



Universidade Federal do Rio Grande
Instituto de Ciências Biológicas
Pós-graduação em Biologia de
Ambientes Aquáticos Continentais



3

4

5

6

7

8

9

Toxicidade do chumbo, em diferentes

10

temperaturas, sobre hemócitos da *Pomacea*

11

canaliculata (Mollusca, Gastropoda)

12

13

14

15

16

Rafaela Porto de Oliveira

17

18

19

20

Orientadora: Marta Marques de Souza

21

22

23

24

25

26

Rio Grande

27

2017



Universidade Federal do Rio Grande
Instituto de Ciências Biológicas
Pós-graduação em Biologia de Ambientes
Aquáticos Continentais



32

33

34

35

36 Toxicidade do chumbo, em diferentes temperaturas, sobre

37 hemócitos da *Pomacea canaliculata* (Mollusca, Gastropoda)

38

39

40

41

42

43

Aluna: Rafaela Porto de Oliveira

44

Orientadora: Marta Marques de Souza

45

46

47

48

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-graduação em
Biologia de Ambientes Aquáticos
Continentais como requisito parcial
para obtenção do título de Mestre em
Biologia de Ambientes Aquáticos
Continentais.

49

50

51

52

53

54

55

56

57

58

Rio Grande

59

60

2017

61

62
63
64
65
66
67
68
69
70
71
72
73
74
75
76
77
78
79
80
81
82
83
84
85
86
87
88
89
90
91
92
93
94
95
96
97
98
99
100
101
102
103
104
105
106
107
108
109
110
111

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por estar sempre ao meu lado, guiando meus passos em todas as trajetórias da minha vida.

Agradeço aos meus pais que são a minha base, e que durante essa caminhada e em tantas outras estavam presentes. Obrigada pela paciência e por serem compreensivos durante a minha ausência. Também agradeço a minha irmã, que me escutou e me apoiou. Em muitos momentos nos deparamos com situações parecidas no mestrado, e isso fez com que uma aprendesse com o erro da outra e que também pudéssemos compartilhar tantos momentos de aflição.

Agradeço ao meu namorado por ser tão compreensivo e por me ajudar sempre que precisei. Me apoiou mesmo quando minhas decisões não eram as melhores, isso me fortaleceu para seguir em frente e alcançar meus objetivos. Obrigado pelos conselhos e por estar sempre ao meu lado.

Gostaria de agradecer a minha orientadora pelo apoio durante esses dois anos e por ter acreditado em mim. Agradeço pela oportunidade de ter convivido e aprendido com alguém que ama o que faz, e que exerce a sua profissão da melhor forma possível.

Agradeço aos meus colegas de mestrado, juntos compartilhamos alegrias e tristezas. Irei lembrar de cada um com muito carinho.

Agradeço ao meu grupo de pesquisa, aprendi muito em todas as reuniões. Sentirei saudades gurias! Obrigado por me acolherem tão bem.

Um agradecimento especial a Nicole Guidony, por ter me guiado no início do mestrado e pela paciência e dedicação no laboratório.

Não poderia deixar de agradecer aos professores que compartilharam muitos conhecimentos, e que sempre estavam dispostos a ajudar.

Agradeço a agência de fomento (CNPq) pelo apoio financeiro para que a realização desse estudo fosse possível.

Não tenho palavras para descrever a importância de cada um de vocês durante essa jornada, vocês foram e são muito especiais. Enfim, a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a conclusão desta pesquisa, muito obrigada!

112
113
114
115
116
117
118
119
120
121
122
123
124
125
126
127
128
129
130
131
132
133
134
135
136
137
138
139
140
141
142
143
144
145
146
147
148

RESUMO

Os ecossistemas encontram-se em uma situação crítica, onde os xenobióticos são os principais responsáveis pela contaminação em corpos de água doce. Sendo que inúmeros problemas ambientais são causados por metais pesados como o chumbo e os seus níveis de acumulação nos tecidos dos organismos podem representar a biodisponibilidade desses metais no ambiente aquático. Algumas características físicas do ambiente, como a temperatura, podem influenciar a toxicidade dos metais deixando-os mais ou menos disponíveis no meio. Assim, o estudo das interações entre fatores bióticos e abióticos se torna interessante, porque podem proporcionar uma visão mais realista do funcionamento dos ecossistemas. Devido a isso, o objetivo do estudo foi analisar se a variação de temperatura pode influenciar na toxicidade do chumbo, em hemócitos da *Pomacea canaliculata*. Para isso, foram realizados ensaios citotóxicos, uma modelagem *in vitro* em que alguns parâmetros celulares foram investigados. Os parâmetros celulares avaliados foram a atividade lisossomal e mitocondrial, morfologia e volume celular, frequência de células esféricas, apoptose e necrose. No presente estudo, quando os hemócitos foram expostos à concentração de 0,01mg/l de chumbo (Permitida pela legislação brasileira) na temperatura 11°C, houve aumento na atividade mitocondrial. Já nas temperaturas de 11°C e 15°C, também foi observado aumento da atividade mitocondrial na concentração maior de chumbo (1mg/l). Além disso, também foi observado efeito significativo da atuação conjunta do chumbo e temperatura sobre a frequência de células maiores, em que o aumento dessa frequência foi constatado na concentração intermediária de chumbo (0,1mg/l) na temperatura de 11°C. Porém, a ação conjunta de ambos fatores não afetou os demais parâmetros analisados. Desse modo, pode-se concluir que os caramujos da espécie *Pomacea canaliculata* são animais resistentes. Assim, ao se depararem em uma situação de estresse gerada por metais, ou frente a um cenário de mudanças climáticas, as células desses organismos conseguem responder positivamente a esses estressores ambientais.

Palavras-chave: hemócitos, chumbo, variações de temperaturas e moluscos.

149
150
151
152
153
154
155
156
157
158
159
160
161
162
163
164
165
166
167
168
169
170
171
172
173
174
175
176
177
178
179
180
181
182
183
184
185

ABSTRACT

Xenobiotics are the main responsible for contamination in freshwater bodies, which leads to a critical situation in this ecosystem. There are several environmental problems caused by heavy metals like lead (Pb) and their accumulation levels in the tissues may represent the bioavailability of these metals in aquatic environment. Some environmental physical characteristics, like temperature, can increase or decrease the availability of metals and thus exert influence in their toxicity. Therefore, the assessment of the interactions between biotic and abiotic factors becomes interesting, due to the possibility to generate a more realistic view of the functioning of ecosystems. Based on that, the aim of this study was to evaluate if temperature variation can influence the toxicity of lead in hemocytes of *Pomacea canaliculata*. To that purpose, the lysosomal and mitochondrial activity, cell volume and morphology, frequency of spherical cells, apoptosis and necrosis assay were performed to evaluate the cytotoxicity of lead. The results showed that hemocytes exposed to 0,01 mg/l of lead (allowed under Brazilian legislation) at 11° C increased the mitochondrial activity. This effect was also observed in the concentration of 1mg/l at 11° C and 15° C. Besides that, the frequency of larger cells has increased in the concentration of 0,1mg/l at 11°C. However, none of these factors affected the other parameters analyzed in this study. Thus, these evidences lead to the conclusion that the snail species *P. canaliculata* is resistant to acute toxicity induced by Pb because did not showed any obvious sign of cytotoxicity.

Keywords: hemocyte, lead, temperature variations and molluscs

186	SUMÁRIO	
187		
188	1.LISTA DE FIGURAS	7
189		
190	2.LISTA DE TABELAS	7
191		
192	2.INTRODUÇÃO GERAL	8
193		
194	3.OBJETIVO.....	20
195		
196	3.1 Objetivos específicos.....	20
197		
198	4. CAPÍTULO 1.....	27
199		
200	4.1 Resumo.....	28
201		
202	4.2.Introdução.....	29
203		
204	5. MATERIAIS E MÉTODOS	30
205		
206	5.1 Animais.....	30
207		
208	5.2 Condições experimentais	30
209		
210	5.3 Coleta da hemolinfa: obtenção das células.....	31
211		
212	5.4 Exposição dos hemócitos ao chumbo e a temperaturas.....	31
213		
214	5.4 ANÁLISES DA CITOTOXICIDADE	32
215		
216	5.4.1 Análise da estabilidade lisossomal	32
217		
218	5.4.2 Análise da atividade mitocondrial	32
219		
220	5.5 ANÁLISES CELULARES.....	33
221		
222	5.5.1 Análise da morfologia celular	33
223		
224	5.5.2 Apoptose e necrose	34
225		
226	6. ANÁLISE ESTATÍSTICA	35
227		
228	7. RESULTADOS	36
229		
230	7.1 Efeitos do chumbo e temperatura na viabilidade celular.....	36
231	7.2 Efeitos do chumbo e temperatura na morfologia celular.....	37
232		
233	7.1 Efeitos do chumbo e da temperatura na morte celular	39
234		
235	8.DISSCUSSÃO	41

236	9. CONCLUSÃO.....	48
237		
238		
239		
240	LISTA DE FIGURAS	
241		
242	FIGURA 1	15
243		
244	FIGURA 2	17
245		
246	FIGURA 3	34
247		
248	FIGURA 4	35
249		
250	FIGURA 5	36
251		
252	FIGURA 6	37
253		
254	FIGURA 7	38
255		
256	FIGURA 8	38
257		
258	FIGURA 9	39
259		
260		
261		
262	LISTA DE TABELAS	
263		
264	TABELA 1	30
265		
266		
267		
268		
269		
270		
271		
272		
273		
274		
275		
276		
277		
278		

279 2. INTRODUÇÃO GERAL

280

281 A urbanização e a industrialização são consideradas os principais vilões da biota
282 aquática, pois contribuem para a contaminação em ambientes aquáticos e também
283 auxiliam nas frequentes mudanças climáticas, que são responsáveis por diversas
284 consequências. Dentre essas derivações encontram-se a alteração ambiental e os efeitos
285 dos compostos tóxicos (Noyes *et al.*, 2009). A abordagem desse problema deve ser
286 amplamente investigada, pois não abrange apenas os organismos presentes naquele
287 ambiente, mas todo um contexto de bem estar populacional. Sendo que essa situação pode
288 ser intensificada, pois o ecossistema está exposto a uma ampla gama de substâncias
289 tóxicas que podem agravar esse quadro de contaminações. As substâncias tóxicas são
290 provenientes de várias fontes de emissões (Arias *et al.*, 2007), destacando-se as atividades
291 portuárias como os processos de dragagem (Barbosa *et al.*, 2012), e o lançamento de
292 águas domésticas e industriais (Niencheski & Zepka, 2007). Esse contexto caracteriza a
293 gama de agentes físicos e químicos como sendo abrangente. Sendo que os metais pesados
294 como arsênio, cádmio, cobre, chumbo, mercúrio e níquel, são os metais mais encontrados
295 no meio ambiente, representando uma contaminação ambiental relevante (Pruski &
296 Dixon, 2002), devido a isso adquirem maior atenção, resultando em um número maior de
297 investigações sobre o tema.

298 A temperatura é um fator que age tanto sobre a taxa metabólica, quanto sobre os
299 processos bioquímicos dos organismos, podendo assim afetar praticamente todos os
300 níveis organizacionais. Desde níveis inferiores abrangendo células, como por exemplo a
301 permeabilidade da membrana, até níveis superiores como tecidos e órgãos que integram
302 os organismos (Guderley, 2002). A redução da temperatura pode acarretar diversos danos,
303 entre eles encontram-se as alterações na membrana plasmática, podendo ocorrer a perda
304 de uma parte dessa membrana (Acker & McGann, 2003). Além disso, esse fator também
305 pode determinar as concentrações de metais encontradas no meio aquático. Isso ocorre,
306 porque as variações de temperatura podem influir a quantidade de elementos presentes
307 no ambiente, alterando por exemplo a velocidade de adsorção dos metais (Jimenez *et al.*,
308 2004). Dessa forma, os metais podem estar mais ou menos disponíveis no meio aquático
309 (Paoliello & Chasin, 2001) e assim serem absorvidos pela biota. Quando estes elementos
310 são detectados na sua forma iônica livre, significa que se encontram no seu estado mais
311 tóxico e esse quadro se intensifica devido ao estado em que o metal se encontra, ou seja,
312 se está dissolvido ou não (Hodson *et al.*, 1980, Heath, 1995). A influência que a

313 temperatura exerce sobre a toxicidade dos metais é complexa, pois quando analisamos
314 ambos os fatores temos que levar em consideração que a temperatura por si só pode ser
315 um fator letal e que as alterações dos limites térmicos letais podem aumentar ou diminuir
316 o efeito dos xenobióticos. Isso pode ocorrer, pois a temperatura pode atuar como fator
317 controlador, através do seu efeito sobre o metabolismo, o qual define os limites de
318 atividade máxima. Porém, os xenobióticos podem acabar ocasionando alterações que
319 afetem diretamente ou indiretamente o metabolismo. Por exemplo, os xenobióticos que
320 atuam sobre enzimas envolvidas no metabolismo energético, ou os que causam mudanças
321 na taxa de absorção, podem apresentar o seu efeito potencializado com o aumento da
322 temperatura (Cairns *et al.*, 1975).

323 A complexidade do meio ambiente pode influenciar nos efeitos adversos dos
324 xenobióticos, e devido a isso se faz necessário compreender os mecanismos de toxicidade
325 diante da interação das diferentes variáveis (ex. temperatura e metal) (Fischer *et al.*,
326 2013). Dessa forma, será possível correlacionar as interações entre fatores bióticos e
327 abióticos do ambiente, assim tendo uma visão mais ampla do funcionamento do
328 compartimento ambiental. Assim quando analisamos a resposta da interação entre
329 estressores, esperamos obter uma visão mais realística ambientalmente, pois ao invés de
330 analisar um fator isolado, as combinações de fatores passam a ser avaliadas. Estas
331 combinações podem envolver fatores biológicos, químicos ou físicos, que exercem
332 pressão sobre os organismos (Mullan *et al.*, 2008).

333 Os organismos presentes nos mais diversos ambientes aquáticos podem se deparar
334 com sérios problemas ecotoxicológicos e o quadro de contaminação gerado, pode se
335 agravar. Isso geralmente ocorre devido às características dos metais, como maleabilidade,
336 baixo ponto de fusão e resistência à corrosão (Silva, 2001), que favorecem a sua
337 persistência no local onde se encontram. Devido a isso, há uma ampla distribuição dos
338 metais nos sistemas biológicos e uso generalizado em diversas indústrias. Porém, sabe-se
339 que os seres vivos necessitam de pequenas quantidades de alguns metais, conhecidos
340 como metais essenciais (cobalto, cobre, ferro, manganês, níquel e zinco) para
341 desempenharem funções vitais. No entanto, altas concentrações desses metais ou acúmulo
342 progressivo, pode fazer com que se tornem tóxicos aos organismos. Além disso, há outros
343 metais que não são essenciais aos organismos e quando acumulados podem provocar
344 graves efeitos tóxicos, dentre eles o chumbo (Oliver, 2008). Isso pode ser favorecido
345 devido as fontes de metais permitem que haja um contato direto dos organismos, da região
346 que está sendo impactada, com a contaminação presente no ambiente.

347 Os invertebrados ocupam uma ampla variedade de habitats os quais apresentam
348 uma grande heterogeneidade, como locais com pedras, sedimentos arenosos, lodosos,
349 plantas aquáticas e entre outros (Albertoni & Palma-Silva, 2010). Assim, como os
350 invertebrados ocupam diferentes habitats, se tornam bons modelos para a avaliação da
351 integridade ecológica (Goulart & Callisto, 2003), pois podem indicar por meio da sua
352 presença e densidade, as alterações ambientais. Alguns deles são muito sensíveis ao
353 estresse ocasionado pela poluição ou pela modificação de habitats, enquanto outros são
354 tolerantes a estas perturbações (Albertoni & Palma-Silva, 2010). Além disso, eles são
355 importantes constituintes dos ecossistemas aquáticos, formando um elo entre os
356 produtores primários e servindo como alimento para muitos peixes. Esses organismos
357 também apresentam papel fundamental no processamento de matéria orgânica e ciclagem
358 de nutrientes (Reece & Richardson, 1999), e a maioria deles possuem hábito sedentário,
359 sendo, portanto, representativos da área na qual foram coletados. Também apresentam
360 ciclos de vida relativamente curtos e assim refletem mais rapidamente as alterações do
361 ambiente, o qual está sujeito a sofrer com diversas mudanças na estrutura das populações
362 e das comunidades (Reece & Richardson, 1999). O contato direto com o ambiente onde
363 vivem, pode se tornar uma via de contaminação caracterizada por uma absorção rápida
364 de xenobióticos. Isso ocorre, pois quando esses elementos são lançados como resíduos
365 industriais em diferentes compartimentos do ecossistema, eles podem ser absorvidos
366 tanto pelos animais quanto pelos vegetais próximos do local. Sendo que a absorção desses
367 elementos pode ocorrer por meio da alimentação, do contato com a água e com o solo,
368 porque os metais não dissolvidos ou precipitados na água irão se aderir ao sedimento.
369 Essa acumulação das partículas ao sedimento irá depender do seu tamanho, ou seja,
370 quanto menor for essa partícula, maior será a acumulação no sedimento. Assim,
371 originando uma cascata de efeitos tóxicos ao longo da cadeia alimentar (Pereira &
372 Ebecken, 2009).

