



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



Tolerância de bivalve nativo e invasor perante a contaminação ambiental

Yasmin El Haj

Orientador: Marta Marques de Souza

Rio Grande
2018



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



Tolerância de bivalve nativo e invasor perante a contaminação ambiental

Aluno: Yasmin El Haj

Orientador: Marta Marques de Souza

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

Rio Grande
2018

Dedico este Mestrado à minha avó, que não encontra-se mais neste plano, mas que está presente espiritualmente em todos os momentos da minha vida. Obrigada por todos os ensinamentos e por todo amor. És a minha luz.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha mãe, Suraia Mehzen, que é minha inspiração para tudo nessa vida. Obrigada por me fazer ser a pessoa que sou hoje e por me incentivar nesta caminhada científica. Obrigada por ser mãe, pai, amiga, irmã e tantas outras coisas em uma pessoa só, meu amor por ti ultrapassa essa vida.

Agradeço à minha avó, Nahla Hammoud, a pessoa mais incrível e especial que já conheci. Hoje, és uma alma cheia de luz (sempre fostes), que está em outro plano, não te vejo fisicamente mas sei que estás sempre por perto, guiando meus passos.

À minha orientadora, Marta Marques de Souza, por todos os ensinamentos e por conseguir me passar energia positiva em todos os momentos, principalmente nos mais tensos. Obrigada por ser nossa mãe científica.

Ao meu namorado, Bruno Braga, por estar ao meu lado em todos os momentos.

Aos meus amigos, por todo apoio.

Aos meus colegas do mestrado, especialmente a Thayara Carrasco pela amizade.

Ao técnico do Biotério aquático Mateus, pela ajuda na coleta, manutenção e por todo suporte.

À Silvana, Isadora e Yuri, pela ajuda durante as coletas.

Ao professor Robaldo e ao técnico Nilton, pela ajuda na obtenção dos bivalves nativos.

À Fernanda, que sempre se disponibilizou em me ajudar.

À Nicole, por me ajudar a utilizar o programa estatístico.

Agradeço à CAPES, pela bolsa de estudo.

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO.....	7
RESUMO.....	8
ABSTRACT.....	9
INTRODUÇÃO GERAL.....	10
Hipótese.....	17
Objetivo geral.....	17
Objetivos específicos.....	17
Referências bibliográficas.....	18
CAPÍTULO 1. Tolerância entre bivalve nativo e invasor perante a contaminação ambiental.....	24
Resumo.....	24
Introdução.....	25
Metodologia.....	27
Resultados.....	31
Discussão.....	36
Conclusão.....	39
Considerações finais e perspectivas.....	39
Referências.....	40

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO GERAL

- Figura 1.** Esquema mostrando as principais rotas dos agrotóxicos em ecossistemas aquáticos. (Imagem: Tomita, R. Y.)..... 13
- Figura 2.** *Limnoperna fortunei* (Mexilhão dourado). (Foto: Darrigran G.)..... 15
- Figura 3.** *Limnoperna fortunei* utilizando como substrato de fixação o bivalve nativo *Anodontites trapesialis* (Foto: Tomaz Aguzzoli)..... 15
- Figura 4.** *Anodontites trapesialis* (Foto: Yasmin El Haj)..... 16
- Figura 5.** Modelo do funcionamento do mecanismo de defesa das proteínas da super-família ABC na presença de um xenobiótico (Esquema: Fernanda Moreira Lopes)..... 17

CAPÍTULO 1

- Figura 1.** Integridade lisossomal em brânquia e músculo de *Limnoperna fortunei* avaliando as diferentes concentrações do vermelho neutro..... 32
- Figura 2.** Citotoxicidade em brânquia e músculo de *Limnoperna fortunei* e *Anodontites trapesialis* expostos ao cobre..... 33
- Figura 3.** Atividade das proteínas ABC (MXR) em brânquia e músculo de *Limnoperna fortunei* e *Anodontites trapesialis* expostos ao cobre.....34
- Figura 4.** Citotoxicidade em brânquia e músculo de *Limnoperna fortunei* e *Anodontites trapesialis* expostos ao Roundup Transorb®.....35
- Figura 5.** Atividade das proteínas ABC (MXR) em brânquia e músculo de *Limnoperna fortunei* e *Anodontites trapesialis* expostos ao Roundup Transorb®.....36

APRESENTAÇÃO

O foco desta dissertação é a tolerância de uma espécie de bivalve nativo *Anodontites trapesialis* e outra invasora *Limnoperna fortunei* perante a contaminação ambiental através de testes de citotoxicidade e defesa celular e foi estruturada em um capítulo. A introdução geral e o capítulo 1: “Tolerância de bivalve nativo e invasor perante a contaminação ambiental” foram formatados de acordo com as normas do periódico “Archives of Environmental Contamination and Toxicology” periódico Qualis B1 na área de biodiversidade.

