sediments in biological responses of the polychaete *Capitella teleta*. **Science Total Environmental** 485–486:545–553, 2014.

GOMES, E. G.; FREITAS, L. S.; MACIEL, F. V.; JORGE, M. B.; MARTINS, C. M. G. Combined effects of waterborne copper exposure and salinity on enzymes related to osmoregulation and ammonia excretion by blue crab *Callinectes sapidus*. **Ecotoxicology** 28:781–789, 2019

GRACELI J. B. *et al.* Organotins: a review of their reproductive toxicity, biochemistry, and environmental fate. *Reproductive Toxicology* 36:40–52, 2013.

HALLIWELL, B. & GUTTERIDGE, J. M. *Radicals livres em biologia e medicina*. Oxford University Press, EUA. 2015.

HENRY, R. P.; LUCU, C.; ONKEN, H.; WEIHRAUCH, D. Multiple functions of the crustacean gill: osmotic/ionic regulation, acid-base balance, ammonia excretion, and bioaccumulation of toxic metals. **Frontiers in Physiology** 3:431, 2012.

HERMES-LIMA, M.; MOREIRA, D. C.; RIVERA-INGRAHAM, G. A.; GIRAUD-BILLOUD, M.; GENARO-MATTOS, T. C.; CAMPOS, É. G. Preparation for oxidative stress under

hypoxia and metabolic depression: revisiting the proposal two decades later. **Free Radical Biology and Medicine** 89:1122–1143, 2015.

HERNÁNDEZ-PALOMARES, M. L. E. et al. Regulation of lactate dehydrogenase in response to WSSV infection in the shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Fish and Shellfish Immunology** 74:401–409, 2018.

HOCH, M. Organotin compounds in the environment: a review. **Applied geochemistry** 16(7-8):719–743, 2001.

IGARASHI, A. M. Cultivo de siri: perspectivas para o pequeno criador. **Revista Acadêmica Ciências Agrárias e Ambiente** 7:12, 2009.

IMO, 2001. International Convention on the Control of Harmful Anti-fouling Systems on Ships.

INOHARA, E. T. S.; PINTO, C. B.; MODEL, J. F. A.; TRAPP, M.; KUCHARSKI, L. C.; DA SILVA, R. S. M.; VINAGRE, A. S. Serotonin effects in the crab *Neohelice granulata*: possible involvement of two types of receptors in peripheral tissues. **Comparative Biochemistry and Physiology A: Molecular & Integrative Physiology** 185:80-90, 2015.

JADHAV, S.; BHOSALE, D. & BHOS, L. E. N. Baseline of organotin pollution in fishes, clams, shrimps, squids and crabs collected from the west coast of India. **Marine pollution bulletin** 62:2213–9, 2011.

JAGTAP, J. Depletion Of Glycogen In Different Tissues Of Freshwater Bivalve, *Lamellidens marginalis* Exposed To Tributyltin Chloride. **International Journal of Advanced Scientific Research and Management** 3(10): 147-152, 2018.

JAMES, M. O. Isolation of cytochrome P450 from hepatopancreas microsomes of the spiny lobster, *Panulirus argus*, and determination of catalytic activity with NADPH cytochrome P450 reductase from vertebrate liver. **Archives of biochemistry and biophysics** 282:8–17, 1990.

JEROME, F. C.; HASSAN, A.; OMONIYI-ESAN, G. O.; ODUJOKO, O. O.; CHUKWUKA, A. V. Metal uptake, oxidative stress and histopathological alterations in gills and hepatopancreas of *Callinectes amnicola* exposed to industrial effluent. **Ecotoxicology and environmental safety** 139:179-193, 2017.