373 A entrada de chumbo se dá por vias de influxo de cálcio, isso porque com a
374 incorporação de chumbo no meio intracelular pode haver a competição com vários
375 elementos essenciais, entre eles o magnésio, ferro, cobre, cálcio e zinco (Correia *et al.*,
376 2015, Nolan & Shaikh, 1992). Assim, se houver a competição do cálcio com metais e se
377 nessa competição, por exemplo, entrar o chumbo ao invés do cálcio, conseqüentemente
378 haverá redução nos níveis de cálcio intracelular. Essa incorporação dos metais é possível
379 devido à similaridade de tamanho iônico do eletrólito que está sendo transportado. Por
380 exemplo, o raio iônico do chumbo (1,19Å) é muito próximo ao do cálcio (0,99Å), assim

381 o chumbo pode entrar nas células através de canais de cálcio (Rainbow, 1995). Apesar
382 dos mecanismos de toxicidade do chumbo não serem totalmente conhecidos, alguns
383 estudos indicam que o principal efeito tóxico desse metal é esse desequilíbrio do cálcio
384 (Moreira & Moreira, 2004). Um mecanismo geral de toxicidade dos metais envolve a
385 geração de radicais livres, essa produção de radicais pode ser acentuada por meio da
386 diminuição dos níveis de antioxidantes ou pela formação de espécies reativas de oxigênio
387 (KLEIN *et al*, 1991). Há vários estudos sobre os efeitos tóxicos do chumbo em diversas
388 espécies, entre eles encontra-se o que foi realizado por Shuhaimi-Othman e colaboradores
389 (2012), no qual mostram que entre os oito metais estudados (cobre, cádmio, chumbo,
390 zinco, níquel, ferro, alumínio e manganês), o cobre, o chumbo e o zinco foram os mais
391 acumulados nos tecidos moles do gastrópode *Melanoides tuberculata*. Já no estudo
392 executado por Amusan e colaboradores (2002) a alta dose e a baixa dose do chumbo
393 (5mg/g do animal e 1 mg/g do animal, respectivamente) diminuíram a taxa alimentar do
394 gastrópode *Limicolaria flammea*, e assim conseqüentemente ocasionaram redução no
395 peso. Além disto, os resultados referentes à mortalidade também mostraram que esse
396 metal causa mortalidade na concentração de 6mg/g nessa espécie. Em relação aos efeitos
397 citotóxicos do chumbo, o estudo de Rocha e Souza (2012), retrata que houve uma redução
398 significativa da viabilidade celular em células branquiais do bivalve *Corbicula fluminea*,
399 sendo considerado tóxico tanto em testes *in vitro* em 1µM (0,0002 mg/l), 10 µM (2,07
400 mg/l) e 100 µM (20,72 mg/l), quanto *in vivo* expostos a 5 mg/l, demonstrando a
401 citotoxicidade do chumbo. Devido a isso, pode-se dizer que a exposição ao chumbo
402 compromete de alguma forma o funcionamento das células que estão expostas a estes
403 contaminantes (Bishayi & Sengupta, 2003).

404 Os efeitos do chumbo não são muito reportados na literatura referentes à espécie
405 estudada, geralmente os trabalhos com a *Pomacea canaliculata* abordando variação de
406 temperatura e metais focam na acumulação de metais, como por exemplo o que foi
407 realizado por Deng e colaboradores (2008). No referido estudo, foi observado que o
408 chumbo tende a se acumular mais nas vísceras da *Pomacea canaliculata*, em que níveis
409 elevados (800 à 800 mg/kg) de metal foram encontrados, sugerem que a dieta pode
410 contribuir mais do que a água para quantidade de metais nos animais. Como visto
411 anteriormente, são realizados vários estudos sobre o acúmulo de metais de transição em
412 moluscos, sendo que os níveis de acumulação de metais encontrados nos seus tecidos
413 podem representar a biodisponibilidade desses metais no sistema aquático. Quando
414 incorporados aos tecidos dos moluscos, os metais são transportados por meio da

415 hemolinfa sendo assim distribuídos pelo corpo do animal (Galvão *et al.*, 2009). Os
416 tecidos, de vertebrados em geral, que estão envolvidos nos processos tanto de transporte
417 quanto de eliminação de xenobióticos, como o fígado, rim e sangue, são considerados os
418 principais alvos dos elementos metálicos (Cicik *et al.*, 2004, Klavins *et al.*, 2009). Sendo
419 assim, a maioria dos metais que entram nas células sanguíneas se ligam a enzimas
420 inativando-as, isso ocorre porque todo metal de transição divalente reage com o grupo
421 amino e com o grupo sulfidrilas das proteínas (Correia *et al.*, 2015), assim podendo causar
422 danos nos parâmetros hematológicos. Dentre as células constituintes da hemolinfa de
423 invertebrados em geral, encontram-se os hemócitos, os quais possuem morfologia
424 variável. Estes exibem aderências distintas, processo fagocítico (Van der Knaap) e
425 geralmente formam agregações. Alguns hemócitos não se “espalham” ou se “espalham”
426 pouco, mas a maioria das células normalmente encontra-se espalhadas as quais
427 apresentam projeções citoplasmáticas, mais comumente conhecidas como pseudópodes.
428 Acredita-se que essas projeções são os dirigentes das respostas do encapsulamento
429 (Loker, 2010), durante o processo fagocítico. Dentre várias funções dos hemócitos
430 encontra-se a defesa contra corpos estranhos, que contribuem para a homeostase dos seres
431 vivos (Canesi *et al.*, 2002). Devido a isso, as variações hemocitárias causadas por
432 xenobióticos representam biomarcadores úteis (ex: morfologia celular e menor atividade
433 lisossomal) (Leomanni *et al.*, 2016), que podem indicar a saúde dos animais.

434 A temperatura além de afetar processos fisiológicos, também afeta a integridade
435 de macromoléculas constituintes das células (Tomanek, 2010), sendo considerado um
436 fator limitante para a distribuição das espécies. Uma forma de avaliar os danos
437 decorrentes das diferentes faixas de temperaturas que podem ser encontradas nos habitats
438 afetando os organismos, é por meio da avaliação da estabilidade lisossomal (Zhao, 2011).
439 Sendo que já foi constatado pela literatura que a temperatura da água ideal para a
440 manutenção da estabilidade lisossomal dos hemócitos varia entre 14°C a 16°C, tanto para
441 a ostra *Ostrea edulis* (espécie do hemisfério norte) (Hauton *et al.*, 1998), quanto para a
442 ostra *Cassostrea gigas* (Zhang *et al.*, 2006). Assim, temperaturas superiores ou inferiores
443 a estas podem afetar as células e suas organelas, como mitocôndrias e lisossomos, mas de
444 forma geral a exposição a temperaturas mais baixas causa menos danos do que as
445 temperaturas maiores. Mudanças graduais na temperatura da água, de 15°C a 5°C ou de
446 15°C a 25°C, reduzem a estabilidade da membrana lisossomal dos hemócitos em *C. gigas*
447 (Zhang *et al.*, 2006). Se as alterações de temperatura afetarem a estabilidade lisossomal,

448 como mostrado pelos estudos citados anteriormente, conseqüentemente não irão
449 conseguir reter o conteúdo dos lisossomas, no qual irá se espalhar para o citoplasma,
450 podendo assim ocasionar lesões celulares.

451 Segundo Yoshida e colaboradores (2009), a taxa de sobrevivência dos caramujos
452 durante o inverno e verão depende principalmente das características das regiões que
453 estão sendo avaliadas. Mostrando que a baixa temperatura acumulativa pode exercer
454 efeito significativo sobre a sobrevivência dessa espécie. Alguns estudos mostram que na
455 temperatura de 10°C os caramujos ficam imóveis assim podendo estar mais expostos aos
456 metais, pois as chances de escaparem de uma situação de estresse são menores. Já os
457 caramujos quando se encontram em uma temperatura superior a 18°C, mantêm
458 comportamento ativo como a movimentação e alimentação (Seuffert *et al.*, 2010),
459 apresentando mais chances de fugirem do local impactado. Segundo Cairns e
460 colaboradores (1975), o efeito da variação de temperatura sobre a toxicidade do metal
461 pode ocorrer através das alterações no metabolismo dos organismos, assim o aumento da
462 temperatura normalmente resulta no aumento das taxas de absorção de metal. Geralmente
463 os estudos que avaliam os efeitos da temperatura baixa em moluscos tendem avaliar a
464 influência de diferentes faixas de temperaturas sobre a distribuição geográfica desses
465 organismos, sendo que o aspecto mencionado é pouco abordado. Mas um aspecto mais
466 recente que está sendo explorado é o efeito de temperaturas baixas e altas a nível celular
467 (Yao & Somero, 2012), portanto é preciso que haja mais estudos para que haja um melhor
468 embasamento teórico.

469 Atualmente o uso crescente de espécies nativas nas avaliações ambientais e a
470 aplicação de biomarcadores, proporcionam análises toxicológicas mais precisas em que a
471 integridade ecológica está fortemente incluída (Nogarol, 2012). Os biomarcadores são
472 alterações biológicas nos fluidos corporais, células ou tecidos decorrentes da exposição a
473 concentrações sub-letais de poluentes ambientais, identificadas a nível celular, molecular,
474 morfológico e fisiológico (Livingstone, 1993). Essas alterações podem prejudicar o
475 estado de saúde dos organismos, dessa forma podendo afetar a sobrevivência desses
476 indivíduos (Sunila, 1987). A caracterização de biomarcadores, pode disponibilizar
477 informações sobre o ambiente, se ele está sendo impactado ou não, assim antecipando
478 efeitos tóxicos (Pereira *et al.*, 2012). Nesse contexto, também está inserido a
479 aplicabilidade de ensaios de citotoxicidade *in vitro*, que também auxiliam em avaliar os
480 danos decorrentes da exposição a xenobióticos. Os ensaios *in vitro* fornecem várias

481 vantagens, entre elas destaca-se a redução do número de animais nos experimentos e o
482 seu custo baixo. Além disso, outras vantagens importantes quando abordamos esse tipo
483 de modelo biológico, são a execução rápida das análises e a resposta rápida à exposição,
484 e o controle dos fatores físicos e químicos referentes ao ambiente celular (Olabarrieta *et*
485 *al.*, 2001).

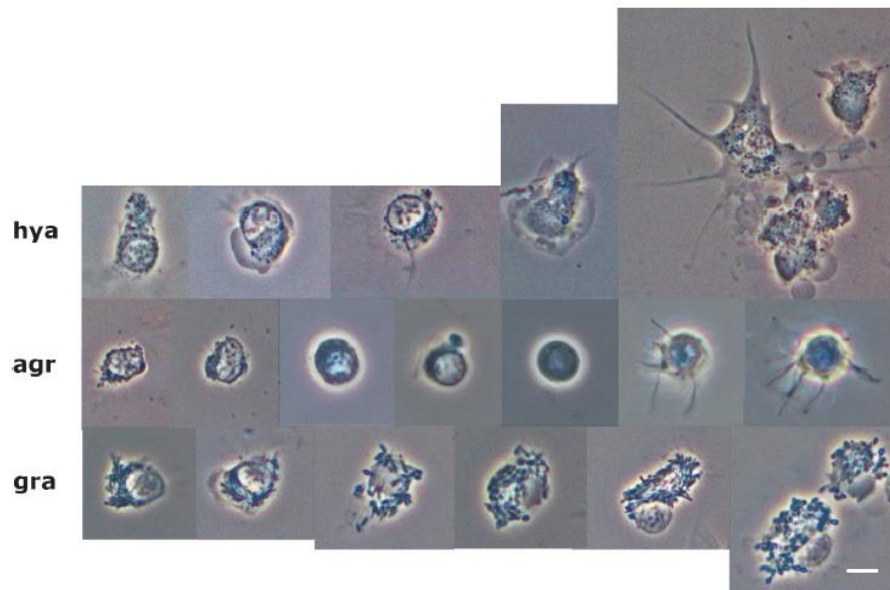
486 Por meio de ensaios *in vitro* já foi relatado que xenobióticos podem modificar o
487 funcionamento de hemócitos em moluscos, como mexilhões, afetando também a
488 estabilidade da membrana lisossomal (Lowe *et al.*, 1995). Os lisossomos são
489 compartimentos/organelas delimitados por membranas preenchidas por enzimas que são
490 responsáveis por controlar a digestão intracelular de macromoléculas (Alberts *et al.*,
491 2010). Essas organelas também estão envolvidas com a degradação de outras organelas
492 danificadas ou que estejam em excesso no interior da célula (ex. mitocôndrias e retículo
493 endoplasmático), e responsáveis pela degradação das proteínas de longa duração
494 (Klionsky & Emr, 2000). Devido à importância da sua funcionalidade e o possível
495 acúmulo de metais ou produtos orgânicos nos lisossomos (Da Ros *et al.*, 2007),
496 provenientes da exposição a contaminantes, a integridade lisossomal constitui uma
497 ferramenta importante nos estudos de toxicidade. Alguns danos celulares, como
498 alterações presentes na membrana dos lisossomos já foram encontradas em ostras
499 expostas a algas tóxicas (Keppler *et al.*, 2005).

500 As mitocôndrias são organelas citoplasmáticas que também são amplamente
501 estudadas na toxicologia, em que os autores visam investigar os efeitos tóxicos de
502 xenobióticos à nível celular (Pereira *et al.*, 2012). Apresentam funções principais como a
503 geração de energia (ATP) utilizada para a realização de atividades pelos organismos
504 sendo responsáveis pela respiração celular. Os metais podem se acumular nas
505 mitocôndrias, isso pode ocorrer porque nas membranas mitocondriais há a presença de
506 transportadores de cálcio, os quais facilitam a sua entrada nas mitocôndrias (ex:
507 mimetismo molecular) ou em função do pH mitocondrial. Nesse último caso, a matriz
508 mitocondrial apresenta carga negativa e pH alcalino em torno de 8, isso pode influenciar
509 na acumulação de xenobióticos (Cohen, 2010). Em pH entre 4,0 e 7,0 há maior adsorção
510 dos metais, assim ficando menos metal disponível no meio, porém como o pH da
511 mitocôndria é maior essa adsorção é menor, favorecendo a disponibilidade de metal. Há
512 uma associação entre apoptose e mitocôndrias, pois essa organela participa do processo
513 apoptótico. Quando ocorre a apoptose, há a liberação do citocromo c (proteína heme
514 associada a membrana interna da mitocôndria) para o citosol, e no citosol há a ligação

515 com uma proteína adaptadora denominada de Apaf-1. Quando essa proteína é ativada se
516 liga a moléculas que desencadeiam a ativação da morte celular (Lima). Assim, quando
517 ocorre a indução de apoptose significa que as células estão danificadas ou estão sofrendo
518 algum estresse, sendo então importante ressaltar que a análise da função dessas duas
519 organelas, as mitocôndrias e os lisossomos, pode indicar a toxicidade de um dado
520 tratamento.

521 Nos invertebrados o mecanismo de defesa celular depende da integridade
522 estrutural e funcional das células sanguíneas. O citoesqueleto é considerado um conjunto
523 de proteínas filamentosas que formam uma rede complexa que auxilia em funções
524 celulares. A remodelagem do citoesqueleto pode ser considerada, em diversas situações,
525 uma resposta ao estresse e quando essa reorganização ocorre vários eventos celulares
526 podem ser afetados, como o crescimento, migração, adesão das células, entre outras
527 (Small *et al.*, 1999). Sabe-se que o chumbo prejudica a resposta imunitária, não somente
528 por reduzir a adesão das células, mas também por interferir na migração destas células.
529 Essas alterações podem afetar significativamente a funcionalidade das células e
530 direcioná-las à morte programada (Gourlay & Ayscough, 2005). A análise da morfologia
531 celular é considerada uma avaliação simples, mas a resposta obtida pode indicar a
532 toxicidade dos metais sobre a morfologia das células. Assim, se houver exposição de um
533 tipo celular a determinado metal, e decorrente disso for encontrado um acentuado número
534 de células arredondas, essa situação pode indicar que o chumbo está afetando a
535 morfologia celular, e conseqüentemente a sua função. Desse modo, o número de células
536 redondas (inativas) pode ser maior do que o número de células não redondas (ativas)
537 (Ladhar-Chaabouni *et al.*, 2015). Essa diferença de morfologia celular está representada
538 a seguir na figura 1, que mostra os tipos celulares clássicos. De acordo com a literatura,
539 os tipos celulares encontrados na hemolinfa de invertebrados podem ser divididos em três
540 tipos, os hialinócitos, os granulócitos e os agranulócitos. Os hialinócitos são polimórficos,
541 possuindo núcleo no núcleo da célula e citoplasma homogêneo, sendo que algumas vezes
542 apresentam alguns poucos grânulos. Já os granulócitos, são células com perfil circular a
543 fusiforme, as quais apresentam projeções citoplasmáticas e núcleo grande. Os
544 agranulócitos são semelhantes aos granulócitos, mas os agranulócitos não apresentam
545 grânulos no citoplasma, enquanto que os granulócitos possuem grânulos citoplasmáticos.
546 Esses tipos celulares mencionados apresentam como principal função a fagocitose de
547 xenobióticos. Em alguns gastrópodes como *Bradybaena similaris* e *Megalobulimus*
548 *abbreviatus*, ainda há a presença de células arredondadas. As células redondas não

549 apresentam projeções citoplasmáticas, possuem forma esférica ou oval, com grande
550 núcleo central ocupando todo o volume celular e o citoplasma se encontra em uma área
551 pequena ao redor do núcleo (Rohr & Amato, 2014). Ainda não se sabe claramente a
552 função das células arredondas, porém de acordo com Sminia e colaboradores (1983),
553 essas células arredondadas seriam células jovens que apresentam intensa atividade
554 mitótica.
555



556
557

558 **Fig 1** Demonstração da diversidade morfológica de hemócitos da *Pomacea canaliculata*
559 de acordo com a literatura. Os tipos celulares são divididos em 3 classes distintas: os
560 hialinócitos, agranulócitos e granulócitos. (Fonte: Cueto *et al*, 2015).

