UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE ANIMAL

Cristina Cerezer

ESTRESSE OXIDATIVO EM *AEGLA LONGIROSTRI* (DECAPODA ANOMURA): EFEITO DA TEMPERATURA E QUALIDADE DA ÁGUA

Santa Maria, RS
2017

Cristina Cerezer

ESTRESSE OXIDATIVO EM *AEGLA LONGIROSTRI* (DECAPODA ANOMURA): EFEITO DA TEMPERATURA E QUALIDADE DA ÁGUA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Animal, da Universidade Federal de Santa Maria, como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Biodiversidade Animal**.

Orientador: Sandro Santos
Coorientadora: Vania Lucia Loro

Santa Maria, RS
2017

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática
da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Cerezer, Cristina
ESTRESSE OXIDATIVO EM AEGLA LONGIROSTRI (DECAPODA ANOMURA): EFEITO DA TEMPERATURA E QUALIDADE DA ÁGUA / Cristina Cerezer.- 2017.
77 p.; 30 cm

Orientador: Sandro Santos
Coorientadora: Vania Lucia Loro
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Animal, RS, 2017

1. hipóxia 2. antioxidantes 3. aquecimento global 4. comportamento 5. crustáceos I. Santos, Sandro II. Loro, Vania Lucia III. Título.

Cristina Cerezer

ESTRESSE OXIDATIVO EM *AEGLA LONGIROSTRI* (DECAPODA ANOMURA): EFEITO DA TEMPERATURA E QUALIDADE DA ÁGUA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Animal, da Universidade Federal de Santa Maria, como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Biodiversidade Animal**.

Aprovado em 24 de março de 2017:

Sandro Santos, Dr.
(Presidente/Orientador)

Luis Esteban Krause Lanés, Dr. (PUCRS)

Charlene Cavalheiro de Menezes, Drª. (UFSM)

Santa Maria, 24 de Março de 2017

DEDICATÓRIA

Ao meu noivo, Charles Zarantonelo por estar ao meu lado em todos os momentos da minha vida, inclusive nos inúmeros campos necessários a realização desta dissertação. Aos meus pais pelo incentivo e apoio nas minhas decisões. Ao meu irmão que sempre foi minha fonte de inspiração.

Agradecimentos

Não somos nada sozinhos e tudo que conquistamos só é possível com a colaboração de diversas pessoas, por isso tenho um imenso prazer em agradecer:

- ao meu orientador Sandro Santos por me dar a oportunidade de trabalhar no laboratório de carcinologia durante esses seis anos e direcionar meus passos durante a graduação e agora no mestrado, obrigada por possibilitar o meu crescimento profissional e pessoal, pelas horas de conversa me guiando no fascinante mundo da pesquisa, muito obrigada pela orientação, fostes mais do que um orientador sendo sempre um conselheiro amigo;
- a minha co-orientadora Vania Lucia Loro pela oportunidade de me aventurar num mundo por mim pouco conhecido, obrigada pelos ensinamentos e confiança, obrigada por ter me adotado em seu laboratório, sou muito grata pelo seu carinho e por me fazer sentir sempre a vontade no lab, do fundo do meu coração muito obrigada;
- a professora Marlise que sempre muito atenciosa, me fez ter curiosidade em trabalhar com biologia molecular, me ensinou que para se extrair RNA deve-se além de muita paciência ter muito cuidado, e além disso se demostrou sempre disponível para ajudar a resolver os inúmeros problemas no decorrer desta dissertação, sou realmente muito grata por tudo;
- a Jossiele Leitemperger por me ensinar todas as técnicas, pela paciência comigo perguntando mil coisas o tempo inteiro, pelo ombro amigo aguentando os meus desabafos sobre a vida, fostes companheira e amiga nesses quase dois anos de convívio, tenha certeza de que sou muito grata por tudo que me ajudaste;
- aos meus pais, Antonio e Leonir, pela base construída que moldou quem eu sou hoje, nunca faltou amor e dedicação deles para com a gente, mesmo sem entender direito o que estudo, sempre me incentivaram e torceram pela minha vitória, se eu e o mano estamos seguindo na pós graduação e lutando pelos nossos sonhos é porque temos bons exemplos de pessoas guerreiras que mesmo vindos de famílias muito humildes lutaram para que a gente tivesse um futuro, tudo o que faço é pensando nos meus pais;
- ao Fernando Cereser por me permitir fazer as coletas em sua propriedade, agradeço a disposição e o carinho de sempre;
- ao meu irmão Cristiano Cerezer que sempre foi meu exemplo maior de que aprendizado nunca é demais, tenho tanto para escrever ao seu respeito, mas te agradeço todo dia por tudo que fez e faz por mim, te amo;
- ao meu noivo Charles que me acompanhou em todos os campos do mestrado (e não foram poucos), sempre me apoiou a continuar, teve toda a paciência do mundo nesses 9 anos, quando eu entrei em depressão e pensei em desistir de tudo me ergueu e me fez renascer, sempre muito dedicado e compreensivo nos meus finais de semana de estudos e campos, se hoje estou finalizando esta fase isso se deve a você, te amo tanto que não sei explicar;
- a toda minha família que compreendeu minha ausência nas festas por estar em campo e principalmente a minha afilhadinha amada Maria Eduarda Nardi que sempre pedia “mãe quando a dindinha vem me ver?” A dindinha estava estudando mas sempre com você nos pensamentos, minha princesa;
- aos colegas do LabTAq, especialmente a Aline Amaral, Aline Marins e ao Eduardo Severo, pelo apoio não só para tirar as dúvidas mas também pelo carinho e companheirismo, e a todos os demais que me acolheram e me aguentaram tagarelando lavando a louça e contando minhas histórias, vocês me acolheram como irmãos e vou levar cada um de vocês para a minha vida;

- as minhas amigas, tenho uma lista enorme de amigos verdadeiros que eu poderia citar mas para gerar ciúmes citarei os que me ajudaram diretamente, Fabiana Perrando Coradini e Bruna Palese obrigada por toda a ajuda com as imagens e as filmagens noturnas no prédio assombrado (nunca saberemos como aquelas tampas caíram), amo muito vocês. Aos demais amigos que mesmo distantes me deram muito apoio com palavras e pensamentos positivos meu muito obrigada.
- a minha co-orientada Bruna Ceretta Ferreira por toda a ajuda nos experimentos, meu pintinho muito obrigada por tudo, pela tua amizade, pelas horas extraindo RNA e tecidos, por me ouvir desabafando, por ser a melhor colega de laboratório que eu poderia desejar, obrigada por me deixar ser tua mãe postiça e ouvir minhas broncas e conselhos, tudo o que lhe digo é para que futuramente você esteja apta a passar por dificuldades sem baixar a cabeça, te amo muito.
- Aos meus amigos do muay thai em especial a Winnie Silva que além de ser meu saco de pancadas sempre foi uma amiga fiel e ótima conselheira, as artes marciais além de nos servirem como um ótimo exercício físico nos proporciona ensinamentos os quais podemos aplicar também na pesquisa, ao meu mestre de coração Fabio obrigada por todos os conselhos e ensinamentos.
- aos professores, ao secretário Sidnei da Cruz pela paciência e eficiência na hora de cessar nossas dúvidas e aos colegas do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Animal, por compartilharem seus conhecimentos e sempre estarem dispostos a ajudar, buscando não só o desenvolvimento deste curso mas também a união entre os alunos.
- a CAPES pelo apoio financeiro.
- a Universidade Federal de Santa Maria, cedendo oportunidades e infraestrutura, permitindo meu crescimento pessoal bem como o desenvolvimento desta dissertação.

Agradeço a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a concretização deste trabalho. Quero compartilhar com cada um a felicidade deste momento, que para mim simboliza mais um tijolo que estou colocando na minha escada da vida. Para mim defender a dissertação não simboliza só o fim de uma etapa, mas o recomeço de uma nova caminhada, Muito obrigada!

“Impossível é apenas uma palavra usada pelos fracos que acham mais fácil viver no mundo que lhes foi determinado do que explorar o poder que possuem para muda-lo. O impossível não é um fato consumado. É uma opinião. Impossível não é uma afirmação. É um desafio. O impossível é algo potencial. O impossível é algo temporário. ***Nada é impossível”.***

Muhammad Ali

RESUMO

ESTRESSE OXIDATIVO EM *AEGLA LONGIROSTRI* (DECAPODA, ANOMURA): EFEITO DA TEMPERATURA E QUALIDADE DA ÁGUA

AUTORA: Cristina Cerezer
ORIENTADOR: Sandro Santos
CO-ORIENTADORA: Vania Lucia Loro

A poluição consequente de atividades antrópicas tem causado alteração dos ecossistemas terrestres e aquáticos. Porém, devido a posição que ocupam na paisagem, ambientes límnicos estão propensos a receber grandes cargas de poluentes, como por exemplo pesticidas. Isto, aliado a menor capacidade de diluição, potencializa os efeitos nocivos de substâncias tóxicas aos organismos que ali habitam. Além disso, a temperatura em ascendência, reflexo da alteração climática global, também exerce influência direta e indireta em estudos ecológicos, uma vez que afeta especialmente organismos ectotérmicos que vivem em corpos d'água continentais. A diminuição de oxigênio na água, geralmente associada à temperatura mais alta, por exemplo, é responsável pela baixa qualidade de alguns habitats aquáticos, ameaçando organismos mais sensíveis. A poluição e variações na temperatura têm restringido o hábitat de muitas espécies de crustáceos do gênero *Aegla* às nascentes, visto que possuem preferência por água límpida e bem oxigenada. Estas variáveis influenciam o metabolismo e o comportamento de *Aegla*, podendo alterar o estado oxidativo e consequentemente a sobrevivência desta espécie caso seu ambiente seja alterado. Desta forma, avaliaram-se os efeitos da variação de temperatura, da qualidade da água e da concentração de oxigênio sob parâmetros comportamentais e de estresse oxidativo (através de biomarcadores) em brânquias, hepatopâncreas e músculo de *Aegla longirostri*. Os animais foram expostos, em condições laboratoriais, a temperaturas de 18ºC, 21°C, 24°C e 26ºC durante 48 horas; foram analisadas as respostas comportamentais, letalidade e o sistema de defesa antioxidante no crustáceo de água doce *A. longirostri*. Além disso, verificamos as alterações no sistema antioxidante induzidas por hipóxia moderada (2,5 ppm OD) e grave (1,5 ppm OD) e em águas de diferentes qualidades (antropizadas e naturais) e também as respostas comportamentais e a letalidade. O aumento da temperatura afetou significativamente não só a resposta comportamental, mas também os níveis de quase todos os antioxidantes testados em *A. longirostri* em diferentes tecidos. Nós demonstramos que a variação na temperatura, mesmo em um experimento a curto prazo, é capaz de induzir uma alteração no comportamento de atividade e no tempo de reação dos crustáceos. A atividade antioxidante em animais expostos à hipóxia moderada e grave aumentou em relação àqueles com oxigenação constante. Esses resultados demonstram que esses animais realmente exigem águas bem oxigenadas para sobreviver e que uma menor oxigenação afetaria o seu sistema antioxidante e consequentemente a sua sobrevivência, podendo assim impactar as populações de *A. longirostri.* Águas antropizadas têm o potencial de alterar o comportamento desses eglídeos, diminuindo sua atividade durante à noite, podendo comprometer o seu comportamento de forrageio, por exemplo. Além disso, fica evidente, através do aumento da atividade e do nível da maioria dos biomarcadores avaliados, que esses animais são sensíveis à presença de pesticidas mesmo que estes estejam presentes em quantidades muito pequenas.

Palavras chave: hipóxia, antioxidantes, aquecimento global, comportamento, crustáceos.

Abstract

OXIDATIVE STRESS ON *AEGLA LONGIROSTRI* (DECAPODA, ANOMURA): EFFECTS OF TEMPERATURE AND WATER'S QUALITY

AUTHOR: Cristina Cerezer

ADVISOR: Sandro Santos

CO-ADVISOR: Vania Lucia Loro

The pollution from anthropic activities has produced a pronounced alteration in both terrestrial and aquatic ecosystems. However, because of the position that they occupy in the landscape, limnic environments are susceptible to receive large amounts of pollutants, such as pesticides. This factors combined with the low capability of dilution enhance the harmful effects of toxic substances to the organisms within this habitat. Moreover, the increasing temperature, consequence of global climatic changes, also has a direct and indirect influence on ecological studies, once it affects especially ectothermic organisms which live within continental water bodies. The decrease of water's oxygen, generally associated with a higher temperature, for example, is responsible for the lower quality of some aquatics habitats, threatening more sensitive organisms. The pollution and variations of temperature have restricted the habitat of many species of crustaceans of the genus *Aegla* to water springs since they prefer clean and well-oxygenated waters. These variables have influenced the metabolism and behavior of *Aegla* and might modify its oxidative state and consequently the survival of this species in case of environment alteration. In this way, the aim of this study was to assess the effects of temperature variation, water quality and the oxygen concentration under behavioral and oxidative stress parameters (using biomarkers) on gills, hepatopancreas and muscles of *Aegla longirostri*. Thus, animals were exposed to 18ºC, 21°C, 24°C and 26ºC for 48 hours under laboratory conditions; analysis of behavior's feedback, lethality and antioxidant defense system were made. Beyond, we verified the alterations in the antioxidant system induced by moderated (2.5 ppm OD) and severe (1.5 ppm OD) hypoxia and different qualities of water (Anthropized and natural) and also the behavioral responses and lethality. The increase of temperature has affected significantly not just the behavioral response, but also the levels of almost all the antioxidants tested in different tissues. We have demonstrated that the variation of temperature, even in a short-term experiment, can induce an alteration of behavior both on activity and reaction's time of the crustaceans. The antioxidant activity in animals exposed to moderate and severe hypoxia have increased in relation to those who had constant oxygenation. These results demonstrate that the animals need well-oxygenated waters to survive, and a lower oxygenation affected their antioxidant system and consequently the survival, which could have an impact on populations of *A. longirostri*. Worst quality waters have the potential of changing the behavior, by decreasing activity at night, which could compromise foraging behavior, for example. It is evident, by the increase in activity and level of most biomarkers evaluated, that these animals are sensitive to the presence of pesticides even in very small quantities.

Key Words: hypoxia, antioxidants, global warming, behavior, Crustaceans.

APRESENTAÇÃO

Esta dissertação está organizada da seguinte forma: primeiramente são apresentados a introdução geral e os objetivos. A seguir são apresentados dois manuscritos. O item conclusão, encontrado no final desta dissertação, apresenta interpretações gerais sobre os dois manuscritos. As referências bibliográficas foram apresentadas no final da introdução geral, manuscrito 1 e manuscrito 2 referindo-se a cada tópico mencionado. Os manuscritos que compõem a dissertação são:

Manuscrito 1 - Efeito da temperatura da água no comportamento e parâmetros oxidantes de *Aegla longirostri* (Crustacea, Anomura, Aeglidae).

Manuscrito 2 - Baixa qualidade da água causa alterações bioquímicas e comportamentais em *Aegla longirostri* (Crustacea, Decapoda, Anomura).

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO

Figura 1 - Desenho representativo de Eglídeos.....15
Figura 2 - Vias de degradação e dissipação de agroquímicos para ambientes aquáticos 17
Figura 3 - Estrutura química da Atrazina e do Imidacloprido 18
Figura 4 - Distribuição global de casos documentados de hipóxia em áreas costeiras relacionadas às atividades humanas.....20

MANUSCRITO 1 - EFEITO DA TEMPERATURA DA ÁGUA NO COMPORTAMENTO E PARÂMETROS OXIDANTES DE *AEGLA LONGIROSTRI* (CRUSTACEA, ANOMURA, AEGLIDAE).

Figura 1 - Análise comportamental medida pelo escore de atividade durante a noite e durante o dia nas quatro diferentes temperaturas 38
Figura 2 - Análise comportamental do tempo em segundos que o animal demora a retornar ao equilíbrio durante a noite e durante o dia nas quatro diferentes temperaturas 39
Figura 3 - Níveis de TBARS e atividade da GST em hepatopâncreas, músculo e brânquias, nas quatro diferentes temperaturas.....40
Figura 4 - Concentrações de NPSH e níveis da PC em hepatopâncreas, músculo e brânquias, nas quatro diferentes temperaturas.....41
Figura 5 - Níveis de atividade da CAT no hepatopâncreas e níveis de atividade da AChE em músculo nas quatro diferentes temperaturas.....42

MANUSCRITO 2 - BAIXA QUALIDADE DA ÁGUA CAUSA ALTERAÇÕES BIOQUÍMICAS E COMPORTAMENTAIS EM AEGLA LONGIROSTRI (CRUSTACEA, DECAPODA, ANOMURA).

Figura 1 - Esquema representando o experimento de hipóxia.....56
Figura 2 - Atividade de CAT em hepatopâncreas e atividade de AChE em músculo de *Aegla longirostri* submetida a diferentes concentrações de OD 60
Figura 3 - Conteúdo de PC e níveis de TBARS em hepatopâncreas, músculo e brânquias de *Aegla longirostri* submetida a diferentes concentrações de OD.....61
Figura 4 - Atividade de GST e níveis de NPSH em hepatopâncreas, músculo e brânquias de *Aegla longirostri* submetida a diferentes concentrações de OD.....62
Figura 5 - Atividade de CAT em hepatopâncreas e atividade de AChE em músculo de *Aegla longirostri* exposta a águas com qualidades diferentes durante 7 e 15 dias de tratamento 63
Figura 6 - Conteúdo de PC e níveis de TBARS em hepatopâncreas, músculo e brânquias de *Aegla longirostri* exposta a águas com qualidades diferentes durante 7 e 15 dias de tratamento.....64
Figura 7 - Atividade de GST e níveis de NPSH em hepatopâncreas, músculo e brânquias de *Aegla longirostri* exposta a águas com qualidades diferentes durante 7 e 15 dias de tratamento.....65

Figura 8 – Análise comportamental medida pelo escore de atividade às 22 h e às 10 h de *Aegla longirostri* exposta a águas com qualidades diferentes durante 7 e 15 dias de tratamento 66

LISTA DE TABELAS

MANUSCRITO 1 - EFEITO DA TEMPERATURA DA ÁGUA NO COMPORTAMENTO E PARÂMETROS OXIDANTES DE *AEGLA LONGIROSTRI* (CRUSTACEA, ANOMURA, AEGLIDAE).

Tabela 1 - Descrição dos comportamentos analisados e seus respectivos escores..... 36
Tabela 2 - Porcentagem de sobrevivência e letalidade em cada temperatura testada incluindo uma temperatura considerada a máxima suportada.....39

MANUSCRITO 2 - BAIXA QUALIDADE DA ÁGUA CAUSA ALTERAÇÕES BIOQUÍMICAS E COMPORTAMENTAIS EM *AEGLA LONGIROSTRI* (CRUSTACEA, DECAPODA, ANOMURA).

Tabela 1 - Descrição dos comportamentos analisados e seus respectivos escores 57
Tabela 2 - Parâmetros físico-químicos e agroquímicos das águas coletadas nos riachos utilizadas nos experimentos. 59
Tabela 3 - Porcentagem de sobrevivência e letalidade em cada tratamento 66

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....15
OBJETIVOS.....24
REFERÊNCIAS.....25

MANUSCRITO 1 - EFEITO DA TEMPERATURA DA ÁGUA NO COMPORTAMENTO E PARÂMETROS OXIDANTES DE *AEGLA LONGIROSTRI* (CRUSTACEA, ANOMURA, AEGLIDAE). 32
RESUMO..... 32
INTRODUÇÃO.....33
MATERIAL E MÉTODOS.....34
RESULTADOS.....38
DISCUSSÃO.....42
REFERÊNCIAS.....47

MANUSCRITO 1 - BAIXA QUALIDADE DA ÁGUA CAUSA ALTERAÇÕES BIOQUÍMICAS E COMPORTAMENTAIS EM *AEGLA LONGIROSTRI* (CRUSTACEA, DECAPODA, ANOMURA) 52
RESUMO.....52
INTRODUÇÃO.....53
MATERIAL E MÉTODOS.....55
RESULTADOS.....59
DISCUSSÃO.....67
REFERÊNCIAS.....71

CONCLUSÕES.....76

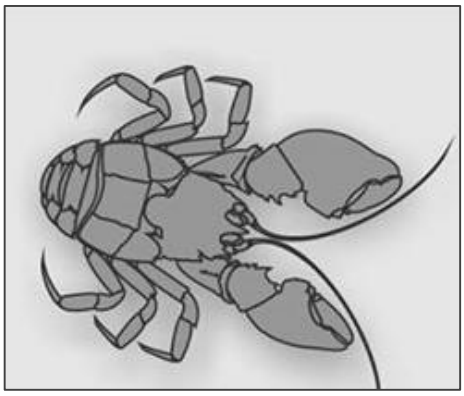
1. INTRODUÇÃO

1.1 ORGANISMO TESTE

Os crustáceos decápodos da família Aeglidae (Figura 1) são “caranguejos” pertencentes à infraordem Anomura, com 83 espécies conhecidas, de hábitos bentônicos e de distribuição restrita a regiões temperadas e subtropicais da América do Sul (BOND-BUCKUP, BUCKUP, 1999; BOND-BUCKUP et al., 2003; SANTOS et al., 2014; MORAES et al., 2016). Nos riachos do sul do Brasil, os eglídeos são importantes fragmentadores que participam do processo de decomposição dos detritos foliares (COGO, SANTOS, 2013), sendo espécies-chave na ciclagem dos nutrientes. Os eglídeos são o único grupo de anomuros com ciclo de vida completo em cursos d’água continentais, sendo encontrados em rios, riachos, lagos e cavernas de águas correntes de temperaturas baixas e bem oxigenadas, sob detritos vegetais ou enterrados no substrato arenoso (BOND-BUCKUP, 2003). Entre os eglídeos, *Aegla longirostri* apresenta distribuição restrita ao nordeste, centro e leste do Rio Grande do Sul (BOND-BUCKUP, BUCKUP, 1999). Esta espécie vem sendo utilizada com frequência como modelo de estudos comportamentais e ecológicos (TREVIZAN et al., 2009; COGO et al, 2014; AYRES-PEREZ et al., 2015; CEREZER et al., 2016), principalmente pela sua relativa abundância em alguns riachos subtropicais.

Figura 1. Desenho representativo de Eglideos.

Fonte: produção própria do autor.

