



Universidade Federal do Rio de Janeiro
Campus Macaé



Avaliação da Produção de Óxido Nítrico pelos Hemócitos da Ascídia *Phallusia nigra*
após Exposição por Metais

Danielly da Fonte Carvalho Martins

MACAÉ
DEZEMBRO DE 2013

Danielly da Fonte Carvalho Martins

Avaliação da Produção de Óxido Nítrico pelos Hemócitos da Ascídia *Phallusia nigra*
após Exposição por Metais

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Universidade Federal do
Rio de Janeiro como exigência parcial
para obtenção do título de Bacharel em
Farmácia

Orientadora: Dra. Cintia Monteiro de
Barros

MACAÉ
DEZEMBRO DE 2013

M379

Martins, Danielly da Fonte Carvalho.

Avaliação da produção de óxido nítrico pelos homócitos da Ascídia *Phallusia nigra* após exposição por metais / Danielly da Fonte Carvalho Martins. - Macaé: [s. n.], 2013. 62 f. : il.

Orientadora: Cíntia Monteiro de Barros

Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Farmácia) - Universidade Federal do Rio de Janeiro. Campus Macaé - Macaé, 2013.

Bibliografia: f. 56-62.

1. Poluição marinha. 2. Metais. 3. Hemócitos. 4. Óxido nítrico. I. Barros, Cíntia Monteiro de. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Campus Macaé. III. Título.

CDD 363.7

Danielly da Fonte Carvalho Martins

Título: Avaliação da Produção de Óxido Nítrico pelos Hemócitos da Ascídia *Phallusia nigra* após Exposição por Metais

Monografia Apresentada ao Curso de Farmácia da Universidade Federal do Rio de Janeiro como um dos requisitos para obtenção do título de farmacêutico

Orientadora: Cintia Monteiro de Barros

MACAÉ
DEZEMBRO DE 2013

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por iluminar meu caminho, pela sabedoria alcançada a cada dia e pela vitória conquistada.

Aos meus pais, Sueli e Antonio, pessoas das quais me orgulho imensamente é pra vocês que dedico essa vitória! Agradeço profundamente por terem me acompanhado em toda essa jornada, por serem compreensivos nos meus momentos de ausência e serem fonte de coragem e inspiração nos momentos difíceis. Obrigada por todo o incentivo e carinho que me concederam...sem vocês essa jornada seria inviável!

Ao meu amor, Thiago, e a sua família que me acompanharam durante todo esse período. Obrigada, meu amor, pois, sempre estive ao meu lado nos momentos mais difíceis desta caminhada, quando os obstáculos pareciam intransponíveis. Obrigada por ter entendido a minha ausência, por compreender a minha falta de tempo, minha tensão nos períodos de prova e todo meu nervosismo. Reconheço e agradeço o inestimável e importante apoio, amor, compreensão, abdicção e sacrifício que me foram dedicados nesta longa caminhada. Alegre-se, pois os méritos desta vitória também são seus.

Aos meus irmãos, Douglas, David e Ana Paula, e a toda a minha família pela força e por me acompanharem durante todos esses anos.

A todos os meus queridos amigos, principalmente a Camila, Bia, Gessica, Monique, Viviane, Thalita, Pamela, Vitor, Gabriel e Thiago, agradeço a amizade, o companheirismo e os muitos momentos de risada e pura alegria que não me deixaram esquecer a importância de vocês nessa longa caminhada.

Aos professores pelos ensinamentos.

A dona Júlia e a dona Cláudia pelo carinho, confiança e por terem sido a minha segunda família nesses anos em Macaé.

À minha orientadora, Cintia, pela amizade, dedicação e paciência durante todos esses anos e a todos do laboratório de morfologia pelo convívio.

Aos professores Dra. Flavia Mury e Dr. Maurício Mussi Molisani por aceitarem participar da avaliação desse trabalho.

À FAPERJ, FUNEMAC e ao CNPQ pela verba cedida para a realização desse trabalho.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** - Escala filogenética, indicando a proximidade do Filo Chordata com o Vertebrata. Modificado de DELSUC et al., 2006.20
- Figura 2** - Esquema de um corte longitudinal de uma ascídia solitária. Modificado de Brusca e Brusca, 2003.....21
- Figura 3** - Esquema ilustrativo da formação de NO a partir da conversão da L-arginina à L-citrulina pela catálise NOS (Fonte: Danielly Martins).23
- Figura 4** - Expressão da enzima NOS pelos hemócitos da ascídia *Styela plicata*.(A) histoquímica de hemocitos para NADPH-diaforase. Duas células fortemente marcadas entre outras células coradas. (b) controle negativo da reação. (c, d) Imunoeletromicroscopi a com anticorpo anti-i NOS (setas) no citoplasma de uma célula do tipo linfócito em dois diferentes aumentos. Barra de escala, (a) 4 μm , (b) 10 μm , (c) 0,17 μm , inserir 0,34 μm , (d) 0,2 μm . Modificado de DE BARROS *et al.*, 2009.24
- Figura 5** - Foto da ascídia *Phallusia nigra*.....25
- Figura 6** - Porto do Forno, Arraial do cabo, RJ, Brasil. Seta branca: ponto da realização da coleta (Fonte: www.googlemaps.com.br).28
- Figura 7** - A - Esquema de corte longitudinal de ascídia, o círculo vermelho representa o local no qual a técnica de sangramento foi realizada. B- Obtenção dos hemócitos. (Fonte: <http://www.brasilecola.com/biologia/urochordata.htm>)29
- Figura 8** - Demonstração da atividade do L-NAME (Fonte: Danielly Martins).31
- Figura 9** - Demonstração da atividade do DETA/NO (Fonte: Danielly Martins).....32
- Figura 10** - Micrografia dos hemócitos da ascídia *Phallusia nigra*. (a, c, e, g, i, k, m, o) Hematoxilina e Eosina (b, d, f, h, j, l, n, p) Azul de toluidina. (a, b) Hemoblasto; (c, d) Célula em Anel de Sinete; (e, f) Granulócito refrátil univacuolar (URG); (g, h) Célula

compartimentar; (i, j) Mórula; (k, l) Nefrócito; (m, n) Célula pigmentar e (o, p) Amebócito;
Barra de escala: 10 μ m38

Figura 11 - Produção de NO, pelos hemócitos da ascídia *Phallusia nigra*, em diferentes tempos, após exposição a concentrações crescentes de citrato de chumbo. A intensidade de fluorescência é apresentada pela média \pm erro padrão (n=5). * P <0,05, *** P <0,0001 significância quando comparado ao controle; ** P <0,001, +++ P <0,0001 Nível de significância comparado à concentração de 10⁻⁸M; ## P <0,001, ### P <0,0001 significância quando comparado à concentração de 10⁻⁵M; 39

Figura 12 - Análise de NO produzido pelos hemócitos da ascídia *Phallusia nigra*, em diferentes tempos, após serem estimulados com concentrações crescentes de cloreto de magnésio. A intensidade de fluorescência é apresentada pela média \pm erro padrão (n=5). * P <0,05, *** P <0,0001 nível de significância em relação ao controle.....40

Figura 13 - Detecção da produção de óxido nítrico pelos hemócitos estimulados por crescentes concentrações de cloreto de manganês durante 30, 60 e 90 minutos. A intensidade de fluorescência é apresentada pela média \pm erro padrão (n=5). * P <0,05, ** P <0,001, *** P <0,0001 nível de significância quando comparado ao controle.41

Figura 14 - Detecção da produção de NO pelos hemócitos, da ascídia *Phallusia nigra*, pré-incubados com L-NAME e posteriormente expostos ao citrato de chumbo 0,1M, em diferentes tempos. A intensidade de fluorescência é apresentada pela média \pm erro padrão (n=5). * P <0,05, *** P <0,0001 significância comparado ao controle. *P <0,05, **P <0,001, +++P <0,0001 indica a significância em relação à concentração de 0,1M; # P <0,05, ## P <0,001, ### P <0,0001 Nível de significância em relação à concentração de 0,1M do metal + 1mM de L-NAME; ϕ P <0,05, $\phi\phi$, $\phi\phi\phi$ P <0,0001 Nível de significância em relação à concentração de 0,1M do metal + L-10mM de L-NAME.43

Figura 15 - Produção de NO pelos hemócitos, da ascídia *Phallusia nigra*, estimulados com cloreto de magnésio 0,1M após exposição prévia ao L-NAME, em diferentes tempos. A

intensidade de fluorescência é apresentada pela média \pm erro padrão (n=5). * P <0,05, ** P <0,001, *** P <0,0001 significância ao comparar com o controle. +++ P <0,001 significância em relação ao magnésio 0,1M; ^{cc} P <0,001 Nível de significância em relação à concentração de 0,1M do metal + 10mM de L-NAME.44

Figura 16 - Produção de NO, pelos hemócitos da ascídia *Phallusia nigra*, estimulados com cloreto de manganês 0,1M, após exposição prévia ao L-NAME, nos tempos de 30, 60 e 90 minutos. A intensidade de fluorescência é apresentada pela média \pm erro padrão (n=5). *** P <0,0001 significância quando comparado ao controle; +++ P <0,0001 significância em relação ao cloreto de manganês 0,1M; ### P <0,0001 nível de significância em relação à concentração de 0,1M do metal + 1mM de L-NAME; ^{cc} P <0,001, ^{ccc} P <0,0001 Nível de significância em relação à concentração de 0,1M do metal + 10mM de L-NAME.45

Figura 17 - Produção de NO, após exposição dos hemócitos da ascídia *Phallusia nigra*, pré-incubados com DETA-NO, ao citrato de chumbo 0,1M em diferentes tempos. A intensidade de fluorescência é apresentada pela média \pm erro padrão (n=5). * P <0,05, ** P <0,001, *** P <0,0001 significância quando comparado ao controle; + P <0,05, +++ P <0,0001 significância em relação ao citrato de chumbo 0,1M; ## P <0,001, ### P <0,0001 significância em relação à concentração de 0,1M do metal + 200 μ M de DETA/NO; ^{cc} P <0,001, ^{ccc} P <0,0001 significância em relação à concentração de 0,1M do metal + 400 μ M de DETA/NO.....46

Figura 18 - Produção de NO, pelos hemócitos da ascídia *Phallusia nigra*, estimulados com cloreto de magnésio na presença prévia de DETA/NO. A intensidade de fluorescência é apresentada pela média \pm erro padrão (n=5). * P <0,05 significância quando comparado ao controle; + P <0,05 significância em relação ao cloreto de magnésio 0,1M; ^c P <0,05 significância em relação à concentração de 0,1M do metal + 400 μ M de DETA/NO.....47

Figura 19 - Detecção da produção de óxido nítrico, pelos hemócitos da ascídia *Phallusia nigra*, estimulado com cloreto de manganês na presença prévia de DETA/NO. A intensidade de fluorescência é apresentada pela média \pm erro padrão (n=5) para. * P <0,05 significância quando comparado ao controle.48

- Figura 20** - Espectro da microanálise de raios-X dos hemócitos da ascídia *P. nigra* controle. Os componentes encontrados intracelularmente incluem o (C) carbono, (O) oxigênio, (Si) silício, (S) enxofre, (Cl) cloro, (Ca) cálcio, (V) vanádio e (Cu) cobre.50
- Figura 21** - Espectro da microanálise de raios-X da ascídia estimulada com citrato de chumbo. Esse espectro mostra a internalização do chumbo pelos hemócitos da ascídia *Phallusia nigra*. Os componentes encontrados intracelularmente incluem o (C) carbono, (O) oxigênio, (Na) sódio, (Si) silício, (S) enxofre, (Pb) chumbo, (Cl) cloro e (Cu) cobre.51
- Figura 22** - Espectro da microanálise de raios-X dos hemócitos estimulados com cloreto de magnésio 0,1M. Os componentes encontrados intracelularmente incluem o (C) carbono, (O) oxigênio, (Na) sódio, (Mg) magnésio, (Si) silício, (P) fósforo, (S) enxofre, (Cl) cloro, (Ca) cálcio, (Ti) titânio, (V) vanádio e (Cu) cobre.52
- Figura 23** - Espectro obtido com a microanálise dos hemócitos estimulados com cloreto de managês 0,1M. Os componentes encontrados intracelularmente incluem o (C) carbono, (O) oxigênio, (Al) alumínio, (Si) silício, (P) fósforo, (S) enxofre, (Cl) cloro, (Ti) titânio, (V) vanádio e (Cu) cobre.....53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Análise da viabilidade celular dos hemócitos da ascídia <i>Phallusia nigra</i>	49
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

cNOS	Óxido Nítrico Sintase Constitutiva
DAF-FM DA	Diacetato de 4-amino-5-metilamino-2',7'-difluororesceína
DETA/NO	Dietilenotriamina/ Óxido nítrico
HE	Hematoxilina e Eosina
iNOS	Óxido Nítrico Sintase Induzível
L-NAME	NG-nitro-L-arginina-metil-éster
LPS	Lipopolissacarídeo de <i>Escherichia coli</i>
MAC	Tampão Marinho Anticoagulante
NO	Óxido Nítrico
NOS	Óxido Nítrico Sintase
NRS	Espécie Reativa de Nitrogênio
ROS	Espécie Reativa de Oxigênio
URG	Granulócito Refrátil Univacuolar

RESUMO

Avaliação da Produção de Óxido Nítrico pelos Hemócitos da Ascídia *Phallusia nigra* após Exposição por Metais

Metais contribuem para a poluição marinha, assim, animais marinhos, como as ascídias, são expostos a essa contaminação. Ascídias são excelentes modelos para estudos comparativos de vários sistemas, inclusive o imunológico, devido à proximidade filogenética com vertebrados. Dentre os diversos parâmetros desse sistema encontra-se o óxido nítrico (NO). Este estudo verifica alterações na produção de NO pelos hemócitos da ascídia *Phallusia nigra* frente a metais. Para isso, os hemócitos foram incubados com DAF-FM DA (4-amino-5-metilamina-2,7-difluoresceína diacetato). Após, estimulados com, citrato de chumbo, cloreto de magnésio e cloreto de manganês. Posteriormente, adicionou-se o DETA/NO (dietilenotriamina) ou o L-NAME (L-nitro arginina metil-éster). Com isso, observou-se que na presença dos metais e do DETA/NO a produção de NO aumentou. Porém, quando os hemócitos foram expostos ao L-NAME essa produção reduziu, indicando a ação da óxido nítrico sintase na produção de NO. Através da classificação morfológica foram encontrados oito hemócitos: Hemoblasto, Célula em Anel de Sinete, Granulócito Refrátil Univacuolar, Célula Compartimentar, Célula do Tipo Mórula, Nefrócito, Célula Pigmentar e Amebócitos. Na microanálise os metais chumbo e magnésio foram internalizados pelos hemócitos. Pode-se concluir que todos os metais estimularam a produção de NO pelos hemócitos da *Phallusia nigra*.

Palavras-chave: Poluição, metais, ascídias, hemócitos e óxido nítrico.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1- Aspectos gerais sobre poluição marinha	15
1.2 - Poluição marinha causada pelo descarte inadequado de águas industriais residuais	15
1.2.1 - <i>Magnésio</i>	16
1.2.2 - <i>Chumbo</i>	17
1.2.3 - <i>Manganês</i>	18
1.3 - Bioindicadores da poluição marinha	18
1.4 - Ascídias como modelos de estudo no biomonitoramento ambiental	19
1.5 - Aspectos gerais das ascídias.....	20
1.6 - Hemócitos.....	22
1.7 - Espécies Reativas de Oxigênio e Nitrogênio.....	22
1.8 - Óxido Nítrico (NO)	23
2. JUSTIFICATIVA	26
3. OBJETIVOS	27
3.1 - Objetivos gerais	27
3.2 - Objetivos específicos.....	27
4. MATERIAIS E MÉTODOS	28
4.1 - Área da coleta.....	28
4.2 - Manutenção das ascídias.....	28

4.3 - Caracterização morfológica dos hemócitos da ascídia <i>Phallusia nigra</i>	29
4.3.1 - <i>Microscopia de luz</i>	29
4.4 - Quantificação da produção de NO decorrente da estimulação por metais	30
4.5 - Produção de NO pelos hemócitos expostos aos metais, após pré-incubação com o inibidor ou com o doador de NO.....	31
4.5.1 - <i>Produção de NO pelos hemócitos expostos aos metais, após pré-incubação com L-NAME</i>	31
4.5.2 - <i>Produção de NO pelos hemócitos expostos aos metais após pré-incubação com DETA/NO</i>	32
4.6 - Viabilidade celular	33
4.7 - Microanálise.....	34
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
5.1 - Classificação morfológica dos hemócitos da ascídia <i>Phallusia nigra</i>	36
5.2 - Ação dos metais sobre a Produção de NO pelos hemócitos da ascídia <i>Phallusia nigra</i>	39
5.3 - Envolvimento da NOS na produção de NO pelos hemócitos de <i>P. nigra</i>	41
5.4 - Ação do DETA/NO sobre a produção de NO pelos hemócitos de <i>P. nigra</i>	45
5.5 - Internalização dos metais pelos hemócitos da ascídia <i>Phallusia nigra</i>	450
6. CONCLUSÕES	54
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56

1. INTRODUÇÃO

1.1- Aspectos gerais sobre poluição marinha

A poluição é um grande problema que afeta direta ou indiretamente os seres expostos a ela, causando diversos prejuízos aos mesmos. Esse problema vem ganhando a devida importância e destaque. A notoriedade desse assunto e a percepção da responsabilidade ambiental vêm aumentando devido à ocorrência de inúmeras catástrofes ecológicas e alterações ambientais nos últimos anos. Formas para o combate ou decréscimo da poluição vêm sendo amplamente discutidas e medidas de controle e monitoramento sendo tomadas (VAN DER PLOEG e DE ZEEUW, 1992).