561

562 A regulação do volume celular é considerada outro processo fundamental por
563 manter a homeostase celular. Esse processo regulatório é indispensável, pois as chances
564 dos animais sofrerem inúmeros distúrbios, que levem à alteração de volume, é ampla.
565 Assim, qualquer movimento seja entrada ou saída de água pode ocorrer, até que um novo
566 equilíbrio osmótico seja alcançado. Esse fluxo de água, que pode ser decorrente de
567 movimento de solutos, resulta no aumento ou na redução do volume celular (Hoffmann,
568 2011). Frente às alterações no volume celular, as células ativam mecanismos para lidar
569 com essas variações, sendo que cada tipo de célula pode responder diferentemente ao
570 estresse ambiental. Assim o volume celular pode retornar aos valores iniciais, de forma
571 rápida ou não, dependendo da espécie que está sendo analisada, ou as células podem não

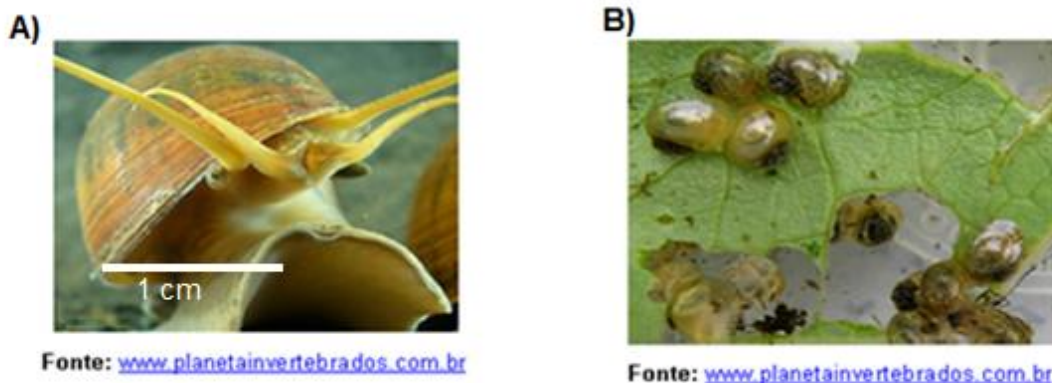
572 apresentar regulação. As células geralmente respondem ao aumento ou redução do
573 volume ativando transportadores específicos de membrana, possibilitando a passagem de
574 osmólitos que podem ser inorgânicos (íons Na^+ , K^+ , Cl^-) ou moléculas orgânicas. Assim
575 com essa transferência de osmólitos também ocorre a entrada ou saída de água das células,
576 dessa forma regulando o seu volume (Lang *et al.*, 1998; Strange, 2004). Há uma
577 associação entre a apoptose e o volume celular, pois na apoptose ocorre uma diminuição
578 do volume celular, o qual é conhecido como diminuição apoptótica de volume (AVD),
579 em que há a liberação do citocromo C e fragmentação do DNA encaminhando para a
580 morte celular, onde ocorre perda de K^+ e água. Enquanto que na necrose é evidente um
581 aumento do volume celular (Okada, 2004).

582 Dentre os vários efeitos decorrentes de metais a nível celular encontram-se danos
583 mais simples como as alterações na proliferação celular, podendo alcançar uma escala de
584 danos mais severos como a morte das células. Porém, é importante ressaltar que o
585 processo de apoptose (a morte programada das células) pode ser considerado um processo
586 normal, em muitas ocasiões as células programam a sua morte para que haja, por exemplo,
587 uma renovação tecidual. Um exemplo simples que demonstra o motivo pelo qual esse
588 processo pode ser classificado como natural, são as altas taxas de apoptose observadas
589 nos hemócitos circulantes (Sokolova, 2004), que contribuem para a reposição celular.
590 Entretanto, esse processo muitas vezes pode ser induzido por estímulos intracelulares ou
591 extracelulares (Hengartner, 2000), e conseqüentemente pode causar uma perda drástica
592 de populações celulares (Rana, 2008). A apoptose desempenha papel importante na
593 homeostase e no sistema imunitário, realizando a defesa contra corpos estranhos
594 (Sokolova, 2004), sendo que é considerada a principal forma de eliminação de células
595 criticamente danificadas (Lowe & Lin, 2000). Vários estímulos podem induzir a apoptose
596 como radiação, temperatura, hipóxia, xenobióticos e entre outros, porém esses mesmos
597 estímulos em níveis elevados podem direcionar o estado apoptótico para o necrótico
598 (Elmore, 2007). Esse processo apoptótico é considerado rápido, primeiramente ocorre o
599 encolhimento das células e a cromatina sofre condensação. Logo em seguida, há a
600 formação de extensões pela membrana celular e ocorre a desintegração do núcleo em
601 fragmentos. Esses prolongamentos aumentam de tamanho e assim ocorre o seu
602 rompimento, originando estruturas denominadas de corpos apoptóticos, os quais são
603 fagocitados por macrófagos sem causar um processo inflamatório. Nesse caso a
604 inflamação não acontece, porque a morte celular programada resulta na proteção da

605 integridade dos tecidos presentes ao redor dessas células, assim limitando o processo
606 inflamatório potencialmente prejudicial (Sokolova, 2004). A consequência da morte é a
607 principal diferença entre os processos de apoptose e necrose, pois a apoptose não libera
608 os constituintes do meio interno para o meio externo, enquanto a necrose faz essa
609 liberação (Abastado, 1996). A necrose se refere à morte patológica das células, ou seja,
610 quando as células são impedidas de continuarem realizando suas funções. Esse
611 procedimento pode ser encadeado por vários fatores, destacando-se as temperaturas
612 elevadas, os produtos tóxicos e a falta de oxigênio, os quais ocasionam lesões celulares
613 físicas ou químicas. Durante esse processo apoptótico as células incham e as organelas
614 constituintes do citoplasma são danificadas, mas o núcleo não é alterado (Silva, 2007).

615 O gastrópode do estudo pertence à família Ampullariidae, a qual compreende
616 moluscos operculados de água doce. Estão distribuídos por toda a América Central,
617 incluindo países do norte da América do Sul e todo o território brasileiro até a Argentina
618 (Mochida, 1991) sendo encontrado também no Sudeste Asiático (Joshi, 2007). A
619 *Pomacea canaliculata* é comumente conhecida como caramujo maçã, caramujo jumbo e
620 caramujo dourado (Mochida, 1991). A espécie *P. canaliculata* está representada a seguir.

621



630 descartados, e assim por meio de canais de irrigação acabavam invadindo campos de
631 arroz. Devido a isso, a *Pomacea canaliculata* é conhecida por ser responsável pelo grave
632 impacto sobre campos de arroz em vários países da Ásia Oriental, bem como sobre as
633 culturas de lótus (Yusa *et al.*, 2006). Devido a ampla distribuição dessa espécie, é
634 necessário que haja mais esclarecimentos sobre seu comportamento e ecologia (Katharina
635 *et al.*, 2014). Como visto anteriormente, a espécie em estudo possui características que
636 permitem a sua colonização em novas áreas, como a adaptabilidade às condições
637 ambientais gerais e o seu hábito alimentar (onívoro), sendo assim, aumentando assim a
638 susceptibilidade à contaminação pela alimentação. Além do que, esses caramujos também
639 se enterram na lama durante o período seco, bem como a temperaturas extremas no
640 campo, o que também os torna mais resistentes para enfrentar condições adversas, dessa
641 forma podem ocorrer tanto em águas limpas e poluídas (Lach *et al.* 2000). Diante disso,
642 é preciso ir além de avaliações que possam esclarecer o histórico de vida dos organismos,
643 sendo necessário investigar os níveis organizacionais menores até os maiores, para que
644 seja possível compreender como estressores ambientais afetam as unidades básicas que
645 compõem os animais. Em relação ao ciclo de vida do molusco gastrópode *Pomacea*
646 *canaliculata* (espécie estudada no presente trabalho), dois períodos são considerados
647 estressantes para essa espécie, as temperaturas frias durante o inverno e a seca durante o
648 verão. A superfície corpórea desses animais é totalmente permeável à água, e por isso o
649 risco acentuado de sofrerem dessecação em habitats secos e quentes, é extremamente alta,
650 frente a isso os indivíduos desenvolvem algumas adaptações com o intuito de lidarem
651 com esses ambientes extremos (Dittbrenner, 2008).

652 Como mencionado anteriormente, o efeito da combinação entre as variáveis
653 temperatura e metal, será analisado em hemócitos da *Pomacea canaliculata*. A exposição
654 a metais pesados pode resultar em uma perturbação da homeostase celular, pois pode
655 interferir no sistema imune dos gastrópodes, e conseqüentemente pode ocasionar a morte
656 celular e a morte do animal. Devido a isso, esse estudo avaliou a citotoxicidade em
657 hemócitos do gastrópode *Pomacea canaliculata* (classe: Gastropoda; Figuras 2 e 3),
658 exposto ao chumbo em diferentes temperaturas, utilizando uma abordagem *in vitro*.
659 Sendo que os parâmetros celulares avaliados foram os lisossomos, as mitocôndrias, o
660 volume celular, morfologia celular e apoptose/ necrose.

661
662
663

664 **2.1 OBJETIVO GERAL**

665 Analisar se variação de temperatura afeta a possível toxicidade do chumbo em
666 hemócitos da *Pomacea canaliculata*.

667

668 **2.2 Objetivos específicos**

669 • Avaliar o efeito da temperatura associado à exposição ao chumbo sobre a estabilidade
670 lisossomal e a atividade mitocondrial em hemócitos da *Pomacea canaliculata*.

671 • Investigar o efeito da associação entre o chumbo e a temperatura sobre a morfologia e
672 o volume celular nos hemócitos.

673 • Examinar se o efeito da associação entre o chumbo e temperatura causa apoptose e
674 necrose.

675 • Analisar se há uma correlação positiva entre a temperatura e o efeito do metal.

676

677

678 **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

679

680 Acker, J.P., McGann, L.E., 2003. Protective effect of intracellular ice during freezing ?
681 Cryobiology 46, 197–202.

682

683 Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P., 2010. Biologia
684 Molecular da célula. 5a edição, Editora Artmed, 1728 p.

685

686 Albertoni, E.F, Palma-Silva, C., 2010. Caracterização e importância dos invertebrados de
687 águas continentais com ênfase nos ambientes de Rio Grande. Cad Ecol Aquat 5, 9–27.

688

689 Amusan, A.A.S., Anyaele, O.O., Lasisi, A.A., 2002. Effects of copper and lead on
690 growth, feeding and mortality of terrestrial gastropod *Limicolaria flammea* (MULLER,
691 1774). Afr J Biomed 5, 47–50.

692

693 Anderson, K.I., Small, J., Rottner, K., Hahne, P., Anderson, K.I., 2015. Visualising the
694 actin cytoskeleton Visualising the Actin Cytoskeleton. Microsc Res Tech 29, 2–17.

695

696 Arias, A.R.L., Buss, D.F., Albuquerque, C., Inácio, A.F., Freire, M.M., Egler, M.,
697 Mugnai, R., Baptista, D.F., 2007. Utilização de bioindicadores na avaliação de impacto e

698 no monitoramento da contaminação de rios e córregos por agrotóxicos. Cien Saude Colet
699 1, p. 61-72.
700

701 Barboza, S.H.R., Romanelli, P.F., 2005. Rendimento de carcaça e composição centesimal
702 do musculo dos moluscos escargot (*Achatina fulica*) e aruá (*Pomacea lineata*). Alim Nutr
703 16, 77-82.
704

705 Barbosa, F. G., Wallner-Kersanach, M., Zepka Baumgarten, M.G., 2012. Metais traço
706 nas águas portuárias do estuário da Lagoa dos Patos, RS. Braz J Aquat Sci Technol 16,
707 27-36.
708

709 Bishayi, B., Sengupta, M., 2003. Intracelular survival of Staphylococcus aureus due to
710 alteration of cellular activity in arsenic and lead intoxicated mature Swiss albino mice.
711 Toxicology 184, 31-39.
712

713 Cairns, J.J.R., Heath, A.G., Parker, B.C., 1975. The effects of temperature upon the
714 toxicity of chemicals to aquatic organisms. Hydrobiologia 47, 135-171.
715

716 Canesi L., Gallo G., Gavioli M., Pruzzo C., 2002. Bacteria–hemocyte interactions and
717 phagocytosis in marine bivalves. Microsc Res Techniq 57, 469-476.
718

719 Cicik, B., Ay, O., Karayakar, F., 2004. Effects of lead and cadmium interactions on the
720 metal accumulation in tissue and organs of the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)
721 Bull Environ Contam Toxicol 72, 141-148.
722

723 Correia, M.G.S., Alves, L.L., Melo, A.R.S., De Oliveira, C.E.S., 2015. Avaliação dos
724 teores de metais pesados no rio do sal. Reesag, 1-6.
725

726 Cueto, J.A., Rodriguez, C., Vega, I.A., Castro-Vazquez, A., 2015. Immune defenses of
727 the invasive apple snail *Pomacea canaliculata* (Caenogastropoda, Ampullariidae):
728 phagocytic hemocytes in the circulation and the kidney. PLOS One 10, 1-22.
729

730 Da Ros, L., Moschino, V., Guerzoni, S., Halldórsson, H.P., 2007. Lysosomal responses
731 and metallothionein induction in the blue mussel *Mytilus edulis* from the south-west coast
732 of Iceland. *Environ Int* 33, 362–369.
733

734 De Lima, T.F.O., Duarte, D.A., Braghini Sá, A.L. Função mitocondrial em foco apoptose,
735 termorregulação e DNA mitocondrial. *União das Instituições Para o Serviço, Ensino e*
736 *Pesquisa – UNISEP*.
737

738 Deng, P.Y., Shu, W.S., Lan, C.Y., 2008. Metal contamination in the sediment, pondweed,
739 and snails of a stream receiving effluent from a lead/zinc mine in southern China.
740 *Bull Environ Contam Toxicol* 81, 69-74.
741

742 Dittbrenner, N., Lazzara, R., Ko, H., Mazzia, C., Capowiez, Y., Triebkorn, R., 2009.
743 Heat tolerance in mediterranean land snails: histopathology after exposure to different
744 temperature regimes. *J. Mollus. Stud* 75, 9–18.
745

746 Elmore, S., 2007. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol* 35,
747 495–516.
748

749 Fischer B., Pomati F., Eggen R., 2013. The toxicity of chemical pollutants in dynamic
750 natural systems: The challenge of integrating environmental factors and biological
751 complexity. *Science of the Total Environment* 449, 253-259.
752

753 Galvão, P.M.A., Rebelo, M.F., Guimarães, J.R.D., Torres, J.P.M., Malm, O., 2009.
754 Bioacumulação de metais em moluscos bivalves: aspectos evolutivos e ecológicos
755 a serem considerados para a biomonitoração de ambientes marinhos. *Braz J Aquat Sci*
756 *Technol* 13, 59-66.