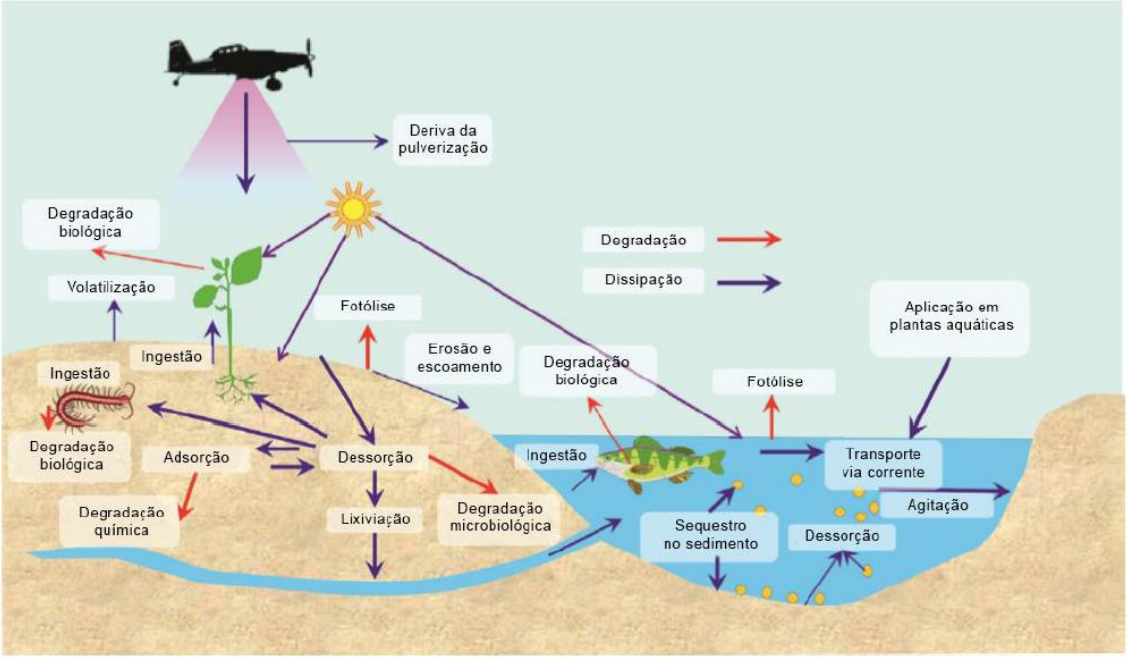


1.2 QUALIDADE DA ÁGUA

A poluição dos ambientes aquáticos causada pela atividade humana gera acúmulo de substâncias tóxicas que, por sua vez, causam um grande impacto sobre a vida nesses locais (SWACKHAMER et al., 2004). Efluentes de esgotos, escoamentos de áreas agrícolas e de pecuária são tipicamente contaminados por uma variedade de químicos nocivos que podem causar modificações no estado oxidativo, seja pelo aumento na geração de espécies reativas de oxigênio ou pela redução na atividade de enzimas antioxidantes (STEINBERG et al., 2008).

Oriundos do típico processo de produção agrícola baseado na aplicação desmedida, agroquímicos acabam atingindo o solo e as águas, principalmente devido aos ventos, a água das chuvas, que promovem escoamento superficial, a lavagem das folhas tratadas, a lixiviação e a erosão (Figura 2) (TOMITA, BEYRUTH, 2002; SILVA, FAY, 2004). Deste modo, os organismos aquáticos são constantemente expostos a contaminantes químicos que podem induzir diferentes mecanismos de toxicidade (CORREIA et al., 2003). No entanto, para espécies dulcícolas, a matéria orgânica natural composta principalmente por plantas terrestres em processo de decomposição, e a variação anormal dos parâmetros físico-químicos também tem o potencial de causar estresse oxidativo (STEINBERG et al., 2006; TIMOFEYEV et al., 2006a, b). Além do estresse oxidativo, estas substâncias podem se acumular nos tecidos dos organismos vivos. O nível desta bioacumulação depende da capacidade fisiológica do organismo em eliminar o produto químico, influenciando seus mecanismos de defesa (LIVINGSTONE, PIPE, 1992).

Figura 2 – Vias de degradação e dissipação de agroquímicos para ambientes aquáticos. Fonte: MARINS, 2016; adaptado de SOLOMON et al., 2014, p.373.



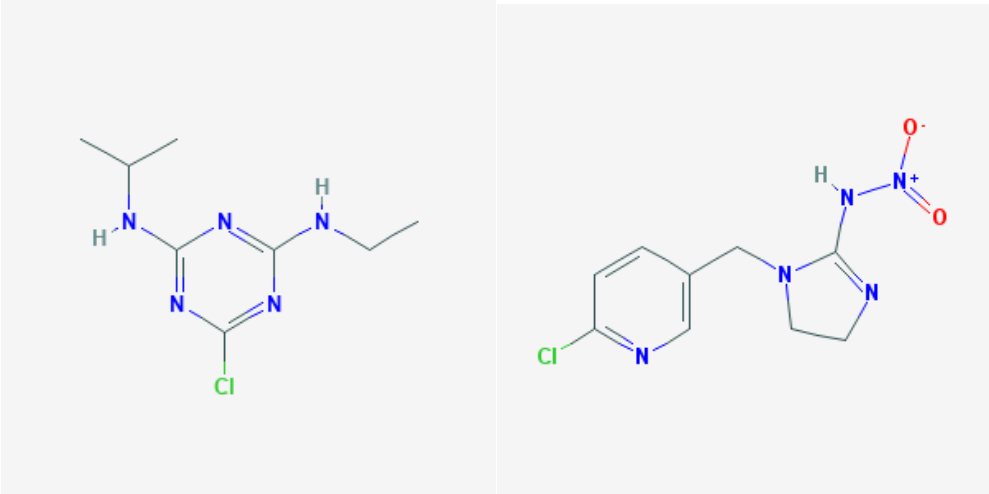
Um dos agroquímicos encontrados com frequência nas águas da região central do estado do Rio Grande do Sul é a Atrazina (ATZ) (LORO et al., 2015) (Figura 3a). Este é um herbicida utilizado principalmente nos cultivos de cana-de-açúcar, milho e sorgo. No Brasil, foi registrada a ocorrência de ATZ em concentrações variando de 0,09 µg/L até 5,4 µg/L em águas superficiais (LORO et al., 2015; VIEIRA et al., 2016).

A presença da ATZ em ambientes aquáticos pode causar a diminuição na quantidade de organismos fotossintetizantes, o que afetaria a disponibilidade de alimentos para os herbívoros. Além de afetar a teia trófica, a morte de um grande número de organismos acaba prejudicando a qualidade da água devido à decomposição (GRAYMORE et al., 2001). Além disso, ATZ, além de ter potencial carcinogênico (SHIRMARDI et al., 2016), possui a capacidade de estimular a produção de espécies reativas de oxigênio (EROS), podendo gerar um desequilíbrio na produção e ou eliminação de EROS, bem como outros radicais livres (estresse oxidativo) (LORO et al., 2015).

Outro agroquímico muito comum no estado é o Imidacloprido (IMI) (Figura 3b), inseticida utilizado para o controle de pragas. O IMI tem potencial para atingir as águas superficiais em concentrações até 36 µg/L, podendo se acumular e causar toxicidade aos organismos (JEMEC et al., 2007; PISA et al., 2015).

Figura 3: estrutura química da Atrazina (A) e do Imidacloprido (B). Fonte: *URL: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov*

A B



1.3 ALTERAÇÕES TÉRMICAS NO AMBIENTE

Com a alteração climática global, a temperatura vem sendo uma variável importante nos estudos de estresse oxidativo (VINAGRE et al., 2014). A temperatura da água é um fator ambiental que afeta o crescimento e a sobrevivência dos animais aquáticos (WANG et al., 2006) e também afeta o comportamento tanto de animais terrestres quanto aquáticos (BRIFFA et al., 2013). Organismos que vivem em locais sujeitos à variação de temperatura podem sofrer alterações em seus processos bioquímicos, moleculares e fisiológicos relacionados à manutenção da homeostase (MADEIRA et al., 2013).

Além disso, sabe-se que um aumento de temperatura aumenta o potencial tóxico de poluentes químicos (IPCC, 2007). Assim, o estresse térmico associado com a exposição a xenobióticos pode aumentar as chances do organismo a produzir EROS e entrar em estado de estresse oxidativo (HALLIWELL, 1994; AHMED, 2005). Estudos mostram que o aumento da temperatura resulta em metabolismo acelerado, aumento do consumo de oxigênio e, consequentemente, na produção de EROS (LUSHCHAK, BAGNYUKOVA, 2006[a]; AN, CHOI, 2010).

As mudanças de temperatura podem afetar não apenas as taxas fisiológicas e reações bioquímicas, mas também a estabilidade biológica de membrana e funções

sistêmicas, como a ventilação ou a absorção dos alimentos (HOCHACHKA, SOMERO 2002; SOKOLOVA, 2008).

A temperatura também modifica a distribuição de espécies ectotérmicas e pode conduzir à extinção da população, o que contribui para o aumento da vulnerabilidade ecossistêmica (CAIRNS, 1975; WILLMER, 2000; WALTHER, et al., 2002).

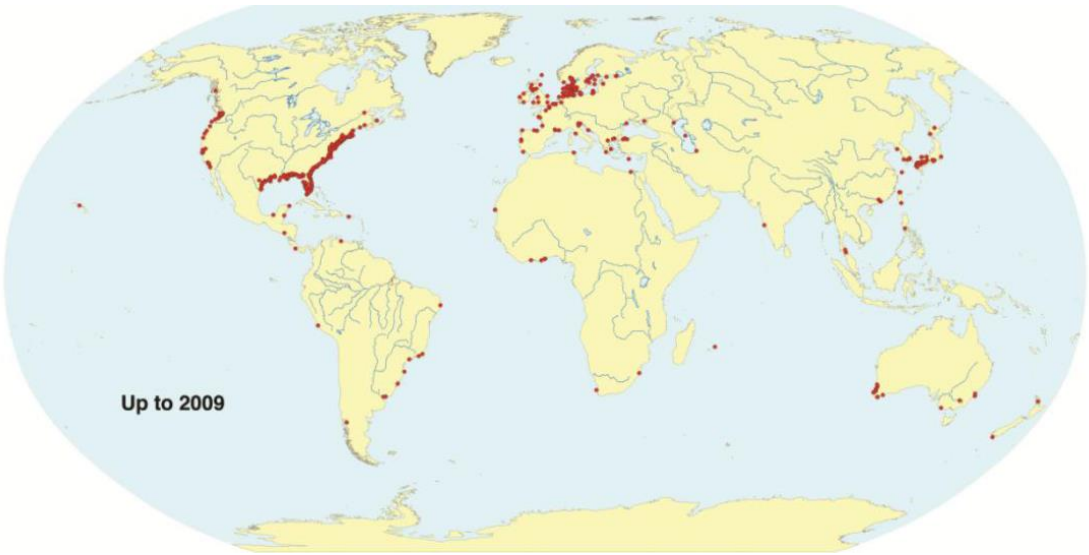
Além disso, a temperatura é considerada um dos principais fatores capazes de influenciar os mecanismos de defesa em crustáceos (LE MOULLAC, HAFFNER, 2000). O metabolismo aeróbio destes animais, como o da maioria dos outros organismos aquáticos, é dependente da temperatura (MCGAW, 2003). Em peixes, mudanças na temperatura podem afetar sua capacidade de obter oxigênio do ambiente e podem promover mudanças no nível fisiológico que alteram a taxa de consumo de oxigênio e sua entrega aos tecidos (POWELL, WATTS, 2006).

Por isso, a avaliação do nível de estresse térmico, bem como a capacidade de adaptação dos organismos a alterações térmicas, precisam ser melhor entendidas (BONE et al., 2014).

1.4 HIPÓXIA

A baixa concentração de oxigênio na água (hipóxia) é outro fator responsável pela baixa qualidade de alguns hábitats aquáticos (BROUWER et al., 2007). A entrada de contaminantes e nutrientes na água, provenientes da ação antrópica, pode levar à redução nos níveis de oxigênio dissolvido e à morte de animais nesses ambientes, sendo conhecidos vários casos em áreas costeiras no mundo (Figura 4) (UN-WATER, 2009; DÍAZ, RABALAIS, 2010; MATEO-SAGASTA et al., 2010). Além disso, a temperatura também pode influenciar a hipóxia (PÖRTNER, 2009). Estes mesmos fatores podem afetar a disponibilidade de oxigênio em ambientes aquáticos de água doce.

Figura 4: Distribuição global de casos documentados de hipóxia em áreas costeiras relacionadas às atividades humanas, representadas aqui em vermelho. Fonte: RABALAIS et al., 2010.



Os invertebrados aquáticos podem ser submetidos à hipóxia ambiental periódica ou até mesmo à anóxia (ausência de oxigênio), e podem desenvolver mecanismos anaeróbicos eficientes para poderem sobreviver a esses períodos com uma menor quantidade de oxigênio dissolvido no ambiente (HOCHACHKA, 1980; LUTZ, STOREY, 1997; CHILDRESS, SEIDEL, 1998; HOCHACHKA, LUTZ, 2001). Dentre os invertebrados, sabe-se que os moluscos são animais que toleram mais a hipóxia e que crustáceos são mais sensíveis (VAQUER-SUNYER, DUARTE, 2008).

A hipóxia pode ser prejudicial para organismos dependentes de oxigênio, alterando seu comportamento, fisiologia e inclusive alterações celulares, resultando em impactos negativos, como crescimento reduzido, perda reprodutiva, mortalidade, redução da biodiversidade e perda de produção secundária (RABALAIS et al., 2010; WANNAMAKER, RICE, 2000; WU, 2002). A falta de oxigênio também pode causar mudanças no estado oxidativo dos organismos (WU, 2002).

Portanto, a hipóxia representa uma grave ameaça para as comunidades bentônicas, composta por organismos sensíveis a baixas concentrações de oxigênio (GRAY et al., 2002). O oxigênio dissolvido e a temperatura são as duas variáveis ambientais fundamentais para inferências iniciais sobre a qualidade do ambiente aquático e esses dois fatores influenciam diretamente a sobrevivência dos animais nesse ecossistema (ADDY, GREEN, 1997).

1.5 ANTIOXIDANTES E ESTRESSE OXIDATIVO

A exposição de organismos a estressores pode resultar em uma série de alterações bioquímicas e fisiológicas. O estresse oxidativo ocorre quando a concentração de EROs aumenta cronicamente, perturbando o metabolismo celular e sua regulação, causando danos aos constituintes celulares como proteínas, lipídios e ácidos nucléicos (LUSHCHAK, 2011). As EROs mais comuns são: radical ânion superóxido (O_2^-), radicais hidroxila (OH) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (BLOKHINA et al., 2003). Os efeitos negativos devido à acumulação de EROs incluem o aumento de reações de oxidação de radicais livres com dano oxidativo de polímeros importantes e aumento de peroxidação lipídica, o que pode levar à disfunção de células, tecidos e órgãos, e, finalmente, mortalidade dos organismos (FERRARI, 2000; YAU-HUEI, HSIN-CHEN, 2002).

As espécies reativas incluem radicais do oxigênio (ERO) e do nitrogênio (ERN), e certas espécies não radicalares, que podem ser convertidas facilmente à radical (EHRENBRINK et al., 2006). As espécies reativas possuem a capacidade de causar danos em macromoléculas, como lipídeos, proteínas e bases nitrogenadas. Quando os organismos são expostos, por exemplo a xenobiótico, a produção de espécies reativas pode ultrapassar a capacidade de defesa do organismo, caracterizando-se uma situação de estresse oxidativo (PISOSCHI, POP, 2015).

As células contêm enzimas antioxidantes que minimizam os efeitos deletérios provocados por EROs (WINSTON, DI GIULIO, 1991; LEMAIRE, LIVINGSTONE, 1993; LIVINGSTONE, 2001). A superóxido-dismutase (SOD) e a catalase (CAT) fornecem uma primeira linha de defesa contra EROs (NWANI et al., 2010). A enzima SOD catalisa a dismutação de superóxido formando oxigênio e peróxido de hidrogênio (FRIDOVICH, 1989). A CAT faz a decomposição de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em água e oxigênio ($H_2O + O_2$).

Os biomarcadores vêm sendo muito utilizados para a detecção de contaminação ambiental, sendo considerados indicadores precoces (WALKER et al., 1996). A exposição de organismos aquáticos a contaminantes ambientais vai implicar em efeitos que, a longo prazo, serão notados na população, comunidade e ecossistema. Os biomarcadores são importantes na detecção prévia de mudanças bioquímicas, moleculares, celulares, morfológicas e fisiológicas à nível de organismo

que poderão afetar níveis mais altos, como populações (LÓPEZ-DOVAL, BARATA, DÍEZ, 2015).

Podemos dividir os biomarcadores ecotoxicológicos entre marcadores de defesa e de dano. Os marcadores de defesa incluem a atividade de enzimas de detoxificação (Citocromo P450- CYP e metalotioneina- MT), biotransformação (Glutationa S-transferase - GST), e defesa antioxidante (Superóxido dismutase- SOD, Catalase- CAT, e Glutationa peroxidase - GPx). Já os biomarcadores de dano são a atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE), formação de micronúcleo e adutos no DNA, marcadores de estresse oxidativo, e histocitopatologias (AMIARD-TRIQUET, BERTHET, 2015). Como marcadores de estresse oxidativo são utilizadas as análises dos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), indicativo de peroxidação lipídica, bem como a dosagem do conteúdo de proteína carbonilada (MENEZES et al., 2016).

Estudos com decápodos de água doce relacionados a enzimas antioxidantes tornam-se de grande relevância para o entendimento dos processos adaptativos desse grupo. Também contribuem para uma compreensão integrada da biologia e ecologia ligada ao grupo de organismos em questão.

A poluição, a eutrofização, o uso indevido das margens e/ ou da bacia de drenagem são alguns dos problemas que interferem direta ou indiretamente nas comunidades límnicas que desenvolvem mecanismos adaptativos para sobreviverem. A avaliação da atividade antioxidante em eglídeos pode contribuir para o conhecimento dos mecanismos adaptativos que as espécies desenvolvem para sobreviver em ambientes alterados. A análise dos processos oxidativos contribui para a compreensão da ecologia e evolução dos animais em questão. A análise comportamental contribui para entendermos melhor como estes animais se comportam mediante situação de estresse.

Tendo em vista que a integridade biológica de um ecossistema pode ser avaliada com base na integridade da sua fauna (ROBINSON, 1986) e que a saúde de todos os organismos vivos em um ecossistema aquático é afetada pela deterioração da qualidade da água (DOHERTY et al., 2010), estudos que verifiquem os prováveis efeitos decorrentes das alterações da qualidade ambiental são de grande importância para a preservação da fauna límnica.

Estudos comportamentais vêm sendo utilizados, ultimamente, como uma ferramenta complementar para testes de ecotoxidade e monitoramento da qualidade da água, pois permitem a ligação entre os efeitos tóxicos obtidos em níveis bioquímicos/celulares aos impactos observados em populações e comunidades (FELTEN et al., 2001; MALTBY et al., 2002; WALLACE et al., 2004; MILLS et al., 2006;).

Assim, a identificação, monitoramento e redução dos efeitos da poluição sobre a saúde dos animais aquáticos, através de programas de gestão e educação ambiental, são vitais. Os crustáceos são sensíveis às mudanças em seu hábitat, incluindo aumento nos níveis de poluição da água. Examinando os níveis de antioxidantes nesses animais podemos, portanto, revelar alterações no ambiente aquático e investir na preservação desses e de outros animais da fauna aquática.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Investigar como variações de temperatura, hipóxia e qualidade da água podem afetar os parâmetros de estresse oxidativo e a atividade no crustáceo límnico *Aegla longirostri*.

2.2 Objetivos específicos

- Caracterizar os níveis de antioxidantes para *A. longirostri* em condições naturais;
- Determinar o perfil oxidativo através da atividade dos antioxidantes nas brânquias, hepatopâncreas e músculos dos crustáceos;
- Avaliar a resposta antioxidante em animais submetidos a ambientes com hipóxia moderada e grave;
- Avaliar a influência do aumento da temperatura na atividade das enzimas examinadas e demais antioxidantes;
- Avaliar se há mudanças comportamentais e na sobrevivência desses eglídeos em diferentes temperaturas e à águas com substâncias de origem antropogênica;
- Avaliar o potencial adaptativo do sistema de defesa antioxidante em crustáceos submetidos a estresse oxidativo causado por condições ambientais diferentes dos de sua origem.

3. REFERÊNCIAS

ADDY, K.; GREEN, L. (1997) Dissolved Oxygen and Temperature. Natural Resources Facts. 96-3.

AHMED, R.G. (2005) Is there a balance between oxidative stress and antioxidant defense system during development? Medical Journal of Islamic World Academy of Sciences. 15: 55–63.

AMIARD-TRIQUET, C.; BERTHET, B. (2015) Individual biomarkers. In: AMIARDTRIQUET, C.; AMIARD, J.C., MOUNEYRAC, C. Aquatic ecotoxicology. Advancing tools for dealing with emerging risks. Elsevier, cap. 7, p. 153-182.

AN, M.I.; CHOI, C.Y. (2010) Activity of antioxidant enzymes and physiological responses in ark shell, *Scapharca broughtonii*, exposed to thermal and osmotic stress: effects on hemolymph and biochemical parameters. Comparative Biochemical Physiology B. 155: 34-42.

AYRES-PERES, L. et al. (2015) How variable is agonistic behavior among crab species? A case study on freshwater anomurans (Crustacea: Decapoda: Aeglidae). Journal of Zoology. 297: 115–122.

BLOKHINA, O.; VIOLAINEN, E.; FAGERSTEDT, K. V. (2003) Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. Annals of Botany. 91: 179-194.

BOND-BUCKUP, G.; BUCKUP. L. (1999) Família *Aeglidae* (Caranguejos anomuros de água doce). In: BUCKUP. L.; BOND-BUCKUP, G. Os Crustáceos do Rio Grande do Sul. Porto Alegre: Ed. Universidade/ UFRGS, p.362-382.

BOND-BUCKUP, G. (2003) Família *Aeglidae*. *In*: MELO, G. A. S. Manual de identificação dos Crustacea Decapoda de água doce do Brasil, São Paulo: Loyola. p. 21-116.

BOND-BUCKUP, G. et al. (2003) Crustáceos. *In*: FONTANA, C.S.; BENCKE, G.A.; REIS, R.E. Livro Vermelho da Fauna Ameaçada de Extinção no Rio Grande do Sul. Porto Alegre: Edipucrs. p.73-83.