Dentre os diversos tipos de poluição, encontra-se a poluição marinha. Esta contaminação pode ser ocasionada por diferentes tipos de agentes poluidores, como por exemplo, o descarte inadequado de esgoto doméstico, a atividade agrícola extensiva, o descarte de águas industriais residuais, entre outras atividades antropogênicas (DE OLIVEIRA, 2012).

O agente poluidor que contribui significativamente no que diz respeito à detecção de elevados níveis de substâncias tóxicas no ambiente aquático é o descarte de águas industriais residuais. Essas substâncias podem causar efeitos nocivos ao homem, aos seres que vivem no ambiente marinho e ao ecossistema como um todo e são representadas, principalmente, pelo descarte de metais, incluindo metais pesados (MORAES e JORDÃO, 2002).

Através do monitoramento da exposição e da identificação de bioindicadores marinhos é possível identificar a extensão e a intensidade do impacto causado por pelas substâncias tóxicas despejadas nos mares de maneira inadequada (FONTAÍNHAS-FERNANDES, 2005).

1.2 - Poluição marinha causada pelo descarte inadequado de águas industriais residuais

Quando os distúrbios causados ao ecossistema aquático são resultantes da toxicidade aguda, estes são fáceis de observar e seus impactos são geralmente

dramáticos. No entanto, os efeitos subletais são mais discretos, porém mais difíceis de serem assessorados e observados. A toxicidade subletal causa diversos prejuízos, dentre eles, a redução da competitividade das espécies afetadas, podendo afetar populações biológicas através de doenças, parasitismo e predação (OLIVER e FISHER, 1999).

Diversos estudos relacionados à ação de substâncias tóxicas envolvem roedores e mamíferos. Por isso, pouco se sabe com relação às consequências dos contaminantes ambientais sobre as espécies aquáticas e sobre o ambiente marinho como um todo. As principais substâncias tóxicas, comumente relacionadas ao descarte de águas residuais industriais, são metais (FOURNIER *et al.*, 2000).

Apesar de se saber pouco sobre a ação de substâncias tóxicas em animais e no ambiente marinho, o número dos experimentos envolvendo os mesmos vêm crescendo significativamente. No entanto, a maioria dos estudos que correlacionam à ação de substâncias tóxicas com os animais marinhos envolvem experimentos com moluscos. Como é o caso do estudo em que o molusco *Mytilus edulis* é exposto ao cádmio durante um intervalo de sete dias que culmina no aumento do número de hemócitos circulantes. Já a exposição do mesmo molusco ao cobre aumenta em 60% a mortalidade dos hemócitos (COLES *et al.*, 1995).

Dentre os metais frequentemente descritos como poluentes marinhos encontra-se o magnésio. Esse metal é amplamente detectado em águas contaminadas devido ao fato de ser o metal leve mais utilizado e produzido em escala comercial (DENNIS, 1963). Além do magnésio, encontram-se, metais pesados como o manganês e o chumbo. O motivo desses metais serem frequentemente relatados como agentes poluentes, está relacionado com as posições em que se situam no mercado de consumo mundial, sendo estas a terceira e a sexta posição, respectivamente (ILZSG, 2003).

1.2.1 - Magnésio

O magnésio, representado pelo símbolo Mg, é um metal alcalino-terroso, elemento químico que se apresenta sólido em condições ambientes e, por isso, é amplamente empregado por indústrias, principalmente, nos seguimentos automotivo, ferroviário e aeroespacial (ISHIKAWA *et al.*, 2005).

Esse metal é considerado um elemento essencial ao organismo já que desempenha papel fundamental em atividades enzimáticas. O magnésio é descrito como cofator de diversas reações metabólicas, dentre elas o metabolismo energético e proteico, glicólise e síntese de adenosina trifosfato. Além dessas atividades, esse metal está relacionado com a regulação de diversas funções como a hormonal e imunológica e também como estabilizador da membrana neuromuscular e cardiovascular (WILBORN *et al.*, 2004). Embora esse elemento seja considerado essencial, níveis elevados do mesmo causam prejuízo ao organismo. Por esse motivo, diversos estudos são realizados relacionando poluição ambiental por metais com a contaminação de organismos. Um exemplo disso foi a realização de pesquisas, nas quais foram demonstradas altas concentrações de magnésio em guelras de peixes durante o seu biomonitoramento (DHANEESH *et al.*, 2012). A poluição do ambiente aquático com metais pode causar prejuízos ao homem, já que os animais marinhos, como os peixes são acumuladores desses componentes presentes na água e os mesmos são empregados na nutrição humana (KESKIN *et al.*, 2007).

1.2.2 - Chumbo

O chumbo é um metal pesado, identificado pelo símbolo Pb, possui coloração cinza azulado brilhante. A sua utilização industrial está relacionada com a fabricação e reciclagem de baterias de automóveis, com a indústria de tintas, pintura em cerâmica e soldagem. O chumbo é considerado um elemento não essencial, tóxico que se acumula no organismo (MOREIRA e MOREIRA, 2004).

Esse metal pesado é altamente prejudicial ao homem, pois é capaz de afetar quase todos os órgãos e sistemas, no entanto, as lesões mais significativas causadas por ele parecem ocorrer de maneira subcelular e através de efeitos neurológicos sobre o desenvolvimento (MOREIRA e MOREIRA, 2004).

Diversos estudos abordam a utilização de animais marinhos como bioindicadores de poluição e relatam o chumbo como um agente poluidor de grande preocupação em todo o mundo, como é o caso do estudo realizado por pesquisadores em Istambul. Nesse estudo, os níveis de chumbo e cádmio foram mensurados em amostras de tecidos de mexilhões a fim de avaliar o estado de

poluição por esse metal. Com isso, observouse que as concentrações destes metais em tecidos moles excederam os níveis aceitáveis e representavam perigo se utilizado como fonte de alimento para o consumo humano (KAYHAN *et al.*, 2007).

1.2.3 - Manganês

O manganês é um metal pesado representado pelo símbolo, Mn, possui coloração cinza escuro é um metal duro e quebradiço. Esse metal é amplamente empregado na indústria siderúrgica, sua ampla utilização pode ser justificada pelas suas características físico-químicas, além disso, esse metal possui atividade como agente dessulfurante e desoxidante (LEMOS, 2011).

O manganês é um metal considerado essencial por apresentar funções cruciais em organismos animais e vegetais. Dentre as funções importantes para o organismo animal, pode-se, destacar a atividade como cofator de uma grande variedade de enzimas, além disso, o mesmo é fundamental na síntese de dopamina e de colesterol, entre outras funções. No entanto, em níveis elevados, esse metal é nocivo ao homem e está relacionado a problemas como desordens neurológicas, motoras e também com problemas respiratórios (DA ROCHA e AFONSO, 2012).

Muitos trabalhos tem evidenciado a presença de níveis elevados do metal manganês em tecidos de animais marinhos. Um exemplo é o estudo realizado na Turquia, que relata níveis elevados do metal pesado manganês, na cabeça de *Merlangius merlangus* (badejo), presente no Mar Negro. No entanto, nessa pesquisa, apesar dos níveis elevados do metal os valores encontrados indicam que não há risco com relação ao consumo humano desse peixe (FINDIK e CICEK, 2011). Apesar de nesse experimento não ter sido encontrado risco para o consumo humano, esses animais, particularmente os filtradores, são substancialmente expostos à contaminação do ambiente aquático, e por isso, são frequentemente utilizados como bioindicadores marinhos.

1.3 - Bioindicadores da poluição marinha

O uso de bioindicadores, no Brasil, é permitido e estimulado pela legislação de recursos hídricos (Lei 9433/97, que institui a Política Nacional de Recursos

Hídricos e cria o Sistema Nacional de Gerenciamento de Recursos Hídricos (SILVEIRA *et al.*, 2004).

A utilização de biomarcadores permite avaliar a quantidade de um determinado agente químico em diferentes amostras ambientais ou através da checagem de parâmetros biológicos (AMORIM, 2003). No entanto, um bioindicador não pode ser escolhido empiricamente, o mesmo deve apresentar alguns requisitos mínimos para a sua utilização no monitoramento ambiental. A preocupação no ato de sua escolha consiste, basicamente, em optar por um bioindicador ideal. Para ser assim considerado, o mesmo deve ser facilmente encontrado, ou seja, sua presença deve ocorrer em abundância e, principalmente, deve ser capaz de refletir de maneira clara o efeito de um agente estressante na biota (NIEMI e MCDONALD, 2004).

Inúmeros indicadores biológicos são descritos como capazes de refletir a saúde de um ecossistema aquático (CHESSMAN *et al.*, 1999; HARRIS e SILVEIRA, 1999; KINGSFORD, 1999). No entanto, os bioindicadores mais frequentemente utilizados são macroinvertebrados bentônicos (SMITH *et al.*, 1999; KAY *et al.*, 1999). A utilização preferencial desses animais como bioindicadores pode ser justificada por inúmeros motivos, como por exemplo, pelo tamanho do corpo desses animais ser relativamente grande, o que os torna facilmente visíveis, pelo fato da alta diversidade das espécies, por serem animais que apresentam longos ciclos de vida, por apresentarem respostas variáveis de acordo com os diferentes níveis de contaminação, entre outros (LENAT e BARBOUR, 1994; ALBA-TERCEDOR, 1996). Por isso, moluscos bivalves, são comumente empregados no estudo de biomonitoramento da poluição de ecossistemas marinhos. No entanto, a utilização das acídias como modelos de estudo, no âmbito do monitoramento ambiental, vem crescendo e despertando interesse em diversos pesquisadores. Esse interesse se justifica, pois além desses animais serem macroinvertebrados bentônicos, assim como os moluscos, os mesmos apresentam diversas outras vantagens, como o fato de serem sésseis, durante a vida adulta, e apresentarem alta razão de filtração, o que permite que esses animais acumulem grande variedade de contaminantes, e também, por serem filogeneticamente os invertebrados mais próximos dos vertebrados (BONADA, 2006).

1.4 - Ascídias como modelos de estudo no biomonitoramento ambiental

A característica mais relevante das ascídias para a sua escolha como modelo de estudo desse trabalho, além do fato serem bioindicadores ideais, é devido a sua posição filogenética privilegiada.

As ascídias estão localizadas filogeneticamente anteriormente ao subfilo Vertebrata, fazendo parte do filo Chordata, subfilo Urochordata, classe Ascidiacea (figura 1), essa posição torna esses animais excelentes modelos para estudos comparativos, já que ocupam uma posição chave para a compreensão da evolução de vários sistemas (BURIGHEL e CLONEY, 1997; KHALTURIN *et al.*, 2003).

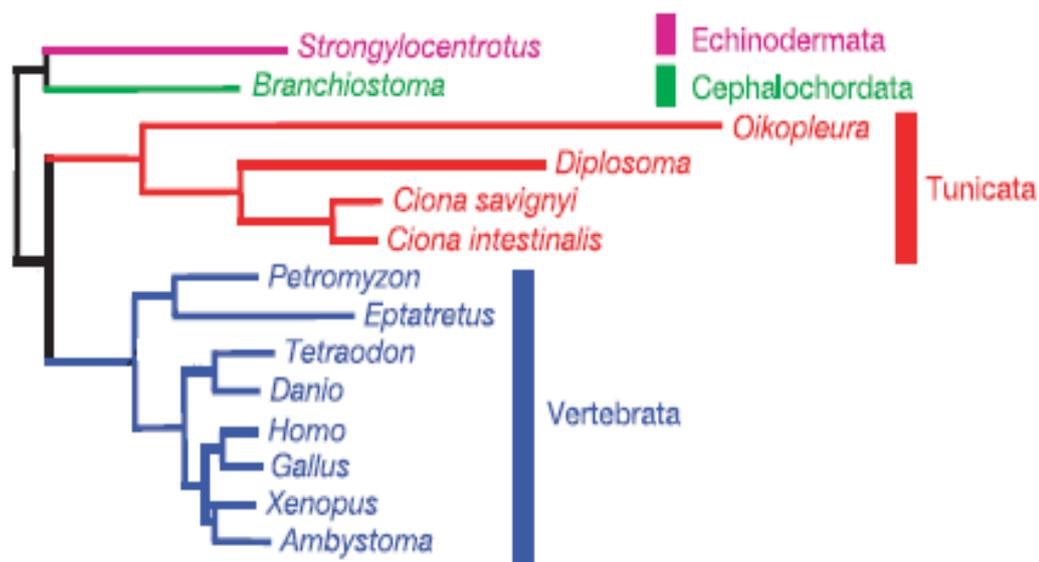


Figura 1 - Escala filogenética, indicando a proximidade do Filo Chordata com o Vertebrata.

Modificado de DELSUC *et al.*, 2006.

1.5 - Aspectos gerais das ascídias

As ascídias são invertebrados marinhos sésseis de ampla distribuição, hermafroditas, sua fecundação ocorre externamente ao corpo e, após a fecundação, apresentam metamorfose passando do estágio de larva para o estágio adulto. Esses invertebrados podem ser encontrados na forma solitária ou colonial. As ascídias solitárias possuem formato esférico ou cilíndrico (figura 2), enquanto nas espécies coloniais os indivíduos encontram-se dentro de uma matriz comum possuindo o mesmo sifão atrial (BARNES, 2005; BURIGHEL e CLONEY, 1997).

As ascídias apresentam-se, inicialmente sob a forma larval, as larvas apresentam notocorda, de origem mesodérmica e são livres. Posteriormente, um extremo do corpo se fixa a um substrato, iniciando a metamorfose, na qual o animal passa do estágio larval para o estágio adulto e sésil, com a consequente perda da notocorda (BARNES, 1982). Nesse instante, começa o desenvolvimento dos sífões atrial e branquial. Os sífões permitem a filtração da água do mar, a entrada da água ocorre através do sífão branquial e circula até o sífão atrial devido à corrente hídrica produzida pelo batimento dos cílios nas fendas branquiais. O material filtrado, contido na água, é encaminhado ao aparelho digestivo que é constituído pelo esôfago, estômago e intestino, desembocando no átrio onde é excretado (BRUSCA *et al.*, 2003).

Esses invertebrados marinhos possuem os seus órgãos envoltos por uma túnica espessa que se assemelha a cartilagem, essa túnica é formada a partir da secreção de uma camada de células epidérmicas e por ela percorrem vasos sanguíneos, nos quais se encontram os hemócitos (células sanguíneas) (MONNIOT *et al.*, 1991).



Figura 2 - Esquema de um corte longitudinal de uma ascídia solitária. Modificado de Brusca e Brusca, 2003.

1.6 - Hemócitos

Os hemócitos são células sanguíneas presentes na hemolinfa de diversos animais. Nas ascídias, essas células desempenham diversas funções fisiológicas como, por exemplo, o transporte de nutrientes, produtos do metabolismo, reconhecimento do próprio e do não próprio, fagocitose e reparo de tecidos danificados (COOPER e PARRINELLO, 2001). Essas características dos hemócitos também foram identificadas e descritas em trabalhos realizados com a ascídia *Halocynthia roretzi*, o qual demonstrou diversas reações de defesa celular relacionadas aos hemócitos, incluindo a fagocitose de materiais estranhos e a agregação celular após injúria da túnica (OHTAKE *et al.*, 1994).

Diversos estudos vêm sendo realizados a fim de caracterizar morfofisiologicamente os hemócitos. A ultraestrutura dos hemócitos da ascídia *Styela plicata* foi recentemente caracterizada em nosso laboratório (DE BARROS *et al.*, 2007).

A produção de moléculas citotóxicas, pelos hemócitos das ascídias, é outro ponto de investigação que vem sendo amplamente abordado. Diversos estudos avaliaram a produção de vários peptídeos microbicidas, lectinas, fatores humorais e espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (RNS) pelos hemócitos das ascídias.

1.7 - Espécies Reativas de Oxigênio e Nitrogênio

Espécie reativa é definida como qualquer substância capaz de existir com um ou mais elétrons desemparelhados (HALLIWELL, 1987).

A produção de espécies reativas é parte integrante do metabolismo e é observada em diversas condições fisiológicas. Tanto as ROS quanto as RNS apresentam ação biológica fundamental, estas são produzidas como o objetivo de eliminar o agente agressor, através de fenômenos relacionados com danos ao DNA e ao RNA. No entanto, se essas espécies reativas são produzidas de maneira exacerbada o organismo dispõe de um eficiente sistema antioxidante que consegue controlar e restabelecer o equilíbrio. O desequilíbrio causado entre o sistema pró e anti-oxidante resulta no estresse oxidativo (VASCONCELOS *et al.*, 2007).

As ROS incluem todos os radicais do oxigênio, como o ânion radical superóxido, radical hidroxila, radical alquila, alcoxila e peroxila (BARBER e BERNHEIM, 1967; CHANGE *et al.*, 1979). Nas RNS estão incluídos além do peroxinitrito, o óxido nítrico e o radical dióxido de nitrogênio (EISERICH *et al.*, 1998; HOGG e KALYANARAMAN, 1999).

Dentre as espécies reativas que o nosso grupo tem investigado encontra-se a produção de óxido nítrico (NO).