- JIMENEZ, A. G. & KINSEY, S. T. Energetics and metabolic regulation. **The Natural of the Crustacea** 4:391-419, 2015.
- JORDÃO, R. *et al.* Obesogens beyond vertebrates: lipid perturbation by tributyltin in the crustacean *Daphnia magna*. **Environmental Health Perspective** 123:813–9, 2015.
- KALYANARAMAN, B. Teaching the basics of redox biology to medical and graduate students: oxidants, antioxidants and disease mechanisms. **Redox biology** 1:244-257, 2013.
- KANDER, M. C.; CUI, Y.; LIU, Z. Gender difference in oxidative stress: a new look at the mechanisms for cardiovascular diseases. **Journal of cellular and molecular medicine** 21(5):1024-1032, 2017.
- KHARAT, P. S.; LAXMI, I.; GHOBLE, B.; SHEJULE, K. B.; GHOBLE, I. B. C. Effect of TBTCL on glycogen profile in freshwater prawn, *Macrobrachium kistnensis*. **World Applied Sciences Journal** 7(12):1534-1539, 2009.
- KIM, B. M.; SARAVANAN, M.; LEE, D. H.; KANG, J. H.; KIM, M.; JUNG, J. H.; RHEE, J. S. Exposure to sublethal concentrations of tributyltin reduced survival, growth, and 20-hydroxyecdysone levels in a marine mysid. **Marine environmental research** 140:96-103 2018.
- KONSTANTINOOU I. K. & ALBANIS, T. A. Worldwide occurrence and effects of antifouling paint booster biocides in the aquatic environment: a review. **Environment international** 30(2):235-248, 2004.
- LAGADIC, L.; KATSIADAKI, I.; BIEVER, R.; GUINEY, P. D.; KAROUNA-RENIER, N.; SCHWARZ, T.; MEADOR, J. P. In: Tributyltin: advancing the science on assessing endocrine disruption with an unconventional endocrine-disrupting compound. New York, NY: Springer New York, 1–63, 2018.
- LAGERSTRÖM, M.; STRAND, J.; EKLUND, B.; YTREBERG, E. Total tin and organotin speciation in historic layers of antifouling paint on leisure boat hulls. **Environmental Pollution** 220:1333–41, 2017.
- LARANJEIRO, F.; SÁNCHEZ-MARÍN, P.; OLIVEIRA, I. B.; GALANTE-OLIVEIRA, S.; BARROSO, C. Fifteen years of imposex and tributyltin pollution monitoring along the Portuguese coast. **Environmental pollution** 232:411-421, 2018.

- LAVARÍAS, S.; GARCÍA, C.; CRESPO, R.; PEDRINI, N.; HERAS, H. Study of biochemical biomarkers in freshwater prawn *Macrobrachium borellii* (Crustacea: Palaemonidae) exposed to organophosphate fenitrothion. **Ecotoxicology and environmental safety** 96:10-16, 2013.
- LEBLANC, G. A. Crustacean endocrine toxicology: A review. **Ecotoxicology** 16:61–81, 2007.
- LEE, R. F. Metabolism and accumulation of xenobiotics within hepato-pancreas cells of the blue crab, *Callinectes sapidus*. **Marine Environmental Research** 28:93–7, 1989.
- LEE, R. F. Metabolism of tributyltin by aquatic organisms. **Organotin Environ Fate Eff** 369–82, 1996.
- LEE, C. C.; HSU, Y. C.; KAO, Y. T.; CHEN, H. L. Health risk assessment of the intake of but-yltin and phenyltin compounds from fish and seafood in Taiwanese population. **Chemosphere** 164:568–75, 2016.
- LE MAIRE, A.; GRIMALDI, M.; ROECKLIN, D.; DAGNINO, S.; VIVAT-HANNAH, V.; BALAGUER, P.; BOURGUET, W. Activation of RXR–PPAR heterodimers by organotin environmental endocrine disruptors. **EMBO reports** 10(4):367-373, 2009.
- LESSER, M. P. Oxidative stress in tropical marine ecosystems. **Oxidative stress in aquatic ecosystems**. 2011.
- LIMÓN-PACHECO, J. & GONSEBATT, M. E. The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis** 674(1-2):137-147, 2009.
- LORENZON, S.; GIULIANINI, P. G.; MARTINIS, M.; FERRERO, E. A. Stress effect of different temperatures and air exposure during transport on physiological profiles in the American lobster *Homarus americanus*. **Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology** 147, 94–102, 2007.
- LORENZON, S.; GIULIANINI, P. G.; LIBRALATO, S.; MARTINIS, M.; FERRERO, E. A.. Stress effect of two different transport systems on the physiological profiles of the crab *Cancer pagurus*. **Aquaculture** 278:156–163, 2008.

- LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin-phenol reagent. **Journal of biological chemistry** 193:265-275, 1951.
- LIU, Z. M.; ZHU, X. L.; LU, J.; CAI, W. J.; YE, Y. P.; LV, Y. P. Effect of high temperature stress on heat shock protein expression and antioxidant enzyme activity of two morphs of the mud crab *Scylla paramamosain*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology** 223:10-17, 2018.
- LUSHCHAK, V. I. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. **Aquatic toxicology** 101(1):13-30, 2011.
- LUQUET, C. M.; GENOVESE, G.; ROSA, G. A.; PELLERANO, G. N. Ultrastructural changes in the gill epithelium of the crab *Chasmagnathus granulatus* (Decapoda: Grapsidae) in diluted and concentrated seawater. **Marine Biology** 141(4):753–760, 2002.
- MACIEL, D. C.; CASTRO Í. B.; SOUZA, J. R. B.; YOGUI, G. T.; FILLMANN, G.; ZANARDI-LAMARDO, E. Assessment of organotins and imposex in two estuaries of the northeastern Brazilian coast. **Marine pollution bulletin** 126:473-478, 2018.
- MACIEL, J. E. S.; SOUZA, F.; VALLE, S.; KUCHARSKI, L. C.; DA SILVA, R. S. M. Lactate metabolism in the muscle of the crab *Chasmagnathus granulatus* during hypoxia and post-hypoxia recovery. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology** 151:61–65, 2008.
- MALEV, O.; SRUT, M.; MAGUIRE, I.; STAMBUK, A.; FERRERO, E. A.; LORENZON, S.; KLOBUCAR, G. Genotoxic, physiological and immunological effects caused by temperature increase, air exposure or food deprivation in freshwater crayfish *Astacus leptodactylus*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology** 152(4):433–443, 2010.
- MARQUES, V. B.; FARIA, R. A.; DOS SANTOS, L. Overview of the Pathophysiological implications of Organotins on the endocrine System. **Frontiers in endocrinology** 9:101, 2018.
- MARTINOVIĆ R. *et al.* Comparative assessment of cardiac activity and DNA damage in haemocytes of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* in exposure to tributyltin chloride. **Environmental Toxicology and Pharmacology** 47:165–74, 2016.



- MARTINS, C. D. M. G.; BARCAROLLI, I. F.; DE MENEZES, E. J.; GIACOMIN, M. M.; WOOD, C. M.; BIANCHINI, A. Acute toxicity, accumulation and tissue distribution of copper in the blue crab *Callinectes sapidus* acclimated to different salinities: in vivo and in vitro studies. **Aquatic toxicology** 101(1):88-99, 2011.
- MARTINS, T. L.; CHITTÓ, A. L. F.; ROSSETTI, C. L.; BRONDANI, C. K.; KUCHARSKI, L. C.; DA SILVA, R. S. M. Effects of hypo- or hyperosmotic stress on lipid synthesis and gluconeogenic activity in tissues of the crab *Neohelice granulata*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology** 158:400–405, 2011.
- MASSARSKY, A.; TRUDEAU, V. L. & MOON, T. W.  $\beta$ -blockers as endocrine disruptors: the potential effects of human  $\beta$ -blockers on aquatic organisms. **Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology** 315(5):251–65, 2011.
- MAZZEI, V. *et al.* Metallothioneins and heat shock proteins 70 in *Armadillidium vulgare* (Isopoda, Oniscidea) exposed to cadmium and lead. **Ecotoxicology and environmental safety** 116:99–106, 2015.
- MELO, G. A. S. Infraordem Brachyura (siris e caranguejos: espécies marinhas e estuarinas). In: BUCKUP, L. & BOND-BUCKUP, G. **Os crustáceos do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre. Ed. Universidade UFRGS, 1999, pp 415-485.
- MENDONÇA, J. T.; VERANI, J. R. & NORDI, N. Evaluation and management of blue crab *Callinectes sapidus* (Rathbun, 1896) (Decapoda- Portunidae) fishery in the Estuary of Cananéia, Iguape and Ilha Comprida, São Paulo, Brazil. **Brazilian Journal of Biology** 70(1):37–45, 2010.
- MIZEREK, T.; REGAN, H. M. & HOVEL, K. A. Seagrass habitat loss and fragmentation influence management strategies for a blue crab *Callinectes sapidus* fishery. **Marine Ecology Progress Series** 427:247–257, 2011.
- MODEL, J. F. A.; DOS SANTOS, J. T.; DA SILVA, R. S. M.; VINAGRE, A. S. Metabolic effects of epinephrine on the crab *Neohelice granulata*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology** 231, 111-118, 2019.

MONSERRAT, J. M. Pollution biomarkers in estuarine animals: critical review and new perspectives. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology** 146(1-2):221-234, 2007.