BONE, J.W.P. et al. (2014) Using biochemical markers to assess the effects of imposed temperature stress on freshwater decapod crustaceans: *Cherax quadricarinatus* as a test case. Journal of Comparative Physiology. 185:291-301.

BRIFFA, M.; BRIDGER, D.; BIRO, P. A. (2013). How does temperature affect behaviour? Multilevel analysis of plasticity, personality and predictability in hermit crabs. Animal Behaviour. 86: 47- 54.

BROUWER, M. et al. (2007). Molecular and whole animal responses of grass shrimp, *Palaemonetes pugio*, exposed to chronic hypoxia. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology. 341: 16–31.

CAIRNS, J, et al. (1975) The effects of temperature upon the toxicity of chemicals to aquatic organisms. Hydrobiologia. 47: 135–171.

CEREZER, C. et al. (2016). Avoid predation or take risks in basic activities? Predator–prey relationship in subtropical streams between decapods and caddisflies. Marine and Freshwater Research. 67: 1880-1887.

CHILDRESS, J.J.; SEIDEL, B.A. (1998). Life at stable low oxygen levels: adaptations of animals to oceanic oxygen minimum layers. Journal of Experimental Biology. 201: 1223–1232.

COGO, G. B.; SANTOS, S. (2013) The role of aeglids in shredding organic matter in Neotropical streams. Journal of Crustacean Biology. 33: 519–526.

COGO, G.B. et al. (2014) The effect of the macroconsumer *Aegla longirostri* (Crustacea, Decapoda) on the invertebrate community in a subtropical stream. Acta Limnologica Brasiliensia (Online). 143-153.

CORREIA, A.D. et al. (2003) Age-related changes in antioxidant enzyme activities, fatty acid composition and lipid peroxidation in whole body *Gammarus locusta* (Crustacea: Amphipoda). Journal of Experimental Marine Biology and Ecology. 289: 83–101.

DÍAZ, R.J.; RABALAIS, N.N. (2010) Land-based activities and coastal and marine hypoxia: Global assessment of coastal low dissolved oxygen environments and water quality interactions. Rome, FAO.

DOHERTY, V. F.; OGUNKUADE, O. O.; KANIFE, C. U. (2010) Biomarkers of oxidative stress and heavy metal levels as indicators of environmental pollution in some selected fishes in Lagos, Nigeria. American-Eura. Journal of Agriculture and Environmental Sciences. 7: 359-365.

EHRENBRINK, G. et al. (2006). Antioxidant enzymes activities and protein damage in rat brain of both sexes. Experimental Gerontology. 41: 368-371.

FELTEN, V.; GUEROLD, F. (2001) Hyperventilation and loss of hemolymph Na and Cl in the freshwater amphipod *Gammarus fossarum* exposed to acid stress: a preliminary study. Diseases of Aquatic Organisms. 45: 77–80.

FERRARI, C.K. (2000) Free radicals, lipid peroxidation and antioxidants inapoptosis: implications in câncer, cardiovascular and neurological diseases. Biologia. 55: 581-590.

FRIDOVICH, I. (1989) Superoxide dismutases. An adaptacion to a paramagnetic gas. Journal of Biological Chemistry.264: 7761-7764.

GE, W. et al. (2015) Oxidative Stress and DNA Damage Induced by Imidacloprid in Zebrafish (*Danio rerio*). 63:1856-62.

GRAY, J. S.,et al. (2002) Effects of hypoxia and organic enrichment on the coastal marine environment. Marine Ecology Progress. 238: 249-279.

GRAYMORE, M. et al. (2001) Impacts of atrazine in aquatic ecosystems. Environment Internatinal. 26: 483–495.

HALLIWELL, B. (1994). Free radicals, antioxidants and human disease: curiosity, cause or consequence. Lancet. 344: 721–724.

HOCHACHKA, P.W. (1980). Living without oxygen. Closed and Open Systems in Hypoxia Tolerance. Harvard University Press, New York.

HOCHACHKA, P.W.; LUTZ, P.L. (2001) Mechanism, origin, and evolution of anoxia tolerance in animals. Comparative Biochemical Physiology. 130: 435–459.

HOCHACHKA, P.W.; SOMERO, G.N. (2002) Biochemical adaptation: mechanism and process in physiological evolution. Oxford University Press. 478 p.

IPCC (Intergovernmental Panel on Climate Change) (2007) Fourth assessment report. New York: Cambridge University Press.

JEMEC, A. et al. (2007) Comparative toxicity of imidacloprid, of its commercial liquid formulation and of diazinon to a non-target arthropod, the microcrustacean *Daphnia magna*. Chemosphere. 68: 1408–1418.

LEMAIRE, P.; LIVINGSTONE, D.R. (1993) pro-oxidant/antioxidant processes and organic xenobiotic interactions in marine organisms, in particular the flounder *Platichthys flesus* and the mussel *Mytillus edulis*. Trends in Comparative Biochemistry Physiology. 1: 1119-1150.

LE MOULLAC, G.; HAFFNER, P. (2000) Environmental factors affecting immune responses in Crustacea. Aquaculture. 191: 121-131.

LIVINGSTONE, D. R.; PIPE, R. K. (1992) Mussels and environment contaminants: molecular and cellular aspects. In *The Mussel Mytilus:* Ecology, Physiology, Genetics and Culture, ed. E. Gosling. Elsevier Science Publishers. 25: 425-464.

LIVINGSTONE, D.R. (2001) Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. Marine Pollution Bulletin. 42: 656-666.

LIVINGSTONE, D.R. (2003) Oxidative stress in aquatic organisms in relation to pollution and aquaculture. Revue de Médecine Vétérinaire. 154: 427-430.

LÓPEZ-DOVAL, J. C.; BARATA, C.; DÍEZ, S. (2015) El uso de organismos como indicadores de la contaminación y evaluación del riesgo sobre el ecosistema acuático en el embalse de Flix (Cataluña, NE de España). In: POMPÊO, M. et al. Ecologia de reservatórios e interfaces. São Paulo: Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. cap. 1, p.1-32.

LORO, V.L. et al. (2015a) Spatial and temporal biomarkers responses of *Astyanax jacuhiensis* (Cope, 1894) (Characiformes: Characidae) from the middle rio Uruguai, Brazil. Neotropical Ichthyology. 13: 569–578.

LORO, V. L et al. (2015b) Glyphosate-based herbicide affects biochemical parameters in *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824) and *Leporinus obtusidens* (Valenciennes, 1837). Neotropical Ichthyology. 13: 229-236.

LUSHCHAK, V.I.; BAGNYUKOVA T.V. (2006a) Temperature increase results in oxidative stress in goldfish tissues. 1. Indices of oxidative stress. Comparative Biochemistry and Physiology. 143: 30-35.

LUSHCHAK, V. I. (2011) Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. Aquatic Toxicology: 101: 13-20.

LUTZ, P.L.; STOREY, K.B. (1997) Adaptations to variations in oxygen tension by vertebrates and invertebrates. In: Dantzler, W.H. (Ed.), Handbook of Physiology, Section 13: Comparative Physiology. Oxford University Press, Oxford. 2: 1479–1522.

MADEIRA, D. et al. (2013) Influence of temperature in thermal and oxidative stress responses in estuarine fish. Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, 166: 237–243.

MALTBY, L. et al. (2002) Evaluation of the *Gammarus pulex* in situ feeding assay as a biomonitor of water quality: robustness, responsiveness and relevance. Environmental Toxicology and Chemistry. 21: 361–368.

MALEV, et al. (2012) Comparative toxicity of imidacloprid and its transformation product 6-chloronicotinic acid to non-target aquatic organisms: Microalgae *Desmodesmus subspicatus* and amphipod *Gammarus fossarum*. Pesticide Biochemistry and Physiology.104:178–186.

MATEO-SAGASTA, J.; BURKE, J. (2010). Agriculture and water quality interactions: a global overview. SOLAW Background thematic report- tr08. FOOD and agriculture organization of the United nations, Rome.

MCGAW, I. J. (2003). Behavioral Thermoregulation in Hemigrapsus nudus, the Amphibious Purple Shore Crab. *Biological Bulletin.* 204**:** 38–49.

MENEZES, C. et al. (2016) Effects of diphenyl diselenide on growth, oxidative damage, and antioxidant response in silver catfish. Science of the Total Environment. 542: 231-237.

MILLS, C.L.; SHUKLA, D.H.; COMPTON, G.J. (2006) Development of a new low cost high sensitivity system for behavioural ecotoxicity testing. Aquat Toxicol 77, Lawrence AJ, Poulter C (1998) Development of a sublethal pollution bioassay using the estuarine amphipod *Gammarus duebeni*. Water Research. 32: 569–578.

MARINS, A. T. (2016). Efeito de dieta suplementada com selênio em carpas (*cyprinus carpio*) expostas a atrazina. Dissertação (mestrado em Biodiversidade Animal) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS. 44 p.

MORAES, J. C. B. et al., (2016). Morphological and molecular data reveal the cryptic diversity among populations of *Aegla paulensis* (Decapoda, Anomura, Aeglidae), with descriptions of four new species and comments on dispersal routes and conservation status. Zootaxa. 4193: 1-48.

NWANI, C. D et al. (2010) Toxicity of the herbicide atrazine: Effects on lipid peroxidation and activities of antioxidant enzymes in the freshwater fish *Channa Punctatus* (Bloch). International Journal of Environmental Research and Public Health. 7: 3298–3312.

PISA, L.W.; et al (2015) Effects of neonicotinoids and fipronil on non-target invertebrates. Environ. Science Pollution Research. *22*, 68-102.

PISOSCHI, A. M.; POP, A. (2015) The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. European Journal of Medicinal Chemistry. 97: 55-74.

PÖRTNER, H.O. (2009) Oxygen- and capacity-limitation of thermal tolerance: a matrix for integrating climate-related stressor effects in marine ecosystems. The Journal of Experimental Biology. 213: 881-893.

POWELL, M.L.; WATTS, S.A. (2006) Effect of temperature acclimation on metabolism and hemocyanin binding affinities in two crayfish, *Procmbarus clarkia* and *Procambarus zonangulus*. Comparative Biochemical Physiology. 144: 211-217.

RABALAIS, N.N. et al. (2010) Dynamics and distribution of natural and human-caused hypoxia. Biogeosciences. 7: 585–619.

ROBINSON, J. (1986). Evaluation of a health assessment index with reference to bioaccumulation of Metals in *Oreochromis Mossambicus* (Peters, 1852) and aspects of the morphology of *Lernaea cyprinacea*, Linnaeus, 1758", M.Sc. Thesis, Rand Afrikaans University, South Africa.

SANTOS, S. et al. (2014) Aeglidae (Decapoda, Anomura) from Uruguay, with description of a new species of *Aegla*. Crustaceana Monographs. 19: 195-2015.

SHIRMARDI, M.; et al. (2016) Removal of atrazine as an organic micro-pollutant from aqueous solutions: a comparative study. Process Safety and Environmental Protection.103: 23-35.

SILVA, C.M.M.; FAY, E.F. (2004) Agrotóxicos e ambiente. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica.

SOKOLOVA, I.M.; LANNIG, G. (2008) Interactive effects of metal pollution and temperature on metabolism in aquatic ectotherms: implications of global climate change. Climate Research. 37: 181–2001.

SOLOMON, K. R.; et al. (2014) Effects of herbicides on Fish. In: TIERNEY, K. B.; FARREL, A. P.; BRAUNER, C. J. Organic chemical toxicology of fishes. Elsevier. Cap. 7, p.370-403.

STEINBERG, C.E.W. et al. (2006) Dissolved humic substances – ecological driving forces from the individual to the ecosystem level? Freshwater Biology. 51: 1189-1210.

STEINBERG, C.E.W.; STÜRZENBAUM, S.R.; MENZEL, R. (2008) Genes and environment - striking the fine balance between sophisticated biomonitoring and true functional environmental genomics. Science of the Total Environment**.** 400: 142-161.
SWACKHAMER D. L. et al. (2004) Issues in Ecology: Impacts of Atmospheric Pollutants on Aquatic Ecosystems. Ecological Society of America. 12: 2-23.

TIMOFEYEV, M.A. et al. (2006a) Specific antioxidants reaction to oxidative stress promoted by natural organic matter (NOM) in two endemic amphipod species from Lake Baikal**.** Environmental Toxicology**.** 21: 104-110.

TIMOFEYEV, M.A. et al.(2006 b) Natural organic matter (NOM) induces oxidative stress response in freshwater amphipods *Gammarus lacustris* Sars and *G. tigrinus* (Sexton). Science of the Total Environment. 366: 673–681.

TOMITA, R. Y.; BEYRUTH, Z. (2002) Toxicologia de agrotóxicos em ambiente aquático. Biológico, São Paulo. 64: 135-142.

TREVISAN, A.; HEPP, L. U.; SANTOS, S., (2009). Abundância e distribuição de Aeglidae (Crustacea, Anomura) em função do uso da terra na bacia hidrográfica do rio Jacutinga (Rio Grande do Sul - Brasil). Revista Brasileira de Zoologia (Impresso). 26: 419-426.

UN-WATER. (2009) The United Nations World Water Development Report 3: Water in a changing world. Paris and London, UNESCO and Earthscan, pp 127-149.

VAQUER-SUNYER, R.; DUARTE, C.M. (2008) Thresholds of hypoxia for marine biodiversity. Proceedings of the National Academy of Sciences U. S. A. 105: 15452–15457.

VIEIRA, C.E.D. et al. (2016) Multiple biomarker responses in *Prochilodus lineatus* subjected to short-term in situ exposure to streams from agricultural areas in Southern Brazil, Sci. Total Environ. 542, Part, 44–56.

VINAGRE, C. et al. (2014) Effect of increasing temperature in the differential activity of oxidative stress biomarkers in various tissues of the Rock goby, *Gobius Paganellus*. Marine Environmental Research**.** 97: 10- 14.

WALLACE, W.G.; ESTEPHAN, A. (2004) Differential susceptibility of horizontal and vertical swimming activity to cadmium exposure in a gammaridean amphipod (*Gammarus lawrencianus*). Aquatic Toxicology. 69: 289–297.

WALTHER, G. et al. (2002) Ecological responses to recent climate change. Nature. 416: 389–395.

WALKER, C.H.; HOPKIN, S.P.; SIBLY, R.M.; PEAKALL, D.B. (1996) Principles of Ecotoxicology. Taylor & Francis, Bristol, PA.

WANG, W. et al. (2006) Effects of temperature on growth, adenosine phosphates, ATPase and cellular defense response of juvenile shrimp *Macrobrachium nipponense*. Aquaculture. 256: 624-630.

WANNAMAKER, C.M.; RICE, J.A. (2000) Effects of hypoxia on movements and behavior of selected estuarine organisms from the southeastern United States. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**.** 249: 145–163.

WILLMER, P. et al. (2000) Environmental physiology of animals. Oxford: Blackwell Science.

WINSTON, G.W.; DI GIULIO, R.T. (1991) Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. Aquatic Toxicology. 19: 137-161.

WU, R. S. (2002) Hypoxia: from molecular responses to ecosystem responses. Marine Pollution Bulletin. 45: 35-45.

YAU-HUEI, W.; HSIN-CHEN, L. (2002) Oxidative stress, mitochondrial DNA mutation, and impairment of antioxidant enzymes in aging. Experimental Biology and Medicine. 227: 671-682.

MANUSCRITO 1:

Efeito da temperatura da água no comportamento e parâmetros oxidantes de *Aegla longirostri* (Crustacea, Anomura, Aeglidae).

Cristina Cerezer, Bruna Ceretta Ferreira, Jossiele Wesz Leitemperger, Aline Monique Blank do Amaral, Vania Lucia Loro, Marlise Ladvocat Bartholomei-Santos e Sandro Santos

Resumo

Considerando uma possível elevação na temperatura média mundial com consequências negativas acentuadas para organismos límnicos, foram analisadas as respostas comportamentais, a letalidade e o sistema de defesa antioxidante no crustáceo de água doce *Aegla longirostri*. Os animais foram expostos, em condições laboratoriais, a temperaturas de 18ºC, 21°C, 24°C e 26ºC durante 48 horas. O aumento da temperatura afetou significativamente não só a resposta comportamental, mas também os níveis de todos os antioxidantes testados em *A. longirostri* em diferentes tecidos, com a exceção do nível de tióis não proteicos em hepatopâncreas. Houve aumento dos níveis de atividade da catalase (CAT) no hepatopâncreas e de acetilcolinesterase (AChE) no músculo, danos oxidativos em lipídios (TBARS) no músculo e nas brânquias, aumento nos níveis da proteína carbonil (PC) em hepatopâncreas e de tióis não proteicos em brânquias. Entretanto, a atividade de glutationa-S-tranferase (GST) diminuiu com o aumento da temperatura. Nós demonstramos que a variação na temperatura, mesmo em um experimento a curto prazo, é capaz de induzir uma variação no comportamento de atividade e no tempo de reação, retorno a posição inicial, dos crustáceos. Esses resultados permitem uma predição das consequências que o aumento da temperatura global exercerá em organismos ectotérmicos como *A. longirostri*, causando alterações em seu sistema de defesa antioxidante e podendo afetar a sobrevivência dos organismos.

Palavras Chave: Enzimas antioxidantes, dano oxidativo, nível de atividade, equilíbrio

1- INTRODUÇÃO

De acordo com o IPCC (2014) - Intergovernamental Panel on Climate Change - é previsto que a temperatura global do ar aumente em até 4,8ºC até 2100. Para cada grau aumentado na temperatura do ar pode-se esperar um aumento de 0,3-0,9ºC na água dos riachos, evidenciando uma relação direta entre a temperatura do ar, e da água (LANGAN et al., 2001; MORRILL et al., 2005; KOYCHEVA, KARNEY, 2009). Os riachos de pequena ordem, com vegetação ripária, apresentam microclima diferenciado, como temperatura baixa e pouca luminosidade, por isso são particularmente mais sensíveis às mudanças de temperatura (STEFAN, SINOKROT, 1993). O aumento na temperatura nestas áreas, por sua vez, teria consequências mais diretas e acentuadas para animais ectotérmicos, que regulam sua temperatura corporal através da temperatura ambiente (SOKOLOVA, 2008).

As alterações na temperatura podem afetar as taxas fisiológicas, as reações bioquímicas e a absorção de alimentos, o que pode interferir na distribuição de espécies aquáticas. Dependendo do impacto das alterações, este fenômeno pode inclusive, conduzir à extinção de populações, o que contribuiria para o aumento da vulnerabilidade do ecossistema (CAIRNS et al., 1975; WILLMER et al., 2000; WALTHER et al., 2002; HOCHACHKA et al., 2002; SOKOLOVA, 2008). Além de afetar o crescimento e a sobrevivência dos animais aquáticos (WANG et al., 2006), a temperatura da água também pode causar mudanças no potencial tóxico de poluentes presentes nestes ambientes (IPCC, 2007). Um aumento da temperatura resulta em maior metabolismo e maior captação de poluentes, além de um aumento no consumo de oxigênio e, consequentemente, uma maior produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) (LUSHCHAK, BAGNYUKOVA, 2006; AN, CHOI, 2010). ROS são normalmente eliminadas do organismo através de antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos (BARBOSA et al., 2010). Porém, situações que causem o aumento na produção de EROS, ou desativação das defesas antioxidantes, podem alterar o estado oxidativo do organismo, i.e., provocar estresse oxidativo (BARBOSA et al., 2010).

A temperatura é uma variável abiótica chave no potencial de influenciar o comportamento dos animais, tanto em habitats terrestres como aquáticos (BRIFFA et al., 2013). Estudos comportamentais são utilizados como ferramenta adicional para testes de ecotoxicidade e monitoramento da qualidade da água. Geralmente eles

permitem a associação entre os efeitos tóxicos obtidos em níveis bioquímicos e celulares aos impactos observados na dinâmica de populações e comunidades (FELTEN et al., 2001; MALTBY et al., 2002; WALLACE et al., 2004; MILLS et al., 2006).

Estudos demonstram que a maioria dos caranguejos de água doce tem um risco elevado de extinção, tornando as investigações com esses animais de fundamental importância (CUMBERLIDGE, 2009). Eglídeos, por exemplo, o único grupo de anomuros com ciclo de vida completo em cursos d'água continentais, possui quase 70% das espécies sob algum grau de ameaça (SANTOS et al. *in press*). Nos riachos da América do Sul meridional, os eglídeos são importantes fragmentadores e participam ativamente do processo de decomposição dos detritos foliares (COGO, SANTOS, 2013). *Aegla longirostri*, uma espécies com ampla distribuição, é capaz de fragmentar até 5% da matéria orgânica alóctone que entra nos riachos de pequena ordem (COGO, SANTOS, 2013).

Deste modo, usando-se a espécie *Aegla longirostri* como modelo, pretende-se avaliar as possíveis consequências do aumento na temperatura da água de riachos para o sistema de defesa antioxidante e biomarcadores de dano nos animais. Diferentes tecidos biológicos, bem como alterações comportamentais e a taxa de letalidade serão analisadas. Esperamos que haja o aumento nos níveis das atividades das enzimas assim como um aumento nos biomarcadores de dano, além disso acreditamos que o aumento da temperatura nos riachos seja capaz de induzir uma variação no comportamento de atividade e no tempo de reação dos crustáceos.

2- MATERIAL E MÉTODOS

2.1- LOCAL E COLETA DOS EXEMPLARES

Foram coletados em ambientes lóticos na cidade de Silveira Martins, região central do estado do Rio Grande do Sul, Brasil (29W 35' 38", 53S 33' 17"). O local está sob influência da Floresta Estacional Semidecidual, com vegetação ripária diversa e com aparente ausência de impactos antrópicos. Para as coletas dos indivíduos foram utilizados armadilhas do tipo covo com iscas de fígado e coleta manual. Utilizamos 30 armadilhas, separadas por 10 m uma da outra, colocadas à

tardinha e retiradas na manhã dia seguinte. Os indivíduos capturados foram previamente medidos para padronização utilizando um paquímetro digital (precisão: 0,01mm). Apenas os adultos machos em período de intermuda foram utilizados nos experimentos (animais com mais de 13,7 mm de comprimento do cefalotórax segundo COLPO et al. 2005), pois há diferença nos compostos do hepatopâncreas entre machos e fêmeas, além de que na fase de muda os eglídeos passam por um período em jejum (OLIVEIRA et al., 2003; FERREIRA et al., 2005). Os machos adultos foram transportados ao laboratório para aclimatação.