1.8 - Óxido Nítrico (NO)

O NO é um gás altamente difundível e amplamente encontrado no reino animal, responsável por uma série de ações fisiológicas dentre as quais encontram-se a defesa celular (MONCADA e HIGGS, 2006). Esse gás é produzido a partir da oxidação de L-arginina em L-citrulina, reação catalisada pela enzima óxido nítrico sintase (NOS) (figura 3) (BREDET e SNYDER, 1989).

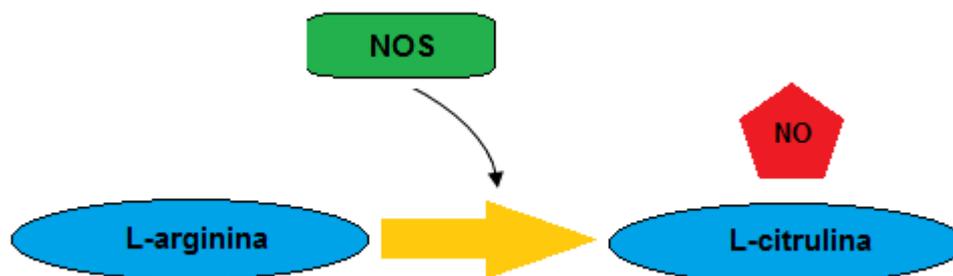


Figura 3 - Esquema ilustrativo da formação de NO a partir da conversão da L-arginina à L-citrulina pela catálise NOS (Fonte: Danielly Martins).

Em vertebrados foram descritas três isoformas dessa enzima, sendo uma isoforma induzível (iNOS) e duas constitutivas (cNOS) (KIECHLE e MALINSKI, 1993).

Recentemente, nosso grupo, identificou a presença da enzima iNOS (óxido nítrico síntese induzível) (figura 4) no hemócito do tipo linfócito da ascídia *Styela plicata*, e a produção de NO em resposta ao LPS (lipopolissacarídeo) de *E.coli*. Esses experimentos foram realizados utilizando-se métodos histoquímicos, imuno-

histoquímicos, e bioquímicos. A reação histoquímica para NADPH-diaforase foi realizada com o objetivo de verificar quais hemócitos eram responsáveis pela produção de NO. Com isso, foi observado que não são todas as células responsáveis pela produção desse gás, as que produzem maiores quantidades do mesmo são as células do tipo linfócito. Resultado confirmado por imunoeletromicroscopia utilizando-se anticorpos primários anti-iNOS e anticorpo secundário conjugado a ouro coloidal (DE BARROS *et al.*, 2009).

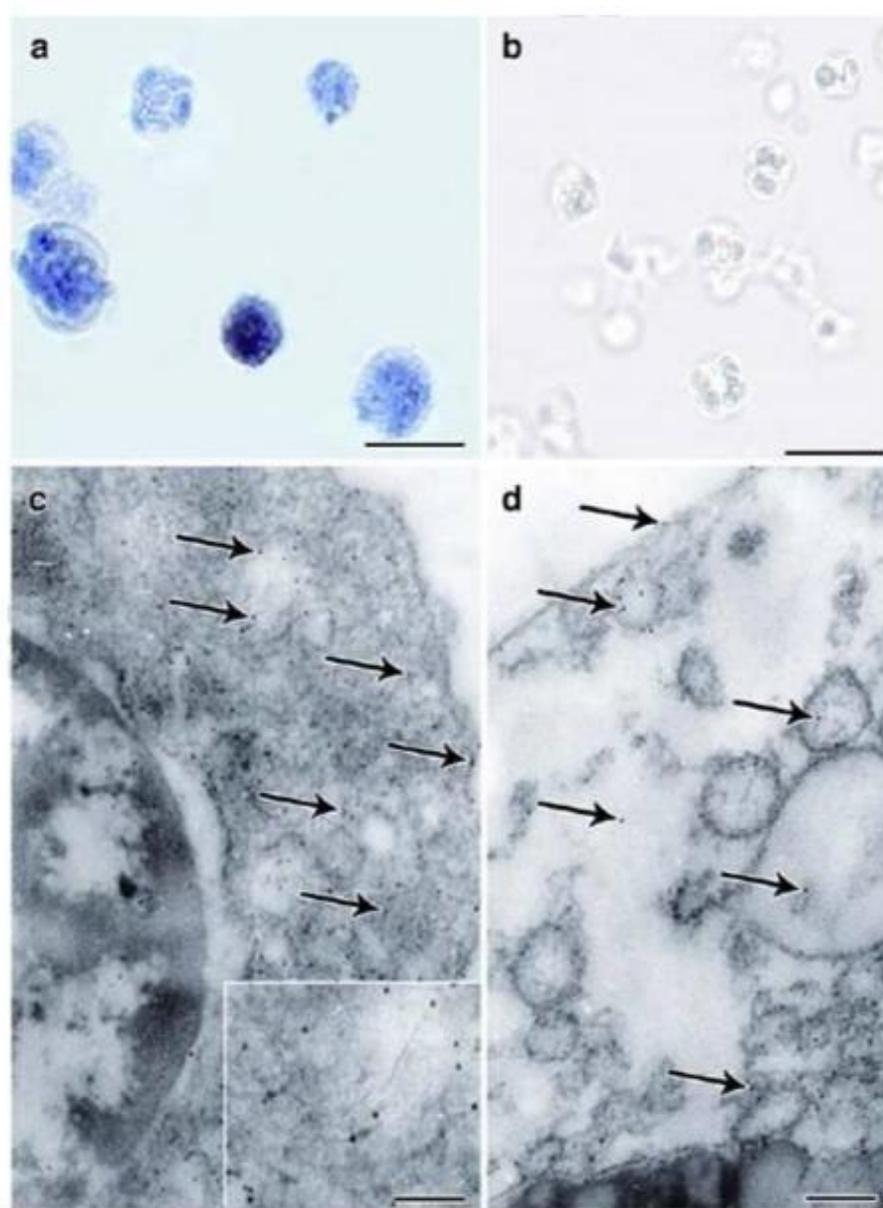


Figura 4 - Expressão da enzima NOS pelos hemócitos da ascídia *Styela plicata*. (A) histoquímica de hemócitos para NADPH-diaforase. Duas células fortemente marcadas entre outras células coradas. (b) controle negativo da reação. (c, d) Imunoeletromicroscopia com anticorpo anti-iNOS (setas) no

citoplasma de uma célula do tipo linfócito em dois diferentes aumentos. Barra de escala, (a) 4 μm , (b) 10 μm , (c) 0,17 μm , inserir 0,34 μm , (d) 0,2 μm . Modificado de DE BARROS *et al.*, 2009.

Muitos trabalhos atualmente têm verificado as alterações promovidas pelos metais pesados em animais como peixes teleósteos, moluscos, camarões e tunicados. Em moluscos e tunicados já foram relatados alguns dos efeitos imunotóxicos de metais como os do cobre no desenvolvimento embriogênico, na diferenciação e em mecanismos de defesa (GAGNEIRE *et al.*, 2004). Os efeitos imunotóxicos de alguns metais refletem alterações na atividade fagocítica, na produção ROS, na produção de NRS e já foram relatados em moluscos bivalves como a *Crassostrea gigas*, *Mitulus edulis* e nos tunicados *Styela plicata*, *Ciona intestinalis* e *Botrillus schlosseri* (PEREZ e FONTANETTI, 2010).

Um trabalho realizado na Índia correlaciona à bioacumulação das ascídias, *Polyclinum madrasensis*, *Polyclinum indicum*, *Herdmania pallida*, *Microcosmus squamiger* e *Microcosmus exasperatus*, com exposição a metais como, ferro, chumbo, cádmio e zinco (PRABHU *et al.*, 2012). Entretanto, não existem relatos da produção de NO em ascídias após exposição aos metais.

Neste trabalho foram realizadas investigações com relação à produção de NO, pelos hemócitos da ascídia *Phallusia nigra*, amplamente distribuída por todo o território brasileiro, frente à estimulação por metais e dessa forma, utilizar esse invertebrado marinho como um bioindicador de poluição marinha.



Figura 5 - Foto da ascídia *Phallusia nigra*.

2. JUSTIFICATIVA

Ainda não existem trabalhos em que a poluição marinha, por metais, seja relacionada com a produção de NO, pelos hemócitos das ascídias. A ascídia foi escolhida como nosso modelo de estudo pelo fato de ser um ótimo modelo para estudos comparativos de vários sistemas. Esse trabalho permite a obtenção de novos conhecimentos a respeito da utilização das ascídias como bioindicadores da poluição marinha. Além disso, fornece novos conhecimentos como, por exemplo, quais os tipos sanguíneos presentes na hemolinfa da ascídia, *Phallusia nigra*, e como ocorre sua resposta imunológica frente à exposição à metais.

3. OBJETIVOS

3.1 - Objetivos gerais

Este trabalho tem como objetivo avaliar os efeitos do magnésio e de metais pesados, como o chumbo e o manganês, sobre os hemócitos das ascídias *Phallusia nigra*, investigando as possíveis alterações na produção de NO.

3.2 - Objetivos específicos

- Caracterização morfológica dos hemócitos da ascídia *Phallusia nigra*;
- Quantificação da produção de NO pelos hemócitos frente à estimulação por cloreto de manganês, cloreto de magnésio e citrato de chumbo, variando-se concentração e tempo;
- Verificar o envolvimento da enzima NOS na produção de NO pelos hemócitos da ascídia *Phallusia nigra* em relação aos metais supra-citados;
- Verificar a ação dos metais sobre a viabilidade dos hemócitos de *Phallusia nigra*
- Realizar microanálise, a fim de verificar se os metais testados foram internalizados pelos hemócitos da ascídia *Phallusia nigra*.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 - Área da coleta

Cada experimento foi realizado com um número de 5 ascídias. As ascídias foram coletadas no Porto do Forno em Arraial do Cabo, RJ, Brasil. Os intervalos entre as coletas foram de aproximadamente 2 meses (figura 6).

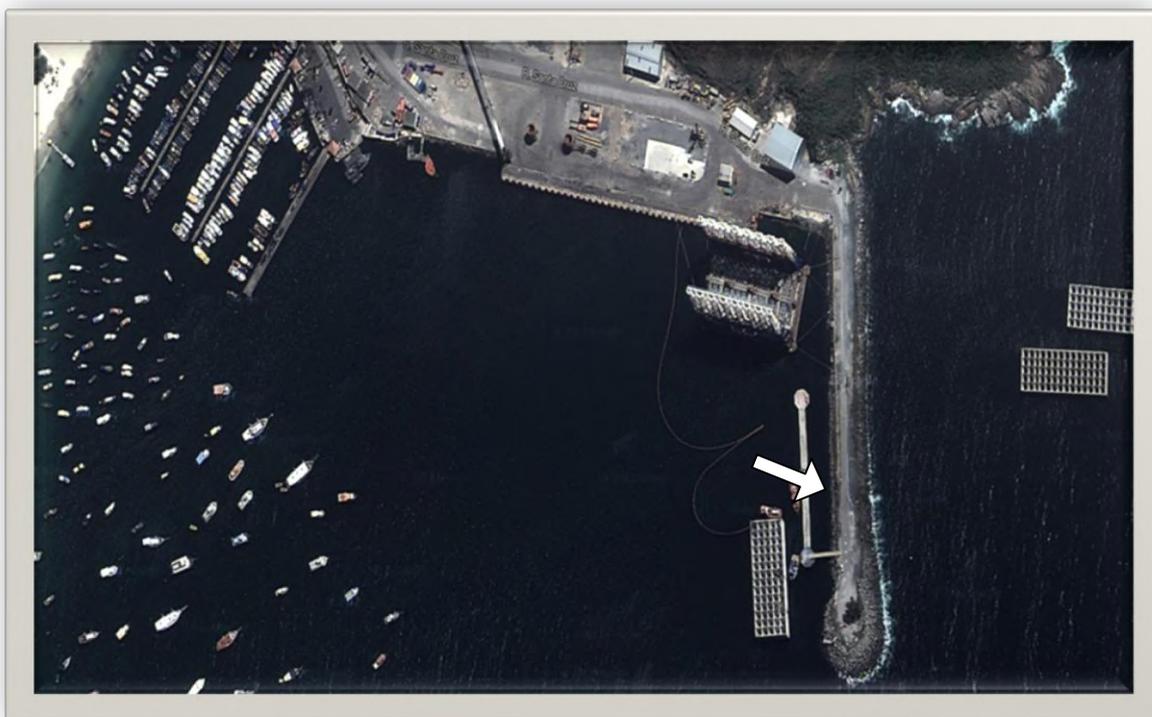


Figura 6 - Porto do Forno, Arraial do cabo, RJ, Brasil. Seta branca: ponto da realização da coleta (Fonte: www.googlemaps.com.br).

4.2 - Manutenção das ascídias

Os animais coletados foram colocados em aquários do biotério aquático, do Núcleo em Ecologia e Desenvolvimento Sócio-Ambiental de Macaé (NUPEM)/UFRJ sob condições ambientais controladas. A manutenção dos animais foi realizada em aquário de 70L contendo água do mar, sob aeração constante, temperatura de aproximadamente 21°C, pH entre 8 e 8,5, salinidade em torno de 35 o/oo e fotoperíodo de 12/12 h. A cada dois dias as ascídias foram alimentadas com 10g da

levedura *Saccharomyces cerevisiae*, previamente fervidos, com o intuito de evitar a multiplicação destas no aquário.

4.3 - Caracterização morfológica dos hemócitos da ascídia *Phallusia nigra*

4.3.1 - Microscopia de luz

Os hemócitos foram obtidos através da técnica de sangramento do sifão, na qual é realizado um corte no sifão branquial. Os hemócitos obtidos foram misturados, em tubos Falcon, com solução anticoagulante marinho (MAC-26,3 g de cloreto de sódio, 18 g de glicose, 4,41 g de citrato trissódico, 2,73 g de ácido cítrico, 3,72g de EDTA em 1000 mL de água destilada, pH 7,0) na proporção de 1:5 v/v (figura 7).

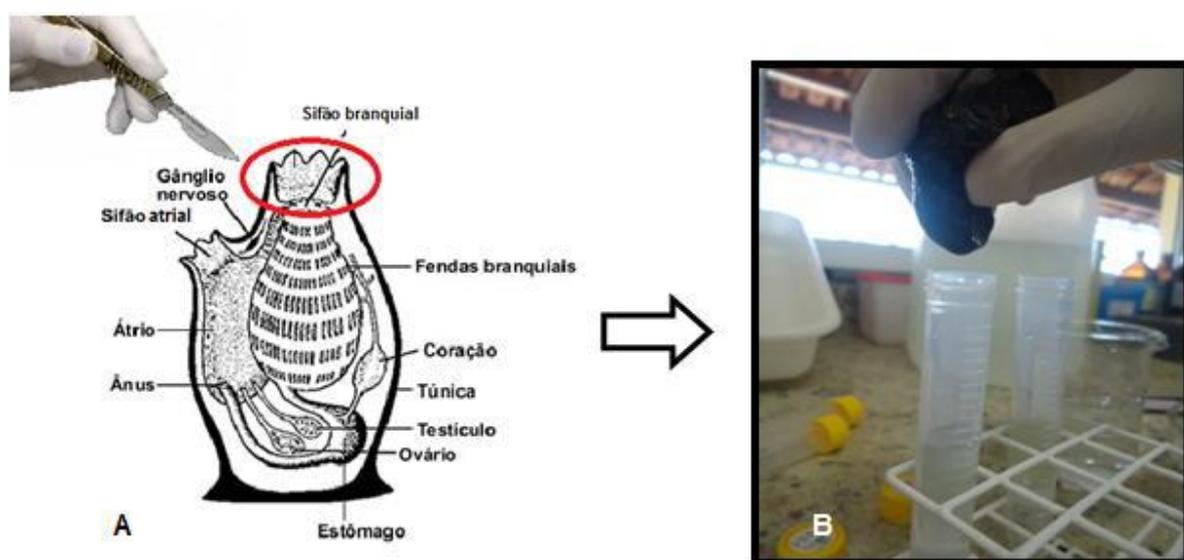


Figura 7 - A - Esquema de corte longitudinal de ascídia, o círculo vermelho representa o local no qual a técnica de sangramento foi realizada. B- Obtenção dos hemócitos. (Fonte: <http://www.brasilescola.com/biologia/urochordata.htm>)

Em seguida, esta solução foi centrifugada a 2800 rpm durante 5 min à 4°C para a separação dos hemócitos do plasma. O pellet contendo os hemócitos foi ressuspensionado em 1mL de água do mar artificial (103,5g de sal marinho em 4,54L de

água destilada) contendo L-cisteína. O número de hemócitos na solução foi ajustado para 3×10^6 células/mL, com auxílio da câmara de Neubauer. Em seguida, os hemócitos foram colocados para aderir em lâminas de vidro por 30 minutos e fixados com 4% de paraformaldeído, após, estes foram corados com Hematoxilina e Eosina ou 1% de azul de toluidina a fim de observar a morfologia dos mesmos e classificá-los.

A caracterização morfológica dos hemócitos da ascídia *Phallusia nigra* foi realizada através do microscópio óptico Olympus (BX 51) acoplado a uma câmera digital (DPF1).