757 Goulart, M.D.C., Callisto, M., 2003. Bioindicadores de Qualidade de Água como
758 Ferramenta em Estudos de Impacto Ambiental. *Rev FAPAM* 2, 153–164.
759

760 Guderley, H., St-pierre, J., Biologie, D., Laval, U., Gt, C., Dunn, M.R.C., Nutrition, H.,
761 Road, H., Cb, C., 2002. Review Going with the flow or life in the fast lane : contrasting
762 mitochondrial responses to thermal change. *J Exp Biol* 2249, 2237–2249.
763

764 Hauton, C., Hawkins, L.E., Hutchinson, S., 1998. The use of the neutral red retention
765 assay to examine the effects of temperature and salinity on haemocytes of the
766 European flat oyster *Ostrea edulis* (L). *Comp Biochem Physiol* 119, 619–623.
767

768 Heath, A.G., 1995. *Water pollution and fish physiology*. 2a edição. 395p. CRC Press, Inc,
769 Boca Raton, New York, London, Tokyo.
770

771 Hengartner, M.O., 2000. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 207, 770-776.
772

773 Hodson, P.V., Blunt, B.R., Whittle, D.M., 1980. Biochemical monitoring of fish blood as
774 an indicator of biologically available lead. *Thalassia Jugoslavica* 16, 389-296.
775

776 Hoffmann, E.K., Pedersen, S.F., 2011. Cell volume homeostatic mechanisms : effectors
777 and signalling pathways. *Acta Physiol* 202, 465–485.
778

779 Katharina, C.M.H., Von Oheimb, P.V., Ekschmitt, K., Albrecht, C., 2014. Studies on the
780 temperature dependence of activity and on the diurnal activity rhythm of the invasive
781 *Pomacea canaliculata* (Gastropoda: Ampullariidae). *Mollusca* 26, 73-81.
782

783 Keppler, C.J., Hogue, J., Smith, K., Ringwood, A.H., Lewitus, A.J., 2005. Sublethal
784 effects of the toxic alga *Heterosigma akashiwo* on the southeastern oyster (*Crassostrea*
785 *virginica*). *Harmful Algae* 4, 275-285.
786

787 Klavins, M., Potapovics, O., Rodinov, V., 2009. Heavy metals in fish from lakes in
788 Latvia: concentrations and trends of changes. *Bull Environ Contam Toxicol* 82, 96-
789 100. Klein, C.B., Frenkel, K., Costa, M., 1991. The role of oxidative processes in metal
790 carcinogenesis. *Chem Res Toxicol* 4, 592-604.
791

792 Klionsky, D.J., Emr, S.D., 2000. Autophagy as a regulated pathway of cellular
793 degradation. *Science* 290, 1717–1721.
794

795 Koshi, R.C., 2007. Problems with the management of the golden apple snail *Pomacea*
796 *canaliculata*: an important exotic pest of rice in Asia. *Area-Wide Control of Insects Pests*,
797 257–264.

798

799 Lach, L., Britton, D.K., Rundell, R.J., Cowie, R.H., 2000. Food preference and
800 reproductive plasticity in an invasive freshwater snail. *Biol. Invasions* 2, 279-288.

801

802 Ladhar-chaabouni, R., Machreki-ajmi, M., 2014. Does a short-term exposure to cadmium
803 chloride affects haemocyte parameters of the marine gastropod *Haliotis tuberculata*?
804 *Environ Sci Pollut Res*, 1-7.

805

806 Lang, F., Busch, G.L., Völkl, H., 1998. The Diversity of Volume Regulatory. *Cell Physiol*
807 *Biochem* 8, 1–45.

808

809 Leomanni, A., Schettino, T., Calisi, A., Lionetto, M.G., 2016. Mercury induced
810 haemocyte alterations in the terrestrial snail *Cantareus apertus* as novel biomarker.
811 *Comp Biochem Physiol Part C* 183–184, 20–27.

812 Livingstone, J.A., Estano, D.B., 1993. Management of the golden apple snail *Pomacea*
813 *canaliculata* (Lamarck) in rice. *Crop Protection* 12, 363-370.

814

815 Loker, E.S., 2010. "Gastropod immunobiology", in invertebrate immunity, ed. Soderhall,
816 editor (AUSTIN: Land Biosci and Springer Sci+Bus Med), 17-43.

817

818 Lowe D.M., Fossato V.U., Depledge M.H., 1995. Contaminant-induced lysosomal
819 membrane damage in blood cells of mussels *Mytilus galloprovincialis* from the Venice
820 lagoon: an in vitro study. *Mar Ecol Prog Ser* 129, 189–196.

821

822 Lowe, S.W., Lin, A.W., 2000. Apoptosis in cancer. *Carcinogenesis* 21, 485–495.

823

824

825 Mochida, O., 1991. Spread of freshwater *Pomacea* snails (Pilidae, Mollusca) from
826 Argentina to Asia. *Micronesica Supplement* 3, p.51-62.

827

828 Moreira, F.R., Moreira, J.C., 2004. Os efeitos do chumbo sobre o organismo humano e
829 seu significado para a saúde. *Rev Panam Salud Publica* 15, 119–129.

830

831 Mullan, C.C., Kroeker, K., Halpern, B., 2008. Interactive and cumulative effects of
832 multiple human stressors in marine systems. *Ecol Lett* 11, 1304–1315.
833

834 Niencheski L.F. & Zepka Baumgarten M.G., 2007. Water quality in Mangueira Bay:
835 anthropic and natural contamination. *J Coast Res* 47, 56-62.
836

837 Nolan, C. V, 1992. Lead nephrotoxicity and associated disorders: biochemical
838 mechanisms. *Toxicology* 73, 127–146.
839

840 Noyes P.D., McElwee M.K., Miller H.D., Clark B.W., Van Tiem L.A., Walcott K.C.,
841 Erwin K.N., Levin E.D., 2009. The toxicology of climate change: Environmental
842 contaminants in a warming world. *Environ Int* 35, 971–986.
843

844 Okada, Y., 2004. Ion channels and transporters involved in cell volume regulation and
845 sensor mechanisms. *Cell Biochem. Biophys* 41, 233–258.
846

847 Olabarrieta, I., Azou, B.L., Yuric, S., Cambar, J., Cajaraville, M.P., 2001. In vitro effects
848 of cadmium on two different animal cell models. *Toxicol in Vitro* 15, 511–517.
849

850 Oliver S., Lins V.S., Alves M.M.S., 2008. Resíduos industriais ricos em metais pesados
851 e implicações ambientais associadas. *Rev Bras Ciênc Ambient* 9, 4-8.
852

853 Paoliello, M.M.B., Chasin, A.A.M., 2001. Ecotoxicologia do chumbo e seus compostos.
854 *Cad Ref Ambiental*, 1-141.
855

856 Pereira, G.C. & Ebecken, N.F.F., 2009. Knowledge discovering for coastal waters
857 classification. *Expert Syst Appl* 36, p.8604-8609.
858

859 Pereira E.R., Soares B.M., Vieira J.P., Mai A.C.G., Picoloto R.S., Muller E.I., Flores
860 E.M.M., Duarte F.A., 2012. Assessment of Inorganic Contaminants in Golden Mussel
861 (*Limnoperna fortunei*) in Southern Brazil. *J. Braz. Chem. Soc* 23, 846-853.
862

863 Pruski, A.M., Dixon, D.R., 2002. Effects of cadmium on nuclear integrity and DNA repair
864 efficiency in the gill cells of *Mytilus edulis* L. *Aquat Toxicol* 57, 127–137.

865

866 Rainbow, P.S., 1995. Physiology, physicochemistry and metal Uptake--A crustacean
867 perspective. Mar Pollut Bull 31, 55–59.

868

869 Rana, S.V.S., 2008. Metals and apoptosis: Recent developments. J Trace Elem Med
870 Biol 22, 262–284.

871

872 Reece, P.F. & Richardson, J.S., 1999. Biomonitoring with the reference condition
873 approach for the detection of aquatic ecosystems at risk. Proceedings of a conference on
874 the biology and management of species and habitats at risk 2, 549-552.

875

876 Rocha, C.T. & Souza, M.M., 2012. The influence of lead on diferente proteins in gill cells
877 from the freshwater bivalve, *Corbicula fluminea*, from defense to repair biomarkers. Arch
878 Environ Contam Toxicol 62, 56-67.

879

880 Rohr, R.A., Amato, S.B., 2014. Hemócitos de *Bradybaena similaris* e *Megalobulimus*
881 *abbreviatus* (Gastropoda, Stylommatophora). Iheringia, Sér Zool 104, 209–215.

882

883 Seuffert, M.E., Burela, S., Martín, P.R., 2010. Influence of water temperature on the
884 activity of the freshwater snail *Pomacea canaliculata* (Caenogastropoda: Ampullariidae)
885 at its southernmost limit (Southern Pampas, Argentina). J. Therm. Biol. 35, 77–84.

886

887 Shuhaimi-Othman, M., Nur-Amalina, R., Nadzifah, Y., 2012. Toxicity of metals to a
888 freshwater snail, *Melanooides tuberculata*. Scientific World Journal 2012, 1-10.

889

890 Silva, B.C.E., 2001. Chumbo in: balanço mineral brasileiro. Disponivel em:
891 <http://www.dnpm.gov.br/galeriadocumento/balancomineral2001/chumbo.pdf> acesso em
892 [15/03/2017](http://www.dnpm.gov.br/galeriadocumento/balancomineral2001/chumbo.pdf).

893

894 Sminia, T., Van der Knaap, W.P.W., Vanasselt, L.A., 1983. Blood cell types and blood
895 cell formation in gastropod molluscs. Dev Comp Immunol 7, 665-668.

896

897 Sokolova, I.M., Evans, S., Hughes, F.M., 2004. Cadmium-induced apoptosis in oyster
898 hemocytes involves disturbance of cellular energy balance but no mitochondrial
899 permeability transition. *J Exp Biol* 207, 443–456.
900

901 Strange, K., 2004. Cellular volume homeostasis. *Adv Physiol Educ* 28, 155–159.
902

903 Sunila, I. 1988: Histopathology of mussels (*Mytilus edulis L.*) from the Tvärminne area,
904 the Gulf of Finland (Baltic Sea). *Ann Zool Fennici* 24, 55-69.
905

906 Tomanek, L., 2010. Variation in the heat shock response and its implication for predicting
907 the effect of global climate change on species' biogeographical distribution
908 ranges and metabolic costs. *J Exp Biol* 213, 971–979.

909 Van der Knaap, W.P.W, Loker, E.S., 1990. Immune mechanisms in trematode-snail
910 interaction. *Trends Parasitol* 6, 175-182.
911

912 Zhang, Z., Li, X., Vandeppeer, M., Zhao, W., 2006. Effects of water temperature and air
913 exposure on the lysosomal membrane stability of hemocytes in pacific oysters,
914 *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Aquaculture* 256, 502–509.
915

916 Zhao, C., Li, X., Luo, S., Chang, Y., 2011. Assessments of lysosomal membrane
917 responses to stresses with neutral red retention assay and its potential application
918 in the improvement of bivalve aquaculture. *Afr J Biotechnol* 10, 13968–13973.
919

920 Yao, C., Somero, G.N., 2012. The impact of acute temperature stress on hemocytes of
921 invasive and native mussels (*Mytilus galloprovincialis* and *Mytilus californianus*):DNA
922 damage , membrane integrity , apoptosis and signaling pathways. *J Exp Biol* 215, 4267–
923 4277.
924

925 Yusa, Y., Sugiura, N., Wada, T., 2006. Predatory potential of freshwater animals on an
926 invasive agricultural pest, the apple snail *Pomacea canaliculata* (Gastropoda:
927 Ampullariidae), in southern Japan. *Biol Invasions* 8, 137-147.
928
929

930 **CAPÍTULO 1**

931

932 **Citotoxicidade do chumbo associado a variação de temperatura em**
933 **hemócitos da *Pomacea canaliculata* (Mollusca, Gastropoda)**

934

935 Manuscrito a ser submetido para a revista *Toxicology in vitro*

936

937 Oliveira, R.P^a, Souza, M.M^{a,b}

938 ^a Programa de Pós-Graduação em Biologia de Ambientes Aquáticos Continentais,

939 Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Rio Grande / RS, Brasil

940 ^b Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Rio
941 Grande / RS, Brasil

942

943

944

945

946

947

948

949

950

951

952

953

954

955

956

957

958

959

960

961

962

963 **1.1 RESUMO**

964

965 A presença excessiva de metais no ambiente e a facilidade de absorção pelos
966 organismos, faz com que seja interessante avaliar sua toxicidade e associada a variáveis
967 ambientais. O objetivo desse estudo foi avaliar se a variação de temperatura influencia na
968 toxicidade do chumbo (Pb) em hemócitos da *Pomacea canaliculata*. Foram realizados
969 ensaios *in vitro* de atividade lisossomal, mitocondrial, morfologia, volume celular,
970 apoptose e necrose. Os hemócitos expostos à concentração de 0,01mg/l de Pb na
971 temperatura 11°C, apresentaram aumento na atividade mitocondrial. Já nas temperaturas
972 de 11°C e 15°C, também foi observado aumento da atividade mitocondrial na
973 concentração de 1mg/l de Pb. Além disso, também foi observado aumento da frequência
974 de células esféricas na concentração de 0,1mg/l de Pb, na temperatura de 11°C. Logo,
975 quanto menor for a temperatura menor será a velocidade de adsorção dos metais, o que
976 explica os efeitos observados em temperaturas menores, pois mais metal irá ficar
977 disponível no meio podendo dessa forma exercer efeito tóxico. Porém, a atuação dos
978 fatores não afetou os demais parâmetros analisados. Desse modo, pode-se concluir que
979 os hemócitos da espécie *P. canaliculata* são animais resistentes a efeitos agudos do
980 chumbo, pois não apresentaram nenhum sinal evidente de citotoxicidade.

981

982 **Palavras-chave:** citotoxicidade, hemócitos, temperaturas, metal pesado e caramujos.

983

984

985

986

987

988

989

990

991

992

993

994

995

996

997 1.2 - INTRODUÇÃO

998 O ecossistema está exposto a uma ampla gama de substâncias tóxicas que são
999 lançadas diariamente no ambiente, sendo que os principais vilões da biota aquática se
1000 referem tanto ao desenvolvimento urbano quanto ao industrial. Sendo que as fontes
1001 poluidoras decorrentes da urbanização e da industrialização são inúmeras, destacando-se
1002 as atividades portuárias como os processos de dragagem (Barbosa *et al.*, 2012), e o
1003 lançamento de águas domésticas e industriais (Niencheski & Zepka, 2007). Esse contexto
1004 caracteriza a gama de agentes físicos e químicos como sendo extensa, porém os metais
1005 pesados como cádmio, chumbo, mercúrio e entre outros, representam uma forma grave
1006 de contaminação ambiental (Pruski & Dixon, 2002). Assim, à forma com que esses
1007 elementos estão presentes no compartimento aquático, pode acentuar o quadro de
1008 contaminação já existente, pois como se sabe os elementos que se encontram na sua forma
1009 iônica livre estão no seu estado mais tóxico. Devido a isso, o contato dos organismos com
1010 as regiões impactadas, pode se tornar uma via de absorção rápida de xenobióticos.

1011 Na natureza, os efeitos adversos provocados por xenobióticos não dependem
1012 apenas das suas concentrações e dos seus mecanismos de toxicidade (Fischer *et al.*, 2013),
1013 mas também são correlacionados às interações entre fatores bióticos e abióticos do
1014 ambiente. Uma compreensão dos efeitos decorrentes da relação entre estressores, tais
1015 como temperatura e metais, é importante para entender o quanto os animais são tolerantes
1016 em determinadas situações (Vinebrooke *et al.* 2004). Já que variações de temperatura
1017 podem afetar praticamente todos os níveis organizacionais, desde células até órgãos e
1018 tecidos, exercendo papel importante sobre a taxa metabólica e sobre os processos
1019 bioquímicos dos organismos. Podendo também influenciar na quantidade de metais
1020 disponíveis no meio aquático, pois esse fator pode alterar a velocidade de adsorção dos
1021 metais (Jimenez *et al.*, 2004).

1022 Quando os metais são incorporados pelos organismos, são conduzidos pelo seu
1023 interior por meio da hemolinfa. Sendo que dentre as principais células constituintes da
1024 hemolinfa se encontram os hemócitos, os quais são responsáveis pela resposta de defesa
1025 contra agentes externos, que contribui para a homeostase dos organismos (Canesi *et al.*,
1026 2002). Devido a isso, as medições de alterações hemocitárias induzidas por xenobióticos
1027 representam biomarcadores potencialmente úteis, que estão relacionados com a saúde dos
1028 animais (Leomanni *et al.*, 2016). Assim, com o intuito de avaliar os possíveis efeitos
1029 tóxicos da interação chumbo e temperatura em hemócitos da *Pomacea canaliculata*, um
1030 molusco operculado de água doce pertencente à família Ampullariidae, foi utilizado uma

1031 abordagem *in vitro*. Os ensaios *in vitro* fornecem várias vantagens, em que várias delas
1032 são amplamente conhecidas, como a redução do número de animais nos experimentos,
1033 custo baixo, resposta rápida e geração de menos resíduo. Além disso, essa abordagem
1034 permite estudar as células em um ambiente controlado e isolado dos sistemas fisiológicos
1035 (Latire *et al.* 2012), eliminando assim as interações sistêmicas.