2.2- DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Durante a aclimatação (no mínimo 7 dias), os animais foram acomodados individualmente em aquários (2L) com temperatura de 18ºC (média da água no ambiente natural destes animais na época da coleta), aeração constante, fotoperíodo controlado (12h luz; 12h escuro), rocha para abrigo e com alimentação *ad libitum* (detritos foliares coletados no riacho).

2.2.1 Alterações na temperatura da água

Sessenta indivíduos foram submetidos a quatro temperaturas diferentes (n=15) durante 48 horas: 18ºC (simulando condições do ambiente natural); 21ºC (temperatura intermediária, 3ºC acima da média); 24ºC (para simular um aumento real da temperatura da água); e 26ºC (temperatura máxima de sobrevivência, observado em experimento piloto). As temperaturas para os tratamentos foram baseadas em dados de trabalhos realizados na região (média da temperatura anual e a máxima da temperatura anual), além de informações do IPCC (2014), que prevê um aumento na temperatura de em média 3ºC podendo chegar a 4,8 ºC nos próximos 100 anos. As demais variáveis abióticas foram mantidas iguais à aclimatação, com oxigênio dissolvido em torno de 8,9 ppm, os animais foram acomodados individualmente em aquários (2L) durante o experimento.

2.2.2 Letalidade

Durante as 48 horas foram contabilizadas as mortes dos animais em cada um dos tratamentos. Este parâmetro permite verificar a amplitude de tolerância térmica dos organismos expostos. Utilizamos a porcentagem de letalidade em cada tratamento.

2.2.3 Comportamento

As observações comportamentais foram realizadas às 10h e às 22h do último dia de exposição. Os animais foram filmados, individualmente no próprio aquário, por 10 minutos (600 s) (Sony® Handycam, modelo HDR-CX560). Durante a noite foram utilizadas lâmpadas incandescentes de cor vermelha, pois os crustáceos têm baixa sensibilidade a este comprimento de onda (TURRA, DENADAI, 2003). A atividade dos eglídeos foi estimada por meio de atos específicos, aos quais atribuem-se escores, conforme Ayres-Perez et al. (2011), adaptado de Dalosto, Santos (2011) (Tabela 1). Para determinar os escores, divide-se os 600 s em intervalos de 10 s (totalizando 60 intervalos) e durante cada intervalo é anotado o escore da atividade predominante (no mínimo 5s, exceto para a atividade *tail flipping*). O escore final é a soma dos escores obtidos em cada intervalo (pode variar de 0: animal inativo a 180: atividade máxima). No experimento de equilíbrio foi medido o tempo gasto (em segundos) pelo animal para retornar ao equilíbrio ao ser virado com parte ventral para cima.

Tabela 1. Descrição dos comportamentos analisados e seus respectivos escores.

Comportamento	Descrição	Escore
Inativo	Ausência de movimento aparente ou somente movimentos de apêndices cefálicos (antenas, antênulas, e/ou maxilípedes)	0
Atividade baixa	Movimentos de quelipodos, pereópodos, pleópodos e/ou curtos movimentos dos animais	1
Atividade moderada	Movimento ativo do animal pelo aquário	2
Atividade intensa	*Tail flipping.*	3

Adaptado de Dalosto e Santos 2011

2.3 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

Após a exposição aos tratamentos os animais foram crioeutanásiados e seus tecidos congelados a -20ºC para analises posteriores. Foram dissecados brânquias, hepatopâncreas e músculo para as análises (n=10), cada indivíduo foi analisado separadamente.

Os tecidos foram homogeneizados e diluídos em Tris-HCl 50 mM. O homogeneizado foi centrifugado a 3.000rpm por 10 min. Após a centrifugação o sobrenadante (amostra) foi separado em alíquotas em tubos do tipo *eppendorf* para cada um dos procedimentos.

A dosagem de proteína foi determinada de acordo com Bradford (1976), a albumina de soro bovino foi utilizada como padrão.

O nível de peroxidação lipídica foi determinado em brânquias, hepatopâncreas e músculo pelo método de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), de acordo com Buege, Aust (1978). Os níveis de TBARS foram expressos como nmol de MDA/mg de proteína.

A atividade da enzima glutationa S-transferase (GST) foi determinada em brânquias, hepatopâncreas e músculo de acordo com o método descrito por Habig et al. (1974) usando 1-cloro-2, 4-dinitrobenzeno (CDNB) como substrato. A atividade da GST foi expressa em µmol GS-DNB/min/mg de proteína.

A determinação de tióis não proteicos (NPSH) foi realizada em brânquias, hepatopâncreas e músculo segundo Ellman (1959). Esse antioxidante foi expresso em µmol de SH/g de tecido.

O conteúdo de proteína carbonilada foi analisada em brânquias, hepatopâncreas e músculo pelo método descrito por Yan et al. (1995). O conteúdo de proteína carbonilada foi expressa em nmol de proteína carbonilada/mg de proteína.

A atividade da catalase (CAT) foi investigada em hepatopâncreas de acordo com o método Nelson, Kiesow (1972). A atividade da CAT foi expressa em µmol/min/mg de proteína.

Determinou-se atividade de acetilcolinesterase (AChE) em músculo de acordo com método descrito por Ellman, Courtney, Andres (1961). A atividade de AChE foi expressa como µmol/min/mg de proteína.

Todas as análises foram ajustadas para leitura em placa de 96 poços no espectrofotômetro de leitura em placas, exceto CAT que foi lida em cubetas de quartzo no espectrofotômetro padrão.

2.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados foram previamente testados quanto à normalidade pelo teste de Kolmogorov–Smirnov e a homogeneidade pelo teste de Levene. ANOVA de uma via com teste Tukey foi usada para comparar os dados entre diferentes temperaturas. Para dados não paramétricos foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis. Os procedimentos estatísticos foram realizados no GraphPad Prism 6.

3- RESULTADOS

3.1 COMPORTAMENTO

Durante a noite (22h), os animais expostos à temperatura mais alta (26ºC) apresentaram menor nível de atividade em comparação às temperaturas intermediárias 21 e 24ºC (*p <0,05*) (Figura 1A). Entretanto, durante o dia (10h) a atividade foi maior nas temperaturas mais altas (24 e 26ºC) em relação a temperatura mais baixa (18ºC) (Figura 1B). Observou-se que tanto às 22 horas como às 10 horas em temperaturas mais baixas (18 e 21ºC) os animais retornam mais rapidamente ao seu equilíbrio (*p<0,05*) (Figura 2A e 2B).

Figura 1: Escore de atividade às 22h (A) e às 10h (B) em diferentes temperaturas. Letras demonstram valores significativamente diferentes nos testes. Os dados são reportados como média ± erro padrão (N = 10). Diferentes letras indicam diferenças entre os grupos (p <0,05).

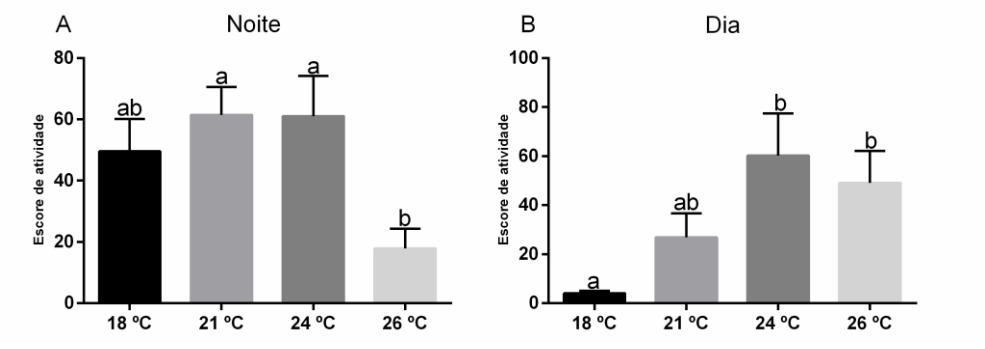
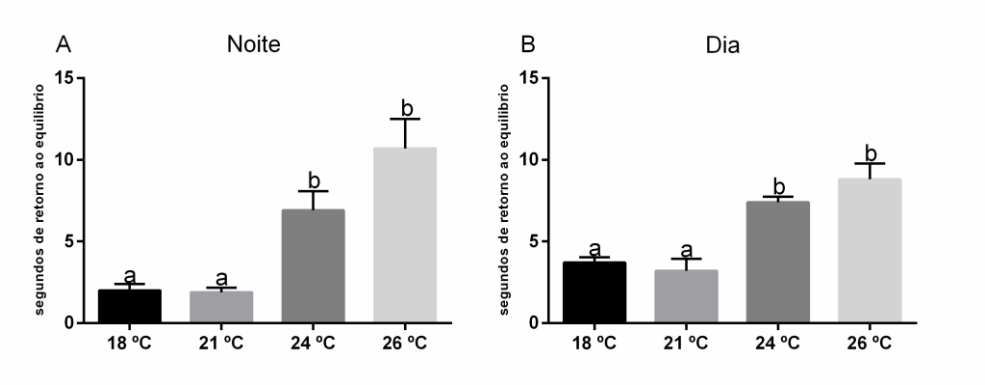


Figura 2: Tempo em segundos que o animal demora a retornar ao equilíbrio em diferentes temperaturas analisado às 22h (A) e às 10h (B). Os dados são reportados como média ± erro padrão (N = 10). Diferentes letras indicam diferenças entre os grupos (p <0,05).



3.2 LETALIDADE

A letalidade foi maior em temperaturas mais altas chegando a aproximadamente 30% em 26ºC, sendo que em 18ºC não houveram mortes.

Tabela 2- Porcentagem de sobrevivência e letalidade em cada temperatura testada incluindo uma temperatura considerada a máxima suportada.

%	Temperatura (ºC)			
	18	21	24	26
Sobrevivência	100	93,4	80	73,3
Letalidade	0	6,6	20	26,7

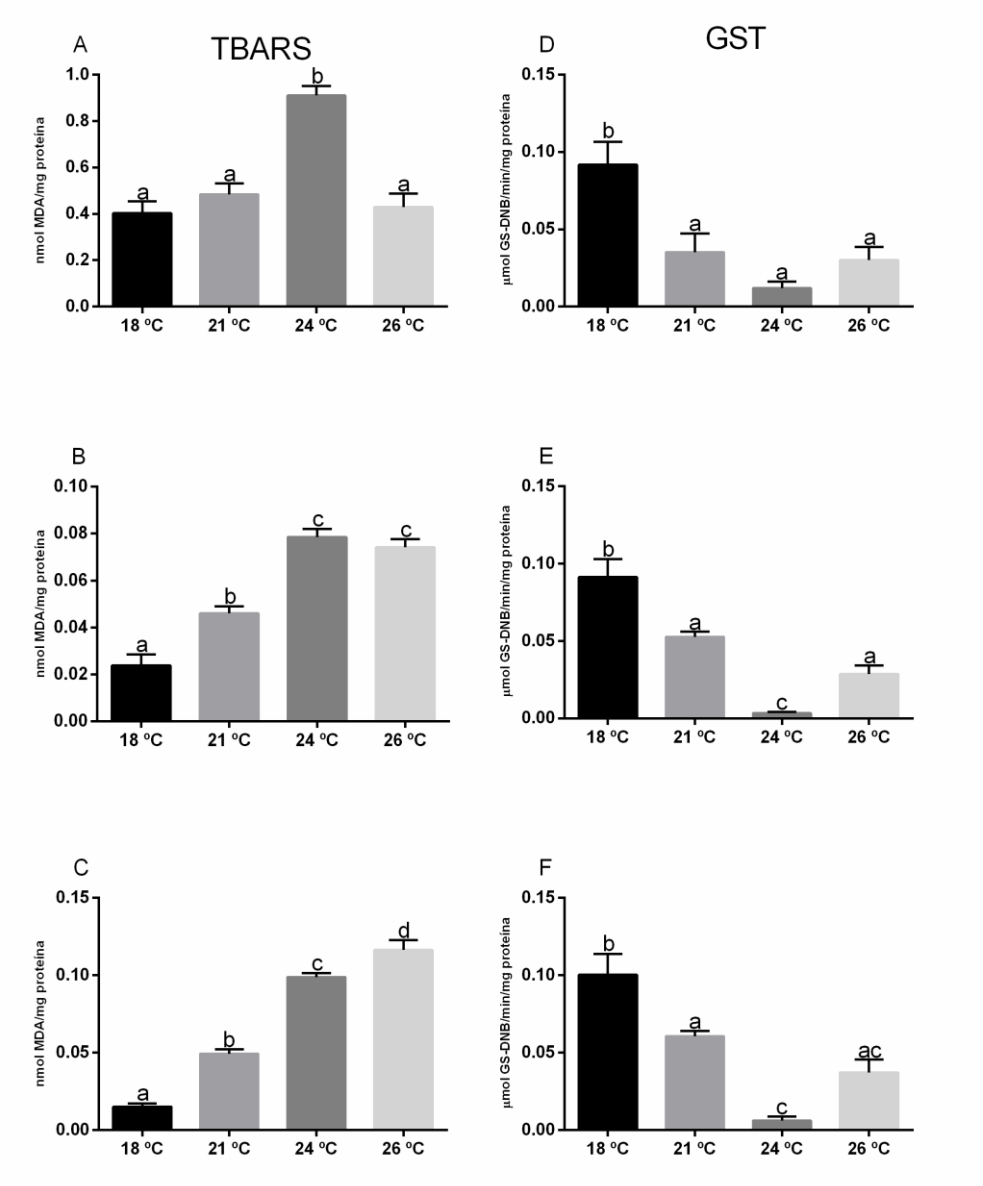
3.3 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

No hepatopâncreas houve aumento de TBARS apenas na temperatura 24ºC em comparação com as demais temperaturas (p <0,0001) (Figura 3A). Em músculo, os níveis do TBARS a 24 e 26ºC aumentaram quando comparados à temperatura de 18ºC, mas não diferiram entre si e também os níveis de TBARS aumentou na temperatura de 21 ºC em comparação a 18 ºC (Figura 3B). A peroxidação lipídica em brânquias aumentou conforme o aumento da temperatura (p <0,0001) (Figura 3C).

No hepatopâncreas o aumento da temperatura provocou uma diminuição da atividade de GST na temperaturas de 21, 24 e 26 ºC quando comparado a 18ºC (p <0,0001) (Figura 3D). No músculo e nas brânquias, a atividade de GST diminuiu

significativamente a 24ºC, sendo maior a atividade em 18ºC (Figura 3E e 3F). A atividade de GST em brânquias diminuiu nas demais temperaturas quando comparados a 18ºC e houve uma diminuição de GST na temperatura 24ºC em comparação com duas temperaturas mais baixas (p <0,0001) (Figura 3F).

Figura 3: Níveis de TBARS em hepatopâncreas (A), músculo (B) e brânquias (C) e Atividade da GST em hepatopâncreas (D), músculo (E) e brânquias (F), nas quatro diferentes temperaturas. Os dados são reportados como média ± erro padrão (N = 10). Diferentes letras indicam diferenças entre os grupos conforme teste de tukey (p <0,05).

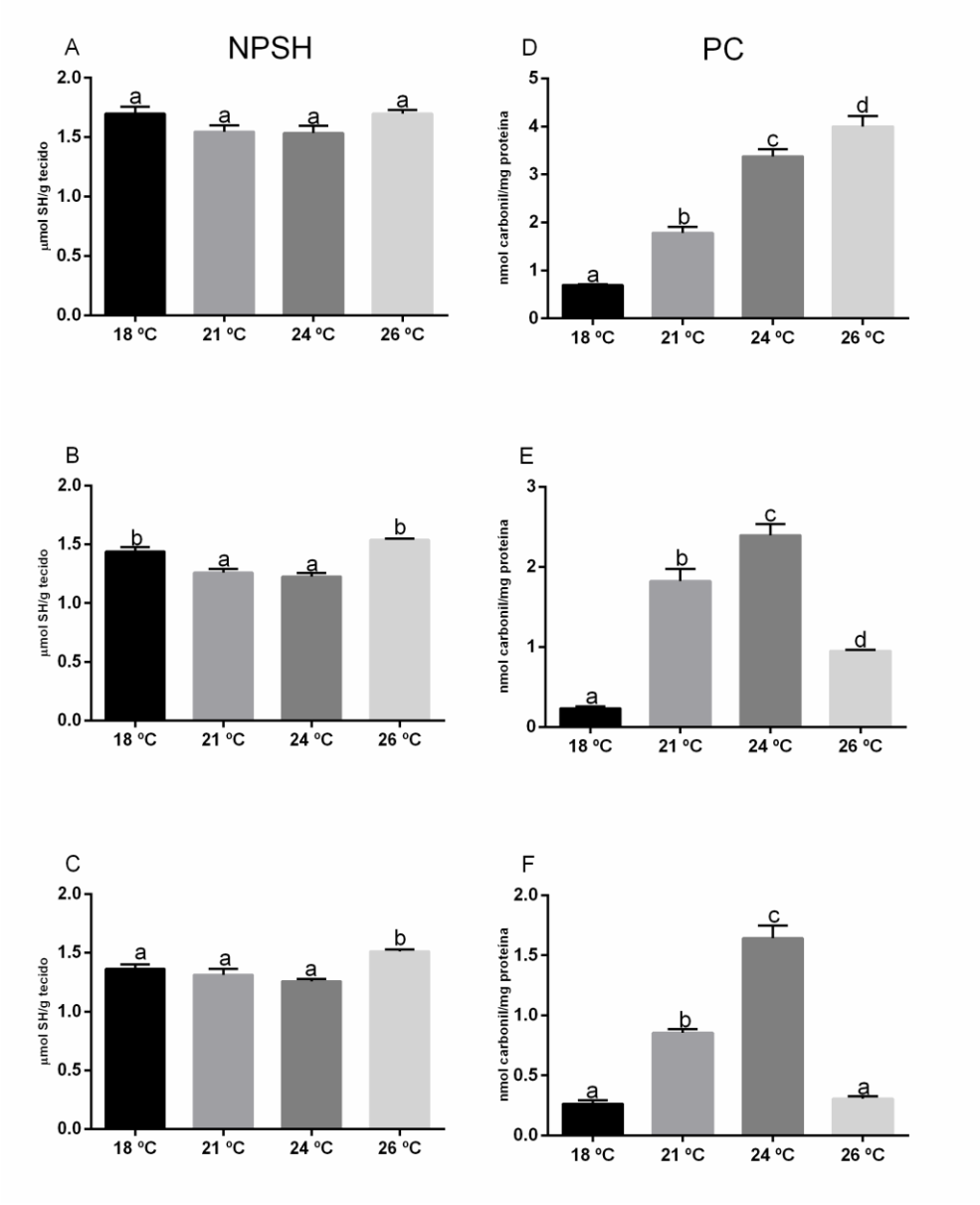


Em relação aos resultados dos tióis não proteicos, no hepatopâncreas não foram encontrados diferenças significativas nas diferentes temperaturas (Figura 4A). Em músculo houve diminuição de tióis em 21 e 24ºC em relação a 18 e 26ºC (Figura

4B). A exposição à temperatura mais alta 26ºC proporcionou um aumento de tióis em brânquias em contraste com as demais temperaturas (p <0,0001) (Figura 4C).

A proteína carbonil aumentou no hepatopâncreas com o aumento da temperatura (p <0,0001) (Figura 4D). Em músculo e brânquias a proteína carbonil aumentou nas temperaturas intermediarias 21 e 24ºC em comparação as demais, mas todas as temperaturas diferiram entre si (p <0,0001) (Figura 4E e 4F).

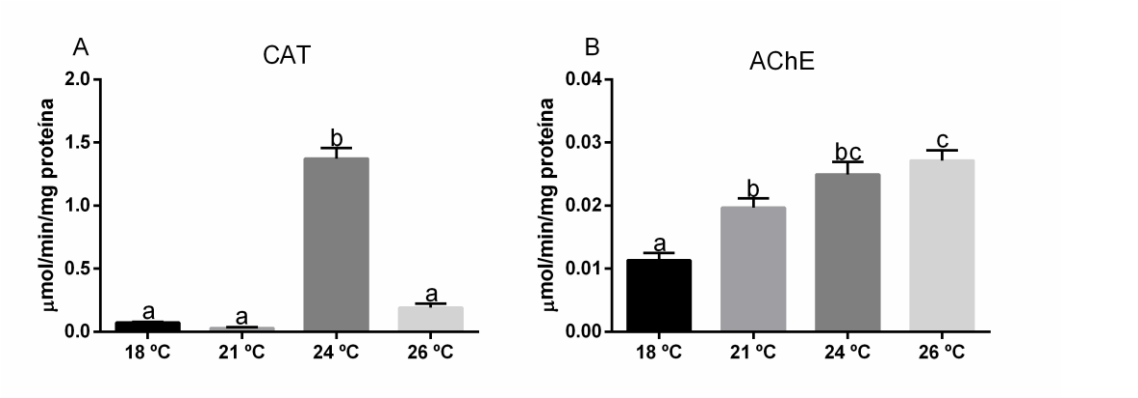
Figura 4: Concentrações de tióis não proteicos (NPSH) em hepatopâncreas (A), músculo (B) e brânquias (C) e níveis da proteína carbonil (PC) em hepatopâncreas (D), músculo (E) e brânquias (F) nas quatro diferentes temperaturas. Os dados são reportados como média ± erro padrão (N = 10). Diferentes letras indicam diferenças entre os grupos (p <0,05).



Houve aumento na atividade da CAT no hepatopâncreas apenas na temperatura 24ºC em comparação com as demais temperaturas (p <0,0001) (Figura 5A).

A atividade da AChE em músculo aumentou conforme o aumento da temperatura, sendo que a temperatura mais alta 26ºC e a mais baixa 18ºC diferiram das demais (p <0,0001) (Figura 5B).

Figura 5: A) Níveis de atividade da CAT no hepatopâncreas. B) Níveis de atividade da AChE em músculo nas quatro diferentes temperaturas. Os dados são reportados como média ± erro padrão (N = 10). Diferentes letras indicam diferenças entre os grupos (p <0,05).