4.4 - Quantificação da produção de NO decorrente da estimulação por metais

Os hemócitos foram obtidos através da técnica de sangramento do sifão, como descrito anteriormente. Em seguida, para a quantificação da produção de NO, os hemócitos foram pré-incubados com o composto 4-amino-5-metilamino-2',7'-difluorofluoresceína diacetato (DAF-FM DA) $5 \mu\text{M}$ (Invitrogen Corporation) durante 30 minutos, ao abrigo da luz. Após incubar com o DAF-FM $5 \mu\text{M}$ esta solução foi centrifugada a 2800 rpm durante 5 min à 4°C , em seguida o pellet contendo os hemócitos foi ressuscitado em 1 mL de água do mar artificial contendo L-cisteína e, posteriormente, estimulado com os metais. Para este propósito foram utilizados dois metais pesados, sendo eles o citrato de chumbo e o cloreto de manganês e o metal cloreto de magnésio. As concentrações utilizadas para cada metal foram de 10^{-8} , 10^{-5} , 10^{-2} , e 0,1M os tempos de exposição avaliados e quantificados, através do espectrofluorímetro, foram de 30, 60 e 90 minutos.

A fluorescência produzida foi quantificada no espectrofluorímetro (Cary Eclipse). Os comprimentos de onda de excitação e emissão do DAF-FM DA são 495 nm e 515 nm, respectivamente.

O DAF-FM deve ser utilizado apenas em células viáveis, já que o mesmo reage com o NO no ato da sua produção, pela célula, e, assim, produz fluorescência. A fluorescência é produzida, pois o DAF-FM precipita nas células que estão produzindo esse gás (NO) e, dessa forma, torna o NO passível de quantificação.

4.5 - Produção de NO pelos hemócitos expostos aos metais, após pré-incubação com o inibidor ou com o doador de NO

4.5.1 - Produção de NO pelos hemócitos expostos aos metais, após pré-incubação com L-NAME

O L-NAME compete com a L-arginina pela catálise da enzima NOS, desta forma, quando presente a tendência é ocorrer redução na produção do gás NO (figura 8). Essa redução só não ocorre se a produção de NO não for via NOS. Ou seja, o L-NAME é capaz de indicar se a produção de NO é via NOS ou não.

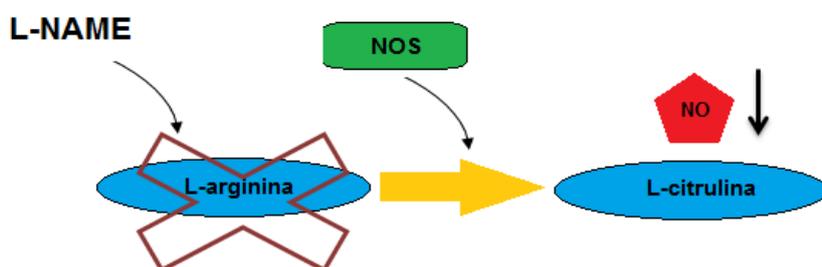


Figura 8 - Demonstração da atividade do L-NAME (Fonte: Danielly Martins).

Os hemócitos obtidos foram pré-incubados com o inibidor de NO, L-nitro arginina metil-éster (L-NAME), este foi adicionado em diferentes concentrações, sendo elas 1mM e 10mM, e deixado agir por 30 minutos. Em seguida, foi adicionado o DAF-FM DA 5µM, durante 30 minutos. Após isso, esta solução foi centrifugada a 2800 rpm durante 5 min à 4°C, em seguida o pellet contendo os hemócitos foi ressuspendido em 1mL de água do mar artificial contendo L-cisteína. Posteriormente, as células foram estimuladas com os metais pesados, cloreto de manganês ou citrato de chumbo, ou com o cloreto de magnésio. As concentrações utilizadas dos metais foram de 10^{-8} , 10^{-5} , 10^{-2} , e 0,1M e os tempos de exposição foram de 30, 60 e 90 minutos. Em seguida os ensaios foram avaliados e quantificados, através do espectrofluorímetro,

4.5.2 - Produção de NO pelos hemócitos expostos aos metais após pré-incubação com DETA/NO

O DETA/NO é um doador de NO, desta forma, quando presente a tendência é ocorrer aumento na produção do gás NO (Keefer *et al.*, 1996). Esse aumento só é detectado caso o marcador de NO (DAF-FM DA) seja específico para o mesmo (figura 9).

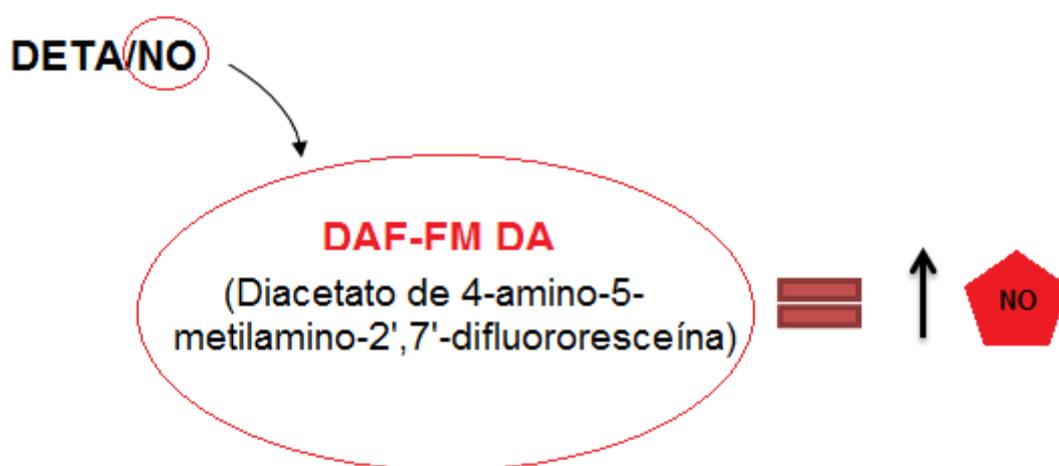


Figura 9 - Demonstração da atividade do DETA/NO (Fonte: Danielly Martins).

Os hemócitos obtidos foram pré-incubados com o doador de NO, dietilenotriamina (DETA/NO). O DETA/NO foi adicionado em diferentes concentrações, sendo elas 200mM e 400mM, e deixado durante agir 30 minutos. Em seguida, foi adicionado o DAF-FM DA 5µM, durante 30 minutos. Após isso, esta solução foi centrifugada a 2800 rpm durante 5 min à 4°C, em seguida o pellet contendo os hemócitos foi ressuspendido em 1mL de água do mar artificial contendo L-cisteína. Posteriormente, as células foram estimuladas com os metais pesados, cloreto de manganês ou citrato de chumbo, ou com o cloreto de magnésio. As concentrações utilizadas dos metais foram de 10^{-8} , 10^{-5} , 10^{-2} , e 0,1M e os tempos de exposição avaliados e quantificados, através do espectrofluorímetro, foram de 30, 60 e 90 minutos.

**Análise estatística:*

Os resultados obtidos com as metodologias citadas acima (tópicos 3.3 e 3.4) são apresentados como médias \pm SE para cada tratamento, respectivamente. A significância de variações entre diferentes tratamentos ou grupos foi analisada por ANOVA, complementada com o pós-teste Tukey. A significância foi estabelecida em $P < 0,05$ através dos programas GraphPad Prism versão 5.0 de Software GraphPad.

4.6 - Viabilidade celular

Foram utilizados hemócitos de cinco animais diferentes, essas células foram obtidas a partir da técnica de sangramento do sifão, como já descrito. Após obtenção estes foram misturados com solução de anticoagulante, em seguida, esta solução foi centrifugada e o pellet contendo os hemócitos foi ressuspenso em 1mL de água do mar artificial estas células foram incubadas com 5mM de DAF-FM DA, durante 30 minutos. As células foram lavadas com água do mar artificial e em seguida incubadas com a mesma durante 15 min. A suspensão de células obtida foi dividida em alíquotas de 3 mL, em seguida, os hemócitos foram estimulados com os metais cloreto de manganês, cloreto de magnésio e citrato de chumbo, na concentração de 0,1M. Imediatamente antes da contagem das células 10 μ L de 1% do corante azul de tripan foram misturados com 10 μ L da solução contendo os hemócitos, em seguida, as células viáveis foram contabilizadas com auxílio da câmara de Neubauer e do microscópio óptico nos tempos de 30, 60 e 90 minutos.

Posteriormente o mesmo teste foi realizado, no entanto, utilizando-se o inibidor L-NAME e o doador de NO, DETA/NO. As células viáveis foram contabilizadas.

Essa metodologia tem como fundamento avaliar a integridade da membrana celular. O teste de exclusão do corante azul de tripan estuda a permeabilidade da membrana plasmática (BARILE, 1994). Ou seja, quando a célula não é mais viável a integridade da sua membrana é perdida, dessa forma, a entrada do corante azul de tripan na célula promove uma coloração azul intensa permitindo que as mesmas sejam diferenciadas das demais células viáveis.

4.7 - Microanálise

Para realizar a microscopia eletrônica de transmissão convencional (MET) e posteriormente a microanálise, os hemócitos foram obtidos através da técnica de sangramento do sifão, detalhada anteriormente. Em seguida, essas células foram fixadas com 4% de formaldeído, recém preparado, e 2,5% de glutaraldeído diluído em tampão 0,1 M cacodilato de sódio, pH 7,3 a 4° C, durante 4h. Após, foram realizadas 3 lavagens de 10 minutos, cada, do fixador com o tampão 0,1 M cacodilato de sódio. Em seguida, foi realizada a pós fixação dos hemócitos com 1% de tetróxido de ósmio diluído em 0,1M de cacodilato de sódio durante 40 minutos. Posteriormente, foram realizadas 3 lavagens de 10 minutos, cada, com o tampão 0,1M de cacodilato de sódio. Após as lavagens realizou-se a desidratação em concentrações crescentes de acetona até 100% de 15 minutos cada. Em seguida, foram realizadas as infiltrações por um período de 24 horas. Na primeira infiltração foram utilizadas 2 partes de acetona para 1 parte de Epon (Sigma) e, assim sucessivamente aumentando-se a concentração de Epon em relação à de acetona até chegar ao Epon puro. Após aguardar 24 horas para a infiltração do Epon, o mesmo foi transferido, juntamente com as células, de maneira cuidadosa, para uma forma de silicone, e esta polimerizada à 60°C, durante 48 horas.

As amostras foram microtomadas em cortes ultrafinos (60 nm), com auxílio de um ultramicrótomo (modelo RMC) depositadas em grades de cobre (300 mesh) e contrastadas com 2% de acetato de uranila por 5 minutos e 1% de citrato de chumbo 2 min. Os cortes foram observados ao microscópio eletrônico de transmissão JEOL 1011, operado em 60 kV.

Para os espectros de raios-X as amostras foram coletadas por 100s usando um detector Si com janela Norvar em uma faixa de 0 a 10 KeV de energia com uma

resolução de 10 eV / canal. As análises foram realizadas utilizando um analisador Noran / Voyager III e o software NSS 2.3 Microanálise de raios-X (Thermo Fisher Scientific).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Esse trabalho promove novos conhecimentos acerca dos efeitos do metal cloreto de magnésio e dos metais pesados citrato de chumbo e cloreto de manganês sobre o sistema imunológico das ascídias. Além disso, fornece ferramentas para investigação de possíveis moléculas que podem ser utilizadas como biomarcadores de poluição ambiental por estes metais.

5.1 - Classificação morfológica dos hemócitos da ascídia *Phallusia nigra*

Após análise das imagens obtidas por microscopia de luz, foram identificados 8 tipos principais de hemócitos.

Dentre os principais hemócitos observados encontrada-se o Hemoblasto (figura 10 a, b), Célula em Anel de Sinete (figura 10 c, d), o Granulócito Refrátil Univacuolar (URG) (figura 10 e, f), Célula compartimentar (figura 10 g, h), a Célula do tipo mórula (figura 10 i, j), Nefrócito (figura 10 k, l), Célula pigmentar (figura 10 m, n) e o Amebócito (figura 10 o, p).

Dentre os hemócitos encontrados, o Amebócito foi o maior, com aproximadamente 27 μm de diâmetro. Esta célula possui morfologia bastante variável, devido à presença de um ou mais pseudópodos, podendo apresentar nenhum, um ou mais grânulos em seu citoplasma, esses grânulos são corados com, Hematoxina e Eosina, indicando natureza acidofílica. Em tunicatos a denominação amebócito é dada aos hemócitos que são responsáveis ou estão relacionadas com a defesa celular (SMITH *et al.*, 2006; BALLARIN, 2008; LEFEBVRE *et al.*, 2008; ARIZZA e PARRINELLO, 2009).

A segunda maior célula observada foi o Nefrócito, com 11,0 μm , seguido pela célula do tipo mórula, com 9,5 μm de diâmetro. O Nefrócito possui morfologia esférica e apresenta diversos grânulos pelo seu citoplasma. A célula do tipo Mórula apresenta formato arredondado e contém diversos vacúolos com material de pigmento verde-amarronzado, esses vacúolos são corados com o corante azul de toluidina.

Estudos realizados no Japão também identificaram a presença dessas duas células na hemolinfa de 9 ascídias do gênero botryllid (HIROSE *et al.*, 2003). A célula do tipo mórula é um hemócito geralmente presente entre as ascídias. Essa célula é conhecida por participar de uma variedade de funções biológicas de importância imunológica, tais como a coagulação da hemolinfa, síntese da túnica, e encapsulamento de corpos estranhos (ENDEAN, 1955b; ANDERSON, 1971; WRIGHT, 1981; ZANIOLO, 1981).

As células de pigmentares, com aproximadamente 7,1 μm de diâmetro, apresentaram pigmento amarelo-alaranjado dentro de vacúolos.

A célula compartimentar apresenta diâmetro variável, de 6,3 a 9,0 μm , são células esféricas que geralmente possuem um, mas podem possuir mais vacúolos, que ocupam quase a totalidade da célula.

Após, encontra-se o URG, com 6,1 μm de diâmetro, uma célula parecida com a célula em anel de sinete, porém maior. O URG possui núcleo excêntrico e um único vacúolo. Esse vacúolo é corado fortemente na presença do corante azul de toluidina. Supõe-se que esta célula represente um estágio avançado da célula em anel de sinete.

A célula compartimentar foi previamente identificada e descrita, na hemolinfa da ascídia *Phallusia Mammillata*, por apresentar a enzima fenoloxiadase em seu interior, entretanto o mesmo experimento, realizado na ascídia *Ciona intestinalis* revelou a presença dessa enzima em URGs (PARRINELLO, 2003).

As menores células encontradas foram a Célula em anel de sinete, com aproximadamente 4,0 μm de diâmetro e o Hemoblasto, com 3,4 μm .

A Célula em anel de sinete não é corada pelo corante azul de toluidina possui núcleo excêntrico e um único vacúolo que ocupa todo o citoplasma. Com base em estudos morfológicos, ENDEAN (1955) e KALK (1963) sugerem que esta célula seja precursora da célula do tipo mórula. Além disso, na ascídia *B.schlosseri*, foi observado, um comportamento comum entre a célula em anel de sinete, a célula compartimentar e a célula do tipo mórula em resposta a algumas lectinas e anticorpos (SCHLUMPBERGER *et al.*, 1984).

Quanto ao Hemoblasto é uma célula pequena e esférica que apresenta, visivelmente, alta relação núcleo/citoplasma. Esta célula já foi observada em diversas outras espécies, acredita-se que seja um tipo de célula indiferenciada e por

isso frequentemente descrita como precursora dos demais hemócitos, quando presente no sangue essa célula é denominada como hemoblasto (MILANESI e BURIGHEL, 1978).