1036 Presumindo que a variação de temperatura (11°C, 15°C e 25°C) possa afetar a
1037 toxicidade do metal (0,01; 0,1 e 1 mg/l), o objetivo do estudo foi avaliar a citotoxicidade
1038 da interação temperatura e chumbo sobre *hemócitos da Pomacea canaliculata*, levando
1039 em consideração alguns parâmetros da função celular.

1040

1041 **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

1042 **4.1 Animais**

1043 Os organismos foram oriundos do lago próximo ao centro esportivo (32° 4' 15''
1044 S e 52° 09' 54'' W) da Universidade Federal do Rio Grande – FURG e de valas no Bolaxa
1045 (32° 8' 33" S e 52° 9' 40" W). Os animais foram mantidos em aquários com aeração e
1046 filtro biológico, temperatura ambiente ~ 20°C e fotoperíodo de 12C:12E, no Biotério
1047 Aquático do Instituto de Ciências Biológicas e eram alimentados três vezes por semana
1048 com alface.

1049

1050 **4.2 Condições experimentais**

1051 As temperaturas do estudo foram escolhidas de acordo com o estudo realizado por
1052 Zanotta *et al.* (2013), em que a caracterização da dinâmica da temperatura da Laguna dos
1053 Patos – RS, em uma escala espacial e temporal (ciclo de um ano), foi avaliada.
1054 Abrangendo as temperaturas de 15°C (temperatura média), 11°C (temperatura baixa) e
1055 25°C (temperatura alta). Definiu-se utilizar também neste estudo, as concentrações de
1056 chumbo (na forma de nitrato de chumbo) de 0,01mg/l - classe 1 (águas doces com
1057 condições e padrões estabelecidos, nos quais fazem com que o seu uso seja considerado
1058 seguro) de acordo com a resolução 357 do CONAMA de 2005, 0,1mg/l (10 x mais
1059 concentrada que a de classe 1) e 1 mg/l (100x mais concentrada que a de classe 1).

1060

1061 **4.3 Coleta da hemolinfa: obtenção das células**

1062 Os animais foram crio-anestesiados por 15 min e a hemolinfa foi coletada com
1063 seringas de insulina sem anticoagulante, só após a coleta era feita a diluição da hemolinfa
1064 em solução anticoagulante (em mM: 30 EDTA, 43 NaCl, 1,8 KCl, 10 HEPES, pH 7,6

1065 Cueto *et al.*, 2013). A hemolinfa foi retirada perfurando o opérculo dos animais, usando
1066 uma agulha de calibre 0,36 mm ligada a uma seringa de 1 ml. Após a extração da
1067 hemolinfa, o comprimento de cada gastrópode foi registrado, variando de 1,3 a 2 cm
1068

1069 **4.4 Exposição dos hemócitos ao chumbo e a temperaturas**

1070 Os hemócitos de caramujos, na concentração de células utilizada em todos os
1071 tratamentos foi de 1×10^5 células/ml, foram expostos às diferentes condições
1072 experimentais em microplacas de 96 poços. Cada tratamento teve 3 réplicas e o número
1073 total de animais utilizados foi de 5 organismos. Os tratamentos do estudo foram os
1074 seguintes:

1075

1076

1077

1078

1079

1080

1081

1082

1083

1084

1085

1086

1087

1088

1089

1090

<i>Controles (3):</i> exposição dos hemócitos as temperaturas (11°C, 15°C e 25°C)
<i>Tratados (9):</i>
1- Hemócitos expostos a temperatura 11°C + 0,01 mg/l de Pb
2- Hemócitos expostos a temperatura 11°C + 0,1 mg/l de Pb
3- Hemócitos expostos a temperatura 11°C + 1 mg/l de Pb
4- Hemócitos expostos a temperatura 15°C + 0,01 mg/l de Pb
5- Hemócitos expostos a temperatura 15°C + 0,1 mg/l de Pb
6- Hemócitos expostos a temperatura 15°C + 1 mg/l de Pb
7- Hemócitos expostos a temperatura 25°C + 0,01 mg/l de Pb
8- Hemócitos expostos a temperatura 25°C + 0,1 mg/l de Pb
9 - Hemócitos expostos a temperatura 25°C + 1 mg/l de Pb

1091

1092

1093

1094

1095

1096

1097

1098

O tempo de exposição dos hemócitos às diferentes condições experimentais foi definido, após teste piloto (identificou alguma redução de viabilidade celular, através do método de exclusão de azul de tripan), em 4 horas. A exposição dos hemócitos às diferentes condições experimentais foi realizada em incubadoras com temperatura controlada.

1099 **4.5 Análise da Citotoxicidade**

1100 Neste estudo foi avaliado o efeito da exposição dos hemócitos a diferentes
1101 temperaturas e a diferentes concentrações de chumbo, segundo a estabilidade lisossomal,
1102 analisado por meio do ensaio do vermelho neutro e atividade mitocondrial, por meio do
1103 ensaio do MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2yl]-2,5-difenil brometo de tetrazolina).

1104

1105 **4.5.1 Análise da estabilidade lisossomal**

1106 O ensaio Vermelho Neutro (EVN) consiste basicamente no uso de um corante
1107 denominado vermelho neutro (2-amino-3-metil-7dimetil-amino-cloreto de fenazina) que
1108 avalia a integridade lisossomal. Após exposição de 4 horas dos hemócitos às diferentes
1109 condições experimentais, as células foram centrifugadas (5 min, 680g) e retirou-se a
1110 solução experimental. Logo após, foi adicionado 200 µL de solução de vermelho neutro
1111 (40 µg/L em solução anticoagulante) e mantida por 3h na temperatura de 20°C.
1112 Posteriormente as amostras foram centrifugadas novamente para retirar o sobrenadante e
1113 logo em seguida as células foram fixadas com 200 µL de formaldeído (0,5% de
1114 formaldeído – 1% cloreto de cálcio). Em seguida, a placa foi centrifugada (5min,
1115 1600rpm) retirou-se o sobrenadante (solução de formaldeído) e foi adicionado 100 µL de
1116 solução de álcool-ácido (50% de álcool etílico – 1% de ácido acético) para extração do
1117 corante (Babich & Borenfreund, 1991). Quando houve o encerramento desses
1118 procedimentos, foi realizada a leitura da absorbância das amostras, a 550nm. Dessa forma
1119 se a intensidade do corante fosse maior, indicaria que a capacidade do lisossomo em reter
1120 o vermelho neutro era maior, mostrando que as células estão saudáveis, ou seja, maior é
1121 a viabilidade celular.

1122

1123 **4.5.2 Análise da atividade mitocondrial**

1124 Para avaliar a funcionalidade mitocondrial foi usado o ensaio do MTT (3-[4,5-
1125 dimetiltiazol-2yl]-2,5-difenil brometo de tetrazolina). O teste se baseia na redução de
1126 MTT (sal de coloração amarela e solúvel em água) em cristais de formazan (sal de
1127 coloração arroxeadada e insolúvel em água), por meio da enzima succinato desidrogenase
1128 que pertence ao ciclo de Krebs, sendo que essa reação ocorre apenas em células saudáveis.
1129 Depois da exposição às condições experimentais, as amostras foram centrifugadas (5min,
1130 680g) e foi adicionado o MTT (0,5 mg/mL, concentração final) e a placa foi incubada por
1131 3h a 20°C. Após o tempo de incubação, a placa foi centrifugada novamente para retirar o
1132 sobrenadante e após isso foi adicionado 200 µL de DMSO (Dimetilsulfóxido), que tem a

1133 função de solubilizar os cristais de formazan gerados. Assim, poderia ser observado
1134 indiretamente a atividade mitocondrial, fazendo-se a leitura da amostra utilizando a
1135 espectrofotometria (550 nm). Quando ocorre a redução mencionada anteriormente, há a
1136 geração dos cristais de formazan que são solubilizados, resultando em uma intensidade
1137 de fluorescência que irá indicar a funcionalidade mitocondrial. Assim, quanto maior for
1138 a fluorescência, há mais cristais, ou seja, há maior funcionalidade mitocondrial.

1139

1140 **4.6 Análise da morfologia celular**

1141 Essa análise foi executada com intuito de obter uma visão mais geral do que
1142 poderia estar acontecendo com as células, nesse caso não estaríamos avaliando danos
1143 pontuais, mas sim danos mais gerais, que poderiam indicar o início de danos em organelas
1144 celulares. Assim, foi quantificado nessa análise o número de células arredondadas, com
1145 o intuito de saber se o metal estava afetando a estrutura das células. As fotos foram obtidas
1146 por meio do microscópio invertido Olympus IX81, e as fotos usadas nessa análise foram
1147 as mesmas fotos adquiridas para a análise do volume celular, que será explicada
1148 posteriormente. Ao total foram utilizadas 182 fotos, em que a quantificação de células foi
1149 realizada em cada uma delas.

1150 A avaliação da frequência de células maiores, nos permite identificar quantas
1151 células maiores são encontradas em cada condição experimental. As células maiores
1152 foram mensuradas, pois quando foi avaliado a frequência de células arredondadas
1153 observou-se a presença de várias células que aparentemente apresentavam tamanho
1154 maior, quando comparadas com as demais células presentes em determinadas condições
1155 avaliadas. De acordo com essa análise é possível observar se o chumbo está fazendo com
1156 que as células aumentem de tamanho, das células, ou seja, indicando alterações no volume
1157 celular. As fotos adquiridas no ensaio do volume celular também foram utilizadas para
1158 essa análise de células maiores. Ao total foram usadas 166 fotos para essa análise, pois
1159 apenas foram avaliadas as imagens que mostravam células maiores (aumento de 0,129%
1160 em relação as células de tamanho normal). Em cada foto foi feita a contagem de células
1161 maiores levando em consideração o número total de hemócitos. Após isso, foi feita a
1162 soma das frequências (incluindo as réplicas) dos tratamentos por animal (n=5).

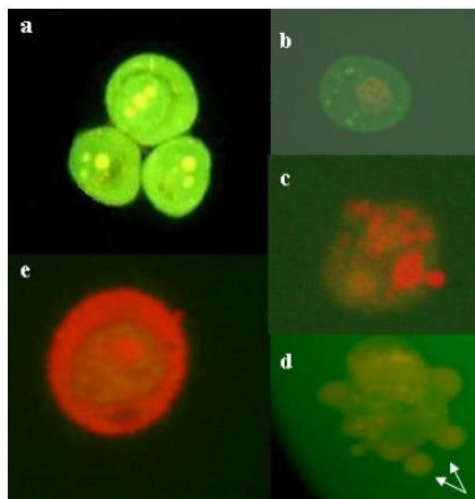
1163 A análise de volume celular permite avaliar o efeito do chumbo sobre o volume
1164 celular, ou seja, por meio dele foi possível identificar se as concentrações de chumbo
1165 testadas podem alterar o volume dos hemócitos. Para isso, foi realizada apenas a
1166 identificação de células inchadas. Logo após a exposição desses hemócitos por 4h aos

1167 tratamentos avaliados, 3 fotos de cada tratamento experimental foram obtidas. Ao total
1168 foram usadas 80 fotos para essa análise, em cada foto foram identificadas as células
1169 maiores, e a partir disso foi calculado o diâmetro dessas células utilizando o programa
1170 *ImageJ*. Em seguida, usando o diâmetro o volume foi calculado usando a seguinte
1171 fórmula: $4/3 \cdot \pi \cdot r^3$

1172

1173 **4.7 Apoptose e necrose**

1174 Este ensaio é aplicado com o objetivo de identificar características morfológicas,
1175 as quais indicam a morte por apoptose ou necrose, utilizando os corantes laranja de
1176 acridina e brometo de etídio (Kasibhatla, 2006). O laranja de acridina apresenta
1177 capacidade de se inserir na molécula de DNA, emitindo uma fluorescência de cor verde.
1178 Já o brometo de etídio também possui essa propriedade, mas a fluorescência emitida nessa
1179 situação é de cor alaranjada marcando células inviáveis. Após a exposição dos hemócitos
1180 às concentrações de chumbo, nas diferentes temperaturas testadas, por 4h, retirava-se a
1181 solução de chumbo da placa e substituía-se por 200 μL de solução anticoagulante. Em
1182 seguida, foi colocado 2 μL de uma mistura dos corantes brometo de etídio (0,5 $\mu\text{g/ml}$) e
1183 laranja de acridina (0,5 $\mu\text{g/ml}$), no qual as células foram incubadas com esses corantes
1184 por 1 min. Após isso, as células nas suas respectivas condições foram observadas com
1185 auxílio de um microscópio invertido de fluorescência. Foram obtidas 3 fotos de cada
1186 tratamento experimental, e foram analisadas no programa *ImageJ*. Algumas fotos serão
1187 demonstradas a seguir, para exemplificar de acordo com a literatura a classificação de
1188 coloração utilizada nesse estudo. Para validar a técnica foi realizado um controle positivo,
1189 em que foi adicionado 10 μL de triton (detergente, permeabiliza membrana celular) em
1190 cada amostra.



1191

1192 **Fig 3** Marcação fluorescente diferencial com laranja de acridina/brometo de etídio.
1193 Linfócitos apresentam diferenças morfológicas: (a) células viáveis, (b), (c) e (d) células
1194 em apoptose (setas brancas), (e) célula em necrose (Fonte: Campos da Paz, 2005 adaptado
1195 por Cardoso, 2012).

1196

1197 Como mencionado anteriormente, os corantes laranja de acridina e brometo de
1198 etídio utilizados nesse ensaio, apresentam colorações distintas. O laranja de acridina
1199 marca tanto células vivas quanto células mortas, pois consegue atravessar a membrana
1200 celular. Enquanto que o brometo de etídio só atravessa células que apresentam membrana
1201 comprometida (não íntegra). De acordo com essas colorações, as células podem ser
1202 classificadas em 4 estágios distintos, em que as células podem ser saudáveis (células
1203 verdes), apoptóticas (células em apoptose inicial ou avançada) e necróticas. No estágio
1204 apoptótico inicial, as células apresentam cromatina condensada com um núcleo verde
1205 fluorescente brilhante, em que a fragmentação nuclear é a principal característica desse
1206 estágio. Já no estágio tardio, apenas algumas áreas das células serão coradas em laranja,
1207 apresentando núcleos condensados e muitas vezes fragmentados. No último estágio, o
1208 necrótico, as células apresentam coloração laranja uniforme, mas não apresentam
1209 cromatina condensada. Sendo que por não apresentarem cromatina condensada, se
1210 assemelham as células viáveis (Kasibhatla, 2006).

1211

1212 **4.8. Análise estatística**

1213 Os resultados foram expressos por média e erro padrão (SE) da média. Os dados
1214 foram avaliados usando ANOVA 2 vias, após testar os pressupostos de normalidade e
1215 homogeneidade. Os dados foram “ajustados” pela transformação de *rank* e pelo log 10.
1216 Quando os resultados foram significativos foi realizado o teste de comparação múltipla
1217 de Tuckey. Diferenças foram consideradas significativas com $p < 0,05$.

1218

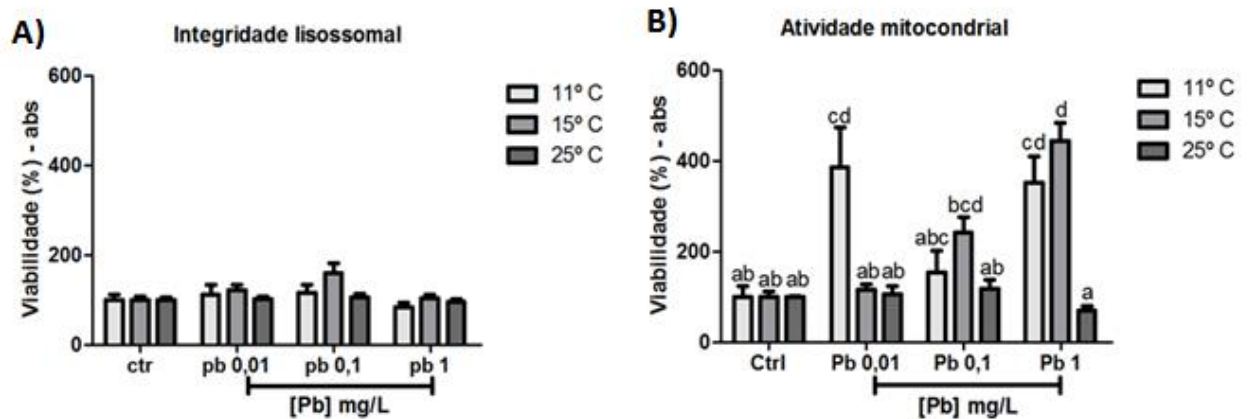
1219 **4.9. Resultados**

1220

1221 **4.9.1 Efeitos do chumbo e temperatura na viabilidade celular**

1222 Por meio da análise de retenção do vermelho neutro, foi observado que a atuação
1223 conjunta do chumbo e temperatura não afetou a integridade lisossomal (Figura 4a).
1224 Resultados distintos foram encontrados através da avaliação da atividade mitocondrial,
1225 nessa condição foi observado que houve o aumento da atividade mitocondrial quando os

1226 hemócitos foram expostos à concentração mais baixa de chumbo (0,01mg/l), que é
 1227 referente a concentração permitida pelo CONAMA (Conselho Nacional do Meio
 1228 Ambiente). Isso foi constatado na temperatura mais baixa (11°C). Já na temperatura
 1229 intermediária (15°C), também foi observado aumento da atividade mitocondrial na
 1230 concentração maior de chumbo (1mg/l) (Figura 4b).