4- DISCUSSÃO

Os organismos possuem amplitudes de tolerância a diversos fatores abióticos, incluindo a temperatura. Fora do intervalo de máxima e de mínima tolerância, a sobrevivência dos seres vivos é afetada. A exposição a diferentes temperaturas foi capaz de induzir inúmeras respostas tanto comportamentais, como fisiológicas em *Aegla longirostri*. Em temperaturas mais altas, os animais apresentaram menor atividade em relação a sua temperatura “ideal” (18ºC) durante a noite. Porém, durante o dia, houve aumento da atividade em temperaturas mais altas. Os eglídeos são mais ativos no período noturno (SOKOLOWICZ et al., 2007), de forma que este resultado pode indicar uma inversão de hábitos em um ambiente com temperaturas mais elevadas. A inversão do período de maior atividade pode ser prejudicial em vários aspectos, podendo interferir não só nos hábitos alimentares como também reprodutivos. Além disso, o tempo de retorno à posição de locomoção após os animais serem colocados com o abdome para cima aumentou com a elevação da temperatura, tanto no período diurno quanto no noturno. Com maior atividade durante o dia e

resposta de retorno ao equilíbrio mais lenta em temperaturas mais elevadas, eles estarão mais sujeitos à predação, o que poderia afetar a dinâmica populacional.

Alguns estudos revelam que crustáceos decápodes submetidos a estresse térmico podem diminuir o gasto de energia reduzindo o seu metabolismo para manter as funções de sobrevida basais (THEBAULT, RAFFIN, 1991; LAGERSPETZ, VAINIO, 2006). Os crustáceos procuram evitar temperaturas mais altas mudando a sua atividade locomotora (LOZÁN, 2000), normalmente aumentando a atividade em sua temperatura ideal (LAGERSPETZ, VAINIO 2006), em concordância com os resultados deste experimento no período noturno. Como em temperaturas mais altas os animais precisam de mais energia para manter a sua temperatura corporal, esta estratégia pode ter sido utilizada para economizar energia.

O aumento da temperatura da água também foi capaz de causar alterações nos parâmetros bioquímicos em *Aegla*. Os resultados apontam para uma clara relação entre temperatura e peroxidação lipídica (MADEIRA et al 2014; VINAGRE et al 2014 A e B). Os níveis de TBARS foram maiores em temperaturas mais altas tanto em músculo quanto em brânquias, sendo proporcional ao aumento da temperatura. Em hepatopâncreas também há aumento no nível do dano lipídico a 24ºC, mas em 26ºC há uma redução. Isto pode ser explicado pela redução no comportamento dos animais nesta temperatura. Esse aumento nos níveis de TBARS indica danos em lipídios, principal constituinte das membranas celulares, o que poderia trazer lesões irreversíveis às células. A peroxidação lipídica é um biomarcador de dano e ocorre quando radicais livres reativos interagem com ácidos graxos, especialmente os insaturados, causando reações em cascata, o que é prejudicial a membranas biológicas (GUTTERIDGE 2010; DELL'ANNA 2007). Outros trabalhos confirmam que a temperatura influencia no aumento dos níveis de peroxidação lipídica (MADEIRA et al. 2014). VINAGRE et al. (2014 A) também observaram em camarões costeiros picos mais elevados desse biomarcador em temperaturas intermediárias, seguido por baixos níveis a temperaturas mais elevadas de TBARS.

Aegla expostas a temperaturas mais altas mostraram uma diminuição significativa na atividade de GST em 24ºC e elevados níveis em sua temperatura ótima 18ºC. Glutationa S-transferase é uma enzima significativa no processo de detoxificação (HAMILTON, 2003; COLES, 2001; HAYES 2005). Estas variações podem não estar associadas à elevação na temperatura, e sim, a fatores intrínsecos como época reprodutiva. Avaliando respostas de *Carcinus maenas* a variações na

temperatura (5, 22 e 27ºC), RODRIGUES et al. (2015) encontraram que a temperatura não afetou a atividade de GST; apenas outra enzima, superóxido dismutase, diminuiu sua atividade a 5ºC em relação a 22ºC. Porém existem estudos que revelam resultados semelhantes ao que encontramos, onde a atividade da GST diminui em altas temperaturas em camarões costeiros (VINAGRE et al., 2014a).

Os tióis não proteicos têm capacidade antioxidante atuando contra a formação de radicais livres na manutenção do balanço redox celular e em defesa contra agentes eletrofílicos (REISCHL et al., 2007). O aumento dos níveis de NPSH de *Aegla* exposta à temperatura de 26ºC em brânquias pode ser uma resposta protetora. Mas por abranger diversas moléculas envolvidas em vias diferentes do metabolismo, os níveis de NPSH oscilam em função disso.

O aumento da temperatura também favoreceu significativamente a formação de proteína carbonil. Os níveis de proteína carbonilada serve como biomarcador de danos oxidativos de proteínas (DAYANAND et al., 2012). Assim, como observado na peroxidação lipídica, a 26ºC houve uma mudança no comportamento e uma diminuição da proteína carbonil em músculos e brânquias. A oxidação de proteínas, bem como de lipídios, parece ser um dos efeitos tóxicos aparentes do aumento da temperatura. O dano oxidativo das proteínas pode alterar mecanismos e poderia interromper funções vitais em células (FRIDOVICH, 1983).

A CAT é uma das enzimas antioxidantes mais importantes envolvidas na eliminação de H_2O_2, catalisando a conversão de H_2O_2 em oxigênio molecular e água. A 24ºC a atividade da CAT no hepatopâncreas estava aumentada, podendo ser consequência da formação de ROS causada pelas temperaturas mais elevadas. Porém a 26ºC houve a inibição da atividade da enzima, o que pode significar que nesta temperatura a atividade da CAT pode ter sido inibida pela flutuação dos radicais superóxido (FILHO, 1996). No caranguejo de lama *Scylla serrata* as atividades de CAT em brânquias foram maiores no verão e menores no inverno (KONG et al., 2008). Contrariamente aos nossos resultados, VINAGRE et al. (2012) encontraram maiores atividades de CAT em peixes expostos a temperaturas fora do seu ótimo térmico. Em um estudo realizado em camarões costeiros revelam resultados semelhantes ao que encontramos, onde a atividade da CAT diminui em temperaturas mais altas (VINAGRE et al., 2014a).

A atividade da AChE aumentou proporcionalmente ao crescimento da temperatura, em tecido muscular. A AChE é a enzima que hidrolisa o

neurotransmissor acetilcolina nas sinapses colinérgicas de vertebrados e invertebrados. O aumento da AChE pode ter colaborado com a demora para o animal retornar ao equilíbrio em temperaturas mais altas e também com a redução da atividade nessas temperaturas, já que ela é a enzima que hidrolisa o neurotransmissor acetilcolina que está associado à contração muscular. Apesar de ser considerado um biomarcador de neurotoxicidade, a temperatura influenciou a atividade da AChE em peixes *Lepomis macrochirus* e *Rutilus rutilus L.* (HOGAN, 1970; CHUIKO et al., 1997).

Em função da variação das respostas antioxidantes, pode-se afirmar que estas são tecido e espécie-específicas. Diferentes padrões de resposta sugerem que a expressão de biomarcadores é específica de uma espécie. Associação entre temperatura e resposta ao estresse térmico pode ser dependente da magnitude da tensão térmica (MADEIRA et al., 2013). Nossos resultados sugerem que em *Aegla longirostri*, extremos de hipertermia podem reduzir as defesas antioxidantes.

Como já demonstrado em alguns estudos, o aumento da temperatura afeta a sobrevivência de ectotérmicos (ISSARTEL et al., 2005; MAAZOUZI et al., 2011). Em nossos experimentos obtivemos resultados que comprovam que a porcentagem de sobrevivência de *A. longirostri* é menor em temperaturas mais altas e que na temperatura considerada ótima para estes crustáceos a sobrevivência é de 100%. Em Foucreau et al. (2013), a sobrevivência em *Gammarus pulex* (Crustacea) também diminui com o aumento da temperatura. A temperatura da água é um dos principais fatores abióticos que podem influenciar a sobrevivência e crescimento de crustáceos decápodos (HARTNOLL, 2001). Mesmo em um estudo de curto prazo, a temperatura de 26ºC causou alterações não só na atividade mas também no equilíbrio desses crustáceos, e também afetou a sobrevivência destes animais.

A fisiologia dos animais compreende uma ligação entre as características de história de vida e as condições ambientais atuais, portanto a compreensão de como estes processos respondem às alterações ambientais pode fornecer evidências sobre as implicações do aquecimento global previsto nas comunidades biológicas (SMALL et al., 2015). Nosso estudo mostrou que a temperatura da água pode influenciar o comportamento e as respostas fisiológicas de *A. longirostri*, indicando que um aumento da temperatura global certamente trará consequências negativas para este grupo. Sabendo que os eglídeos são importantes fragmentadores, que participam do processo de decomposição dos detritos foliares e da ciclagem de nutrientes (COGO, SANTOS, 2013), além de predadores ativos (CEREZER et al., 2016), alterações no

seu nicho podem levar a desequilíbrios nos ciclos biogeoquímicos e nas cadeias tróficas aquáticas. Considerando-se também que a maioria das espécies de eglídeos (70%) está ameaçada de extinção (SANTOS et al., 2017), a previsão de possíveis consequências do aquecimento global é vital para a conservação do grupo. Novos estudos, levando em consideração a qualidade do ambiente associada ao aumento da temperatura, serão bem vindos para termos uma melhor compreensão das consequências dos impactos antrópicos causados ao ecossistema aquático de água doce.

5- REFERÊNCIAS

AN, M.I.; CHOI, C.Y. (2010) Activity of antioxidant enzymes and physiological responses in ark shell, *Scapharca broughtonii*, exposed to thermal and osmotic stress: effects on hemolyph and biochemical parameters. Comparative Biochemical Physiology B. 155: 34-42.

AYRES-PERES L.; ARAÚJO P. B.; SANTOS S. (2011) Description of the Agonistic Behavior of *Aegla longirostri* (Decapoda: Aeglidae). Journal of crustacean biology. 31: 379-388.

BARBOSA K. B. F. et al. (2010) Oxidative stress: concept, implications and modulating factors. Revista de Nutrição, Campinas. 23 :629-643.

BRADFORD, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry. 72: 248–254.

BRIFFA A.; BRIDGER D. A.; BIRO P. A. (2013) How does temperature affect behaviour? Multilevel analysis of plasticity, personality and predictability in hermit crabs. Animal Behaviour. 86: 47-54.

BUEGE, J. A.; AUST, S.D. (1978) Microssomal lipid peroxidation. Methods Enzymology. 52: 302-309.

CAIRNS, J.; HEAT, A.G.; PARKER, B.C. (1975) The effects of temperature upon the toxicity of chemicals to aquatic organisms. Hydrobiologia. 47: 135–171.

CEREZER, C. et al. (2016). Avoid predation or take risks in basic activities? Predator–prey relationship in subtropical streams between decapods and caddisflies. Marine and Freshwater Research. 67: 1880-1887.

CHUIKO, G.M.; ZHEHIN, Y.; POD'GORNAYA, V.A. (1997) Seasonal fluctuation in brain AChE activity and soluble protein content in roach (*Rutilus rutilus L.*): a freshwater fish from northwest Russia. Comparative Biochemical Physiology. 117C, 251–257.

COGO, G. B; SANTOS S. (2013) The role of *aeglids* in shredding organic matter in Neotropical streams. Journal of Crustacean Biology. 33: 519–526.

COLES, B. et al. (2001) The role of human glutathione S-transferases (hGSTs) in the detoxification of the food-derived carcinogen metabolite N-acetoxy-PhIP, and the effect of a polymorphism in hGSTA1 on colorectal cancer risk. Resultados da pesquisa. Mutation Research. 482: 3-10.

COLPO, K. D.; RIBEIRO, L. D.; SANTOS, S. (2005) Population biology of the freshwater Anomura Aegla *longirostri* (Aeglidae) from South Brazilian streams. Journal of Crustacean Biology. 25: 495-499.

CUMBERLIDGE, et al. (2009) Freshwater crabs and the biodiversity crisis: Importance, threats, status, and conservation challenges. Biological Conservation**.** 142: 1665–1673.

DALOSTO, M.; SANTOS. S. (2011) Differences in oxygen consumption and diel activity as adaptations related to microhabitat in Neotropical freshwater decapods (Crustacea). Comparative Biochemistry and Physiology-Part A .160: 461–466.

DAYANAND, C. D.; VEGI, P. K.; KUTTY, A. V. (2012) Protein carbonyl content as a stable Oxidative stress marker in Type II Diabetes. International Journal of Biological and Medical Research. 3: 2362-2365.

DELL'ANNA, M.L.; et al. (2007) Membrane lipid alterations as a possible basis for melanocyte degeneration in vitiligo. Journal of Investigative Dermatology. 127: 1226-33.

ELLMAN, G.L. (1959) Tissue sulfhydryl groups. Archives of Biochemistry and Biophysics**.** 82: 70-77.

ELLMAN, G.L. et al. (1961) A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. Biochemical Pharmacology. 7, 88-95.

FELTEN, V. GUEROLD, F. (2001) Hyperventilation and loss of hemolymph Na and Cl in the freshwater amphipod *Gammarus fossarum* exposed to acid stress: a preliminary study. Diseases of Aquatic Organisms. 45: 77–80.

FERREIRA, B. D. P., et al. (2005) Perfil metabólico de *Aegla platensis* Schmitt, 1942 (Crustacea, Anomura) submetida a dietas ricas em carboidratos ou proteínas. Revista Brasileira de Zoologia. 22: 161–168.

FILHO, D.W. (1996) Fish antioxidant defences – a comparative approach. Brazilian Journal of Medical and Biological Research. 29: 1735–1742.

FOUCREAU, N. et al. (2014) Physiological and metabolic responses to rising temperature in *Gammarus pulex* (Crustacea) populations living under continental or Mediterranean climates. Comparative Biochemistry and Physiology, Part A. 168: 69–75.

GUTTERIDGE, J.M.; HALLIWELL, B. (2010) Antioxidants: molecules, medicines, and myths. Biochemical and Biophysical Research Communications. 393: 561-4.

HABIG, W.H.; PABST, M.J.; JAKOBY, W.B. (1974) Glutathione S-transferases. The first enzimatic step in mercapturic acid formation. The Journal of Biological Chemistry**.** 249: 7130–7139.

HALLIWELL, B. (1994) Free radicals, antioxidants and human disease: curiosity, cause or consequence. Lancet. 344: 721–724.

HAMILTON, D. S. et al. (2003) Mechanism of the glutathione transferase-catalyzed conversion of antitumor 2-crotonyloxymethyl-2-cycloalkenones to GSH adducts. American Chemical Society. 125: 15049- 48.

HARTNOLL, R. G. (2001) Growth in Crustacea-twenty years on. Hydrobiologia 449: 111 –122.

HAYES, J. D.; FLANAGAN, J. U.; JOWSEY, I. R.; (2005) Glutathione transferases. Annual Review of Pharmacology and Toxicology. 45, 51.

HOCHACHKA, P.W.; SOMERO, G.N. (2002) Biochemical adaptation: mechanism and process in physiological evolution. Oxford University Press. 478 p.

HOGAN, J.M. (1970) Water temperature as a source of variation in specific activity of brain acetylcholinesterase of bluegills. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology. 5: 347– 353.

IPCC (Intergovernmental Panel on Climate Change) (2007) Fourth assessment report. New York: Cambridge University Press.

ISSARTEL, J.; HERVANT, F.; VOITURON, Y.; RENAULT, D.; VERNON, P. (2005) Behavioural, ventilatory and respiratory responses of epigean and hypogean crustaceans to different temperatures. Comparative Biochemistry and Physiology, A. 141:1–7.

KONG, X.; WANG G.; LI, S. (2008) Seasonal variations of ATPase activity and antioxidant defenses in gills of the mud crab *Scylla serrata* (Crustacea, Decapoda). Marine Biology. 154, 269-276.

KOYCHEVA, J.; KARNEY, B. (2009) Stream water temperature and climate change – An ecological perspective. International Symposium on Water Management and Hydraulic Engineering A112.

LAGERSPETZ, K. Y. H.; L. A. VAINIO. (2006) Thermal behaviour of crustaceans. Biological Reviews. 81: 237–258.

LANGAN, S.J. (2001) Variation in river water temperatures in an upland stream over a 30-year period. The Science of the Total Environment. 265: 195-207.

LOZÁN, J. L. (2000) On the Threat to the European Crayfish: A Contribution with the Study of the Activity Behaviour of Four Crayfish Species (Decapoda: Astacidae). Limnologica. 30: 156–161.

LUSHCHAK, V.I.; BAGNYUKOVA, T.V. (2006a) Temperature increase results in oxidative stress in goldfish tissues. 1. Indices of oxidative stress. Comparative Biochemistry and Physiology. 143: 30-35.

MAAZOUZI, C., PISCART, C., LEGIER, F., HERVANT, F., (2011) Ecophysiological responses to temperature of the “killer shrimp” *Dikerogammarus villosus*: is the invader

really stronger than the native *Gammarus pulex*? Comparative Biochemistry and Physiology. 159: 268–274.

MADEIRA, et al. (2013) Influence of temperature in thermal and oxidative stress responses in estuarine fish. Comparative Biochemistry and Physiology, Part A. 166: 237–243.

MADEIRA, D. et al. (2014) Role of termal niche in the cellular response to termal stress: lipidperoxidation and HSP70 in coastal crabs. Ecological Indicators. 36:601–606.

MALTBY, L; CLAYTON, S.A.; WOOD, R.M.; MCLOUGHLIN, N. (2002) Evaluation of the *Gammarus pulex* in situ feeding assay as a biomonitor of water quality: robustness, responsiveness and relevance. Environmental Toxicology and Chemistry. 21: 361–368.

MILLS, C.L.; SHUKLA, D.H.; COMPTON, G.J. (2006) Development of a new low cost high sensitivity system for behavioural ecotoxicity testing. Aquat Toxicol 77, Lawrence AJ, Poulter C (1998) Development of a sublethal pollution bioassay using the estuarine amphipod *Gammarus duebeni*. Water Research. 32: 569–578.

MORRILL, J. C.; BALES R. C.; CONKLIN M. H. (2005) Estimating stream temperature from air temperature: implications for future water quality. Journal of Environmental Engineering. 131: 139–146.

NELSON, D.P.; KIESOW, L.A. (1972) Enthalphy of decomposition of hydrogen peroxide by catalase at 25C (with molar extinction coefficients of H2O2 solution in the UV). Analytical Biochemistry. 49: 474–478.

OLIVEIRA, G. T., et al. (2003) Circadian and seasonal variations in the metabolism of carbohydrates in *Aegla ligulata* (Crustacea:Anomura: Aeglidae). Memoirs Museum of Victoria. 60: 59-62.

REISCHL, E.; DAFRE A. L.; FRANCO J. L.; WILHELM-FILHO D. (2007) Distribution, adaptation and physiological meaning of thiols from vertebrate hemoglobins. Comparative Biochemistry and Physiology, Part C: Toxicology & Pharmacology. 146: 22-53.

RODRIGUES, E. T. et al. (2015) Biochemical and physiological responses of *Carcinus maenas* to temperature and the fungicide azoxystrobin. Chemosphere 132: 127–134.

SANTOS, S. et al. (2017) Diversity and conservation status of *Aegla* spp. (Anomura, Aeglidae): an update. Nauplius (*in press*).

SMALL, D. P. et al. (2015) Stage-Specific Changes in Physiological and Life-History Responses to Elevated Temperature and PCO2 during the Larval Development of the European Lobster *Homarus gammarus* (L.). Physiological and Biochemical Zoology 88:494–507.

SOKOLOVA, I.M.; LANNIG, G. (2008) Interactive effects of metal pollution and temperature on metabolism in aquatic ectotherms: implications of global climate change. Climate Research. 37: 181–2001.

SOKOLOWICZ, C. C.; LÓPEZ-GRECO, L. S.; GONÇALVES, R. & BOND-BUCKUP, G. (2007) The gonads of *Aegla platensis Schmitt* (Decapoda, Anomura, Aeglidae): a macroscopic and histological perspective. Acta Zoologica 88:71-79.

STEFAN, H. G.; SINOKROT B. A. (1993) Projected global climate change impact on water temperatures in five North Central U.S. streams. Climate Change 24: 353–381.

THEBAULT, M. T.; RAFFIN, J. P. (1991) Seasonal variations in *Palaemon serratus* abdominal muscle metabolism and performance during exercise, as studied by ^{31}PNMR. Marine Ecology Progress Series. 74: 175-183.

TURRA, A.; DENADAI M. R. (2003) Daily activity of four tropical intertidal hermit crabs from southeastern Brazil. Brazilian Journal of Biology. 63: 537–544.

VINAGRE, C. et al. (2012) Effect of Temperature on oxidative stress in fish: lipid peroxidation and catalase activity in the muscle of juvenile *seabass Dicentrarchus labrax*. Ecology Indicators. 23:274–279.

VINAGRE C. et al. (2014a) Effect of temperature in multiple biomarkers of oxidative stress in coastal shrimp. Journal of Thermal Biology. 41: 38–42.

VINAGRE C. et al. (2014b) Effect of increasing temperature in the differential activity of oxidative stress biomarkers in various tissues of the Rock goby, *Gobius Paganellus*. Marine Environmental Research**.** 97: 10- 14.

WALLACE, W.G; ESTEPHAN, A. (2004) Differential susceptibility of horizontal and vertical swimming activity to cadmium exposure in a gammaridean amphipod (*Gammarus lawrencianus*). Aquatic Toxicology. 69 : 289–297.

WALTHER, G. et al. (2002) Ecological responses to recent climate change. Nature. 416: 389–395.

WANG, W. et al. (2006) Effects of temperature on growth, adenosine phosphates, ATPase and cellular defense response of juvenile shrimp *Macrobrachium nipponense*. Aquaculture. 256: 624-630.

WILLMER, P.; STONE, G.; JOHNSTON, I. (2000) Environmental physiology of animals. Oxford: Blackwell Science.

YAN, L.J.; TRABER, M.G.; PACKER, L. (1995) Spectrophotometric method for determination of carbonyls in oxidatively modified apolipoprotein B of human low density lipoproteins. Analytical Biochemical. 228: 349-351.