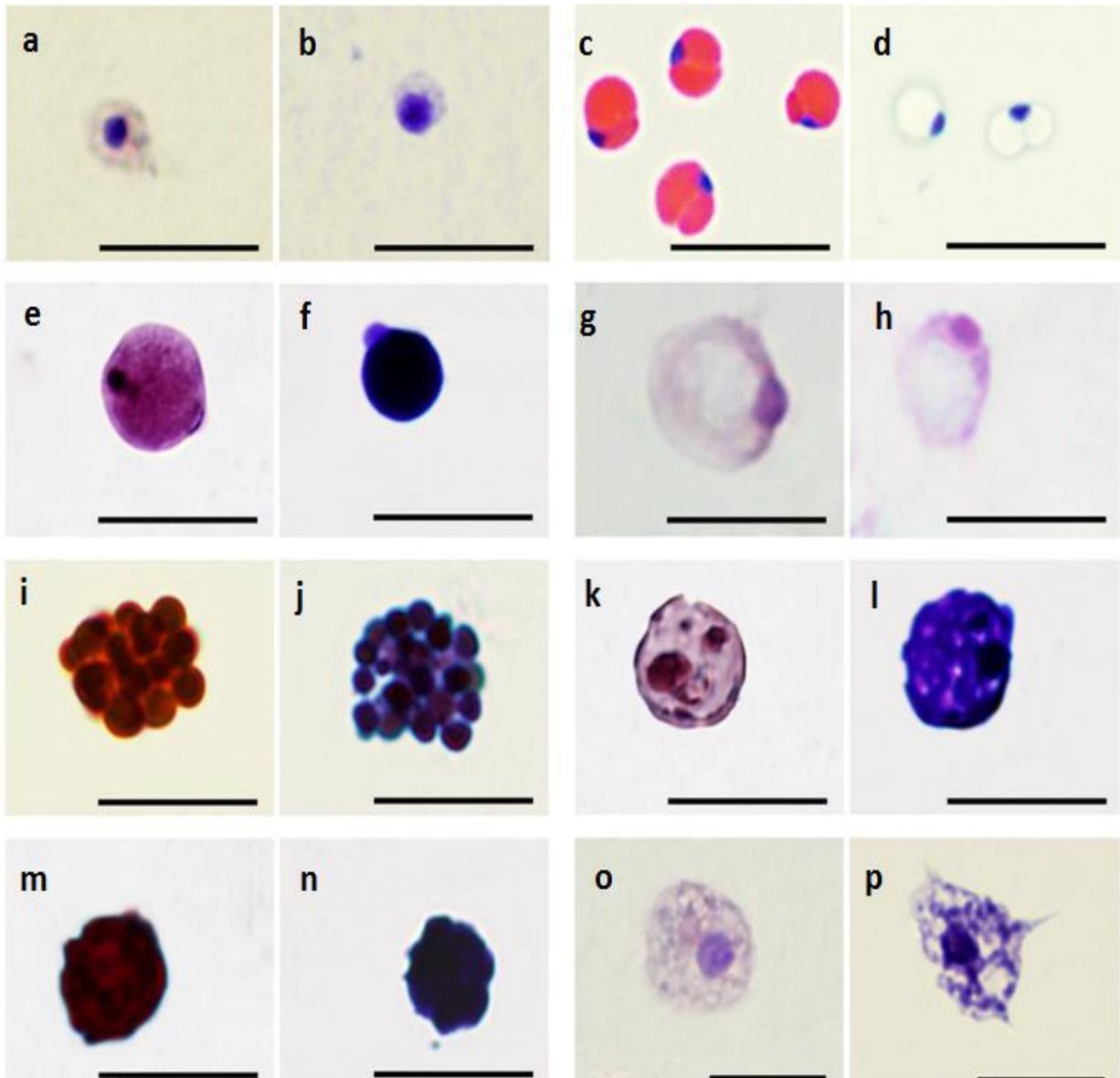


Figura 10 - Micrografia dos hemócitos da ascídia *Phallusia nigra*. (a, c, e, g, i, k, m, o) Hematoxilina e Eosina (b, d, f, h, j, l, n, p) Azul de toluidina. (a, b) Hemoblasto; (c, d) Célula em Anel de Sinete; (e, f) Granulócito refrátil univacuolar (URG); (g, h) Célula compartimentar; (i, j) Mórula; (k, l) Nefrócito; (m, n) Célula pigmentar e (o, p) Amebócito; Barra de escala: 10µm

5.2 - Ação dos metais sobre a Produção de NO pelos hemócitos da ascídia *Phallusia nigra*

Com a intenção de identificar e quantificar as alterações bioquímicas dos hemócitos através do monitoramento da intensidade de fluorescência foi possível observar que para o citrato de chumbo, no tempo de 30 minutos, houve aumento significativo na produção de NO de $1948 \pm 7,89\%$ na concentração de 0,1M quando comparado ao controle (figura 11 a). Já no tempo de 90 minutos foi possível observar aumento significativo na produção de NO de $1232 \pm 4,85\%$ e $2655 \pm 10,46\%$ na concentração de $10^{-2}M$ e 0,1M, comparados ao controle, respectivamente (figura 11 c).

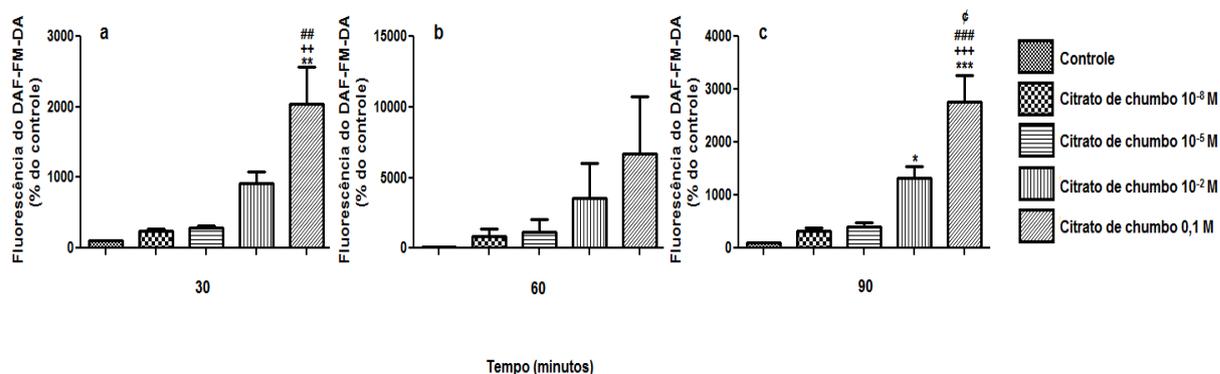


Figura 11 - Produção de NO, pelos hemócitos da ascídia *Phallusia nigra*, em diferentes tempos, após exposição a concentrações crescentes de citrato de chumbo. A intensidade de fluorescência é apresentada pela média \pm erro padrão (n=5). * P <0,05, *** P <0,0001 significância quando comparado ao controle; ++ P <0,001, +++ P <0,0001 Nível de significância comparado à concentração de $10^{-8}M$; ### P <0,001, #### P <0,0001 significância quando comparado à concentração de $10^{-5}M$; \$\$\$ P <0,0001 Nível de significância em relação à concentração de $10^{-2}M$.

O cloreto de magnésio, no tempo de 30 minutos, apresentou aumento significativo na produção de NO de $112,1 \pm 9,03\%$ na concentração de 0,1M, comparado ao controle (figura 12 a). No tempo de 60 minutos também houve aumento significativo na produção de NO de $98,13 \pm 5,51\%$ na concentração de 0,1M comparado ao controle (figura 12 b). E no tempo de 90 minutos o aumento

significativo na produção de NO foi de $89,03 \pm 4,50\%$ na concentração de 0,1M comparado ao controle (figura 12 c).

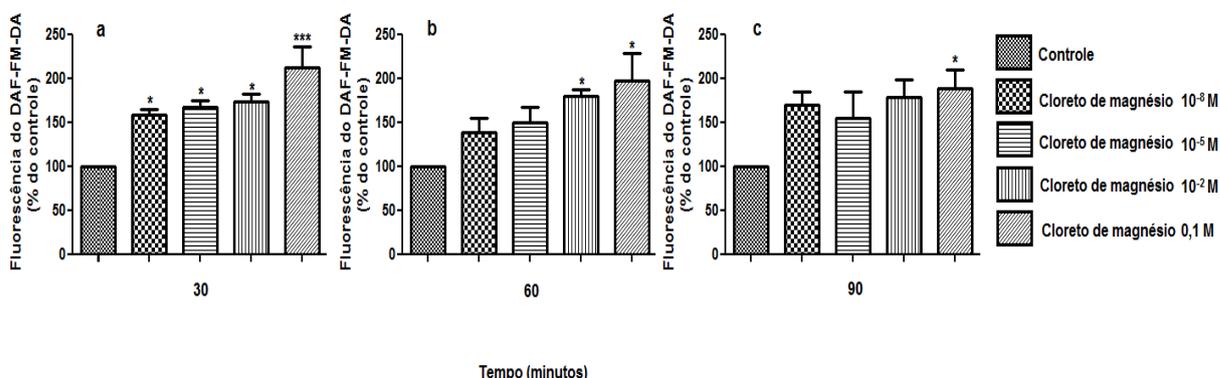


Figura 12 - Análise de NO produzido pelos hemócitos da ascidia *Phallusia nigra*, em diferentes tempos, após serem estimulados com concentrações crescentes de cloreto de magnésio. A intensidade de fluorescência é apresentada pela média \pm erro padrão (n=5). * P < 0,05, *** P < 0,0001 nível de significância em relação ao controle.

Utilizando-se o cloreto de manganês, como estímulo, foi possível observar que no tempo de 30 minutos o aumento significativo na produção de NO foi de $58,10 \pm 4,96\%$, $76,71 \pm 6,55\%$, $74,03 \pm 6,32\%$ e $98,30 \pm 8,39\%$ nas concentrações, 10^{-5} , 10^{-2} , 10^{-8} e 0,1M, comparados ao controle, respectivamente (figura 13 a). Observando-se o tempo de 60 minutos houve aumento significativo na produção de NO de $109,7 \pm 5,35\%$ na concentração de 0,1M, comparado ao controle (figura 13 b). E no tempo de 90 minutos, houve aumento significativo na produção de NO de $115,8 \pm 6,20\%$, $131,8 \pm 7,05\%$, $137,2 \pm 7,34\%$ e $182,6 \pm 9,78\%$ nas concentrações de 10^{-5} , 10^{-2} e 0,1M, comparados ao controle, respectivamente (figura 13 c).

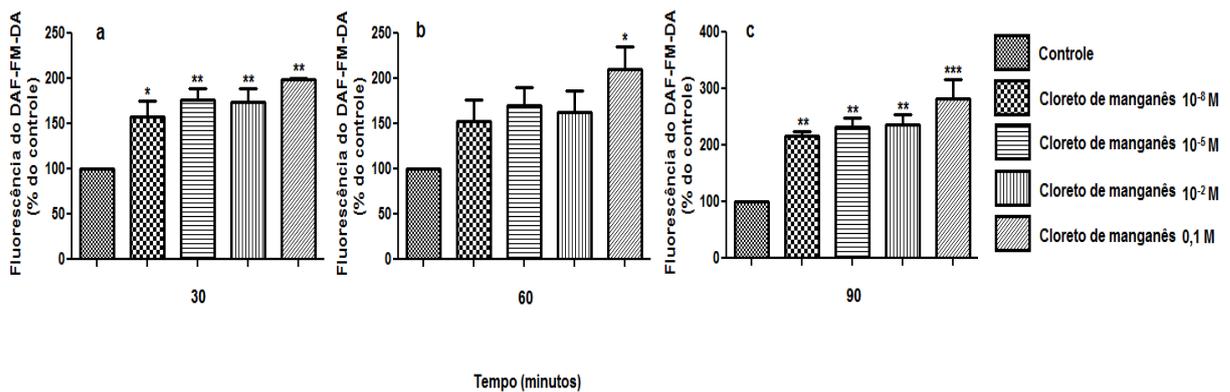


Figura 13 - Detecção da produção de óxido nítrico pelos hemócitos estimulados por crescentes concentrações de cloreto de manganês durante 30, 60 e 90 minutos. A intensidade de fluorescência é apresentada pela média \pm erro padrão (n=5). * P <0,05, ** P <0,001, *** P <0,0001 nível de significância quando comparado ao controle.

Diversos estudos vêm sendo desenvolvidos com o objetivo de avaliar parâmetros imunológicos, principalmente de invertebrados marinhos, após exposição a certos poluentes. Como é o caso do trabalho realizado com o molusco *Mytilus galloprovincialis*, o qual investiga a capacidade do metal cádmio (Cd) em alterar a produção de NO pelos hemócitos do mesmo. Nesse estudo, foi observado que concentrações micro molares de Cd (0, 05, 5, 10 e 50 μ M) promoveram aumento na produção de NO pelos hemócitos dos moluscos (DAILIANIS, 2009).

Assim como observado nos estudos realizados com moluscos, os resultados encontrados em nosso trabalho também refletem em aumento da produção de NO.

Após exposição dos hemócitos, da ascídia *Phallusia nigra*, aos metais, citrato de chumbo, cloreto de magnésio e cloreto de manganês, notou-se aumento da produção de NO frente a todos os metais testados. Para todos os metais a melhor concentração utilizada foi a de 0,1M, no entanto, o melhor tempo de exposição para o citrato de chumbo corresponde ao de 60 minutos, para o cloreto de magnésio ao de 30 minutos e para o cloreto de manganês corresponde ao de 90 minutos.

5.3 - Envolvimento da NOS na produção de NO pelos hemócitos de *P. nigra*

O L-NAME é uma substância que compete com a L-arginina pela catálise da NOS e, conseqüentemente, causa diminuição da produção de NO, quando esta

depende da enzima. Caso a produção do gás não dependa da catálise da NOS a presença de L-NAME não interfere nos resultados obtidos.

Experimentos utilizando o composto L-NAME são frequentemente realizados quando se objetiva identificar não apenas a variação da produção de NO, mas também a via de sua produção, já que esse gás pode ser produzido a partir de outras formas que não necessitem a presença dessa enzima (MOLLACE *et al.*, 1991). É o que ocorre, por exemplo, em estudos realizados com os hemócitos do caramujo, *Lymnaea stagnalis*. Neste trabalho, os hemócitos foram expostos ao PMA (10 μ M) e ao β - 1,3 - glucano laminarin (10 mg / ml), após isso notou-se um aumento de 8 vezes e 4 vezes, respectivamente, na produção de NO, após 60 minutos de exposição. No entanto, a produção de NO foi parcialmente inibida na presença de L-NAME, indicando a participação da enzima NOS na produção desse gás (WRIGHT *et al.*, 2006).

O mesmo fato ocorreu em nossos experimentos após pré-incubar os hemócitos, da ascídia *Phallusia nigra*, com L-NAME e posteriormente submetê-los à presença dos metais, citrato de chumbo, cloreto de magnésio e cloreto de manganês.

Ao monitorar a intensidade de fluorescência foi possível observar que quando as células foram estimuladas com o citrato de chumbo na presença de L-NAME, no tempo de 30 minutos, houve diminuição significativa na produção de NO de $589,5 \pm 4,77\%$ e $774,8 \pm 6,27\%$ nas concentrações de 0,1M do metal + 1Mm de L-NAME e 0,1M do metal + 10Mm de L-NAME quando comparados à concentração de 0,1M de citrato de chumbo sem L-NAME, respectivamente (figura 14 a). No tempo de 60 minutos, houve diminuição significativa na produção de NO de $540,0 \pm 28,06\%$ e $734,6 \pm 38,18\%$ nas concentrações de 0,1M do metal + 1Mm de L-NAME e 0,1M do metal + 10Mm de L-NAME, respectivamente, quando comparados à concentração de 0,1M de citrato de chumbo apenas (figura 14 b). Já no tempo de 90 minutos, houve diminuição significativa na produção de NO de $725,7 \pm 20,74\%$ e $922,4 \pm 26,37\%$ nas concentrações de 0,1M do metal + 1Mm de L-NAME e 0,1M do metal + 10Mm de L-NAME, respectivamente, quando comparados a concentração de 0,1M de citrato de chumbo, somente (figura 14 c).

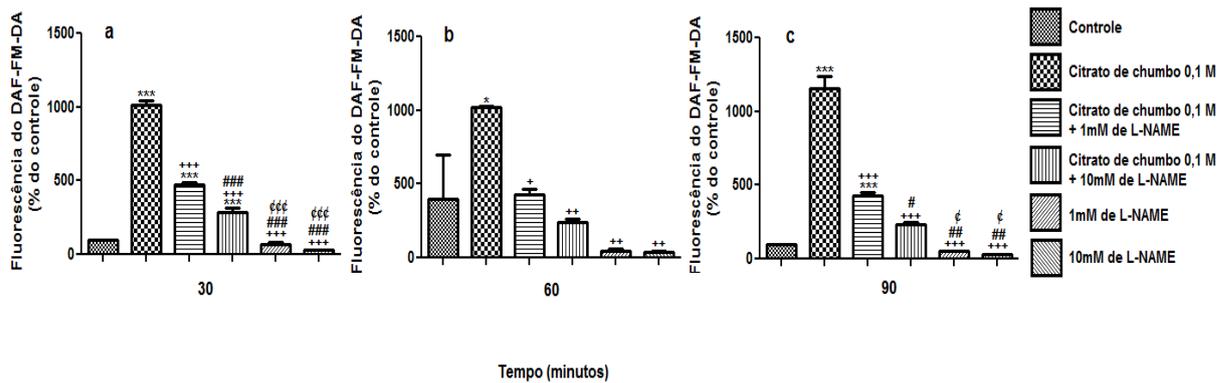


Figura 14 - Detecção da produção de NO pelos hemócitos, da ascídia *Phallusia nigra*, pré-incubados com L-NAME e posteriormente expostos ao citrato de chumbo 0,1M, em diferentes tempos. A intensidade de fluorescência é apresentada pela média \pm erro padrão (n=5). * P <0,05, *** P <0,0001 significância comparado ao controle. +P <0,05, ++P <0,001, +++P <0,0001 indica a significância em relação à concentração de 0,1M; # P <0,05, ## P <0,001, ### P <0,0001 Nível de significância em relação à concentração de 0,1M do metal + 1mM de L-NAME; ¢ P <0,05, ¢¢, ¢¢¢ P <0,0001 Nível de significância em relação à concentração de 0,1M do metal + L-10mM de L-NAME.

Ao monitorar a intensidade de fluorescência foi possível observar que ao utilizar cloreto de magnésio na presença de L-NAME, no tempo de 30 minutos, houve diminuição significativa na produção de NO de $107,5 \pm 18,94\%$ e $123,5 \pm 21,77\%$ nas concentrações de 0,1M do metal + 1Mm de L-NAME e 0,1M do metal + 10Mm de L-NAME quando comparados a concentração de 0,1M de cloreto de magnésio, respectivamente (figura 15 a). No tempo de 60 minutos, houve diminuição significativa na produção de NO de $115,1 \pm 30,20\%$ e $131,5 \pm 34,50\%$ nas concentrações de 0,1M do metal + 1Mm de L-NAME e 0,1M do metal + 10Mm de L-NAME quando comparados a concentração de 0,1M de cloreto de magnésio, respectivamente (figura 15 b). No tempo de 90 minutos, também houve diminuição significativa na produção de NO de $99,92 \pm 11,65\%$ e $129,6 \pm 15,12\%$ nas concentrações de 0,1M do metal + 1Mm de L-NAME e 0,1M do metal + 10Mm de L-NAME, respectivamente, quando comparados a concentração de 0,1M de cloreto de magnésio apenas (figura 15 c).