1231
 1232 **Fig.4** Efeitos da exposição de 4 horas sobre a viabilidade de hemócitos expostos a
 1233 atuação conjunta de chumbo e temperatura, representados pela média (\pm SE). (A)
 1234 Integridade lisossomal representada pela porcentagem de células sadias ou viáveis
 1235 submetidas às condições experimentais. (B) Efeitos de ambas variáveis na atividade
 1236 mitocondrial de hemócitos da *Pomacea canaliculata*. Letras diferentes indicam médias
 1237 que apresentam diferença estatística .

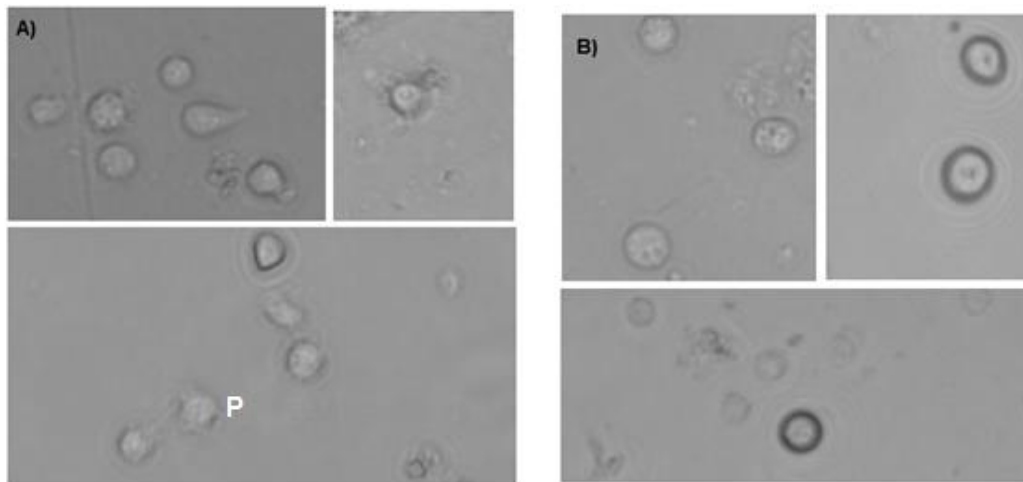
1238

1239

1240 4.9.2 Efeitos do chumbo e da temperatura na morfologia celular

1241 A diversidade morfológica dos hemócitos da *Pomacea canaliculata* está
 1242 representada a seguir. Sendo que a figura 5a demonstra os hemócitos do caramujo *P.*
 1243 *canaliculata* que não apresentam formato redondo, ou seja, os que ficam “espalhados”
 1244 (apresentam pseudópodes), no qual esse formato indica células ativas. Enquanto que na
 1245 figura 5b estão sendo demonstradas hemócitos da *P. canaliculata* com formato
 1246 arredondado sem pseudópodes, indicando células inativas.

1247



1248

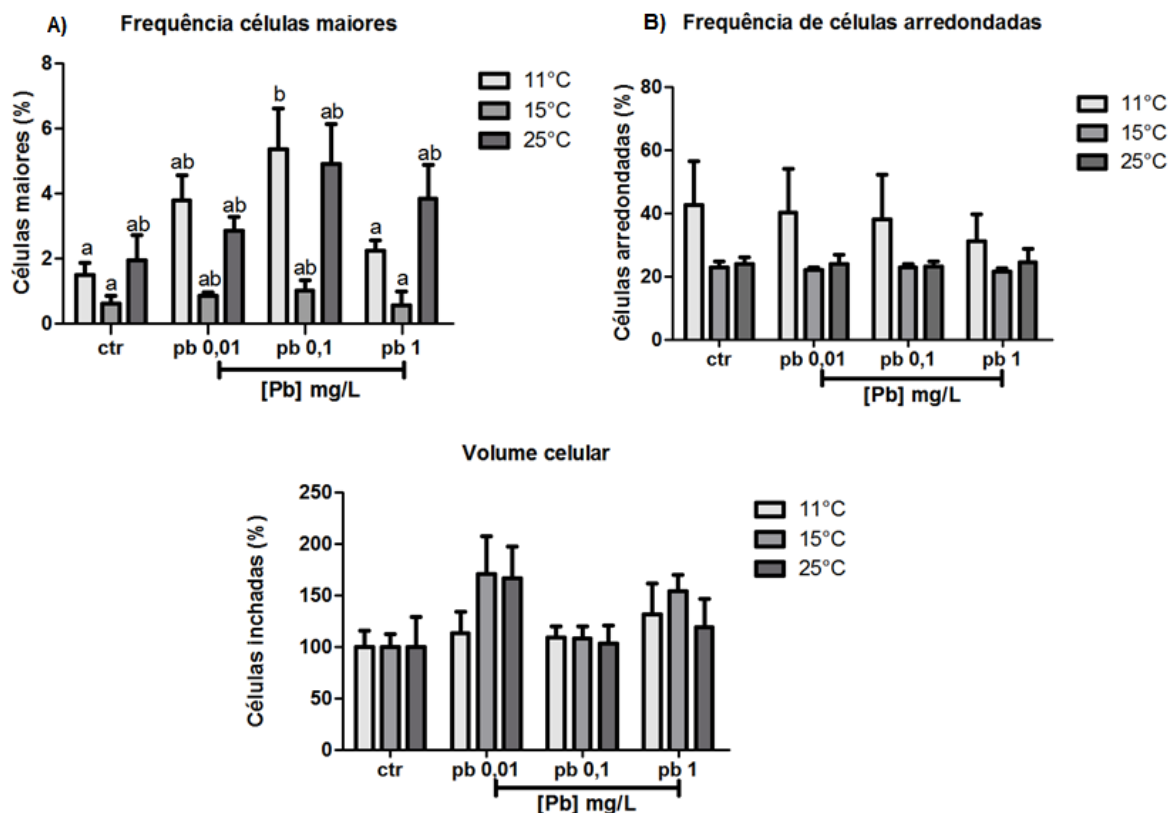
1249 **Fig 5** Demonstração da diversidade morfológica dos hemócitos da *Pomacea*
 1250 *canaliculata*. (A) Hemócitos ativos, os quais apresentam pseudópodes (P). (B) Hemócitos
 1251 inativos sem a presença de pseudópodes. Aumento de 400x.

1252 Avaliando os parâmetros morfológicos não foi possível observar por meio da
 1253 frequência de células maiores, o efeito significativo da atuação conjunta do chumbo e
 1254 temperatura, apenas foi observado efeito do chumbo. Essa resposta de aumento na
 1255 frequência de células esféricas, somente foi observada na concentração intermediária de
 1256 chumbo (0,1mg/l) (Figura 6a). Nas demais condições experimentais não foi observado
 1257 efeito significativo da atuação conjunta das variáveis sobre os hemócitos.

1258 Enquanto que não foi evidenciado nenhum efeito significativo para a proporção
 1259 de células arredondas e não arredondadas, em todas as condições experimentais testadas
 1260 (Figura 6b). Já a avaliação do volume celular também não apresentou diferenças
 1261 significativas para as concentrações de chumbo e temperaturas analisadas (Figura 6c).

1262

1263



1264

1265

1266

1267

1268

1269

1270

1271

1272

1273

1274

1275

1276

1277

1278

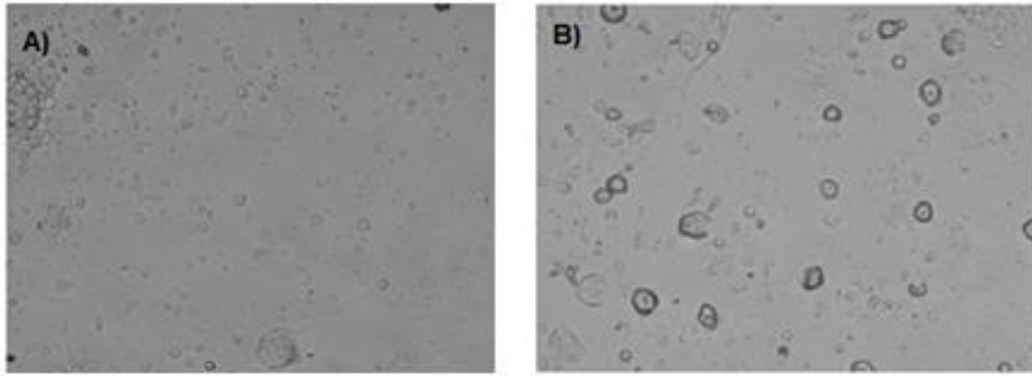
1279

1280

1281

Fig. 6 Efeitos do chumbo sobre parâmetros morfológicos de hemócitos da *Pomacea canaliculata* expostos à atuação conjunta do chumbo e temperatura. Os dados foram representados por média (\pm SE). (A) Frequência de células maiores observadas após exposição à atuação conjunta das variáveis. (B) Morfologia das células sujeitas à relação avaliada (C) Volume dos hemócitos submetidos nas condições testadas. Letras diferentes significam médias que possuem diferença estatística.

As fotos a seguir demonstram células maiores e células arredondadas na temperatura 15°C, em concentrações diferentes de chumbo. A figura 7 (A) se refere células em condição controle, já a figura 7b se refere ao gráfico de frequência de células maiores (Figura 6a), e a figura 7c é uma demonstração de células arredondadas referente ao gráfico 2 apresentado anteriormente (Figura 6b). Essas fotos demonstram a nítida diferença de tamanho das células em concentrações distintas de chumbo, mostrando que em temperaturas maiores as células parecem sofrerem um estresse maior. Já a segunda foto, demonstra células na concentração menor de chumbo, as quais estão aparentemente normais quando comparadas com o controle, as quais podem estar indicando células em uma condição não estressante.



1282

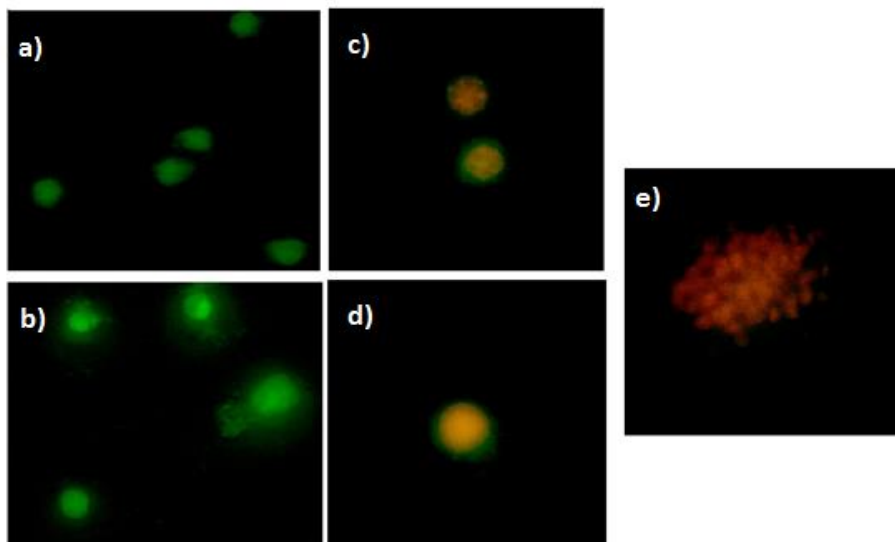
1283 **Fig 7** Células em condição controle e células expostas à ação conjunta do chumbo e
 1284 temperatura, mostrando o aumento da frequência de células maiores. (A) Controle dos
 1285 hemócitos. (B) Hemócitos expostos ao chumbo e temperatura. Aumento de 400x.

1286

1287

1288 **4.9.3 Efeitos do chumbo e da temperatura na morte celular: níveis de apoptose e**
 1289 **necrose**

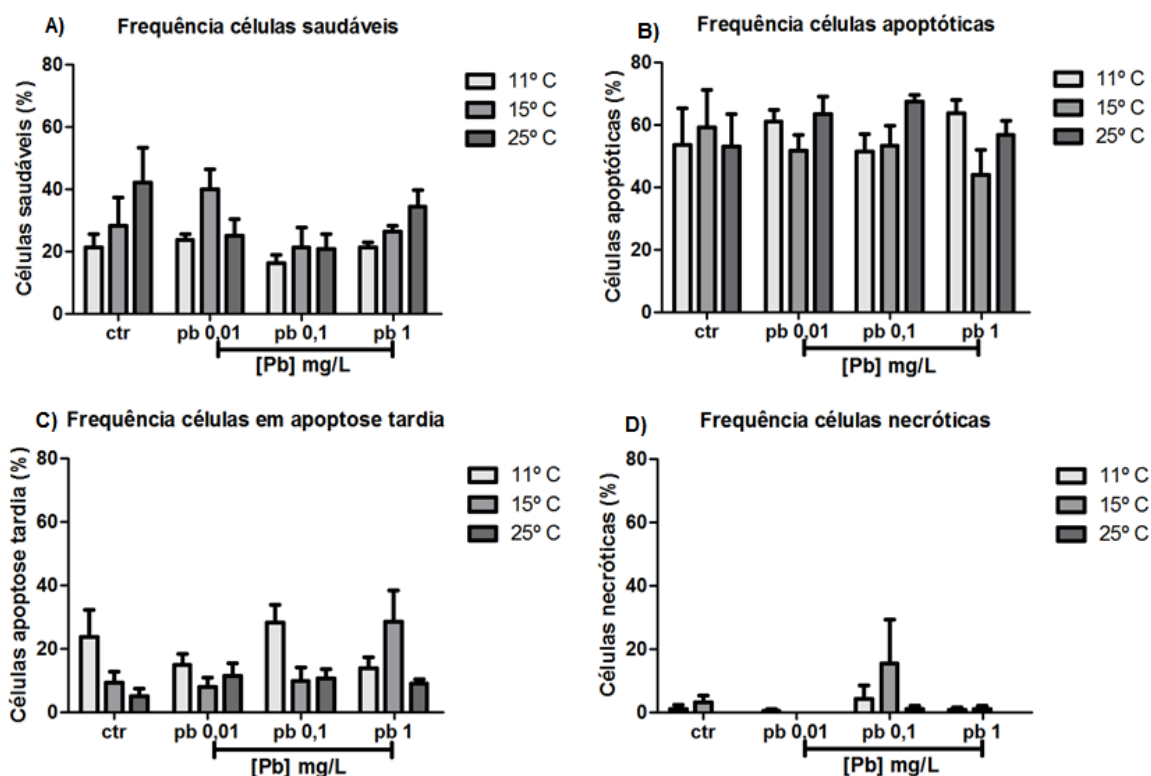
1290 Os três níveis de classificação determinados (células saudáveis, apoptóticas e
 1291 necróticas) para o ensaio de apoptose e necrose são demonstrados a seguir.



1292

1293 **Fig 8** Células submetidas a marcação fluorescente com laranja de acridina/brometo de
 1294 etídio, as quais representam (a) hemócitos viáveis, (b) hemócitos apoptóticos, (c)
 1295 hemócitos em apoptose tardia e (d) hemócitos em necrose. Já a figura (e) se refere ao
 1296 controle positivo desse ensaio. Aumento de 400x.

1297 De acordo com o ensaio da apoptose e necrose, levando em consideração os níveis
 1298 de classificação determinados observa-se primeiramente que as células saudáveis
 1299 encontradas nos experimentos não foram afetadas pela atuação conjunta do chumbo e
 1300 temperatura (Figura 9a) ($p=0,33$, $n=15$). A associação das variáveis não afetou a
 1301 proporção de células apoptóticas (incluindo as células em apoptose tardia), como
 1302 observado pela figura 9b e 9c, não apresentando diferenças significativas nas
 1303 circunstâncias avaliadas. Além disso, as variáveis também não afetaram a proporção de
 1304 células necróticas, como mostrado pela figura 9d, onde o efeito não foi significativo.



1305
 1306 **Fig.9** Efeito da atuação conjunta do chumbo e temperatura sobre a frequência de
 1307 células apoptóticas e necróticas. (A) Frequência de células saudáveis expostas as
 1308 variáveis avaliadas. (B) Frequência de células apoptóticas após exposição à ambas
 1309 variáveis investigadas. (C) Frequência de células em apoptose tardia, após serem
 1310 submetidas as condições experimentais analisadas. (D) Frequência de células necróticas
 1311 sujeitas aos tratamentos experimentais aplicados no estudo.