MANUSCRITO 2

Baixa qualidade da água causa alterações bioquímicas e comportamentais em *Aegla longirostri* (Crustacea, Decapoda, Anomura)

Cristina Cerezer, Bruna Ceretta Ferreira, Jossiele Wesz Leitemperger, Aline Monique Blank do Amaral, Aline Teixeira Marins, Vania Lucia Loro, Marlise Ladvocat Bartholomei-Santos e Sandro Santos

Resumo

Condições de hipóxia, geralmente, figuram entre os principais fatores responsáveis pela baixa qualidade do habitat. O objetivo deste estudo foi verificar, em condições laboratoriais, se a hipóxia e águas de diferentes qualidades químicas afetam o sistema antioxidante, o comportamento e a sobrevivência do crustáceo *Aegla longirostri,* espécie com papel destacado na reciclagem de nutrientes em riachos subtropicais. Verificamos alterações induzidas por hipóxia moderada (2,5 ppm OD) e grave (1,5 ppm OD) e em águas de diferentes qualidades químicas (com e sem pesticidas) em três tecidos (brânquias, hepatopâncreas e músculos). A exposição à hipóxia resulta em respostas antioxidantes significativamente diferentes em relação aos animais com oxigenação constante. O que demonstra que águas com uma menor oxigenação afetariam o seu sistema antioxidante e consequentemente a sua sobrevivência. Águas antropizadas tem o potencial de alterar o comportamento desses crustáceos, diminuindo sua atividade durante a noite, o que poderia comprometer o seu comportamento de forrageio, considerando-se que possuem hábito preferencialmente noturno. A presença de pesticidas na água é outro fator capaz de afetar as respostas antioxidantes e a sobrevivência de *A. longirostri*. Este talvez seja, de imediato, o maior risco para as populações naturais, pelo uso indiscriminado de agroquímicos no campo.

Palavras Chave: Atrazina, Imidacloprido, oxigênio dissolvido, hipóxia, riachos

1- INTRODUÇÃO

A poluição dos ambientes aquáticos relacionada à atividade humana gera acúmulo de substâncias tóxicas que, por sua vez, causam um grande impacto sobre os organismos que habitam esses locais (SWACKHAME et al., 2004). Efluentes provenientes de esgotos domésticos e industriais, bem como escoamentos de áreas agrícolas e de pecuária, são tipicamente contaminados por uma variedade de químicos nocivos (STEINBERG et al., 2008). Agroquímicos acabam inevitavelmente atingindo corpos d'água, principalmente devido aos ventos, à água das chuvas, que promovem escoamento superficial, a lavagem das folhas tratadas, a lixiviação e a erosão (TOMITA, BEYRUTH, 2002; SILVA, FAY, 2004). Deste modo, os organismos aquáticos são constantemente expostos a contaminantes que podem induzir diferentes mecanismos de toxicidade (CORREIA et al., 2003).

Muitas substâncias químicas presentes em águas poluídas podem causar modificações no estado oxidativo dos organismos, seja pelo aumento na geração de espécies reativas de oxigênio ou pela redução na atividade de enzimas antioxidantes (STEINBERG et al., 2008). Além disso, a matéria orgânica natural composta principalmente por plantas terrestres em processo de decomposição, e a variação anormal dos parâmetros físico-químicos também tem o potencial de causar estresse oxidativo (STEINBERG et al., 2006; TIMOFEYEV et al., 2006a, b).

A entrada de contaminantes, nutrientes em excesso e matéria orgânica provenientes da ação antrópica nos ambientes aquáticos, pode levar à redução nos níveis de oxigênio dissolvido (OD) e a morte de animais nesses ambientes (WU, 2002; UN-WATER, 2009; DÍAZ, RABALAIS, 2010; MATEO-SAGASTA et al., 2010). A hipóxia pode ser prejudicial para organismos dependentes de oxigênio, alterando o comportamento, a fisiologia e, inclusive o metabolismo celular, resultando em impactos negativos, como crescimento reduzido, perda reprodutiva, mortalidade, redução da biodiversidade e perda de produção secundária (RABALAIS et al., 2010; WANNAMAKER, RICE, 2000; WU, 2002).

Diversos biomarcadores têm sido amplamente utilizados para avaliar alterações bioquímicas causadas por contaminantes orgânicos em organismos

aquáticos. Entre estes se destacam as espécies reativas de oxigênio (EROs) e as enzimas que fazem parte do sistema de defesa antioxidante que minimiza os danos oxidativos aos componentes celulares (LAVARÍAS et al., 2011). Estes biomarcadores também podem ser utilizados para observar os efeitos da condição de hipóxia sobre organismos aquáticos (LAWNICZAK et al., 2013). Uma das principais características dos biomarcadores é o seu potencial de antecipar alterações em níveis superiores de organização biológica (populações, comunidades ou ecossistemas), sendo considerados indicadores de curto prazo de efeitos de longo prazo (CAJARAVILLE et al., 2000). Estudos de toxicologia ambiental ou ecotoxicologia tornam-se úteis ao investigar o impacto de contaminantes ambientais através de respostas fisiológicas e bioquímicas (biomarcadores) em organismos (SILVA, POMPÊO, PAIVA, 2015). Tendo em vista que a integridade biológica de um ecossistema pode ser avaliada com base na integridade da sua fauna (ROBINSON, 1986) e que a saúde de todos os organismos vivos em um ecossistema aquático é afetada pela deterioração da qualidade da água (DOHERTY et al., 2010), estudos que verifiquem os prováveis efeitos decorrentes das alterações da qualidade ambiental são de grande importância para a preservação da fauna límnica.

Crustáceos decápodos da família Aeglidae possuem hábitos bentônicos. São importantes fragmentadores que participam do processo de decomposição dos detritos foliares, sendo espécies-chave na ciclagem dos nutrientes (BUENO, BOND-BUCKUP, 2004; SANTOS et al., 2008; COGO, SANTOS, 2013). São encontrados em rios e riachos de águas correntes de temperaturas baixas e bem oxigenadas do sul da América do Sul, sob detritos vegetais ou enterrados no substrato arenoso (BOND-BUCKUP, 2003). Apesar da importância ecológica destes animais, talvez este seja o grupo mais ameaçado de extinção em ambientes aquáticos continentais, cerca de 70% das espécies estão sob risco (SANTOS et al., 2017).

O objetivo deste estudo foi analisar, em condições laboratoriais, o efeito da hipóxia e da exposição à águas de diferentes qualidades químicas (com e sem pesticidas) nas respostas do sistema antioxidante, no comportamento e sobrevivência de *Aegla longirostri*, espécie com ampla distribuição no sul do Brasil (BOND-BUCKUP, 2003).

2- MATERIAL E MÉTODOS

2.1 AMOSTRAS BIOLÓGICAS

Caranguejos machos adultos da espécie *A. longirostri* foram coletados em ambientes lóticos na cidade de Silveira Martins, Rio Grande do Sul, Brasil (29W 35' 38", 53S 33' 17"). Para as coletas dos indivíduos foram utilizadas 30 armadilhas do tipo covo, feitas com garrafas plásticas de boca cônica invertida contendo iscas de fígado, além de coleta manual realizada por três pessoas. As armadilhas foram colocadas ao entardecer e retiradas no dia seguinte pela manhã, uma vez que os animais possuem hábitos preferencialmente noturnos.

2.2 ANÁLISE DA QUALIDADE DA ÁGUA

A água utilizada nos experimentos foi coletada em dois riachos, com diferentes características: Riacho Linha Seis (riacho 1- Natural), localizado em Silveira Martins-RS (29W 35' 38", 53S 33' 17") e Riacho Guarda Mor (riacho 2- Antropizado) localizado em Faxinal do Soturno- RS (29W 34' 54", 53S 32' 02"). Todos os animais utilizados nos experimentos são provenientes do riacho Linha Seis, que apresenta vegetação densa e é distante de residências e lavouras (riacho 1 - C); Já o Riacho 2 apresenta uma pequena interferência antrópica, ou seja, possui uma vegetação escassa com residências e lavouras próximas (riacho 2 - P). No momento da coleta de água foram medidos os seguintes dados abióticos, ao longo de 10 pontos, com espaçamento médio de 10 metros entre um e outro: temperatura, pH, oxigênio dissolvido, turbidez, condutividade, potencial de oxirredução e sólidos totais dissolvidos. Estes parâmetros foram registrados com o auxílio de aparelho multiparâmetro HORIBA. As concentrações de nitrito e amônia foram medidas no Laboratório de Bioquímica Toxicológica (LabTaq) da Universidade Federal de Santa Maria. Amostras de água foram avaliadas qualitativamente e quantitativamente para presença de agroquímicos, de acordo com metodologia descrita por Sabin et al. (2009), no laboratório de análises de resíduos de pesticidas da Universidade Federal de Santa Maria (LARP) (Tabela 2).

2.3 EXPERIMENTOS LABORATORIAIS

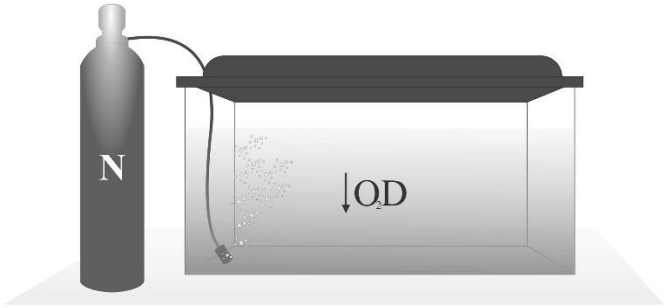
Os espécimes coletados foram colocados em aquários de 2 L com oxigenação constante para aclimatação durante sete dias, sendo alimentados com folhas. Após o período de aclimatação, os animais foram divididos em dois grupos para os experimentos.

2.3.1 Experimento 1: exposição à hipóxia

Foram realizados três tratamentos, com duração de 24 horas cada, com diferentes concentrações de oxigênio dissolvido na água: 8,9 ppm OD (oxigenação padrão laboratorial), 2,5 ppm OD (hipóxia moderada), e 1,5 ppm OD (hipóxia grave). Foram utilizados 10 indivíduos por tratamento.

A medição da concentração de oxigênio dissolvido na água foi realizada com um oxímetro portátil e a redução do nível de oxigênio na água foi obtido com o borbulhamento de gás nitrogênio (Figura 1). Os valores utilizados foram baseados em estudos de hipóxia, que é definida como uma concentração de oxigênio dissolvido (OD) <2,8 mg de O_2/L (DALOSTO, SANTOS, 2011; BROUWER et al., 2007; WU, 2002).

Figura 1. Esquema representando o experimento de hipóxia, onde N refere-se ao galão de nitrogênio e O_2D à concentração de oxigênio dissolvido na água.



2.3.2 Experimento 2: qualidade da água

Foram realizados dois tratamentos, nos quais os organismos foram expostos à água com diferentes qualidades: 1- do riacho controle onde os animais foram coletados (riacho 1 - C) (n=15); 2- de um riacho com interferência antrópica (riacho 2

- P) (n=15, 7 dias e n=20, 15 dias). O experimento durou 15 dias, com coleta de tecidos no 7º dia e no 15º para analisarmos se o tempo de exposição influência os resultados.

2.3.2.1 Comportamento: qualidade da água

As observações comportamentais foram realizadas às 10 h e às 22 h no último dia de exposição em cada tratamento no experimento de qualidade da água, em dois momentos diferentes, 7º e 15º dias. Os animais foram filmados (n=10), individualmente no próprio aquário, por 10 minutos (600 s) (Sony® Handycam, modelo HDR-CX560). Para as filmagens noturnas foram utilizadas lâmpadas incandescentes de cor vermelha, procedimento padrão para este tipo de experimento (AYRES-PERES et al., 2011, 2015). A atividade dos eglídeos foi estimada por meio de atos específicos, aos quais atribui-se escores, conforme DALOSTO, SANTOS (2011) (Tabela 1). Para determinar os escores, divide-se os 600 s em intervalos de 10 s (totalizando 60 intervalos) e durante cada intervalo é anotado o escore da atividade predominante (no mínimo 5s, exceto para a atividade *tail flipping*). O escore final é a soma dos escores obtidos em cada intervalo (pode variar de 0 - animal inativo - a 180 - atividade máxima).

Tabela 1. Descrição dos comportamentos analisados e seus respectivos escores.

Comportamento	Descrição	Escore
Inativo	Ausência de movimento aparente ou somente movimentos de apêndices cefálicos (antenas, antênulas, e/ou maxilípedes)	0
Atividade baixa	Movimentos de quelipodos, pereópodos, pleópodos e/ou curtos movimentos dos animais	1
Atividade moderada	Movimento ativo do animal pelo aquário	2
Atividade intensa	*Tail flipping.*	3

Adaptado de Dalosto e Santos, 2011.

2.3.2.2 Letalidade: Qualidade da água

No decorrer do experimento de qualidade da água foi registrada a quantidade de animais que morreram em cada tratamento (em porcentagem).

2.4 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

Após a exposição aos tratamentos os animais foram crioeutanasiados e seus tecidos congelados a -20ºC para análises posteriores. Foram dissecados brânquias, hepatopâncreas e músculo para as análises (n=10). As análises bioquímicas foram realizadas para os animais utilizados nos dois experimentos, hipóxia e qualidade da água.

Os tecidos foram homogeneizados e diluídos em Tris-HCl 50 mM. O homogeneizado foi centrifugado a 3.000 rpm por 10 min. Após a centrifugação, o sobrenadante (amostra) foi separado em alíquotas em tubos do tipo *eppendorf* para cada um dos procedimentos.

A dosagem de proteína total foi determinada de acordo com Bradford (1976), usando albumina de soro bovino como padrão.

A atividade da catalase (CAT) foi realizada em hepatopâncreas de acordo com o método descrito por Nelson, Kiesow (1972). A atividade da CAT foi expressa em µmol/min/mg de proteína.

Determinou-se atividade de AChE em músculo de acordo com método descrito por Ellman, Courtney, Andres (1961). A atividade de AChE foi expressa como µmol/min/mg de proteína.

O conteúdo de proteína carbonilada foi analisada em brânquias, hepatopâncreas e músculo pelo método descrito por Yan et al. (1995). O conteúdo de proteína carbonilada foi expressa em nmol de proteína carbonilada/mg de proteína.

O nível de peroxidação lipídica foi determinado em brânquias, hepatopâncreas e músculo pelo método de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), de acordo com Buege, Aust (1978). Os níveis de TBARS foram expressos como nmol de MDA/mg de proteína.

A atividade da enzima glutationa S-transferase (GST) foi determinada em brânquias, hepatopâncreas e músculo de acordo com o método descrito por Habig et al. (1974) usando 1-cloro-2, 4-dinitrobenzeno (CDNB) como substrato. A atividade da GST foi expressa em µmol GS-DNB/min/mg de proteína.

A determinação de tióis não proteicos (NPSH) foi realizada em brânquias, hepatopâncreas e músculo segundo Ellman (1959). Os níveis de NPSH foram expressos em µmol de SH/g de tecido.

Todas as análises foram ajustadas para leitura em placa de 96 poços no espectrofotômetro de leitura em placas, exceto CAT que foi lida em cubetas de quartzo no espectrofotômetro padrão.

2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram apresentados como a média ± erro padrão, analisados quanto à sua normalidade, pelo teste de Shapiro-Wilk, e a homogeneidade através do teste de Levene. Foi realizada ANOVA de uma via para comparar os dados entre tratamentos de um mesmo experimento. Para dados não paramétricos foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis. Foi considerado significante $P < 0,05$. Usamos o programa estatístico GraphPad Prism 6.

3- RESULTADOS

3.1 ANÁLISE DA QUALIDADE DA ÁGUA

Tabela 2: Parâmetros físico-químicos e agroquímicos da água dos dois riachos estudados. Limite de quantificação (Limit Of Quantification - LOQ) para os pesticidas testados = 0,13 µg/ L.

Variáveis	Unidade	Riacho 1 (C)	Riacho 2 (P)
Temperatura	ºC	19 ± 0,19	21±0,86*
pH		7,4 ± 0,38	7,14±0,08
Turbidez	NTU	4,04 ± 3,5	9,8±0,25*
Condutividade	ms/cm	0,04 ± 0	0,077± 0*
Potencial de oxirredução	ORP mv	328 ± 13,7	350 ± 7,25
Oxigênio dissolvido	mg/L DO	8,3 ± 0,45	7,89 ± 0,92
Sólidos totais dissolvidos	g/l TDS	0,026 ± 0	0,05 ± 0*
Nitrito	mg/ml	0	0,005
Amônia	µmol amônia/g tecido	0,00276	0,00456
Atrazina	µg/L	0	< LOQ
Imidacloprido	µg/L	0	< LOQ

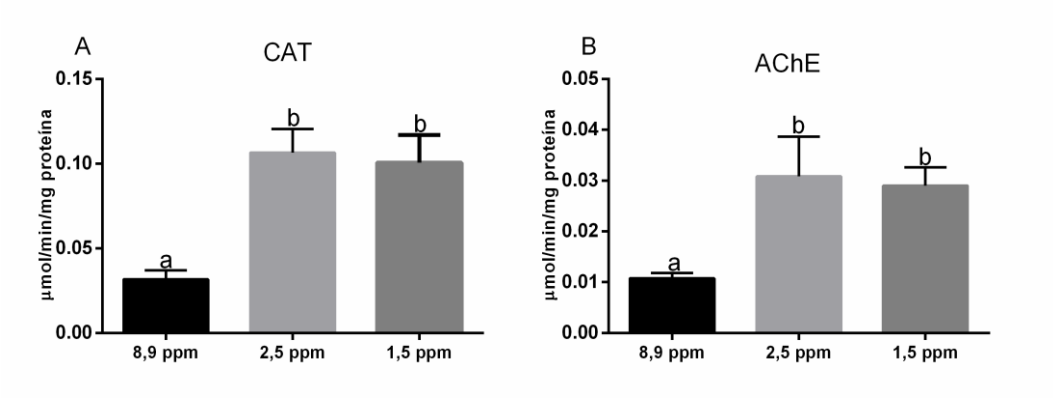
Os riachos apresentaram diferença significativa quanto aos seguintes parâmetros ($p<0,05$): Temperatura, condutividade, turbidez e sólidos dissolvidos totais (Tabela 2, marcados com asterisco). Nitrito e amônia foram analisados somente uma vez juntando-se os pontos. Os agroquímicos foram encontrados somente no riacho antropizado como <LOQ o que não é um valor numérico testável. Os valores de

potabilidade para substâncias químicas que representam risco à saúde segundo o CONAMA para ATRAZINA são de 2 µg/L.

3.2 EXPERIMENTO 1: *EXPOSIÇÃO À HIPÓXIA*

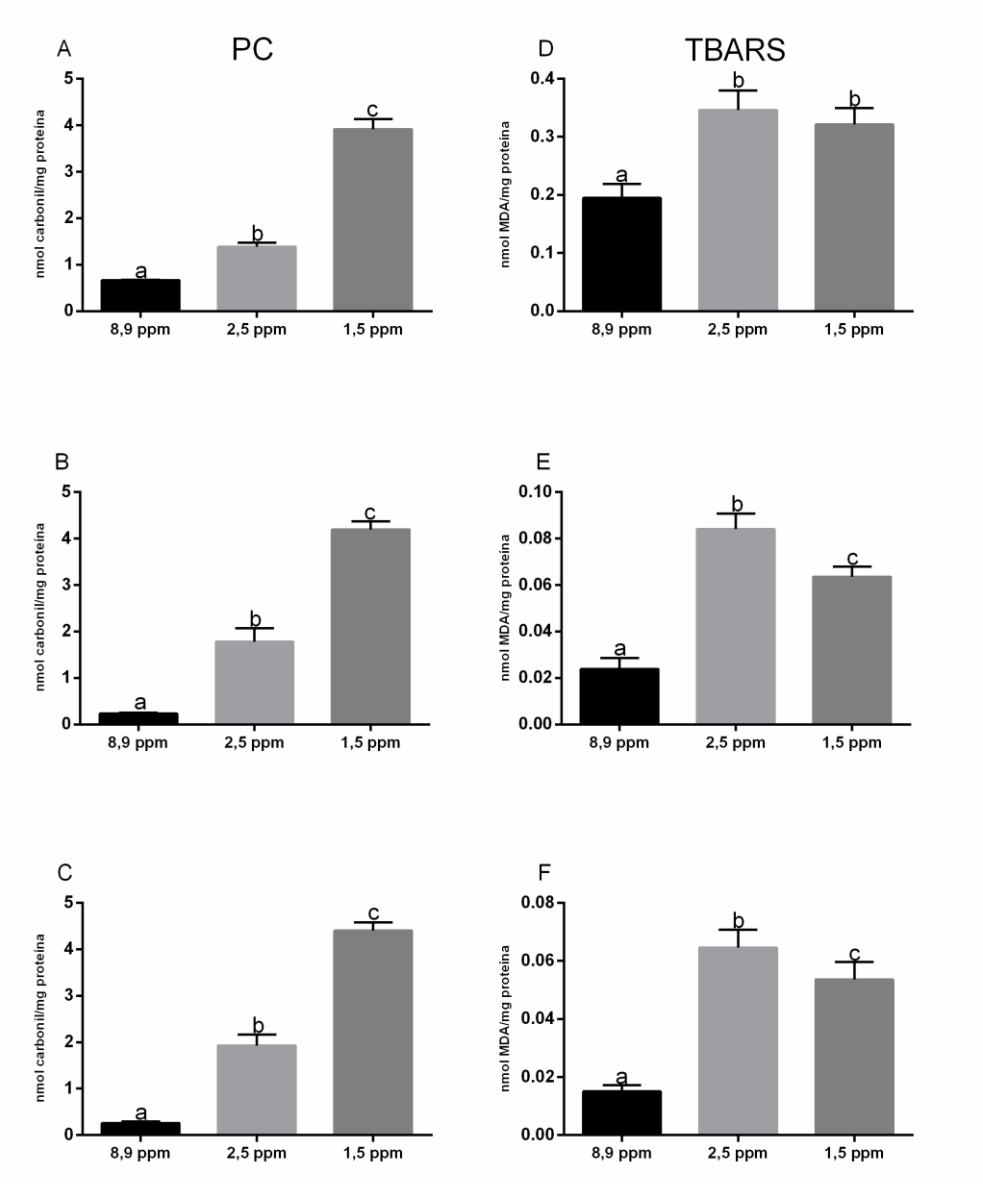
Tanto a atividade da CAT em hepatopâncreas quanto a atividade da AChE em músculo foram significativamente diferentes e maiores em animais submetidos a hipóxia do que em animais com oxigenação normal (p<0,0001; Figura 2A e 2B).

Figura 2: Atividade de CAT em hepatopâncreas (A) e atividade de AChE em músculo (B) de *Aegla longirostri* submetida a diferentes concentrações de OD (oxigenação controle, hipóxia moderada e grave respectivamente). Os dados são reportados como média ± erro padrão (n = 10). Números no eixo x representam a concentração de oxigênio dissolvido em cada tratamento. Diferentes letras indicam diferenças entre os grupos (p <0,05).