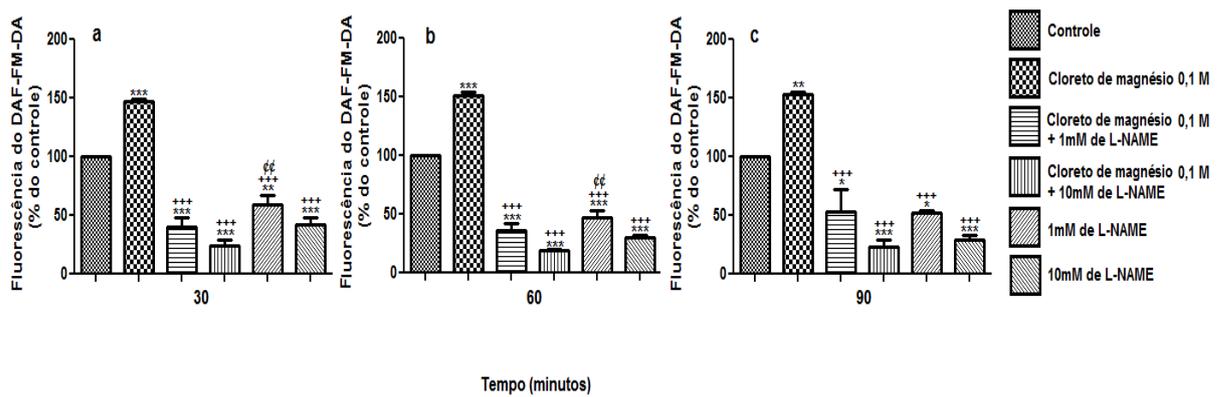


Figura 15 - Produção de NO pelos hemócitos, da ascídia *Phallusia nigra*, estimulados com cloreto de magnésio 0,1M após exposição prévia ao L-NAME, em diferentes tempos. A intensidade de fluorescência é apresentada pela média \pm erro padrão (n=5). * P <0,05, ** P <0,001, *** P <0,0001 significância ao comparar com o controle. +++ P <0,001 significância em relação ao magnésio 0,1M; $\mathcal{C}\mathcal{C}$ P <0,001 Nível de significância em relação à concentração de 0,1M do metal + 10mM de L-NAME.

Ao monitorar a intensidade de fluorescência notou-se que ao utilizar cloreto de manganês na presença de L-NAME, no tempo de 30 minutos, houve diminuição significativa na produção de NO de $155,3 \pm 30,29\%$ e $167,4 \pm 32,65\%$ nas concentrações de 0,1M do metal + 1Mm de L-NAME e 0,1M do metal + 10Mm de L-NAME quando comparados a concentração de 0,1M de cloreto de manganês, respectivamente (figura 16 a). No tempo de 60 minutos, houve diminuição significativa na produção de NO de $153,7 \pm 11,63\%$ e $153,4 \pm 11,61\%$ nas concentrações de 0,1M do metal + 1Mm de L-NAME e 0,1M do metal + 10Mm de L-NAME quando comparados a concentração de 0,1M, respectivamente (figura 16 b). No tempo de 90 minutos, também houve diminuição significativa na produção de NO de $163,9 \pm 17,20\%$ e $189,5 \pm 19,88\%$ nas concentrações de 0,1M do metal + 1Mm de L-NAME e 0,1M do metal + 10Mm de L-NAME quando comparados a concentração de 0,1M de cloreto de manganês, respectivamente (figura 16 c).

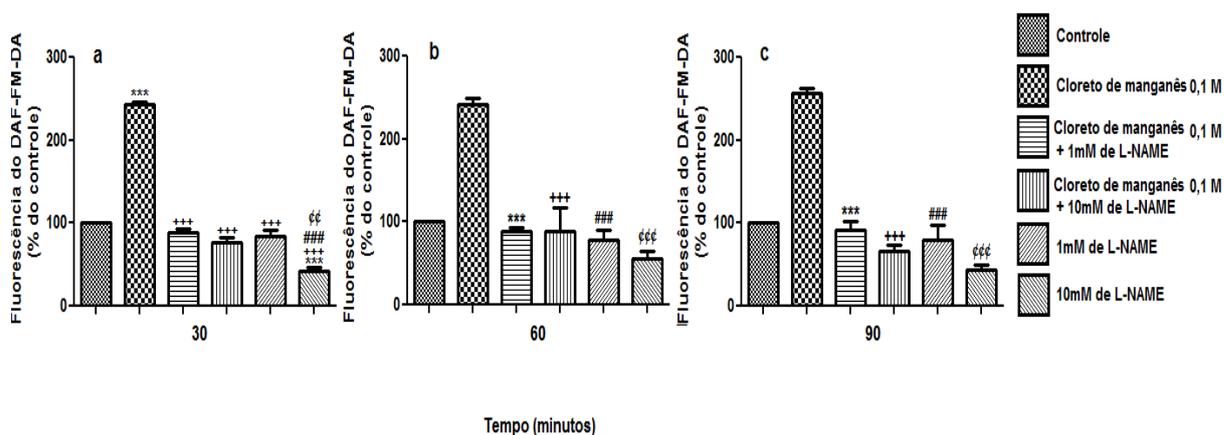


Figura 16 - Produção de NO, pelos hemócitos da ascídia *Phallusia nigra*, estimulados com cloreto de manganês 0,1M, após exposição prévia ao L-NAME, nos tempos de 30, 60 e 90 minutos. A intensidade de fluorescência é apresentada pela média \pm erro padrão (n=5). *** P <0,0001 significância quando comparado ao controle; +++ P <0,0001 significância em relação ao cloreto de manganês 0,1M; #### P <0,0001 nível de significância em relação à concentração de 0,1M do metal + 1mM de L-NAME; ## P <0,001, ### P <0,0001 Nível de significância em relação à concentração de 0,1M do metal + 10mM de L-NAME.

Após analisar os dados obtidos é possível afirmar que a concentração de L-NAME mais representativa, dentre as que utilizamos, no que se refere ao decréscimo da produção de NO pelos hemócitos, foi a de 10mM, independente do estímulo posteriormente acrescido. No entanto o melhor tempo de exposição na presença do estímulo citrato de chumbo e também do cloreto de manganês foi o de 90 minutos, porém para o cloreto de magnésio o melhor tempo corresponde ao de 60 minutos.

5.4 - Ação do DETA/NO sobre a produção de NO pelos hemócitos de *P. nigra*

O composto DETA/NO é um doador de NO, conseqüentemente, após a utilização do mesmo, a detecção do gás tende a aumentar. Caso não haja aumento na detecção da produção do mesmo, após utilização do DETA/NO, pode-se dizer que o marcador de NO empregado não é específico nem eficaz na detecção desse gás. Diversos estudos utilizam o DETA-NO com essa finalidade, como pode ser observado no trabalho realizado com as lagartas *Galleria mellonella*, no qual os hemócitos das larvas e da pré-pulpa revelam aumento estatisticamente significativo

após a utilização do DETA/NO, apesar do aumento ter sido maior em hemócitos da pré-pulpa do que nos hemócitos das larvas, indicando dessa forma, a especificidade do marcador de NO (KRISHNAN *et al.*, 2006).

Os dados obtidos, em nosso trabalho, com a exposição dos hemócitos, pré-incubados com DETA/NO, aos metais, citrato de chumbo, cloreto de magnésio e cloreto de manganês também indicaram aumento na produção do NO em todos os tempos analisados.

Observou-se ao analisar a produção de NO na presença do DETA/NO e do citrato de chumbo que no tempo de 30 minutos, houve aumento estatisticamente significativo na produção de NO de $4160 \pm 4,09\%$ e $7789 \pm 7,66\%$ nas concentrações de 0,1M do metal + 200 μ M de DETA/NO e 0,1M do metal + 400 μ M de DETA/NO, comparados a 0,1M de citrato de chumbo, respectivamente (figura 17 a). No tempo de 60 minutos, houve aumento estatisticamente significativo na produção de NO de $1210 \pm 1,81\%$ e $2140 \pm 3,20\%$ nas concentrações de 0,1M do metal + 200 μ M de DETA/NO e 0,1M do metal + 400 μ M de DETA/NO, comparados à de 0,1M de citrato de chumbo, respectivamente (figura 17 b). Já no tempo de 90 minutos, houve aumento estatisticamente significativo na produção de NO de $503,3 \pm 3,16\%$ e $875,3 \pm 5,51\%$ nas concentrações de 0,1M do metal + 200 μ M de DETA/NO e 0,1M do metal + 400 μ M de DETA/NO, comparados à de 0,1M de citrato de chumbo, respectivamente (figura 17 c).

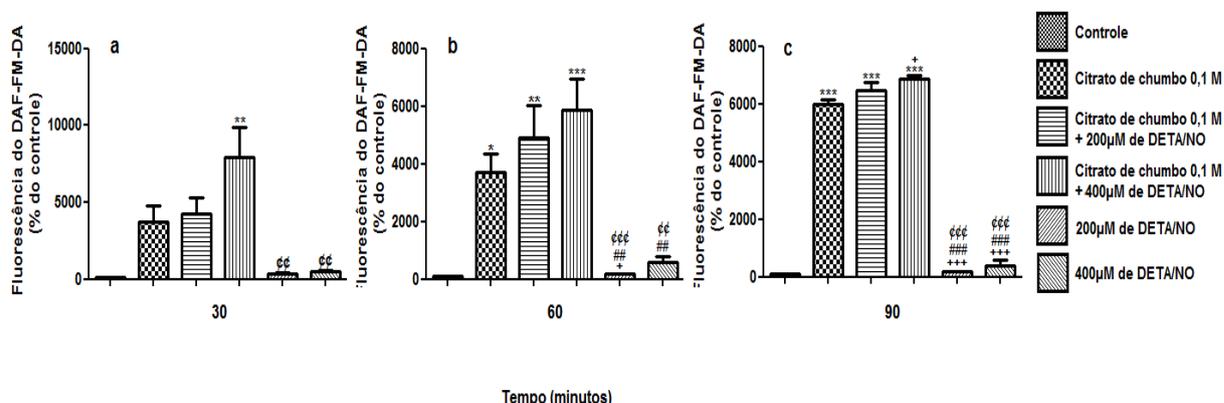


Figura 17 - Produção de NO, após exposição dos hemócitos da ascídia *Phallusia nigra*, pré-incubados com DETA-NO, ao citrato de chumbo 0,1M em diferentes tempos. A intensidade de fluorescência é apresentada pela média \pm erro padrão (n=5). * P <0,05, ** P <0,001, *** P <0,0001 significância quando comparado ao controle; + P <0,05, +++ P <0,0001 significância em relação ao citrato de chumbo 0,1M; ## P <0,001, ### P <0,0001 significância em relação à concentração de 0,1M

do metal + 200µM de DETA/NO; ^{cc} P <0,001, ^{ccc} P <0,0001 significância em relação à concentração de 0,1M do metal + 400µM de DETA/NO.

Na presença de cloreto de magnésio e DETA/NO observou-se que no tempo de 60 minutos, houve aumento estatisticamente significativo na produção de NO sendo este de $403,3 \pm 6,01$ na concentração de 0,1M do metal + 400µM de DETA/NO quando comparado à concentração de 0,1M de cloreto de magnésio (Figura 18 b).

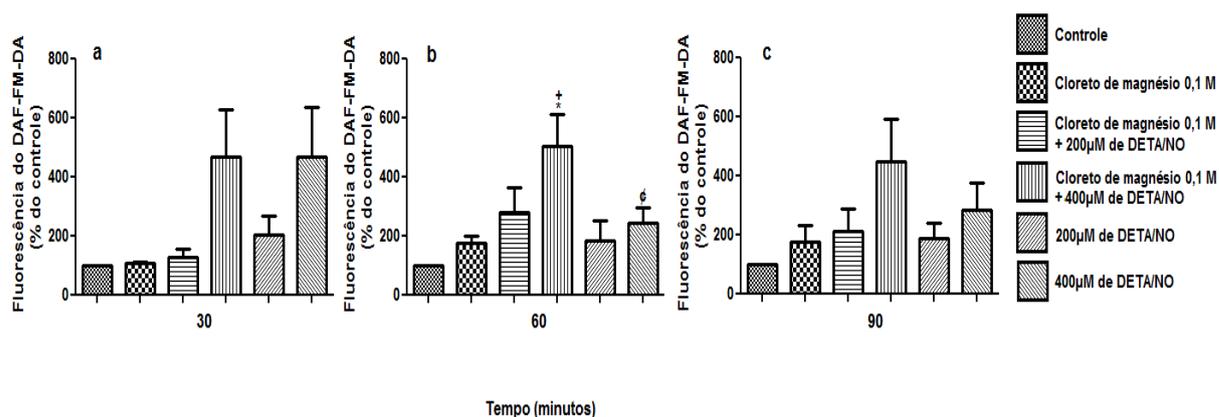


Figura 18 - Produção de NO, pelos hemócitos da ascídia *Phallusia nigra*, estimulados com cloreto de magnésio na presença prévia de DETA/NO. A intensidade de fluorescência é apresentada pela média \pm erro padrão (n=5). * P <0,05 significância quando comparado ao controle; + P <0,05 significância em relação ao cloreto de magnésio 0,1M; ° P <0,05 significância em relação à concentração de 0,1M do metal + 400µM de DETA/NO.

Monitorando a intensidade de fluorescência pode-se notar que no tempo de 90 minutos, houve aumento estatisticamente significativo na produção de NO sendo este de $533,1 \pm 4,69\%$ na concentração de 0,1M do metal + 400µM de DETA/NO quando comparado à concentração de 0,1M de cloreto de manganês (Figura 19 c).

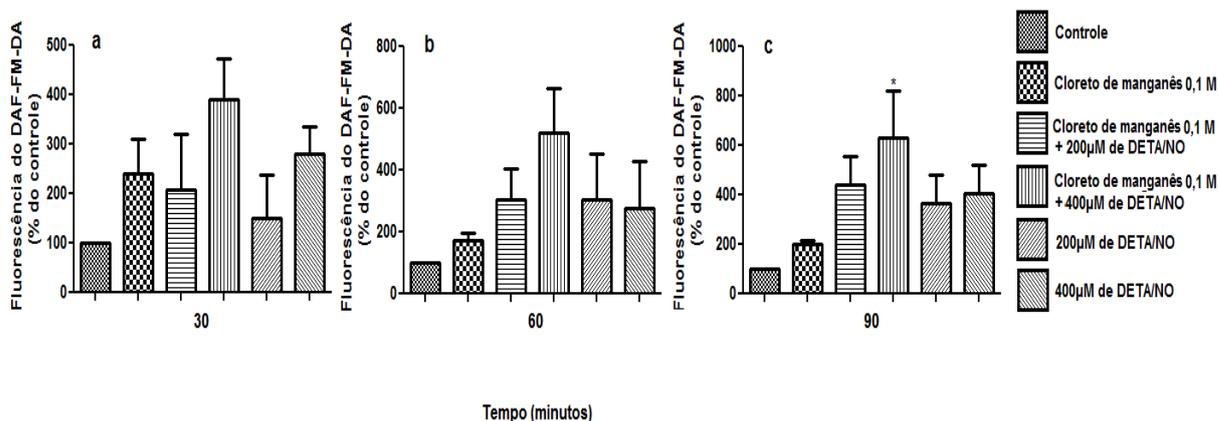


Figura 19 - Detecção da produção de óxido nítrico, pelos hemócitos da ascídia *Phallusia nigra*, estimulado com cloreto de manganês na presença prévia de DETA/NO. A intensidade de fluorescência é apresentada pela média \pm erro padrão ($n=5$) para. * $P < 0,05$ significância quando comparado ao controle.

A melhor concentração de DETA/NO, dentre as utilizadas nesse estudo, foi a de $400\mu\text{M}$, já que a mesma foi a responsável pelo aumento mais representativo na produção do gás, independente do estímulo.

No entanto, os tempos ideais de exposição variam de acordo com o estímulo acrescido posteriormente. Para o citrato de chumbo o melhor tempo de exposição foi o de 30 minutos, para o cloreto de magnésio foi o de 60 minutos e para o cloreto de manganês o melhor tempo corresponde ao de 90 minutos.

Em seguida, para a obtenção de resultados mais conclusivos e esclarecedores, ensaios da viabilidade dos hemócitos, da ascídia *Phallusia nigra*, foram realizados a fim de verificar se as células permaneciam viáveis durante todo o experimento. Com isso, foi possível observar que nenhum dos metais induziu a morte celular, já que os valores de viabilidade encontrados na presença dos mesmos foram próximos aos valores encontrados no experimento controle. Pelo contrário, foi possível notar leve aumento na viabilidade celular na presença do magnésio.

Além disso, o doador e o inibidor da produção de NO, DETA/NO e L-NAME, respectivamente, não induziram a morte celular. Conforme descrito previamente em um trabalho, realizado na Espanha, em que a viabilidade dos hemócitos de *Ruditapes decussatus* foi analisada na presença DETA-NO e L-NAME (TAFALLA *et al.*, 2003).

Dessa maneira, a utilização dos metais, do DETA/NO e do L-NAME, não provocou a morte dos hemócitos e conseqüentemente não causou interferências na detecção da quantidade de NO produzido, pelas mesmas, pois estas permaneceram viáveis durante todo o tempo de experimento.

Tabela 1 - Análise da viabilidade celular dos hemócitos da ascídia *Phallusia nigra*.