1312
 1313
 1314

1315 **DISCUSSÃO**

1316 Os metais pesados afetam os organismos aquáticos de diversas formas, podendo
1317 influenciar na fisiologia e/ou no desenvolvimento desses indivíduos. No presente estudo
1318 analisamos os efeitos da exposição *in vitro* do chumbo e temperatura sobre os hemócitos
1319 do molusco *Pomacea canaliculata*. A temperatura pode potencializar os efeitos tóxicos
1320 dos metais, pois as variações de temperatura podem influir na quantidade de elementos
1321 presentes no ambiente, alterando a velocidade de adsorção dos metais. Assim quanto
1322 maior for a temperatura maior é a velocidade de adsorção dos metais. Por isso é
1323 importante levar em consideração a atuação de ambos os fatores, temperatura e metal. De
1324 acordo com as nossas análises de citotoxicidade, foi observado que o efeito do chumbo
1325 associado à variação de temperatura não alterou a estabilidade lisossomal dos hemócitos
1326 estudados ($p=0,90$, $n=15$) (Figura 5a). Os nossos resultados são similares ao estudo de
1327 Regoli e colaboradores (1998), onde foi avaliado o efeito do chumbo sobre vieiras
1328 expostas por 6 dias a $40 \mu\text{g/l}$ de chumbo. Também foi visto por esses autores, que o
1329 chumbo não induziu efeito significativo na estabilidade da membrana lisossomal em um
1330 tempo de exposição mais longo (6 dias, *in vivo*). Então, comparando o presente estudo
1331 com o de Regoli e colaboradores, por mais que o tempo de exposição aplicado foi
1332 diferente (no estudo presente a exposição ao chumbo foi de 4h e no estudo citado foi de
1333 6 dias), e que as concentrações de chumbo usadas foram distintas (aqui foi utilizado
1334 concentrações de chumbo maiores (0,1 e 1 mg/l) do que $40 \mu\text{g/l}$ (0,04 mg/l) que foi a
1335 concentração usada pelos autores citados), a resposta adquirida em ambos estudos
1336 avaliando o mesmo parâmetro celular foi igual. Nesse caso, algumas respostas celulares
1337 podem ter sido ativadas não permitindo que houvesse a toxicidade nos hemócitos
1338 investigados. Dentre as possibilidades de respostas celulares destacam-se a ação das
1339 metalotioneínas e a extrusão de xenobióticos. Sendo que a presença dos níveis de chumbo
1340 mencionados anteriormente, poderiam ter induzido a síntese dessas metalotioneínas, que
1341 são proteínas que se ligam ao metal. Assim menos metal ficaria disponível, evitando a
1342 desestabilização da membrana lisossomal e impossibilitando o aparecimento de outros
1343 efeitos. Dessa forma, essas organelas conseguiriam executar suas funções normalmente,
1344 entre essas funções encontram-se a digestão intracelular, o sequestro e a desintoxicação
1345 dos elementos, as quais não permitem que haja uma sobrecarga dos metais (Regoli *et al.*,
1346 1998). Já em relação a extrusão de xenobióticos, o chumbo poderia estar sendo eliminado
1347 por meio de bombas de extrusão, ou seja, através de proteínas que expulsam o xenobiótico
1348 para fora das células, gerando o fenótipo de resistência a múltiplos xenobióticos (Achard

1349 *et al.*, 2004; Franzellitti *et al.*, 2016). Assim, não haverá acúmulo dessas substâncias no
1350 meio intracelular e o seu potencial danoso será evitado. Ou então, as concentrações de
1351 chumbo testadas no presente estudo podem ter sido muito baixas para gerar efeitos tóxicos
1352 e ativar respostas de defesa celular.

1353 Com o intuito de avaliar os efeitos provenientes da interação chumbo e
1354 temperatura, além de avaliar a atividade lisossomal também foi analisada a
1355 funcionalidade mitocondrial, como parâmetro de citotoxicidade. Este alvo além de apontar
1356 citotoxicidade pode indicar uma demanda maior de energia (Sokolova & Lannig, 2008).
1357 Por sua vez, a demanda de energia pode sinalizar uma situação de estresse, e nesse caso,
1358 as células estão possivelmente ativando mecanismos de defesa para compensar estes
1359 efeitos desfavoráveis. Visto isso, esse aumento na atividade mitocondrial pôde ser
1360 observado quando os hemócitos foram expostos à temperatura de 15°C e concentração de
1361 1 mg/l de Pb ($p=0,000005$, $n=15$). Além disso, também observamos aumento na
1362 temperatura mais baixa (11°C) tanto para a concentração de 0,01 e 1 mg/l de chumbo
1363 (Figura 5b). Já no estudo de Katsumiti e colaboradores (2014), foi observado a diminuição
1364 da atividade mitocondrial em hemócitos do mexilhão *Mytilus galloprovincialis* expostos
1365 *in vitro* a 0,01 mg/l e 1 mg/l de cádmio por 24h. Essa resposta de diminuição é a clássica
1366 resposta de citotoxicidade, mas no entanto os resultados do nosso estudo diferem dos
1367 resultados desses autores, pois como mencionado anteriormente foi encontrado aumento
1368 da atividade mitocondrial em temperaturas menores nos hemócitos do gastrópode
1369 investigado. No presente estudo, a temperatura e o possível processo de detoxificação
1370 podem estar atuando e favorecendo o aumento da atividade mitocondrial. Sabe-se que
1371 quanto maior for a temperatura maior é a velocidade de adsorção dos metais, como
1372 representado no estudo de Jimenez e colaboradores (2004). Nesse estudo, a adsorção do
1373 cádmio a 25°C foi de 60%, enquanto que a 60°C atingiu 92%. Isso pode explicar o porque
1374 houve a presença de efeito apenas em temperaturas menores (11°C e 15°C), pois quanto
1375 menor for a temperatura menor será a velocidade de adsorção, assim mais metal irá ficar
1376 disponível no meio podendo dessa forma exercer efeito tóxico. Então, o efeito do metal
1377 na temperatura mais baixa 11°C tende a ser maior do que nas outras temperaturas testadas.
1378 Dessa forma, o aumento da atividade mitocondrial, pode estar indicando que o organismo
1379 está respondendo a quantidades mais elevadas de metais, ou seja, possivelmente está
1380 tentando lidar com estresse por metal. Esse aumento da atividade mitocondrial pode ser
1381 visto, também, através de taxas elevadas de vazamento de prótons, como representado no

1382 estudo de Cherkasov 2006. Neste trabalho foi encontrado aumento da atividade
1383 mitocondrial em ostras *Crassostrea Virginica* expostas a 50 µg/l de cádmio em
1384 temperatura de 12°C (*in vivo*). Assim, como o vazamento protônico mitocondrial envolve
1385 uma grande despesa de energia, a taxa de síntese de ATP iria conseqüentemente aumentar
1386 nessa temperatura. Desse modo, mesmo sob condições de estresse o organismo tem
1387 energia suficiente para suprir todas as suas necessidades metabólicas basais, até porque
1388 em temperatura baixa a demanda energética é menor. Assim, tendo energia suficiente
1389 para a síntese de proteínas de choque térmico (HSP), as quais geralmente são ativadas em
1390 temperaturas altas. Então devido à isso, um sistema citoprotetor representado pelas HSP
1391 também pode ter sido ativado em temperatura baixa (Jones *et al.*, 1987; Yamashita *et al.*,
1392 1996), o qual é responsável pelo dobramento correto das proteínas (conformação
1393 proteica), sendo assim importante para lidar com condições de estresse térmico (Ivanina
1394 *et al.*, 2009). De acordo com os resultados para ambos parâmetros celulares discutidos
1395 anteriormente, a atividade lisossomal e atividade mitocondrial, pode-se concluir que
1396 ambos parâmetros nas condições experimentais investigadas não indicaram
1397 citotoxicidade. Porém por meio da análise da atividade mitocondrial é possível observar
1398 que houve o seu aumento, o qual pode indicar que as células estão tentando se defender
1399 nessas condições, ou seja, estão provavelmente tentando eliminar o chumbo.

1400 Os hemócitos são considerados um bom modelo biológico para investigar o efeito
1401 agudo de xenobióticos, pois são considerados sensíveis ao estresse ambiental, incluindo
1402 exposição a contaminantes, assim podendo responder de forma mais rápida as condições
1403 experimentais testadas (Muroga & Takahashi, 2007). A principal característica dos
1404 hemócitos é a sua diversidade morfológica, pois podem assumir uma morfologia de
1405 “espalhamento” ou redondas (Loker, 2010). Geralmente, as células não redondas são
1406 encontradas em uma quantidade maior do que células redondas, como mostrado no estudo
1407 de Rohr & Amato, 2014. A densidade de células redondas encontradas nesse estudo para
1408 o gastrópode *Megalobulimus abbreviatus* foi de 48% e de células não redondas foi de
1409 162%, enquanto que para o gastrópode *Bradybaena similares* foi encontrado 72% de
1410 células redondas e 362% de células não redondas. O metal pode afetar essa proporção de
1411 células redondas e não redondas, fazendo com que estas últimas adquirem formato
1412 arredondado. As funções celulares, como migração e crescimento, podem ser afetadas
1413 devido a essa proporção de células redondas e não redondas, pois as células redondas
1414 indicam células inativas, enquanto que as células não redondas são células ativas

1415 (presença de pseudópodes) (Ladhar-Chaabouni *et al.*, 2015). Dessa forma, se os
1416 hemócitos não conseguirem se “espalhar” (projetar seus pseudópodes), não será possível
1417 a adesão celular, impossibilitando tanto a migração quanto a proliferação das células.
1418 Com base na frequência de células arredondadas, não foram encontradas alterações
1419 significativas nos hemócitos expostos à atuação conjunta das três concentrações de
1420 chumbo (0,01, 0,1 e 1 mg/l) com as três temperaturas (11°C, 15°C e 25°C) por 4h
1421 ($p=0,99$, $n=13$). (Figura 6b). Com base no estudo de Ballarin e colaboradores 2014, os
1422 quais avaliaram efeitos imunotóxicos *in vitro* do fluoreto nos hemócitos do molusco
1423 *Venerupis philippinarum*, é sugerido que o fluoreto pode interferir na polimerização da
1424 actina, proteína motora importante para estrutura celular, assim a formação de
1425 pseudópodos interfere na propagação celular. Assim, pode-se dizer que o chumbo e a
1426 variação de temperatura no presente estudo parecem não ter causado, nas situações
1427 testadas, efeitos prejudiciais aos filamentos de actina constituintes do citoesqueleto, pois
1428 não foi observado alterações nas proporções de células arredondadas. Dessa forma, a
1429 estrutura dinâmica do citoesqueleto, que é um fator essencial que auxilia em tarefas
1430 celulares específicas como a morfologia celular, o tráfico intracelular e endocitose
1431 (Gourlay & Ayscough, 2005), parece não ter sido afetada. Já no estudo de Mottin e
1432 colaboradores (2010), em que os hemócitos do gastrópode *Haliotis tuberculata* foram
1433 expostos *in vitro* a 10 μM (0,65 mg/l), 100 μM (6,53 mg/l) e 1000 μM (65,38 mg/l) de
1434 zinco, após 24h de exposição as células estavam isoladas e arredondadas. A presença
1435 significativa de células redondas também foi observada no estudo de Leomanni e
1436 colaboradores (2016), em que os hemócitos do caracol *Cantareus apertus* exposto a 0,5
1437 μM (0,10 mg/l) e 1 μM (0,20 mg/l) de mercúrio, durante 14 dias de exposição *in vivo*. Nesse
1438 trabalho foi observado um aumento na proporção de células redondas após 7 dias de
1439 exposição. Dessa forma, esses resultados enfatizam a importância do tempo de exposição,
1440 mostrando que os ensaios agudos *in vitro* são vantajosos, pois em algumas situações
1441 podem antecipar as respostas *in vivo* (não foi o caso do presente estudo) as quais podem
1442 ser obtidas de forma rápida. Utilizando esse modelo *in vitro* um quadro de contaminação
1443 pode ser previsto, e as medidas de remediação podem ser tomadas, evitando sérios
1444 problemas ambientais. Isso evidencia que a exposição ao tóxico e tempo de exposição são
1445 importantes pois, a intensidade da resposta pode mudar ao longo do tempo.

1446 Outro aspecto relacionado à morfologia avaliado foi a frequência de células
1447 maiores. De acordo com os resultados, a concentração de 0,1 mg/l de chumbo causou o

1448 aumento da frequência de células maiores na temperatura de 11°C, porém foi observado
1449 apenas efeito do chumbo ($p=0,0014$, $n=15$) e não da interação das variáveis ($p=0,17$,
1450 $n=15$). (Figura 6a). Desse modo, as células inchadas (aumento de aproximadamente 4%)
1451 mostram efeito tóxico do chumbo e temperatura, podendo indicar o início de perturbações
1452 mais severas como alterações no volume das células, afetando a homeostase celular. A
1453 atuação do chumbo e temperatura causaram o aumento da frequência de células maiores,
1454 e também foi observado, em algumas condições discutidas posteriormente, tendência de
1455 aumento do volume celular na concentração 0,01 mg/l nas temperaturas de 15 e 25° C.
1456 Assim, os hemócitos se mostraram resistentes tanto às temperaturas testadas, quanto as
1457 concentrações de chumbo investigadas. A resposta de aumento da frequência de células
1458 maiores nas outras concentrações testadas não foi observada (Fig. 6a). Uma das possíveis
1459 justificativas para o aumento da frequência de células maiores, é que nesse caso o chumbo
1460 pode ter alterado a atividade da bomba sódio-potássio (Na^+/K^+ ATPase - NKA), afetando
1461 assim o equilíbrio entre a água e sais (principalmente o sódio) (Fischer & Giroux, 1987).
1462 Dessa forma, iria ocorrer a contenção desses íons no meio intracelular ocasionando o
1463 inchaço e posteriormente o rompimento das células. Sendo que já foi evidenciado por
1464 meio de vários estudos que metais podem causar inibição da bomba NKA, interferindo
1465 no seu bom funcionamento. Sabe-se que os metais cobre (Sampaio *et al.*, 2008), prata
1466 (Morgan *et al.*, 1997), o chumbo (Rogers *et al.*, 2005) e alumínio (Camargo *et al.*, 2009)
1467 são os principais causadores da redução dessa enzima. No presente estudo se o chumbo
1468 tivesse causado a inibição da bomba, esta não iria conseguir manter sua atuação
1469 eletrogênica (Marins, 1995), assim não gerando diferença de cargas a qual é considerada
1470 a força motriz para que haja a entrada de outros íons (Hwang & Lee, 2007). Decorrente
1471 disso, haveria a redução de íons como o sódio e o cloreto, os quais teriam as suas
1472 concentrações plasmáticas diminuídas devido a redução do influxo iônico, assim
1473 causando alterações no volume celular (Rogers *et al.*, 2005). Em relação ao volume
1474 celular, foi observado que os hemócitos expostos a concentração de 0,01 mg/l de chumbo
1475 nas temperaturas de 15°C e 25°C, apresentaram uma tendência de aumento do volume
1476 celular. Ou seja, as células parecem aumentar sua turgescência nessas condições (Figura
1477 6c). Por mais que o aumento de volume das células não tenha sido significativo ($p=0,44$,
1478 $n=15$), nesse caso o volume pode ter induzido a estimulação dos filamentos de actina,
1479 que se encontram despolimerizados em vários tipos celulares. Por sua vez, a actina pode
1480 ter interferido tanto na entrada quanto na saída de água das células (Okada, 2004, Lang
1481 *et al.*, 1998), não permitindo o acúmulo de osmólitos e nem de água no meio intracelular.