O conteúdo de proteína carbonilada em hepatopâncreas, brânquias e músculo aumentou com a diminuição do oxigênio dissolvido (OD), com diferença significativa entre os três tratamentos (p <0,0001; Figura 3A, 3B E 3C). Em relação ao nível de peroxidação lipídica, para hepatopâncreas e brânquias, os maiores níveis de TBARS foram encontrados tanto na hipóxia moderada quanto na grave que diferiram do tratamento com oxigenação normal (p<0,0001; Figura 3D E 3F). Porém, no músculo houve diferença significativa entre os três tratamentos, sendo que os animais submetidos à hipóxia moderada demonstraram um aumento significativo nos níveis de TBARS em músculo quando comparado com o tratamento com oxigenação constante e hipóxia grave (p <0,0001; Figura 3E).

Figura 3: Conteúdo de proteína carbonilada em hepatopâncreas (A), músculo (B) e brânquias (C), e níveis de TBARS em hepatopâncreas (D), músculo (E) e brânquias (F) de *Aegla longirostri* submetida a diferentes concentrações de OD (oxigenação controle, hipóxia moderada e grave respectivamente). . Os dados são reportados como média ± erro padrão (N = 10). Números no eixo x representam a concentração de oxigênio dissolvido em cada tratamento. Diferentes letras indicam diferenças entre os grupos (p <0,05).

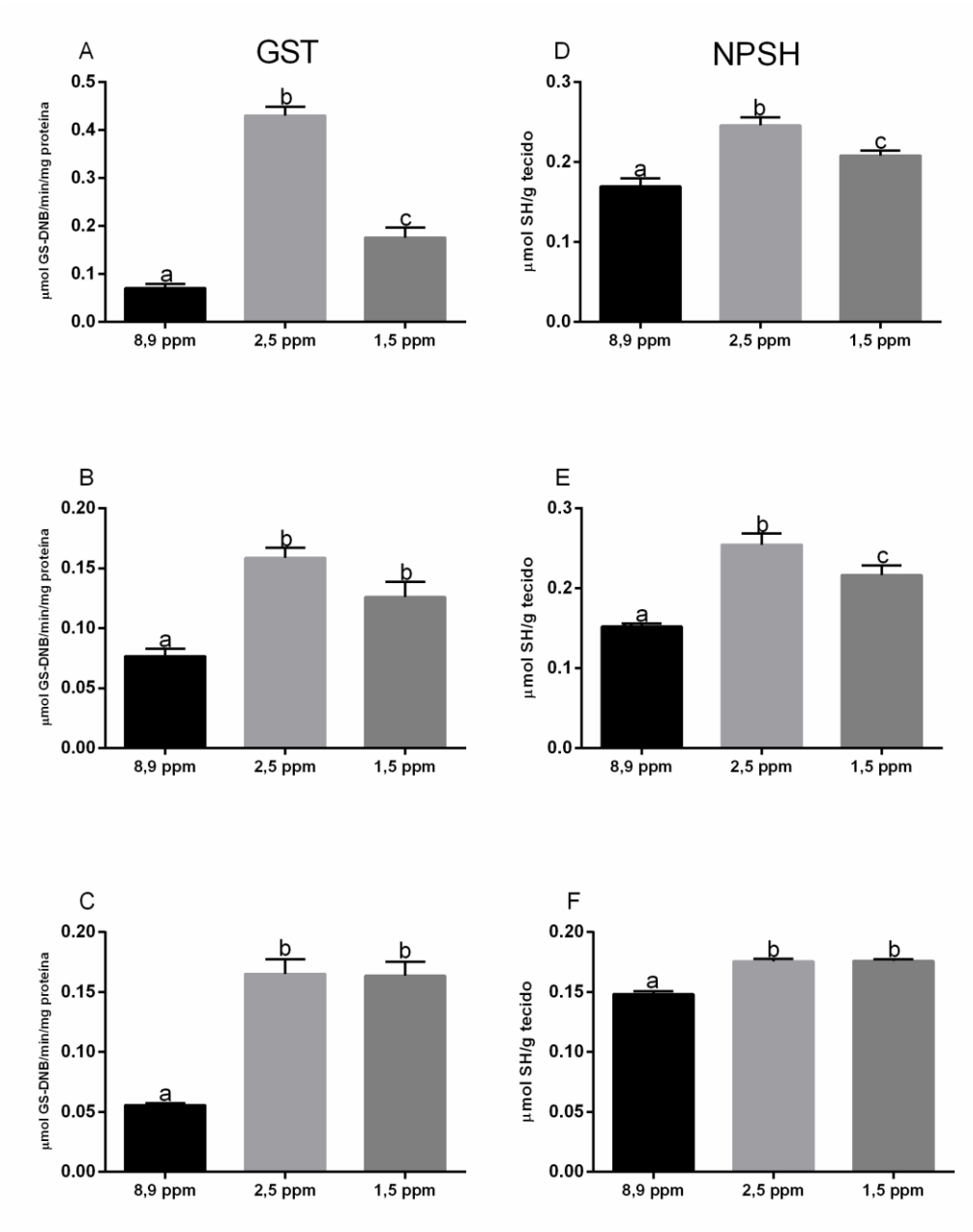


A atividade de GST no hepatopâncreas foi maior nos grupos expostos à hipóxia quando comparados ao grupo com oxigenação constante, sendo maior na hipóxia moderada (p <0,0001; Figura 4A). Indivíduos de *Aegla* expostos à hipóxia mostraram um aumento significativo na atividade de GST em brânquias e músculo, diferindo do tratamento com oxigenação normal (p <0,0001; Figura 4B e 4C).

O nível de tióis não proteicos na exposição à hipóxia moderada aumentou significativamente no músculo e hepatopâncreas (p <0,0001), sendo que o tratamento

com oxigenação normal apresentou os menores níveis (Figura 4D e 4E). Em brânquias, os níveis de tióis não proteicos foram maiores nos dois tratamentos de hipóxia, diferindo do tratamento com oxigenação constante (p <0,0001; Figura 4E).

Figura 4: Atividade de GST em hepatopâncreas (A), músculo (B) e brânquias (C), e níveis de tióis não proteicos em hepatopâncreas (D), músculo (E) e brânquias (F) de *Aegla longirostri* submetida a diferentes concentrações de OD (oxigenação controle, hipóxia moderada e grave respectivamente). Os dados são reportados como média ± erro padrão (N = 10). Números no eixo x representam a concentração de oxigênio dissolvido em cada tratamento. Diferentes letras indicam diferenças entre os grupos (p <0,05).

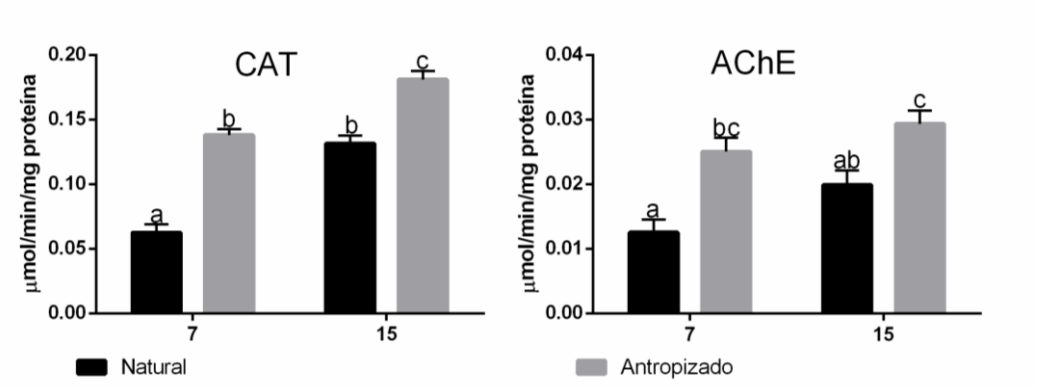


3.3 EXPERIMENTO 2: *QUALIDADE DA ÁGUA*

3.3.1 Ensaios bioquímicos

Verificou-se aumento da atividade da CAT no decorrer do experimento nos animais expostos a água do local onde foram coletados, bem como nos tratamentos expostos a água antropizada. Comparando-se todos os tratamentos, houve diferença significativa entre a água do local controle no dia 7 e os demais tratamentos, sendo que no tratamento de água antropizada e maior tempo de exposição (15 P) a atividade da CAT foi maior, diferindo dos demais tratamentos (p <0,0001; Figura 5A). A atividade da AChE aumentou no tecido muscular em animais expostos durante 15 dias a água antropizada em comparação aos grupos expostos a água natural (p <0,0001; Figura 5B).

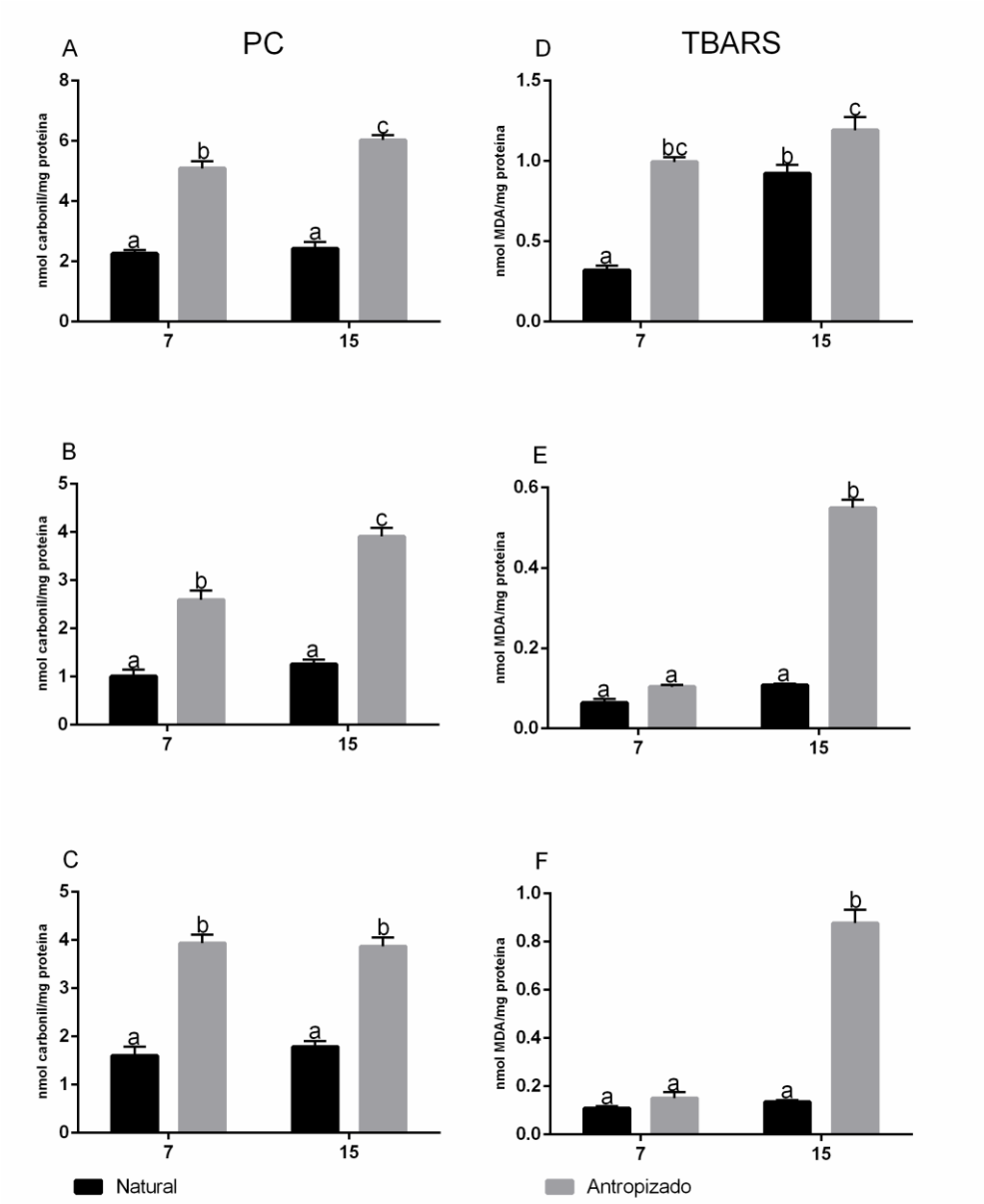
Figura 5: Atividade de CAT em hepatopâncreas (A) e atividade de AChE em músculo (B) de *Aegla longirostri* exposta a águas com qualidades diferentes durante 7 e 15 dias de tratamento. Os dados são reportados como média ± erro padrão (n = 10). Diferentes letras indicam diferenças entre os grupos (p <0,05). Números representam o tempo de exposição em dias. Box preto representa o tratamento controle e o cinza o Antropizado.



O conteúdo de proteína carbonilada em hepatopâncreas e músculo não diferiu entre os tempos de tratamento em animais expostos à água natural, sendo menores em comparação aos grupos expostos à água antropizada. Além disso, houve aumento da quantidade de proteínas carboniladas nestes tecidos com o aumento do tempo de exposição a água antropizada (p <0,0001; Figura 6). Já em brânquias o conteúdo de proteínas carboniladas aumentou em animais expostos à água antropizada em comparação aos grupos expostos à água natural (p <0,0001; Figura 5C).

Os níveis de TBARS em hepatopâncreas foram menores no grupo exposto durante 7 dias a água natural e diferiu dos demais tratamentos (p <0,0001; Figura 5D). Os animais submetidos a água antropizada durante 15 dias demonstraram aumento significativo nos níveis de TBARS em músculo e brânquias quando comparado com os demais tratamentos (p <0,0001, Figura 6 E e 6F).

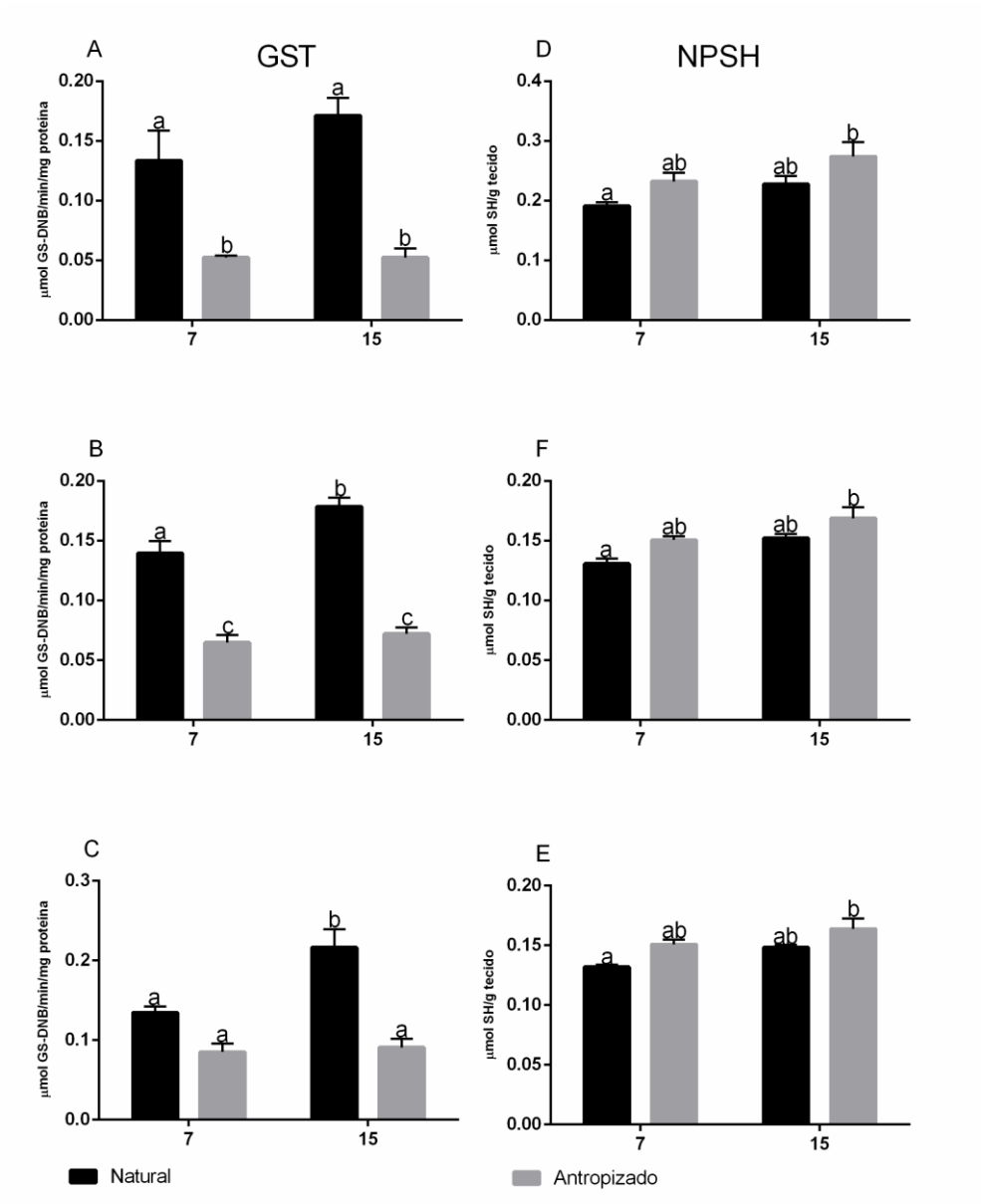
Figura 6: Conteúdo de proteína carbonilada em hepatopâncreas (A), músculo (B) e brânquias (C), e níveis de TBARS em hepatopâncreas (D), músculo (E) e brânquias (F) de *Aegla longirostri* exposta a águas com qualidades diferentes durante 7 e 15 dias de tratamento. Os dados são reportados como média ± erro padrão (N = 10). Diferentes letras indicam diferenças entre os grupos (p <0,05). Números representam o tempo de exposição em dias. Box preto representa o tratamento controle e o cinza o Antropizado.



Os animais expostos a águas antropizadas mostraram uma diminuição significativa na atividade de GST em todos os tecidos, em comparação aos

tratamentos expostos a água natural em ambos os períodos (p <0,0001; Figura 7ª, 7B e 7C). Em relação aos níveis de tióis não proteicos, em hepatopâncreas houve diferença entre o grupo do dia 7 da água natural que foi menor do que os demais tratamentos (Figura 7D). Já em brânquias e músculos apenas houve diferença entre os grupos do dia 7 da água natural e o dia 15 expostos a água antropizada (p<0,0001). (p> 0,05; Figura 7E e 7F).

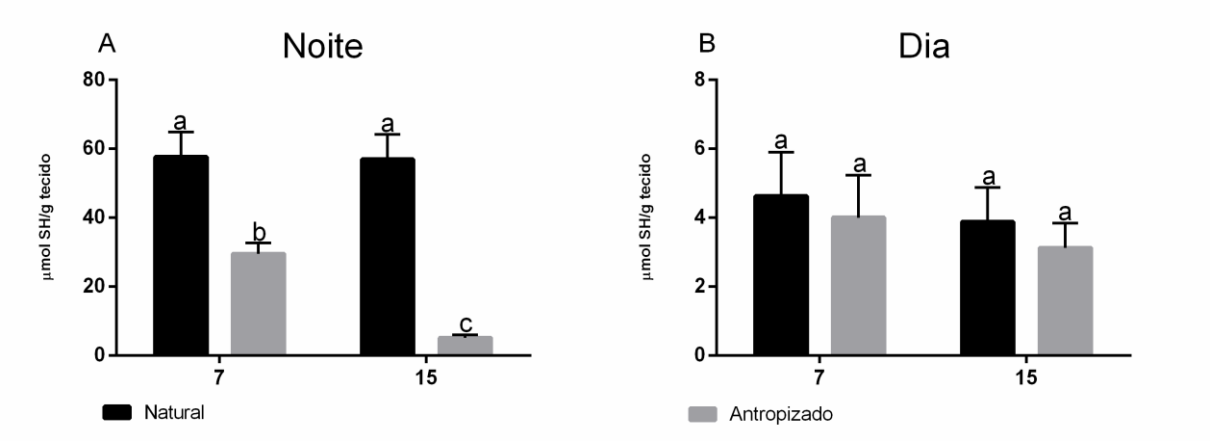
Figura 7: Atividade de GST em hepatopâncreas (A), músculo (B) e brânquias (C), e NPSH não proteicos em hepatopâncreas (D), músculo (E) e brânquias (F) de *Aegla longirostri* exposta a águas com qualidades diferentes durante 7 e 15 dias de tratamento. Os dados são reportados como média ± erro padrão (N = 10). Diferentes letras indicam diferenças entre os grupos (p <0,05). Números representam o tempo de exposição em dias. Box preto representa o tratamento controle e o cinza o Antropizado.



3.3.2 Análise comportamental

Às 22 horas, houve diminuição da atividade dos animais após 15 dias expostos a água antropizada em relação ao dia 7 de exposição e em relação ao período de exposição a água natural (que não diferiram) (p <0,05) (Figura 8a). Entretanto, durante o dia não houve diferença significativa entre os tratamentos (p>0,05) (Figura 8b).

Figura 8: Escore de atividade às 22 h (A) e às 10 h (B) de *Aegla longirostri* exposta a águas com qualidades diferentes durante 7 e 15 dias de tratamento. Os dados são reportados como média ± erro padrão (n = 10). Diferentes letras indicam diferenças entre os grupos (p <0,05). Números representam o tempo de exposição em dias. Box preto representa o tratamento controle e o cinza o Antropizado.



3.3.3 Letalidade

Houve uma maior letalidade nos animais submetidos à água antropizada. Porém, no decorrer do experimento, mesmo expostos a água natural, do local onde foram capturados, houve declínio no número de animais.

Tabela 3- Porcentagem de sobrevivência e letalidade em cada tratamento. Diferentes letras indicam diferenças entre os grupos (p <0,05). 7C – tratamento controle durante 7 dias; 15C - tratamento controle durante 15 dias; 7P tratamento com água antropizada por 7 dias; 15 P tratamento com água antropizada por 15 dias.

	7C	15C	7P	15P
Sobrevivência	100	87,7	66,6	55
Letalidade	0	13,3	33,4	45

4- DISCUSSÃO

Estudos relacionados à toxicologia aquática em laboratório comumente utilizam concentrações de xenobióticos muitas vezes não encontradas no ambiente, o que não é realista quanto à exposição ambiental, embora importantes para predições sobre os efeitos produzidos por altas quantidades destas substâncias. No presente estudo, foram avaliadas alterações bioquímicas em *A. longirostri* induzidas pela hipóxia e pela exposição a dois períodos de tempo diferentes (7 e 15 dias) a poluentes em concentrações ambientais, em relação à concentração de oxigênio dissolvido própria do riacho de origem dos animais e a sua água, de qualidade boa. A atividade dos animais também foi comparada entre os tratamentos com diferentes qualidade da água.