Estímulos	30 minutos	60 minutos	90 minutos
Controle	95%	95%	94%
Células + Chumbo 0,1M	95%	95%	94%
Células + Magnésio 0,1M	96%	95%	96%
Células + Manganês 0,1M	94%	94%	94%
Células + 10 mM de L-NAME + Chumbo 0,1M	95%	94%	94%
Células + 10 mM de L-NAME + Magnésio 0,1M	95%	93%	94%
Células + 10 mM de L-NAME + Manganês 0,1M	96%	94%	94%
Células + 400µM de DETA/NO + Chumbo 0,1M	95%	93%	96%
Células + 400µM de DETA/NO + Magnésio 0,1M	96%	95%	93%
Células + 400µM de DETA/NO + Manganês 0,1M	95%	97%	96%
Células + 10mM de L-NAME	94%	95%	94%
Células + 400µM de DETA/NO	95%	95%	95%

5.5 - Internalização dos metais pelos hemócitos da ascídia *Phallusia nigra*

Os resultados obtidos, pelo nosso grupo, após a realização da microanálise de raios-X dos hemócitos, da ascídia *Phallusia nigra*, foram similares aos resultados encontrados com os hemócitos da ascídia *Phallusia mammillata* (SCIPPA *et al.*, 1985).

Os espectros de microanálise de raios-X revelaram os elementos constituintes dos hemócitos da ascídia *Phallusia nigra* e sua respectiva proporção. No espectro do animal controle é possível notar a presença de carbono, oxigênio, silício, enxofre, cloro, cálcio, vanádio e cobre (figura 20). Os picos mais representativos correspondem ao elemento carbono, seguido pelo oxigênio e pelo cloro, respectivamente. O pico do cloro parece estar relacionado com a inclusão dos hemócitos na resina Epon (SCIPPA *et al.*, 1985). Além disso, os resultados obtidos indicaram a acumulação de vanádio, é descrito que esse metal é acumulado nas células denominadas como mórula ou vanadócitos, confirmando dados encontrados em outros estudos (BOTTE *et al.*, 1979). O pico de enxofre pode ter relação com os elevados níveis de ácido sulfúrico, anteriormente descritos, presentes nas células do tipo mórula (HENZE 1911, 1912).

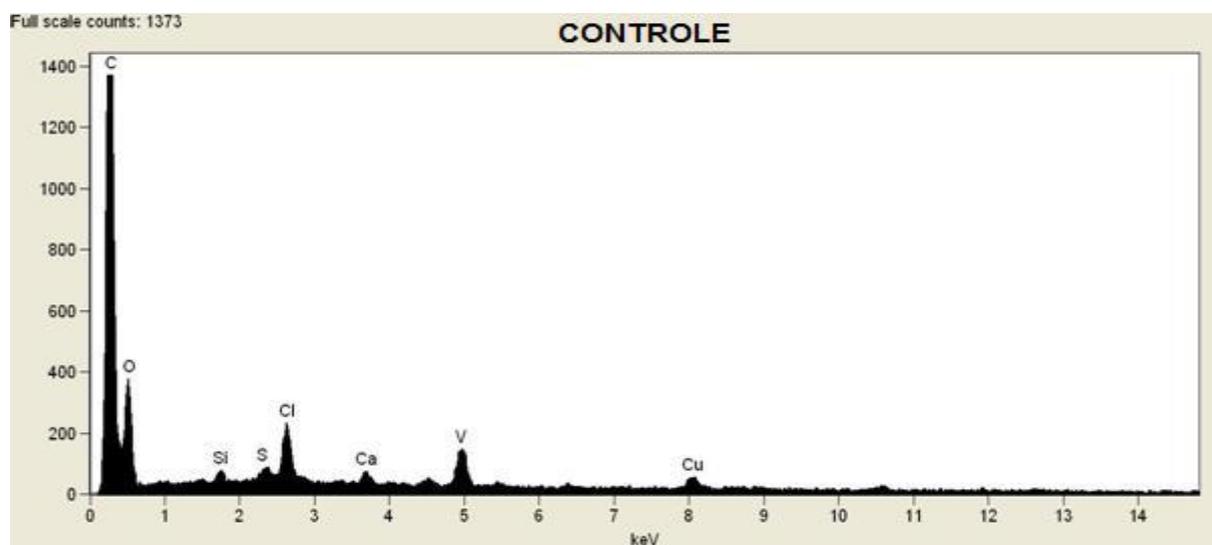


Figura 20 - Espectro da microanálise de raios-X dos hemócitos da ascídia *P. nigra* controle. Os componentes encontrados intracelularmente incluem o (C) carbono, (O) oxigênio, (Si) silício, (S) enxofre, (Cl) cloro, (Ca) cálcio, (V) vanádio e (Cu) cobre.

No espectro da microanálise de raios-X dos hemócitos estimulados com citrato de chumbo 0,1 M é possível notar a presença de elementos como, carbono, oxigênio, sódio, silício, chumbo, enxofre, cloro e cobre (figura 21). Os elementos encontrados em maior proporção são o carbono, seguido de oxigênio e enxofre, como já visualizados no espectro do animal controle. No entanto, o chumbo também apresenta um pico representativo e não encontrado nos hemócitos controle, indicando a internalização desse metal pesado após a exposição dos hemócitos ao mesmo.

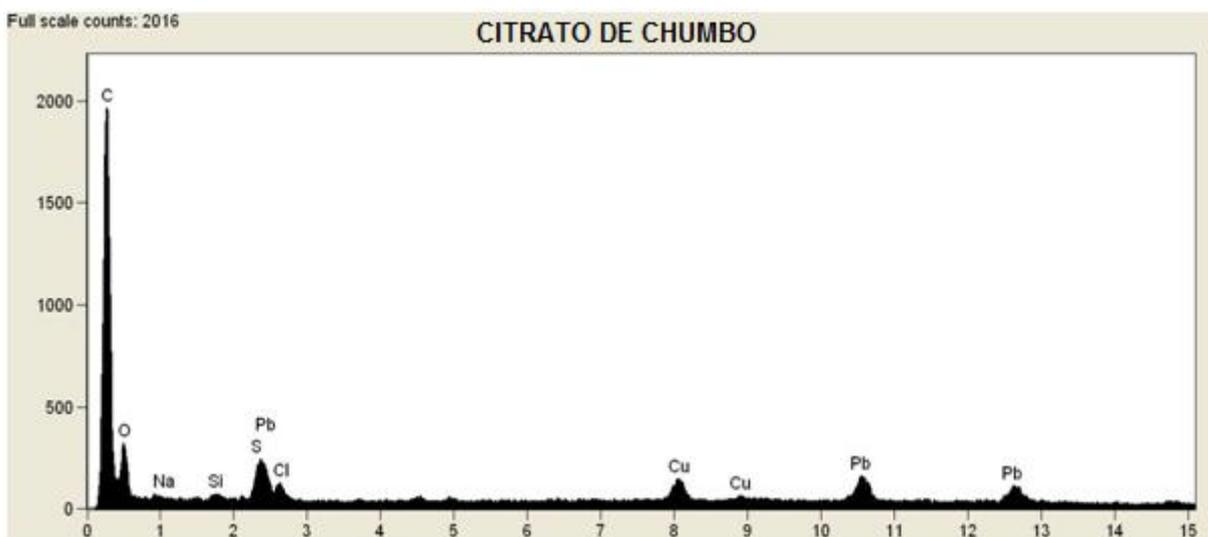


Figura 21 - Espectro da microanálise de raios-X da ascídia estimulada com citrato de chumbo. Esse espectro mostra a internalização do chumbo pelos hemócitos da ascídia *Phallusia nigra*. Os componentes encontrados intracelularmente incluem o (C) carbono, (O) oxigênio, (Na) sódio, (Si) silício, (S) enxofre, (Pb) chumbo, (Cl) cloro e (Cu) cobre.

No espectro dos hemócitos estimulados com cloreto de magnésio 0,1 M é possível notar a presença de elementos como, carbono, oxigênio, sódio, magnésio, silício, fósforo, enxofre, cloro, cálcio, titânio, vanádio e cobre (figura 22). Os elementos encontrados de forma mais representativa foram o carbono e oxigênio, seguidos de sódio, fósforo, cloro, titânio e vanádio.

A internalização do magnésio foi constatada, da mesma forma que ocorreu no caso do citrato de chumbo. Apesar da internalização de magnésio, pelos hemócitos

expostos ao mesmo, não ter sido tão significativa quanto à do chumbo pode-se afirmar que o mesmo foi acumulado intracelularmente. Esse dado fica claro quando os espectros dos hemócitos expostos a esses metais são comparados ao espectro controle. Acredita-se que a internalização desses metais esteja relacionada com processos de defesa celular como, por exemplo, a fagocitose. A fagocitose representa uma das respostas imune inata mais importantes. Ela permite que ocorra o reconhecimento de um corpo estranho, a sua imersão no interior de um fagossoma e, finalmente, sua morte, que pode ocorrer através da ação de espécies reativas de oxigênio, nitrogênio ou enzimas lisossomais liberadas dentro do lúmen das vesículas endocíticas (ABBAS *et al.*, 2012).

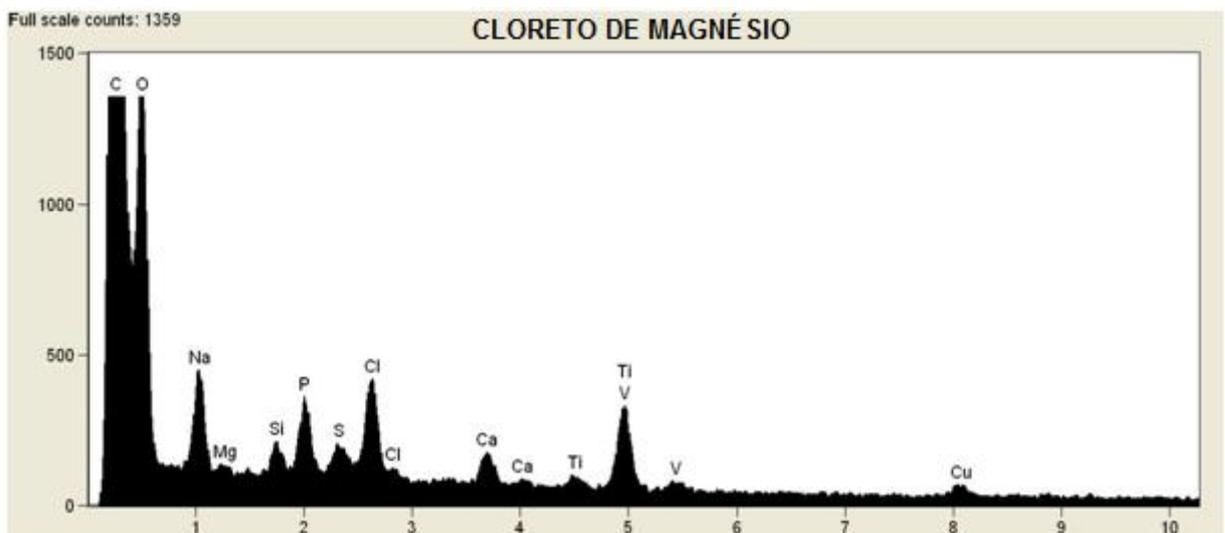


Figura 22 - Espectro da microanálise de raios-X dos hemócitos estimulados com cloreto de magnésio 0,1M. Os componentes encontrados intracelularmente incluem o (C) carbono, (O) oxigênio, (Na) sódio, (Mg) magnésio, (Si) silício, (P) fósforo, (S) enxofre, (Cl) cloro, (Ca) cálcio, (Ti) titânio, (V) vanádio e (Cu) cobre.

Nos resultados obtidos com a microanálise de raios-X dos hemócitos estimulados com cloreto de manganês 0,1 M nota-se a presença dos seguintes elementos, carbono, oxigênio, alumínio, silício, fósforo, enxofre, cloro, titânio, vanádio e cobre (figura 23). Os elementos encontrados em proporções mais significativas foram, carbono seguido de oxigênio, enxofre, titânio e vanádio. O espectro indica que não houve internalização do manganês, pelos hemócitos, como ocorreu com os demais metais utilizados no experimento.

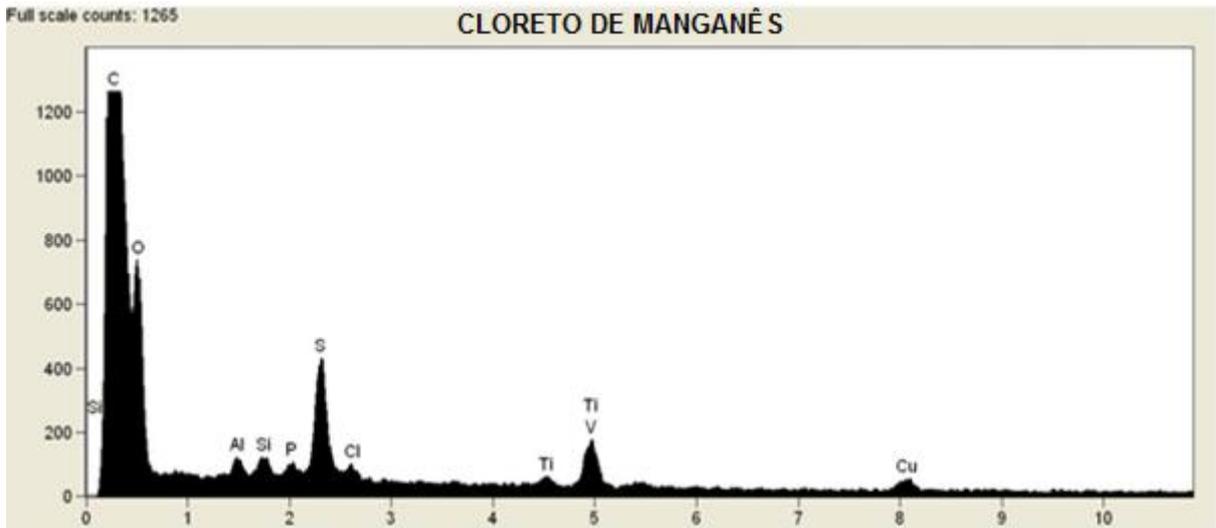


Figura 23 - Espectro obtido com a microanálise dos hemócitos estimulados com cloreto de managês 0,1M. Os componentes encontrados intracelularmente incluem o (C) carbono, (O) oxigênio, (Al) alumínio, (Si) silício, (P) fósforo, (S) enxofre, (Cl) cloro, (Ti) titânio, (V) vanádio e (Cu) cobre.

6. CONCLUSÕES

Identificamos e classificamos 08 tipos principais de hemócitos presentes na hemolinfa da ascídia *Phallusia nigra*, são eles, o Hemoblasto, o Granulócito Refrátil Univacuolar (URG), a Célula do Tipo Mórula, Célula Pigmentar, Célula em Anel de Sinete, Célula Compartimentar, Nefrócito e o Amebócito. Acredita-se que a Célula do tipo mórula seja a mais frequentemente encontrada na hemolinfa da ascídia *Phallusia nigra*.

Também foi verificado aumento significativo da produção de NO após exposição dos hemócitos, da ascídia *Phallusia nigra*, a concentrações crescentes dos metais citrato de chumbo, cloreto de magnésio e cloreto de manganês. Todos os metais promoveram aumento da produção desse gás, porém, quando utilizados na concentração de 0,1M o aumento na produção de NO foi mais expressivo. Comparando a produção de NO induzida por todos os metais observamos que o metal que induziu maior produção do mesmo foi o citrato de chumbo, no tempo de 60 minutos, sendo esta cerca de 5000 vezes maior do que a induzida pelos outros metais testados.

Na presença de L-NAME notou-se diminuição na produção de NO independente do estímulo adicionado. A concentração de L-NAME mais eficaz, dentre as utilizadas, no que se refere ao decréscimo da produção de NO pelos hemócitos, foi a de 10mM, apesar da concentração de 1mM também promover diminuição na produção do mesmo, o que comprova a participação da NOS na produção de NO.

O contrário foi observado na presença do doador de NO, DETA/NO. A concentração de DETA/NO responsável pelo aumento mais representativo na produção do gás, dentre as utilizadas nesse estudo, foi a de 400µM, independente do estímulo acrescido.

Com isso, pode-se afirmar que o marcador de NO, utilizado nos experimentos, DAF-FM DA, é específico para o NO.

A produção de NO verificada em todos os experimentos realizados não sofreu nenhum tipo de interferência com relação à viabilidade dos hemócitos. Já que os ensaios de viabilidade celular demonstraram que os hemócitos permaneceram

viáveis mesmo após exposição aos metais citrato de chumbo, cloreto de magnésio e cloreto de manganês e aos compostos L-NAME e DETA/NO.

Os dados obtidos com a microanálise de raios-X dos hemócitos demonstraram a acumulação intracelular do chumbo e do magnésio, após exposição dos hemócitos aos respectivos metais. Apesar de constatarmos a presença do manganês como capaz de induzir aumento na produção de NO e conseqüentemente apresentar certa toxicidade aos hemócitos a internalização desse metal não foi notada.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, ABUL K.; LICHTMAN, ANDREW H.; PILLAI, SHIV. **Basic immunology: functions and disorders of the immune system**. Saunders WB, 2012.

ALBA-TERCEDOR, JAVIER. **Macroinvertebrados acuáticos y calidad de las aguas de los ríos**. In: IV Simposio del agua en Andalucía (SIAGA). Almería. p. 203-213, 1996.

AMORIM, L.C.A. **Biomarkers for evaluating exposure to chemical agents present in the environment**. Revista Brasileira de Epidemiologia, v. 6, n. 2, p. 158-170, 2003.