MORALES, M.; MARTÍNEZ-PAZ, P.; OZÁEZ, I.; MARTÍNEZ-GUITARTE, J. L.; MORCILLO, G. DNA damage and transcriptional changes induced by tributyltin (TBT) after short in vivo exposures of *Chironomus riparius* (Diptera) larvae. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology** 158:57–63, 2013.

MORRIS, S.; POSTEL, U.; MRINALINI, L. M.; TURNER, L.; PALMER, J.; WEBSTER, S. G. The adaptive significance of crustacean hyperglycemic hormone (CHH) in daily and seasonal migratory activities of the Christmas Island red crab *Gecarcoidea natalis*. **Journal of Experimental Biology** 213:3062–3073, 2010.

NAGARAJU, G. P. C.; BASHA, M. R. & REDDY, P. S. Organotin-induced hyperglycemia in the crab, *Oziotelphusa senex senex fabricius*. **Zeitschrift fur Naturforsch** 56:315–7, 2001.

NEGRO, C. L.; ITURBURU, F. G.; MENDIETA, J.; MENONE, M. L.; COLLINS, P. Are Oxidative Stress Biomarkers Sensitive to Environmental Concentrations of Chlorpyrifos Exposed to the Freshwater Crab, *Zilchiopsis collastinensis* (Decapoda; Trichodactylidae)? **Bulletin of environmental contamination and toxicology** 103(3), 405-410, 2019.

NOAA 2016. National Oceanic and Atmospheric Administration.

NUNES-SILVA, A.; DITZ, D.; SANTANA, H. S.; FARIA, R. A.; FREITAS, K. M.; COUTINHO, C. R.; LIMA, F. The Pollutant Organotins Leads to Respiratory Disease by Inflammation: A Mini-Review. **Frontiers in endocrinology** 8:369, 2018.

OBERDÖRSTER, E.; RITTSCHOF, D. & MCCLELLAN-GREEN, P. Induction of cytochrome P450 3A and heat shock protein by tributyltin in blue crab, *Callinectes sapidus*. **Aquatic Toxicology** 41(1-2):83-100, 1998.

OLIVEIRA A, PINTO TK, SANTOS DPD, D'INCAO F. Dieta natural do siri azul *Callinectes sapidus* (Decapoda, Portunidae) na região estuarina da Lagoa dos Patos, Rio Grande do Sul, Brasil. **Iheringia. Série Zoologia** 96(3):305–313, 2006.

OLIVEIRA, G. T.; ROSSI, I. C.; KUCHARSKI, L. C. DA SILVA, R. S. M. Hepatopancreas gluconeogenesis and glycogen content during fasting in crabs previously maintained on a high-protein or carbohydrate-rich diet. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A** 137:383–390, 2004.

OSUNA-FLORES, I.; PÉREZ-MORALES, A.; OLIVOS-ORTIZ, A.; ÁLVAREZ-GONZÁLEZ, C. A. Effect of organophosphorus pesticides in juveniles of *Litopenaeus vannamei*: alteration of glycogen, triglycerides, and proteins. **Ecotoxicology** 28(6):698-706, 2019.

PARK, M. S.; KIM, Y. D.; KIM, B. M.; KIM, Y. J.; KIM, J. K.; RHEE, J. S. Effects of antifouling biocides on molecular and biochemical defense system in the gill of the pacific oyster *Crassostrea gigas*. **PLoS One** 11(12), 2016.

PELLEGRINO, R.; KUCHARSKI, L. C. & DA SILVA, R. S. M. Effect of fasting and refeeding on gluconeogenesis and glyconeogenesis in the muscle of the crab *Chasmagnathus granulatus* previously fed a protein- or carbohydrate-rich diet. **Journal of experimental marine biology and ecology** 358(2):144–150, 2008.

PELLEGRINO, R.; MARTINS, T. L.; PINTO, C. B.; SCHEIN, V.; KUCHARSKI, L. C.; DA SILVA, R. S. M. Effect of starvation and refeeding on amino acid metabolism in muscle of crab *Neohelice granulata* previously fed protein- or carbohydrate-rich diets. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology** 164:29–35, 2013.

PERANANDAM, R.; PALANISAMY, I.; LOURDARAJ, A.V.; NATESAN, M.; VIMALANANTHAN, A.P.; THANGAIYAN, S.; PERUMAL, A.; MUTHUKALINGAN, K. TBT effects on the development of intersex (Ovotestis) in female fresh water prawn *Macrobrachium rosenbergii*. **BioMed research international** 2014, 2014.