1482 A apoptose também apresenta papel importante na homeostase, pois é considerada
1483 a principal forma de eliminação de células criticamente danificadas (Lowe & Lin, 2000).
1484 A atuação da temperatura e do chumbo sobre os hemócitos da *Pomacea canaliculata* não
1485 causou a morte dessas células (Figura 8b e 8c). Isso indica que no presente estudo as
1486 células também parecem resistentes nas condições testadas como no estudo citado de
1487 Gagnaire e colaboradores (2006). Neste estudo, hemócitos da ostra *Crassostrea gigas* não
1488 apresentaram mortalidade até 35°C (*in vitro*). Foi observado esse mesmo padrão de
1489 resposta no estudo de Gagnaire e colaboradores (2004), em que não houve a morte celular
1490 em 4h de exposição ao cádmio nas concentrações de $3 \cdot 10^{-11}$ M (0,000348 mg/l) e $3 \cdot 10^{-4}$
1491 M (44,96 mg/l), à temperatura de 20°C. Porém, nesse mesmo trabalho houve aumento da
1492 mortalidade em 4h de exposição na concentração de $2 \cdot 10^{-4}$ M (33,72 mg/l) de cloreto de
1493 mercúrio, então nesse caso, o mecanismo de ação do metal se torna mais importante do
1494 que o tempo de exposição à esses metais. De acordo com os nossos resultados, foi possível
1495 observar que no controle havia um número expressivo de células em apoptose (60%)
1496 (Fig.8b), o que também foi visto no estudo de Russo & Madec (2007) em hemócitos do
1497 caramujo *Lymnaea stagnalis* (exposição *in vivo*). No estudo de Cherkasov e
1498 colaboradores (2007), em que os autores também avaliaram a atuação da temperatura e
1499 do metal (cádmio) em hemócitos da ostra *Crassostrea virginica*, foi observado células
1500 apoptóticas no controle. Sendo que quando os hemócitos foram expostos a 50 ug/l de
1501 cádmio nas temperaturas 12°C e 20°C, 25% representavam células apoptóticas, enquanto
1502 que na temperatura mais alta testada (28°C) essa porcentagem de células em apoptose
1503 aumentou para 32%. Um padrão semelhante a esse pode ser observado no presente estudo,
1504 pois há uma tendência de aumento da porcentagem de células apoptóticas no controle, de
1505 acordo com o aumento da temperatura, na concentração de 0,1 mg/l de chumbo. A
1506 hipótese utilizada por Russo & Madec (2007) justificou a quantidade de células
1507 apoptóticas (10%) encontradas nos controles, em que foi sugerido que os hemócitos dos
1508 animais dessa condição podem ter sido provenientes de uma população mais antiga de
1509 células que podem ser mais susceptíveis à apoptose, podendo representar uma resposta
1510 homeostática. Porém, essa hipótese não pode ser confirmada para o presente estudo, pois
1511 durante os experimentos não era possível controlar se o que era coletado de hemolinfa
1512 havia células de populações mais antigas. Portanto, dessa forma a hipótese apresentada
1513 anteriormente não pode ser excluída, mas também não é considerada a mais adequada.

1514 No nosso trabalho, foi encontrado um nível baixo de células necróticas (Fig.8d),
1515 e a frequência de células em apoptose e em apoptose tardia observada variou mas não foi
1516 significativa, propondo que tanto as células apoptóticas quanto as necróticas podem estar
1517 sendo eliminadas eficientemente (Russo & Madec, 2007). Sabe-se que os metais são
1518 capazes de modular a permeabilidade da membrana, fazendo que seja mais ou menos
1519 permeável. Isso porque se refere a primeira barreira encontrada por agentes tóxicos
1520 quando estes atingem as células. Sendo que quando isso ocorre a composição iônica, a
1521 entrada de nutrientes e a eliminação de resíduos podem ser afetados, pois dependem
1522 diretamente da permeabilidade seletiva da membrana plasmática (Kinter & Pritchard,
1523 1977). Uma teoria amplamente conhecida sobre como os metais alteram a permeabilidade
1524 da membrana plasmática, se baseia na interação dos metais com proteínas de membrana.
1525 Porém, de acordo com o presente estudo é possível concluir que mesmo que o chumbo
1526 seja capaz de aumentar a permeabilidade da membrana (Cuypers *et al.*, 2010), e
1527 consequentemente ocasionar alterações citoplasmáticas, não houve alterações suficientes
1528 para causar a morte dos hemócitos, nas concentrações de Pb estudadas.

1529 Os resultados obtidos por meio desse estudo, mostram que a espécie *Pomacea*
1530 *canaliculata* é uma espécie que apresenta células resistentes, sendo que essa resistência
1531 deve ser a causa do sucesso de invasão desses organismos. Ainda assim, foi possível
1532 observar que a mitocôndria pode estar associada ao processo de detoxificação, auxiliando
1533 na eliminação de metais. Essa associação é possível, pois foi visto aumento da atividade
1534 mitocondrial que pode indicar que as células estão gastando muita energia com o intuito
1535 de eliminar os xenobióticos. Possivelmente devido a isso não foi encontrado danos nos
1536 parâmetros avaliados. Dessa forma, pode-se concluir que o chumbo nas concentrações e
1537 temperaturas testadas não foi tóxico para os hemócitos dos caramujos, e que a
1538 concentração de chumbo indicada pelo Conselho Nacional do Meio Ambiente -
1539 CONAMA (0,01 mg/l) mostrou-se segura para hemócitos estudados.

1540

1541 **5. CONCLUSÃO:**

1542 Pode ser concluído por meio desse estudo, que os hemócitos da espécie *Pomacea*
1543 *canaliculata*, não apresentam a sua capacidade de suportar e lidar com o chumbo
1544 comprometida. Assim, tanto em uma situação de estresse gerada por um quadro de
1545 contaminação por metal, ou frente a um cenário de mudanças climáticas, considerando os
1546 hemócitos nas condições que foram apresentadas são considerados saudáveis para

1547 responder a esses estressores ambientais, o que favorece o sucesso desses organismos.
1548 Porém, outras análises celulares são necessárias, tendo como foco a defesa celular desses
1549 animais, com o intuito de elucidar um pouco mais os dados obtidos. Sendo que em uma
1550 abordagem nova, se faz importante a avaliação da resistência a múltiplos xenobióticos.
1551 Já que os resultados obtidos podem indicar o início de perturbações celulares.

1552

1553

1554 **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1555 Achard, M., Baudrimont, M., Boudou, A., Bourdineaud, J.P., 2004. Induction of a
1556 multixenobiotic resistance protein (MXR) in the Asiatic clam *Corbicula fluminea* after
1557 heavy metals exposure. *Aquat Toxicol* 67, 347–357.

1558 Babich, H.; Borenfreund, E., 1991. Cytotoxicity of T-2 toxin and its metabolites
1559 determined with the neutral red cell viability assay. *Appl Environ Microbiol* 57, 2101-
1560 2103.

1561 Ballarin, L., Covre, V., Masiero, L., Casellato, S., 2014. Immunotoxic effects of fluoride
1562 on the hemocytes of *Venerupis philippinarum*. *ISJ* 11, 22-29.

1563 Barbosa, F. G., Wallner-Kersanach, M., Zepka Baumgarten, M.G., 2012. Metais traço
1564 nas águas portuárias do estuário da Lagoa dos Patos, RS. *Braz J Aquat Sci Technol* 16,
1565 27-36. Camargo, M.M.P., Fernandes, M.N., Martinez, C.B.R., 2009. How aluminium
1566 exposure promotes osmoregulatory disturbances in the neotropical freshwater fish
1567 *Prochilus lineatus*. *Aquat Toxicol* 94, 40–46.

1568 Campos da Paz, M. Citotoxicidade induzida pelo extrato de *Pteridium aquilinum* sobre
1569 células HSG e OSCC. Dissertação de mestrado. Instituto de Biologia – Departamento de
1570 Biologia Molecular, Universidade de Brasília.

1571 Canesi L., Gallo G., Gavioli M., Pruzzo C., 2002. Bacteria–hemocyte interactions and
1572 phagocytosis in marine bivalves. *Microsc Res Techniq* 57, 469-476.

1573

1574 Cardoso P.C. Dos Santos, 2012. Avaliação *in vitro* dos possíveis efeitos citotóxicos,
1575 genotóxicos e mutagênicos das drogas antimaláricas artemisinina e artemeter em
1576 linfócitos humanos. Tese do Instituto de Ciências Biológicas – Neurociências e Biologia
1577 celular, Universidade do Pará.

1578

1579 Cherkasov, A.S., Ringwood, A.H., Sokolova, I.M., 2006. Combined effects of
1580 temperature acclimation and cadmium exposure on mitochondrial function in eastern
1581 oysters *Crassostrea virginica* Gmelin (Bivalvia: Ostreida). Environ Toxicol Chem 25,
1582 2461–2469.

1583 Cueto, J.A., Vega, I.A., Vazquez, A.C., 2013. Multicellular spheroid formation and
1584 evolutionary conserved behaviors of apple snail hemocytes in culture. Fish Shellfish
1585 Immunol 34, 443-453.

1586 Cuypers, A., Plusquin, M., Remans, T., Jozefczak, M., Smeets, K., 2010. Cadmium stress
1587 : an oxidative challenge. Biometals 23, 927–940.

1588 Fischer, P.W., Giroux, A., 1987. Effects of Dietary Magnesium on Sodium-Potassium
1589 Pump Action in the Heart of Rats. Bureau of Nutritional Sciences 252, 2091-2095.

1590 Fischer B., Pomati F., Eggen R., 2013. The toxicity of chemical pollutants in dynamic
1591 natural systems: The challenge of integrating environmental factors and biological
1592 complexity. Science of the Total Environment 449, 253-259.

1593 Franzellitti, S., Striano, T., Valbonesi, P., Fabbri, E., 2016. Insights into the regulation of
1594 the MXR response in haemocytes of the Mediterranean mussel (*Mytilus*
1595 *galloprovincialis*). Fish Shellfish Immunol 58, 349-358.

1596 Gagnaire, B., Thomas-Guyon, H., Renault, T., 2004. In vitro effects of cadmium and
1597 mercury on Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), haemocytes. Fish Shellfish
1598 Immunol 16, 501–512.

1599 Gagnaire, B., Frouin, H., Moreau, K., 2006. Effects of temperature and salinity on
1600 haemocyte activities of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). Fish Shellfish
1601 Immunol 20, 536–547.

1602 Gourlay, C.W., Ayscough, K.R., 2005. The actin cytoskeleton: a key regulator of
1603 apoptosis and ageing?. Mol Cell Biol 6, 583–589.

1604 Hwang, P.P., Lee, T.H., 2007. New insights into fish ion regulation and mitochondrion-
1605 rich cells. Comp Biochem Physiol 148, 479-497.

1606 Ivanina, A. V, Taylor, C., Sokolova, I.M., Rd, B.F., 2009. Effects of elevated temperature
1607 and cadmium exposure on stress protein response in eastern oysters *Crassostrea virginica*
1608 (Gmelin). Aquat Toxicol 91, 245–254.

- 1609 Jimenez, R.S., Dal Boso, S.M., Carvalho, W.A., 2004. Remoção de metais pesados de
1610 efluentes aquosos pela seólita natural escolecita – Influência da temperatura e do pH na
1611 adsorção em sistemas monoelementares. *Quim Nova* 27, 734-738.
- 1612 Jones, P.G., Vanbogelen, R.A., Neidhardt, F.C., 1987. Induction of Proteins in Response
1613 to Low Temperature in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 169, 2092-2095.
- 1614 Kasibhatla, S., 2006. Acridine orange/ethidium bromide (AO/EB) staining to detect
1615 apoptosis. *Cold Spring Harb. Protoc.* <http://dx.doi.org/10.1101/pdb.prot4493>. 2006,
1616 pdb.prot4493
1617
- 1618 Katsumiti, A., Gilliland, D., Arostegui, I., Cajaraville, M.P., 2014. Cytotoxicity and
1619 cellular mechanisms involved in the toxicity of CdS quantum dots in hemocytes and gill
1620 cells of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Aquat Toxicol* 153, 39–52.
- 1621 Kinter, W. B., Pritchard, J. B., 1977. Altered permeability of cell membranes. In:
1622 Handbook of Physiology Section 9. Reactions to Environmental Agents. Am Physiol Soc,
1623 563-576.
- 1624 Ladhar-Chaabouni, R., Machreki-Ajmi, M., Serpentine, A., Lebel, J.M., Hamza-Chaffai,
1625 A., 2015. Does a short-term exposure to cadmium chloride affects haemocyte parameters
1626 of the marine gastropod *Haliotis tuberculata*? *Environ Sci Pollut R* 22, 17343–17349.
- 1627 Lang, F., Busch, G.L., Volkl, H., 1998. The Diversity of Volume Regulatory
1628 Mechanisms. *Cell Physiol Biochem* 8, 1-45.
- 1629 Latire, T., Le Pabic, C., Mottin, E., Mottier, A., Costil, K., Koueta, N., Lebel, J.M.,
1630 Serpentine, A., 2012. Responses of primary cultured haemocytes from the marine
1631 gastropod *Haliotis tuberculata* under 10-day exposure to cadmium chloride. *Aquat*
1632 *Toxicol* 109, 213–221.
- 1633 Lee, Y., Park, S.Y., Kim, C., Park, T.G., 2009. Thermally triggered intracellular
1634 explosion of volume transition nanogels for necrotic cell death. *J Control Release* 135,
1635 89–95.
- 1636 Leomanni, A., Schettino, T., Calisi, A., Lionetto, M.G., 2016. Mercury induced
1637 haemocyte alterations in the terrestrial snail *Cantareus apertus* as novel biomarker. *Comp*
1638 *Biochem Physiol Part C* 183–184, 20–27.
- 1639 Loker, E.S., 2010. "Gastropod immunobiology", in invertebrate immunity, ed. Soderhall,
1640 editor (AUSTIN: Land Biosci and Springer Sci+Bus Med), 17-43.

- 1641 Lowe, S.W., Lin, A.W., 2000. Apoptosis in cancer. *Carcinogenesis* 21, 485–495.
- 1642 Marins J.C.B., 1995. Fisiologia da membrana e suas implicações relacionadas com a
1643 hidratação. *Rev min Educ Fis* 3, 5-14.
- 1644 Morgan, I.J., Henryb, P., Wood, C.M., 1997. The mechanism of acute silver nitrate
1645 toxicity in freshwater rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) is inhibition of gill Na⁺ and
1646 Cl⁻ transport. *Aquat Toxicol* 38, 145–163.
- 1647 Mottin, E., Caplat, C., Mahaut, M., Costil, K., Barillier, D., Lebel, J., Serpentine, A., 2010.
1648 Fish & Shellfish Immunology Effect of in vitro exposure to zinc on immunological
1649 parameters of haemocytes from the marine gastropod *Haliotis tuberculata*. *Fish Shellfish*
1650 *Immunol* 29, 846–853.
- 1651 Muroga, K., Takahashi, K.G., 2007. Review: Overview on the studies of humoral defense
1652 factors in bivalve molluscs. *Fish Pathology* 42, 1–17.
- 1653 Niencheski L.F. & Zepka Baumgarten M.G., 2007. Water quality in Mangueira Bay:
1654 anthropic and natural contamination. *J Coast Res* 47, 56-62.
1655
- 1656 OKADA, Y. 2004. Ion channels and transporters involved in cell volume regulation and
1657 sensor mechanisms. *Cell Biochem Biophys* 41, 233-258.
- 1658 Pruski, A.M., Dixon, D.R., 2002. Effects of cadmium on nuclear integrity and DNA repair
1659 efficiency in the gill cells of *Mytilus edulis L.* *Aquat Toxicol* 57, 127–137.
- 1660 Rainbow, P.S., 1995. Physiology, Physicochemistry and Metal Uptake-A Crustacean
1661 Perspective. *Marine Poll Bull* 31, 55–59.
- 1662 Regoli, F., Nigro, M., Orlando, E., 1998. Lysosomal and antioxidant responses to metals
1663 in the Antarctic scallop *Adamussium colbecki*. *Aquat Toxicol* 40, 375–392.
- 1664 Rogers, J.T., Patel, M., Gilmour, K.M., Wood, C.M., Joseph, T., Patel, M., Gilmour,
1665 K.M., Wood, C.M., 2005. Mechanisms behind Pb-induced disruption Na⁺ of and Cl⁻
1666 balance in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Am J Physiol Regul Integr Comp*
1667 *Physiol* 289, 463–473.
- 1668 Rohr, R.A., Amato, S.B., 2014. Hemócitos de *Bradybaena similaris* e *Megalobulimus*
1669 *abbreviatus* (Gastropoda, Stylommatophora). *Iheringia, Sér Zool* 104, 209-215.

1670 Russo, J., Madec, L., 2007. Haemocyte apoptosis as a general cellular immune response
1671 of the snail, *Lymnaea stagnalis*, to a toxicant. *Cell Tissue Res* 328, 431–441.

1672 Sampaio, F.G., Boijink, C.L., Oba, E.T., Dos Santos, L.R.B., Kalinin, A.L., Rantin, F.T.,
1673 2008. Antioxidant defenses and biochemical changes in pacu (*Piaractus mesopotamicus*)
1674 in response to single and combined copper and hypoxia exposure. *Comp. Biochem.*
1675 *Physiol. Part C* 147, 43–51.

1676 Sokolova, I.M., Lannig, G., 2008. Interactive effects of metal pollution and temperature
1677 on metabolism in aquatic ectotherms: implications of global climate change. *Climate Res*
1678 37, 181-201.

1679 Vinebrooke, R.D., Cottingham, K.L., Norberg, J., Scheffer, M., Dodson, S.I., Maberly,
1680 S.C., Sommer, U., 2004. Impacts of multiple stressors on biodiversity and ecosystem
1681 functioning: the role of species co-tolerance. *Oikos* 104, 451-457.

1682 Yamashita, M., Ojima, N., Sakamoto, T., 1996. Induction of proteins in response to cold
1683 acclimation of rainbow trout cells. *Febs Letters* 382, 261-264.

1684

1685 Zanotta, D.C., Espinoza, J.M.A., Shimabukuro, Y.E., 2013. Padrão de variabilidade anual
1686 dos campos de temperatura superficial da Lagoa dos Patos – RS por análise EOF. *Anais*
1687 *XVI Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto - SBSR*, 1595- 1601.

1688

1689

1690