ANDERSON, R.S. **Cellular responses to foreign bodies in the tunicate *Molgula manhattensis* (DeKay)**. Biol. Bull. v. 141, p. 91-98, 1971.

ARIZZA, V.; e PARRINELLO, D. **Inflammatory hemocytes in *Ciona intestinalis* innate immune response**. Invertebr Survival J v. 6, p. 58-66, 2009.

BALLARIN, L. **Immunobiology of compound ascidians, with particular reference to *Botryllus schlosseri*: state of art**. Inv. Surv. J. v. 5, p. 54-74, 2008.

BARBER, A.A., BERNHEIM, F. **Lipid peroxidation: Its measurement, occurrence and significance in animal tissues**. Adv. Gerontol. Res., v.2, p.355-403,1967.

BARNES, R. D., **Protocordados e Quetógnatos**. Em: Invertebrate Zoology (1982). Philadelphia, PA: Holt-Saunders International p. 856-870, 1982.

BARNES, R. D.; RUPPERT, E.E.; FOX, R. S. **Zoologia dos invetebrados: Uma abordagem funcional - evolutiva**. pp. 1083–1118, São Paulo, 1029 p, 2005.

BONADA, N.; PRAT, N.; RESH, V.H.; e STATZNER, B. **Developments in aquatic insect biomonitoring: a comparative analysis of recent approaches**. Annu. Rev. Entomol., v. 51, p. 495-523, 2006.

BOTTE, L.; SCIPPA, S.; DE VINCENIIS, M. **Ultrastructural localization of vanadium in the blood cells of Ascidiacea**. Experientia v. 35, p. 1228-1230, 1979.

BREDT, D.S.; e SNYDER, S. H. **Nitric oxide mediates glutamate-linked enhancement of cGMP levels in the cerebellum**. Proc Natl Acad Sci U S A. v. 86, p. 9030–9033, 1989.

BRUSCA, R.C.; BRUSCA, G.J. **Other Deuterostomes: Chaetognatha, Hemichordata, Chordata** pp. 855-864. Em: *Invertebrates*, 2ª ed, 902 pp, 2003.

BURIGHEL, P.; CLONEY, R.A. **Urochordata: Ascidiacea**. In: Harrison F.W., Ruppert E.E., editors. *Microscopic anatomy of invertebrates*, vol. 15. New York: Wiley-Liss Inc. p. 221 – 347, 1997.

CHANGE, B., SIES, H., BOVERIS, A. **Hydroperoxide metabolism in mammalian organs**. *Physiol. Rev.*, v. 59, n.3, p. 527-605, 1979.

CHESSMAN, B.; GROWNS, I.; CURREY, J.; PLUNKETT - COLLE, N. **Predicting diatom communities at the enus level for the rapid biological assessment of rivers**. *Freshwater Biology*. v. 41, p. 317-332, 1999.

COLES, JACKIE A.; FARLEY, SOPHIA R.; PIPE, RICHARD, K. **Alteration of the immune response of the common marine mussel *Mytilus edulis* resulting from exposure to cadmium**. *Diseases of Aquatic Organisms*, v. 22, n. 1, p. 59-65, 1995.

COOPER, E. L.; PARRINELO, N. **Immunodefense in tunicates: cells and molecules**. *The biology of ascidians*. Springer, Tokyo, p. 383–391, 2001.

DA ROCHA, R. A.; e AFONSO, J. C. **MANGANÊS**. *Química Nova na Escola*, v. 34, p. 1-3, 2012.

DAILIANIS, S. **Production of superoxides and nitric oxide generation in haemocytes of mussel *Mytilus galloprovincialis* (Lmk.) after exposure to cadmium: a possible involvement of Na(+)/H(+) exchanger in the induction of cadmium toxic effects**. *Fish Shellfish Immunol*. v. 27(3), p. 446-53, 2009.

DE BARROS, C.M.; ANDRADE, L.R.; ALLODI, S.; VISKOV, C.; MOURIER, P.A.; CAVALCANTE, C.M.; STRAUS, A.H.; TAKAHASHI, H.K.; POMIM, V.H.; CARVALHO, V.F.; MARTINS, M.A.; PAVÃO, M.S.G. **The hemolymph of the ascidian *Styela plicata* (Chordata-Tunicata) contains heparin inside basophil-like cells and an unique sulfated galactoglucan in the plasma**. *J. Biol. Chem*. v. 282, p.1615-1626, 2007.

DE BARROS, C.M.; DE CARVALHO, D.R.; ANDRADE, L.R.; PAVAO, M.S. AND ALLODI, S. **Nitric oxide production by hemocytes of the ascidian *Styela plicata***. *Cell Tissue Res*. v. 338, p. 117–128, 2009.

DE OLIVEIRA, A. S. **Uso e ocupação do solo e a concentração de metais pesados no sedimento e na água: bacia do rio Pitimbu**. 63f. Dissertação (Mestrado) – Centro de Tecnologia. Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2012.

DELSUC, F.; BRINKMANN, H.; CHOURROUT, D.; PHILIPPE, H. **Tunicates and not cephalochordates are the closest living relatives of vertebrates.** Nature. v. 439, p. 965-968, 2006.

DENNIS, W.H. **Metallurgy of the Non-ferrous Metals**, 2^a ed. London: Sir Issac Pitman e Sons Ltda, 1963.

DHANEESH, K.V.; GOPI, M.; NOUSHAD, K.M.; GANESHAMURTHY, R.; KUMAR, T.T.A., e BALASUBRAMANIAN, T. **Determination of metal levels in thirteen fish species from Lakshadweep Sea.** Bulletin of environmental contamination and toxicology, v. 88, n. 1, p. 69-73, 2012.

EISERICH, J.P.; PATEL, R.P.; O'DONNELL, V.B. **Pathophysiology of nitric oxide and related species: free radical reactions and modification of biomolecules.** Molec. Aspects Med. v.19, p. 221-357, 1998.

ENDEAN, R. **Studies of the blood and tests of some Australian ascidians. III. The formation of the test of *Pyura sfolonifera* (Heller).** Aust. J. Mar. Freshwater Res. v. 6, p. 157-164, 1955.

FINDIK, Ö.; CICEK, E. **Metal concentrations in two bioindicator fish species, *Merlangius merlangus*, *Mullus barbatus*, captured from the West Black Sea Coasts (Bartın) of Turkey.** Bulletin of environmental contamination and toxicology, v. 87, n. 4, p. 399-403, 2011.

FONTAÍNHAS-FERNANDES, A. **The use of biomarkers in aquatic toxicology studies.** Revista Portuguesa de Zootecnia, p. 67-86, 2005.

FOURNIER, T.M.; LAMORTE, L.; MAROUN, C.R.; LUPHER, M.; BAND, H.; LANGDON, W.; e PARK, M. **Cbl-transforming variants trigger a cascade of molecular alterations that lead to epithelial mesenchymal conversion.** Molecular biology of the cell, v. 11, n. 10, p. 3397-3410, 2000.

GAGNAIRE, B.; THOMAS-GUYON, H.; RENAULT, T. **In vitro effects of cadmium and mercury on Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), haemocytes.** Fish Shellfish Immunol v. 16, p. 502–512, 2004.

HALLIWELL, B.; GROOTVELD, M. **The measurement of free radical reactions in humans: some thoughts for future experimentation.** FEBS letters, v. 213, n. 1, p. 9-14, 1987.

HARRIS, J.H.; SILVEIRA, R. **Large-scale assessments of river health using an Index of Biotic Integrity with low-diversity fish communities.** Freshwater Biology. v. 41, n. 2, p. 235-252, 1999.

HENZE, M. **Untersuchungen über das Blut der Ascidien. I. Mitteilung. Die Vanadiumverbindung der Blutkörperchen.** Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie, v. 72, n. 5-6, p. 494-501, 1911.

HENZE, M. **Untersuchungen über das Blut der Ascidien. II. Mitteilung.** Hoppe-Seyler's Zeitsch Physiol Chem v.79, p.215–228, 1912.

HIROSE, E.; SHIRAE, M.; SAITO, Y. **Ultrastructures and classification of circulating hemocytes in 9 botryllid ascidians (Chordata: Ascidiacea).** Zool Sci. v.20, p. 647–656, 2003.

HOGG, N., KALYANARAMAN, B. **Nitric oxide and lipid peroxidation.** Biochim. Biophys. Acta, v. 1411, n.2-3, p.378-384, 1999.

HYLLAND, K. **Biological effects in the management of chemicals in the marine environment.** Marine pollution bulletin, v. 53, n. 10, p. 614-619, 2006.

ILZSG., **Statistic lead and zinc,** 2003. < <http://www.ilzsg.org/ilzsgframe.htm>>. Disponível em: Acesso em 28/out/2013.

ISHIKAWA, K.; WATANABE, H.; e MUKAI, T. **High strain rate deformation behavior of an AZ91 magnesium alloy at elevated temperatures.** Materials Letters, v. 59, n. 12, p. 1511-1515, 2005.

KAY, W.R.; SMITH, M.J.; PINDER, A.M.; MCRAE, J.M.; DAVIS, J.A., e HALSE, S.A. **Patterns of distribution of macroinvertebrate families in rivers of north-western Australia.** Freshwater Biology, v. 41, n. 2, p. 299-316, 1999.

KAYHAN, F.E.; GULSOY, N.; BALKIS, N.; e YÜCE, R. **Cadmium (Cd) and lead (Pb) levels of Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819) from Bosphorus, Istanbul, Turkey.** Pakistan journal of biological sciences: PJBS, v. 10, n. 6, p. 915, 2007.

KEEFER, Larry K. et al. **“NONOates”(1-substituted diazen-1-ium-1, 2-diolates) as nitric oxide donors: convenient nitric oxide dosage forms.** Methods in enzymology, v. 268, p. 281-293, 1996.

KESKIN, Y.; BASKAYA, R.; ÖZYARAL, O.; YURDUN, T.; LÜLECI, N.E., e HAYRAN, O. **Cadmium, lead, mercury and copper in fish from the Marmara Sea, Turkey.** Bulletin of environmental contamination and toxicology, v. 78, n. 3, p. 258-261, 2007.

KHALTURIN, M. D.; LITVINCHUK, S. N.; BORKIN, L. J.; ROSANOV, J.M.; MILTO, K.D. **Genetic variation in two cryptic forms, with different genome size, of the**

common spadefoot toad, *Pelobates fuscus* (Pelobatidae, Anura, Amphibia), v. 45, n. 3, p. 308 – 323, 2003.

KIECHLE, F.L.; MALINSKI, T. **Nitric oxide: biochemistry, pathophysiology, and detection.** American journal of clinical pathology, v. 100, n. 5, p. 567-575, 1993.

KINGSFORD, R.T. **Aerial survey of waterbirds on wetlands as a measure of river and floodplain health.** Freshwater Biology, v. 41, n. 2, p. 425-438, 1999.

KRISHNAN, N.; HYRSL, P.; e SIMEK, V. **Nitric oxide production by hemocytes of larva and pharate prepupa of *Galleria mellonella* in response to bacterial lipopolysaccharide: cytoprotective or cytotoxic?** Comp. Biochem. Physiol. v. 142, p. 103–110, 2006.

LEFEBVRE, C.; VANDENBULCKE, F.; BOCQUET, B.; TASIEMSKI, A.; DESMONS, A.; VERSTRAETE, M. **Cathepsin L and cystatin B gene expression discriminates immune coelomic cells in the leech *Theromyzon tessulatum*.** Dev. Comp. Immunol. v. 32, p. 795-807, 2008.

LEHNINGER, Albert L.; NELSON, David L.; COX Michael, M. **Lehninger princípios de bioquímica.** 3ª ed. São Paulo 2002.

LEMOS, L.R. **Maximização da eficiência de dessulfuração do gusa líquido num reator Kanbara.** 2011.

LENAT, D.R.; BARBOUR, M.T. **Using benthic macroinvertebrate community structure for rapid, cost-effective, water quality monitoring: rapid bioassessment.** Biological monitoring of aquatic systems. Lewis Publishers, Boca Raton, Florida, p. 187-215, 1994.

MILANESI, C.; BURIGHEL, P. **Blood cell ultrastructure of the ascidian *Botryllus schlosseri*. I. Hemoblast, granulocytes, macrophage, morula cell and nephrocyte.** Acta Zoologica, v. 59, p. 135–147, 1978.

MOLLACE, V.; SALVEMINI, D.; ANGGARD, E.; VANE, J. **Nitric oxide from vascular smooth muscle cells: regulation of platelet reactivity and smooth muscle cell guanylate cyclase.** Br J Pharmacol v. 104, p. 633-8, 1991.

MONCADA, S.; HIGGS, E.A. **The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology.** Br J Pharmacol. v. 147, p. 193-201, 2006.

MONNIOT, C.; MONNIOT, F.; LABOUTE, P. **Coral reef ascidians of New Caledonia.** IRD Editions, 1991.

MORAES, D.S.D.L.; e JORDÃO, B.Q. **Water resources deterioration and its impact on human health.** Revista de Saúde Pública, v. 36, n. 3, p. 370-374, 2002.

MOREIRA, F.R., e MOREIRA, J.C. **Os efeitos do chumbo sobre o organismo humano e seu significado para a saúde.** Rev Panam Salud Publica, v. 15, n. 2, p. 119-29, 2004.

NIEMI, G.J.; e MCDONALD, M.E. **Application of ecological indicators.** Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics, p. 89-111, 2004.

OHTAKE, S.I.; ABE, T.; SHISHIKURA, F.; e TANAKA, K. **The phagocytes in hemolymph of *Halocynthia roretzi* and their phagocytic activity.** Zoological science, v. 11, n. 5, p. 681-691, 1994.

OLIVER, L.M.; FISHER, W.S. **Appraisal of prospective bivalve immunomarkers.** Biomarkers, v. 4, n. 6, p. 510-530, 1999.

PARRINELLO, N.; ARIZZA, V.; CHINNICI, C.; PARRINELLO, D.; CAMMARRATA, M. **Phenoloxidasas in ascidian hemocytes: characterization of the pro-phenoloxidase activating system.** Comp. Biochem. Physiol. v. 135B, p. 583 – 591, 2003.

PRABHU, A.S.; KARTHIKEYAN, M.M.; ANANTHAN, G.; e PANDIAN, P.S. **Bioaccumulation of heavy metals in ascidians from Palk Bay region, southeast coast of India.** In: Proceedings of International Forestry and Environment Symposium, v. 17, 2012.

SCHLUMPBERGER, J.M.; WEISSMAN, I.L.; SCOFIELD, V.L. **Separation and labeling of specific subpopulation of Botryllus blood cells.** J Exp Zool v. 229, p. 401–411, 1984.

SCIPPA, S.; BOTTE, L.; ZIEROLD, K.; DE VINCENTIIS, M. **X-ray microanalytical studies on cryofixed blood cells of the ascidian *Phallusia mammillata*.** Cell Tissue Res v. 239, p. 459-461, 1985.

SILVEIRA, M.P.; QUEIROZ, J.F. de; BOEIRA, R.C. **Protocolo de coleta e preparação de amostras de macroinvertebrados bentônicos em riachos.** Embrapa Meio Ambiente. Comunicado Técnico, v. 19, 2004.

SMITH, L.C.; RAST, J.P.; BROCKTON, V.; TERWILLIGER, D.P.; NAIR, S.V.; BUCKLEY, K.M. **The sea urchin immune system.** Inv. Surv. J. v.3, p. 25-39, 2006.

SMITH, M.J.; KAY, W.R.; EDWARD, D.H.D.; PAPAS, P.J.; RICHARDSON, K.S.J.; SIMPSON, J.C.; e HALSE, S.A. **AusRivAS: using macroinvertebrates to assess ecological condition of rivers in Western Australia.** Freshwater Biology, v. 41, n. 2, p. 269-282, 1999.

TAFALLA, C.; GOMEZ-LEON, J.; NOVOA, B.; FIGUERAS, A. **Nitric oxide production by carpet shell clam (*Ruditapes decussatus*) hemocytes.** Dev Comp Immunol. v. 27, p. 197–205, 2003.

VAN DER PLOEG, F.; E DE ZEEUW, A.J. **International aspects of pollution control.** Environmental and Resource Economics, v. 2, n. 2, p. 117-139, 1992.

VASCONCELOS, S.M.L.; GOULART, M.O.F.; MOURA, J.D.F.; MANFREDINI, V.; BENFATO, M.D.S.; e KUBOTA, L.T. **Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação.** Quim Nova, v. 30, n. 5, p. 1323-38, 2007.

WILBORN, C.D.; KERKSICK, C.M.; CAMPBELL, B.I.; TAYLOR, L.W.; MARCELLO, B.M.; RASMUSSEN, C.J.; E KREIDER, R.B. **Effects of zinc magnesium aspartate (ZMA) supplementation on training adaptations and markers of anabolism and catabolism.** J Int Soc Sports Nutr, v. 1, n. 2, p. 12-20, 2004.

WRIGHT, B.; LACCHINI, A.H.; DAVIES, A.J.; WALKER, A.J. **Regulation of nitric oxide production in snail (*Lymnaea stagnalis*) defence cells: a role for PKC and ERK signaling pathways.** Biol Cell v. 98, p. 265–278, 2006.

WRIGHT, R.K. **Urochordates.** In “invertebrate blood cells”. NA Ratcliffe and AF Rowley Eds., Academic press. v. 2, p. 565-626, 1981.

ZANIOLO, G.; MANNI, L.; BALLARIN, L. **Colony specificity in *Botrylloides leachi*. I. Morphological aspects.** Invertebr. Surviv. J. v. 3, p. 125–136, 2006.