PILLER, S.; HENRY, R.; DOELLER, J.; KRAUS, D. A comparison of the gill physiology of two euryhaline crab species, *Callinectes sapidus* and *Callinectes similis*: energy production, transport-related enzymes and osmoregulation as a function of acclimation salinity. **Journal of Experimental Biology** 198(2):349-358, 1995.

PIANO, A.; VALBONESI, P. & FABBRI, E. Expression of cytoprotective proteins, heat shock protein 70 and metallothioneins, in tissues of *Ostrea edulis* exposed to heat and heavy metals. **Cell Stress & Chaperones** 9(2):134, 2004.

PODRATZ P. L. *et al.* Accumulation of organotins in seafood leads to reproductive tract abnormalities in female rats. **Reproductive Toxicology** (2015) 57:29–42, 2015.

PRYMACZOK, N. C.; PASQUALINO, V. M.; VIAU, V. E.; RODRÍGUEZ, E. M.; MEDESANI, D. A. Involvement of the crustacean hyperglycemic hormone (CHH) in the physiological compensation of the freshwater crayfish *Cherax quadricarinatus* to low temperature and high salinity stress. **Journal of Comparative Physiology B** 186(2):181–91, 2016.

RAMBABU, J. P. & RAO, M. B. Effect of an organochlorine and three organophosphate pesticides on glucose, glycogen, lipid, and protein contents in tissues of the freshwater snail *Bellamya dissimilis* (Müller). **Bulletin of environmental contamination and toxicology** 53(1):142-148, 1994.

RAND, G. M.; PETROCELLI, S. R. **Fundamentals of aquatic toxicology: methods and applications**. FMC Corp., Princeton, NJ, 1985.

RANI, K. U.; MUSTHAFA, M. S.; WAR, M.; AL-SADOON, M. K.; PARAY, B. A.; SHAREEF, T. M. A.; NAWAS, P. M. A. Impact of tributyltin on antioxidant and DNA damage response in spermatozoa of freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. **Environmental Science and Pollution Research** 22(24): 20000-20006, 2015.

RASCIO, V. J. D. Antifouling coatings: where do we go from here? **Corrosion Reviews** 18(2-3):133-154, 2000.

REGOLI, F. Chemical pollutants and the mechanisms of reactive oxygen species generation in aquatic organisms. **Oxidative stress in aquatic ecosystems** 308-316, 2011.

REICHMUTH, J. M.; WEIS, P.; WEIS, J. S. Bioaccumulation and depuration of metals in blue crabs (*Callinectes sapidus* Rathbun) from a contaminated and clean estuary. **Environmental Pollution** 158(2):361-368, 2010.

REVATHI, P.; IYAPPARAJ, P.; VASANTHI, R. A.; MUNUSWAMY, N.; PALAVESAM, A. Bioaccumulation of TBT and Its Cellular Toxic Effects on the Freshwater Prawn *Macrobrachium rosenbergii*. **Bulletin of environmental contamination and toxicology** 103(5):689-696, 2019.

- RIBEIRO, S.; SOUSA, J. P.; NOGUEIRA, A. J. A.; SOARES, A. M. V. M. Effect of endosulfan and parathion on energy reserves and physiological parameters of the terrestrial isopod *Porcellio dilatatus*. **Ecotoxicology and Environmental Safety** 49(2): 131-138, 2001.
- RICE, S. D.; SHORT, J. W. & STICKLE, W. B. Uptake and catabolism of tributyltin by blue crabs fed TBT contaminated prey. **Marine environmental research** 27:137–45, 1989.
- RODRÍGUEZ, E. M.; MEDESANI, D. A. & FINGERMAN, M. Endocrine disruption in crustaceans due to pollutants: a review. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology** 146(4):661-671, 2007.
- RONCONI, K. S.; STEFANON, I. & RIBEIRO JUNIOR, R. F. Tributyltin and vascular dysfunction: the role of oxidative stress. **Frontiers in Endocrinology** 9, 2018.
- ROSSBACH, L. M.; SHAW, B. J.; PIEGZA, D.; VEVERS, W. F.; ATFIELD, A. J.; HANDY, R. D. Sub-lethal effects of waterborne exposure to copper nanoparticles compared to copper sulphate on the shore crab (*Carcinus maenas*). **Aquatic Toxicology** 191:245-255, 2017.
- RUBIO-FRANCHINI, I. & RICO-MARTÍNEZ, R. Evidence of lead biomagnification in invertebrate predators from laboratory and field experiments. **Environmental Pollution** 159(7):1831-1835, 2011.
- RUPPERT, E. E.; FOX, R. S. & BARNES, R. D. Zoologia dos invertebrados: uma abordagem funcional-evolutiva. In: **Zoologia dos invertebrados: uma abordagem funcional-evolutiva** 2005.
- SANCHO, E.; FERRANDO, M. D.; FERNANDEZ, C.; ANDREU, E. Liver energy metabolism of *Anguilla anguilla* after exposure to fenitrothion. **Ecotoxicology and Environmental Safety** 41(2):168-175, 1998.
- SANT'ANNA, B. S. *et al.* Hermit crabs as bioindicators of recent tributyltin (TBT) contamination. **Ecological indicators** 14:184–188, 2012.
- SANT'ANNA, B. S.; DOS SANTOS, D. M.; DE MARCHI, M. R. R.; ZARA, F. J.; TURRA, A. Effects of tributyltin exposure in hermit crabs: *Clibanarius vittatus* as a model. **Environmental toxicology and chemistry** 31(3):632–638, 2012.