A exposição a hipóxia foi capaz de induzir inúmeras respostas fisiológicas em *Aegla longirostri*, o que levou ao aumento dos níveis de todos os biomarcadores testados. Águas antropizadas alteraram o comportamento desses crustáceos, diminuindo sua atividade durante a noite, o que poderia comprometer o seu comportamento de forrageio, considerando-se que possuem hábito preferencialmente noturno. A presença de pesticidas na água afetou as respostas antioxidantes e a sobrevivência de *A. longirostri*, onde houve o aumento de todos os biomarcadores testados com exceção da GST, nos tióis não proteicos somente diferiram os tratamentos 7C (tratamento controle, 7 dias de exposição) e 15P (tratamento com água antropizada, 15 dias de exposição) em brânquias e músculos.

A hipóxia pode resultar de vários fatores naturais como estratificação da coluna de água, mas é frequentemente consequência da poluição e da eutrofização. Frente à diminuição de oxigênio dissolvido na água (hipóxia), podem ocorrer mortes de peixes e invertebrados bentônicos, incluindo crustáceos. Como *A. longirostri* é encontrada em águas limpas e bem oxigenadas, é de fundamental importância entender como o sistema antioxidante dessa espécie se comporta em situação de hipóxia moderada e grave para preservação dessa espécie.

A CAT é uma das enzimas antioxidantes envolvidas na eliminação de H_2O_2. Esta enzima catalisa a conversão de H_2O_2 em oxigênio molecular e água. Suas atividades parecem ser específicas de cada tecido e parece operar especialmente no tecido hepático (STOREY, 1996). O aumento na atividade da CAT no hepatopâncreas

em animais submetidos à hipóxia pode indicar um mecanismo de defesa do organismo frente ao aumento de radicais livres, especialmente H_2O_2. O mesmo resultado foi observado para o peixe teleósteo *Cyprinus carpio* em que a hipóxia estimulou o aumento da atividade da catalase no cérebro e rim (LUSHCHAK, 2005). Em relação aos animais expostos a diferentes qualidades de água, o aumento na atividade da catalase registrada após 7 e 15 dias em contato com água contendo ATZ e IMI é uma resposta comum contra a toxicidade provocada por pesticidas (JEMEC et al. 2007; MALEV et al. 2012; GE et al. 2015).

A AChE é a enzima que hidrolisa o neurotransmissor acetilcolina nas sinapses colinérgicas de vertebrados e invertebrados. A AChE é uma enzima que é fortemente inibida por pesticidas organofosforados e carbamatos mesmo a baixas concentrações (GUILHERMINO, 2000; FULTON, KEY, 2001). A atividade da AChE aumentou em animais expostos à água contendo os pesticidas Atrazina e Imidacloprido. Este último é um neonecotinóide que bloqueia os receptores nicotínicos de invertebrados e causa aumento da atividade da acetilcolinesterase em abelhas (BOILY et al., 2013). Fatores abióticos como a hipóxia também parecem causar alterações na atividade da acetilcolinesterase, apesar de ser difícil de se encontrar estudos de hipóxia que a utilizem. Desse modo a AChE em músculo foi significativamente diferente e maior nos tratamentos de hipóxia do que o tratamento com oxigenação constante. No entanto, vários estudos indicaram que a AChE também é sensível a outros tipos de contaminantes ambientais, tais como piretróides, metais, detergentes e misturas complexas de poluentes (GILL et al., 1990; PAYNE et al, 1996; GUILHERMINO et al., 2000; BADIOU, BELZUNCES, 2008). Apesar de ser inibida por alguns pesticidas, a AChE aumentou em músculos em nossos experimentos na presença desses compostos, o que pode estar associado à diminuição da atividade dos animais a esses tratamentos.

Proteínas são biomoléculas alvo de dano oxidativo, tanto pela reação com radicais livres quanto com produtos da peroxidação lipídica (ZHANG 2010). A taxa de proteína carbonilada serve como biomarcador de danos oxidativos de proteínas (DAYANAND et al., 2012). Já a peroxidação lipídica ocorre quando radicais livres reativos interagem com ácidos graxos, especialmente os insaturados, causando reações em cascata. Esse dano aos lipídeos é muito prejudicial a membranas

biológicas, pois afetam sua integridade e funcionamento (GUTTERIDGE, 2010; DELL'ANNA, 2007). Ambos biomarcadores de danos tiveram seus níveis elevados em animais expostos a hipóxia grave e moderada, evidenciando que mesmo a elevação de algumas enzimas antioxidantes (GST, CAT) não foi capaz de minimizar os efeitos causados pelo provável aumento de espécies reativas de oxigênio. Para o hepatopâncreas, em relação aos antioxidantes analisados, parece que o aumento da catalase reduziu os níveis de peroxidação lipídica, de tal modo que os níveis ficaram mais próximos daqueles animais expostos a água natural depois de 15 dias e não tão discrepantes como visto em músculo e brânquias. Portanto nos animais expostos a água contendo pesticidas, especialmente após 15 dias, parece que o aumento dos níveis de GST não foi suficiente para impedir danos oxidativos em função dos níveis elevados de proteínas carboniladas, especialmente no músculo e no hepatopâncreas, bem como peroxidação lipídica no músculo e brânquias.

Glutationa S-transferase é uma enzima que participa do processo de detoxificação (HAMILTON, 2003; COLES, 2001; HAYES 2005). Embora o aumento de sua atividade esteja relacionada a exposição a xenobióticos, a hipóxia induziu estresse oxidativo que levou ao aumento das atividades de GST. Indivíduos expostos à hipóxia mostraram um aumento significativo na atividade de GST em todos os tecidos diferindo assim do tratamento com oxigenação constante. A GST aumentou significativamente no peixe *Perccottus glenii* e em mexilhões expostos à hipóxia (LUSHCHAK, 2007; WOO, 2013). Tióis não proteicos mostram a capacidade antioxidante atuando contra a formação de radicais livres na manutenção do balanço redox celular e na defesa contra agentes eletrofílicos (REISCHL et al., 2007). Dentre os tióis não proteicos, glutationa reduzida (GSH) é o representante mais abundante. O aumento nos níveis de tióis não proteicos em grupos expostos a hipóxia parece estar relacionado ao aumento da atividade da GST, uma vez que GST utiliza GSH, catalisando a conjugação de moléculas com a mesma. Nos animais expostos a agroquímicos, a inibição da atividade de GST é possível pela ação direta do xenobiótico e seus metabólitos na estrutura das enzimas (XING, 2012). Essa inibição pode aumentar o risco de estresse oxidativo, uma vez que não aumentou a capacidade de proteção celular. Isso explicaria os graves danos oxidativos a proteínas e lipídeos verificados nos diferentes tecidos.

A análise do perfil comportamental se demonstrou um método eficaz e complementar para avaliar os efeitos de diferentes compostos sobre a atividade dos organismos. Durante a noite os animais tiveram uma diminuição significativa no comportamento com o aumento do tempo de exposição e com a presença dos agroquímicos. Isso poderia alterar o comportamento de defesa e reprodução no ambiente natural, podendo causar alterações na dinâmica da população, mas essas são apenas suposições que necessitam de estudos mais detalhados. Tais riscos à integridade da espécie também são evidenciados pela maior porcentagem de letalidade no tratamento com exposição aos agroquímicos. Como *A. longirostri* é menos ativa durante o dia, a presença de pesticidas na água não afetou seu comportamento nesse período.

O presente estudo mostrou que a exposição de *A. longirostri* à ATZ e IMI, embora em concentração baixas, e hipóxia moderada e grave foram capazes de induzir dano oxidativo em curto prazo. Portanto, é incontestável que atividades antrópicas poderão afetar a sobrevivência e integridade dos organismos aquáticos. Efluentes domiciliares e industriais deveriam, por lei, ser tratados antes de alcançar ambientes aquáticos, pois um aumento na carga de nutrientes leva a eutrofização e consequentemente hipóxia dos organismos, especialmente os mais sensíveis, como os crustáceos. O Brasil, líder mundial no consumo de agrotóxicos, carece de uma legislação rígida que garanta seu uso consciente. A concentração de ATZ permitida pela legislação brasileira (2 µg/L) não é inócua para uma fauna aquática, visto que o experimento de exposição foi capaz de causar mudanças bioquímicas e comportamentais em crustáceos submetidos a concentrações inferiores a esta.

5- REFERÊNCIAS

AYRES-PERES, L.; ARAUJO, P. B.; SANTOS, S. (2011) Description of the agonistic behavior of *Aegla longirostri* (Decapoda: Aeglidae). Journal of Crustacean Biology 31: 379-388.

AYRES-PERES, L. et al. (2015) How variable is agonistic behavior among crab species? A case study on freshwater anomurans (Crustacea: Decapoda: Aeglidae). Journal of Zoology. 297: 115–122

BADIOU, A.; BELZUNCES, L.P. (2008) Is acetylcholinesterase a pertinent biomarker to detect exposure of pyrethroids? A study case with deltamethrin. Chemico-Biological Interactions.175: 406–409.

BOND-BUCKUP, G. et al. (2003) Crustáceos. *In*: FONTANA, C.S.; BENCKE, G.A.; REIS, R.E. Livro Vermelho da Fauna Ameaçada de Extinção no Rio Grande do Sul. Porto Alegre: Edipucrs. 73-83.

BOILY M., et al. (2013) Acetylcholinesterase in honey bees (*Apis mellifera*) exposed to neonicotinoids, atrazine and glyphosate: laboratory and field experiments. Environmental Science and Pollution Research. 20: 5603– 5614.

BRADFORD, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry. 72: 248–254.

BROUWER, M. et al. (2007) Molecular and whole animal responses of grass shrimp, *Palaemonetes pugio*, exposed to chronic hypoxia. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology. 341: 16–31.

BUEGE, J.A.; AUST, S.D. (1978) Microsomal lipid peroxidation, in: Methods Enzymol. 302–310.

BUENO, A.A.P. & BOND-BUCKUP, G. (2004) Natural Diet of *Aegla platensis* and *Aegla lingulata* Bond-Buckup and Buckup (Crustacea, Decapoda, Aeglidae) from Brazil. Acta Limnologica Brasiliensis.16:115-127.

CAJARAVILLEA, M. P. et al (2000) The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. The Science of the Total Environment. 247:295-311.

COGO, G. B.; SANTOS S. (2013) The role of *aeglids* in shredding organic matter in Neotropical streams. Journal of Crustacean Biology. 33: 519–526.

COLES, B. et al. (2001) The role of human glutathione S-transferases (hGSTs) in the detoxification of the food-derived carcinogen metabolite N-acetoxy-PhIP, and the effect of a polymorphism in hGSTA1 on colorectal cancer risk. Mutation Research. 482: 3-10.

CORREIA, A.D. et al. (2003) Age-related changes in antioxidant enzyme activities, fatty acid composition and lipid peroxidation in whole body *Gammarus locusta* (Crustacea: Amphipoda). Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**.** 289: 83–101.

DALOSTO, M.; SANTOS S. (2011) Differences in oxygen consumption and diel activity as adaptations related to microhabitat in Neotropical freshwater decapods (Crustacea). Comparative Biochemistry and Physiology-Part A. 160: 461–466.

DAYANAND, C. D.; VEGI, P. K.; KUTTY, A. V. (2012) Protein carbonyl content as a stable Oxidative stress marker in Type II Diabetes. International Journal of Biological and Medical Research. 3: 2362-2365.

DELL'ANNA, M.L. et al. (2007) Membrane lipid alterations as a possible basis for melanocyte degeneration in vitiligo. Journal of Investigative Dermatology. 127: 1226-33.

DÍAZ, R.J.; RABALAIS, N.N. (2010) Land-based activities and coastal and marine hypoxia: Global assessment of coastal low dissolved oxygen environments and water quality interactions. Rome, FAO.

DOHERTY, V. F.; OGUNKUADE O. O.; KANIFE C. U. (2010) Biomarkers of oxidative stress and heavy metal levels as indicators of environmental pollution in some selected fishes in Lagos, Nigeria. American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences. 7: 359-365.

ELLMAN, G.L.; COURTNEY, K.D.; ANDRES, J.V. (1961) A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. Biochemical Pharmacology. 7: 88-95.

ELLMAN, G. L. (1959) Tissue sulfhydryl groups. Archives of Biochemistry and Biophysics. 82: 70-77.

FULTON, M.H.; KEY, P.B. (2001) Acetylcholinesterase inhibition in estuarine fish and invertebrates as an indicator of organophosphorus insecticide exposure and effects. Environmental Toxicology and Chemistry. 20: 37–45.

GE, W. et al. (2015) Oxidative Stress and DNA Damage Induced by Imidacloprid in Zebrafish (*Danio rerio*). 63:1856-62.

GILL, T.S.; TEWARI, H.; PANDE, J.; (1990) Use of fish enzyme system in monitoring water quality: effects of mercury on tissue enzymes. Comparative Biochemistry and Physiology. 97: 287–292.

GUILHERMINO L. A.U. et al. (2000) In vitro and in vivo inhibition of *Daphnia magna* acetylcholinesterase by surfactant agents: possible implications for contamination biomonitoring. The Science of the Total Environment 247: 137-141.

GUTTERIDGE, J.M.; HALLIWELL, B. (2010) Antioxidants: molecules, medicines, and myths. Biochemical and Biophysical Research Communications. 393: 561-4.

HABIG W.B.; PABST, M.J.; JAKOBY, W.B. (1974) Glutathione S-transferase, the first enzymatic step in mercapturic acid formation. Journal of Biological Chemistry. 249: 7130–7139.

HAMILTON, D. S et al. (2003) Mechanism of the glutathione transferase-catalyzed conversion of antitumor 2-crotonyloxymethyl-2-cycloalkenones to GSH adducts. American Chemical Society. 125: 15049.

HAYES, J. D.; FLANAGAN, J. U.; JOWSEY, I. R. (2005) Glutathione transferases. Annual Review of Pharmacology and Toxicology. 45, 51.

JEMEC, A. et al. (2007) Comparative toxicity of imidacloprid, of its commercial liquid formulation and of diazinon to a non-target arthropod, the microcrustacean *Daphnia magna*. Chemosphere. 68: 1408–1418.

LAVARÍAS S. et al. (2011) Antioxidant response and oxidative stress levels in *Macrobrachium borellii* (Crustacea: Palaemonidae) exposed to the water-soluble fraction of petroleum. Comparative Biochemistry and Physiology, Part C. 153: 415–421.

LAWNICZAK M. et al. (2013) Preventive antioxidant responses to extreme oxygen level fluctuation in a subterranean crustacean. Comparative Biochemistry and Physiology, Part A. 165: 299–303.

LUSHCHAK, V.I. et al. (2005) Hypoxia and recovery perturb free radical processes and antioxidant potential in common carp (*Cyprinus carpio*) tissues. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology. 37: 1319–1330.

LUSHCHAK, V.I.; BAGNYUKOVA, T.V. (2007) Hypoxia induces oxidative stress in tissues of a goby, the rotan *Perccottus glenii*. Comparative Biochemistry and Physiology B. 148: 390–397.

MALEV, et al. (2012) Comparative toxicity of imidacloprid and its transformation product 6-chloronicotinic acid to non-target aquatic organisms: Microalgae *Desmodesmus subspicatus* and amphipod *Gammarus fossarum*. Pesticide Biochemistry and Physiology.104:178–186.

MATEO-SAGASTA, J.; BURKE J. (2010) Agriculture and water quality interactions: a global overview. SOLAW Background thematic report- tr08. FOOD and agriculture organization of the United nations, Rome.

NELSON D.P.; KIESOW L.A. (1972) Enthalpy of decomposition of hydrogen peroxide by catalase at 25°C (with molar extinction coefficients of H2O2 solution in the UV), Analytical Biochemist. 49: 474 – 478.

PAYNE, J.F.; MATHIEU, A.; MELVIN, W.; FANCEY, L.L. (1996) Acetylcholinesterase, an old biomarker with a new future? Field trials in association with two urban rivers and a paper mill in Newfoundland. Marine Pollution Bulletin. 32: 225–231.

RABALAIS, N.N. et al. (2010) Dynamics and distribution of natural and human-caused hypoxia. Biogeosciences. 7: 585–619.

REISCHL, E.; DAFRE, A. L.; FRANCO J. L.; WILHELM-FILHO, D. (2007) Distribution, adaptation and physiological meaning of thiols from vertebrate hemoglobins. Comparative Biochemistry and Physiology, Part C: Toxicology & Pharmacology. 146: 22-53.

ROBINSON, J. (1986) Evaluation of a health assessment index with reference to bioaccumulation of Metals in *Oreochromis Mossambicus* (Peters, 1852) and aspects of the morphology of *Lernaea cyprinacea*, Linnaeus, 1758", M.Sc. Thesis, Rand Afrikaans University, South Africa.

SABIN G.P.; PRESTES O.D.; ADAIME M.B.; ZANELLA, R. (2009) Multiresidue Determination of Pesticides in Drinking Water by Gas Chromatography-Mass Spectrometry after Solid-Phase Extraction. Journal Brazilian Chemist Socity. 20: 918–925.

SANTOS, S.; AYRES-PERES, L.; CARDOSO, R.C.F.; SOKOLOWICZ, C.C. (2008) Natural diet of the freshwater anomuran *Aegla longirostri* (Crustacea, Anomura, Aeglidae). Journal of Natural History. 42:1027-1037.

SANTOS, S. et al. (2017) Diversity and conservation status of *Aegla* spp. (Anomura, Aeglidae): an update. Nauplius (*in press*).

SILVA, DCVR; POMPÊO, M; PAIVA, TCB. A ecotoxicologia no contexto atual no Brasil. In: POMPÊO, M; et al. 2015. Ecologia de reservatórios e interfaces. – São Paulo: Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo.

SILVA, C.M.M.; FAY, E.F. (2004) Agrotóxicos e ambiente. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica.

STEINBERG, C.E.W. et al. (2006) Dissolved humic substances – ecological driving forces from the individual to the ecosystem level? Freshwater Biology.51: 1189-1210.

STEINBERG, C.E.W. et al. (2008) Genes and environment - striking the fine balance between sophisticated biomonitoring and true functional environmental genomics. Science of the Total Environment.400**:** 142-161.

STOREY, K.B. (1996) Oxidative stress: animal adaptations in nature. Brazilian Journal of Medical and Biological Research. 29: 1715–1733.

SWACKHAMER, D. L. et al. (2004) Issues in Ecology: Impacts of Atmospheric Pollutants on Aquatic Ecosystems. Ecological Society of America. 12: 2-23.

TOMITA, R. Y.; BEYRUTH, Z. (2002) Toxicologia de agrotóxicos em ambiente aquático. Biológico, São Paulo. 64: 135-142.

TIMOFEYEV, M.A. et al. (2006a) Specific antioxidants reaction to oxidative stress promoted by natural organic matter (NOM) in two endemic amphipod species from Lake Baikal**.** Environmental Toxicology**.** 21: 104-110.

TIMOFEYEV, M.A. et al.(2006 b) Natural organic matter (NOM) induces oxidative stress response in freshwater amphipods *Gammarus lacustris* Sars and *G. tigrinus* (Sexton). Science of the Total Environment. 366: 673–681.

UN-WATER. (2009) The United Nations World Water Development Report 3: Water in a changing world. Paris and London, UNESCO and Earthscan. 127-149.

WANNAMAKER, C.M.; RICE, J.A. (2000) Effects of hypoxia on movements and behavior of selected estuarine organisms from the southeastern United States. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**.** 249: 145–163.

WOO et al. (2013) Expressions of oxidative stress-related genes and antioxidant enzyme activities in *Mytilus galloprovincialis* (Bivalvia, Mollusca) exposed to hypoxia. Zoological Studies. 52:15.

WU, R. S. (2002) Hypoxia: from molecular responses to ecosystem responses. Marine Pollution Bulletin**.** 45: 35-45.

XING H. et al. (2012) Effects of atrazine and chlorpyrifos on activity and transcription of glutathione S-transferase in common carp (*Cyprinus carpio* L.). Environmental Toxicology and Pharmacology. 33: 233-44.

YAN, L.J.; TRABER M.G.; PACKER L. (1995) Spectrophotometric Method for Determination of Carbonyls in Oxidatively Modified Apolipoprotein B of Human Low-Density Lipoproteins. Analytical Biochemistry.228: 349–351.

ZHANG, X. H. (2010) Regulation of protein function by residue oxidation. Proteomics Insights. 3: 17-24.

3. CONCLUSÕES GERAIS

Nosso estudo mostrou que a temperatura da água pode influenciar as respostas fisiológicas de *A. longirostri*, indicando que um aumento da temperatura do riacho trará consequências negativas para este grupo. Mesmo em um estudo de curto prazo, altas temperaturas foram capazes de causar alterações não só na atividade, mas também no equilíbrio e taxa de sobrevivência desses crustáceos. Em função da variação das respostas antioxidantes, pode-se afirmar que estas são tecido e espécie-específicas. Em *A. longirostri*, extremos de hipertermia podem reduzir as defesas antioxidantes.

Mesmo em um experimento de curto prazo, a exposição à hipóxia foi capaz de mudar as respostas antioxidantes. Esses animais parecem exigir águas bem oxigenadas para sobreviver e a hipóxia pode afetar o seu sistema antioxidante e, consequentemente a sua sobrevivência, podendo assim ter impactos em nível de população em *A. longirostri.*

Águas antropizadas têm o potencial de alterar o comportamento desses eglídeos, diminuindo sua atividade durante à noite, podendo comprometer o seu comportamento de forrageio. Esses animais são sensíveis à presença de pesticidas mesmo em concentrações muito baixas, demostrado com o aumento de todos os biomarcadores de estresse oxidativo, com exceção da GST que foi inibida. A maior porcentagem de letalidade no tratamento com exposição à agua contendo agroquímicos, ainda que em baixas concentrações, deixa evidente os riscos à integridade da espécie. O presente estudo mostrou que a exposição de *A. longirostri* à ATZ e IMI, embora em concentração baixas foram capazes de induzir dano oxidativo num tempo maior de exposição. Isso ressalta a importância de se testar a influência de poluentes a longo prazo, e de diminuir as suas concentrações nas aguas através de uma legislação mais rigorosa.

A análise do perfil comportamental se mostrou um método eficaz e complementar para avaliar os efeitos da temperatura e de diferentes qualidades de água sobre a atividade do organismo estudado. Novos estudos, levando em consideração a qualidade do ambiente associada ao aumento da temperatura, são necessários para termos uma melhor compreensão das consequências dos impactos antrópicos causados ao ecossistema aquático de água doce.