SANT'ANNA, B. S.; SANTOS, D. M.; MARCHI, M. R. R.; ZARA, F. J.; TURRA A. Surface-sediment and hermit-crab contamination by butyltins in southeastern Atlantic estuaries after ban of TBT-based antifouling paints. **Environmental Science and Pollution Research** 21:6516–6524, 2014.

SANTOS, M. M.; ENES, P.; REIS-HENRIQUES, M. A.; KUBALLA, J.; CASTRO, L. F. C.; VIEIRA, M. N. Organotin levels in seafood from Portuguese markets and the risk for consumers. **Chemosphere** 75:661–666, 2009.

SARAPIO, E. *et al.* Glyceroneogenesis in the hepatopancreas of the crab *Neohelice granulata*: diet, starvation and season effects. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology** 211:1–7, 2017.

SCHØYEN, M.; GREEN, N. W.; HJERMANN, D. Ø.; TVEITEN, L.; BEYLICH, B.; ØXNEVAD, S.; BEYER, J. Levels and trends of tributyltin (TBT) and imposex in dogwhelk (*Nucella lapillus*) along the Norwegian coastline from 1991 to 2017. **Marine environmental research** 144:1-8, 2019.

SCHULTZ, M. P.; BENDICK, J. A.; HOLM, E.R.; HERTEL, W. M. Economic impact of biofouling on a naval surface ship. **Biofouling** 27(1):87-98, 2011.

SILVA, I. F.; FREITAS-LIMA, L. C.; GRACELI, J. B.; RODRIGUES, L. C. D. M. Organotins in neuronal damage, brain function, and behavior: a short review. **Frontiers in endocrinology** 8:366, 2018.

SNYDER, M. J. & MULDER, E. P. Environmental endocrine disruption in decapod crustacean larvae: hormone titers, cytochrome P450, and stress protein responses to heptachlor exposure. **Aquatic toxicology** 55(3-4):177-190, 2001.

SPIEGEL, H. Trace element accumulation in selected bioindicators exposed to emissions along the industrial facilities of *Danube Lowland*. **Turkish Journal of Chemistry** 26(6):815-824, 202.

STANGE, D.; SIERATOWICZ, A. & OEHLMANN, J. Imposex development in *Nucella lapillus* – Evidence for the involvement of retinoid X receptor and androgen signalling pathways in vivo. **Aquatic toxicology** 106-107:20-24, 2012.

STOVER, K. K.; BURNETT, K. G.; MCELROY, E. J.; BURNETT, L. E. Locomotory fatigue during moderate and severe hypoxia and hypercapnia in the Atlantic Blue Crab *Callinectes sapidus*. **The Biological Bulletin** 224:68–78, 2013.

SUN, P. Y.; FOLEY, H. B.; HANDSCHUMACHER, L.; SUZUKI, A.; KARAMANUKYAN, T.; EDMANDS, S. Acclimation and adaptation to common marine pollutants in the copepod *Tigriopus californicus*. **Chemosphere** 112:465–71, 2014.

SUN, P. Y.; FOLEY, H. B.; BAO, V. W. W.; LEUNG, K. M. Y.; EDMANDS, S. Variation in tolerance to common marine pollutants among different populations in two species of the marine copepod *Tigriopus*. **Environmental Science and Pollution Research** 22:16143–52, 2015

TANG, C. H.; HSU, T. C.; TSAI, C. W.; WANG, W. H. Characterization of the planktonic shrimp, *Acetes intermedius*, as a potential biomonitor for butyltin. **Journal of Environmental Monitoring** 11:92–99, 2009.

TERLIZZI, A.; FRASCHETTI, S.; GIANGUZZA, P.; FAIMALI, M.; BOERO, F. Environmental impact of antifouling technologies: state of the art and perspectives. Aquatic Conservation: **Marine and Freshwater Ecosystems** 11(4):311-317, 2001.

TURNER, L. M.; WEBSTER, S. G.; & MORRIS, S. Roles of crustacean hyperglycemic hormone in ionic and metabolic homeostasis in the Christmas Island blue crab, *Discoplax celeste*. **Journal of Experimental Biology** 216:1191–1201, 2013.

U'REN, S. Acute toxicity of bis (tributyltin) oxide to a marine copepod. **Marine pollution bulletin** 14(8):303–6, 1983.

VAN HANDEL, E. Estimation of glycogen in small amounts of tissue. **Analytical biochemistry** 11(2):256-265, 1965.

VANNUCI-SILVA, M. *et al.* Bioaccumulation of tributyltin by blue crabs. **Journal of the Brazilian Chemical Society** 24(10):1642–8164, 2013.

VINAGRE, A. S.; DA SILVA, R. S. M. Effects of fasting and refeeding on metabolic processes in the crab *Chasmagnathus granulata* (Dana, 1851). **Canadian Journal of Zoology** 80(8):1413-1421, 2002.

VINAGRE, A. S. & CHUNG J. S. Effects of starvation on energy metabolism and crustacean hyperglycemic hormone (CHH) of the Atlantic ghost crab *Ocypode quadrata* (Fabricius, 1787). **Marine biology** 163(1):3, 2016.

VINAGRE, A. S. & DA SILVA, R. S. Effects of starvation on the carbohydrate and lipid metabolism in crabs previously maintained on a high protein or carbohydrate-rich diet.

- Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology** 102(3):579–583, 1992.
- VERHAEGEN, Y. *et al.* The heterodimeric ecdysteroid receptor complex in the brown shrimp *Crangon crangon*: EcR and RXR isoform characteristics and sensitivity towards the marine pollutant tributyltin. **General and comparative endocrinology** 172:158–169, 2011.
- VOGT, É. L.; MODEL, J. F. & VINAGRE, A. S. Effects of Organotins on Crustaceans: Update and Perspectives. **Frontiers in endocrinology** 9:65, 2018.
- YEBRA, D. M.; KIIL, S. & DAM-JOHANSEN, K. Antifouling technology past, present and future steps towards efficient and environmentally friendly antifouling coatings. **Progress in organic coatings** 50(2):75–104, 2004.
- ZHANG, J.; ZHANG, C.; MA, D.; LIU, M.; HUANG, S. Lipid accumulation, oxidative stress and immune-related molecules affected by tributyltin exposure in muscle tissues of rare minnow (*Gobiocypris rarus*). **Fish & shellfish immunology** 71:10-18, 2017.
- ZHANG, Y.; LOUGHERY, J. R.; MARTYNIUK, C. J.; KIEFFER, J. D. Physiological and molecular responses of juvenile shortnose sturgeon (*Acipenser brevirostrum*) to thermal stress. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology** 203:314-321, 2017.
- WANG, Y. H.; KWON, G.; LI, H.; LEBLANC, G. A. Tributyltin synergizes with 20-hydroxyecdysone to produce endocrine toxicity. **Toxicological Sciences** (2011) 123:71–9.
- WANG, Y. H. & LEBLANC, G. Interactions of methyl farnesoate and related compounds with crustacean retinoid X receptor. **Molecular and cellular endocrinology** 309 (1,2):109-115, 2009.
- WEBSTER, S. G.; KELLER, R. & DIRCKSEN, H. The CHH-superfamily of multifunctional peptide hormones controlling crustacean metabolism, osmoregulation, moulting, and reproduction. **General and comparative endocrinology** 175:217–233, 2012.
- WILLIAMS, A. B. The swimming crabs of the genus *Callinectes* (Decapoda: Portunidae). **Fishery Bulletin** 72(3):685-798, 1974.