RESUMO

A introdução de espécies exóticas constitui uma das principais ameaças à biodiversidade. Tais espécies, quando não encontram predadores naturais se proliferam sem controle e ameaçam espécies nativas através da competição por espaço e alimento, podendo levar estas à extinção. A literatura indica que espécies exóticas possuem uma maior tolerância a estressores ambientais quando comparadas a espécies nativas, aumentando assim, a possibilidade dessas espécies se estabelecerem em novos habitats. Nas últimas décadas, as atividades antropogênicas aumentaram em decorrência da urbanização e da industrialização e isso tem gerado um aumento na quantidade de contaminantes no meio ambiente. Propõe-se, com este trabalho, verificar a resistência de moluscos bivalves de água doce de espécie nativa (*Anodontites trapesialis*) e exótica (*Limnoperna fortunei*) à contaminação química. Para isso, utilizamos o método *ex vivo/in vitro*, onde brânquia e músculo foram expostos a dois tipos diferentes de estressores ambientais, cobre (metal) e Roundup Transorb® (herbicida). Os tecidos foram submetidos ao teste de citotoxicidade vermelho neutro, no qual avalia a Integridade lisossomal e ao teste MXR (Resistência a Multixenobióticos) no qual avalia a defesa celular. Na espécie exótica, apenas cobre 9000 µg/L e Roundup Transorb® 5000 µg/L foram citotóxicas. Na espécie nativa, foi observada citotoxicidade do cobre de 900 e 9000 µg/L e do Roundup Transorb® de 50 e 5000 µg/L. Os resultados foram iguais em ambos os tecidos. As proteínas ABC, responsáveis pela extrusão dos contaminantes (defesa celular), mostraram-se inibidas quando expostas aos contaminantes em ambas as espécies, logo, a citotoxicidade pode estar relacionada com a falta de capacidade da defesa celular. Os resultados indicam que brânquia e músculo portaram-se da mesma maneira, não havendo diferença de sensibilidade entre os tecidos. Em relação a integridade lisossomal, a espécie nativa foi mais sensível em apontar maior número de situações com citotoxicidade, onde houve maior número de condições em que a defesa celular foi inibida.

Palavras-chave: *Limnoperna fortunei*, *Anodontites trapesialis*, *ex-vivo*, citotoxicidade, MXR.

ABSTRACT

The introduction of alien species is one of the major threats to biodiversity. These species, when they do not encounter natural predators, proliferate uncontrollably and threaten native species through competition for space and food, which can lead to extinction. The literature indicates that exotic species have a greater tolerance to environmental stressors when compared to native species, thus increasing the possibilities of these species to settle in new habitats. In recent decades, anthropogenic activities have increased as a result of urbanization and industrialization and this has generated an increase in the amount of contaminants released and introduced into the environment. It is proposed, with this work, to verify the resistance of freshwater bivalve molluscs of native species (*Anodontites trapesialis*) and exotic (*Limnoperna fortunei*) to chemical contamination. For this, we used the *ex vivo* / *in vitro* method, where gill and muscle were exposed to two different types of environmental stressors, copper (metal) and Roundup Transorb® (herbicide). The tissues were submitted to the neutral red cytotoxicity test, in which the lysosomal Integrity and the MXR (Multixenobiotic Resistance) test evaluated the cellular defense. In the exotic species, only 9000 µg / L and Roundup Transorb® 5000 µg / L were cytotoxic. In the native species, copper cytotoxicity of 900 and 9000 µg / L and Roundup Transorb ® of 50 and 5000 µg / L were observed. The results were the same in both tissues. The ABC proteins, responsible for the extrusion of the contaminants (cell defense), were inhibited when exposed to the contaminants in both species, therefore, cytotoxicity may be related to the lack of capacity of the cellular defense. The results indicate that the gill and muscle acted in the same way, with no difference in sensitivity between the tissues. In relation to the lysosomal integrity, the native species was more sensitive in pointing out more situations with cytotoxicity, where there were more conditions in which the cellular defense was inhibited.

Key-words: *Limnoperna fortunei*, *Anodontites trapesialis*, *ex-vivo*, cytotoxicity, MXR.

INTRODUÇÃO GERAL

Introdução de espécies exóticas

Espécies exóticas são aquelas que se instalam em locais onde não são naturalmente encontradas. Essas espécies podem chegar acidentalmente, como no lastro dos navios, ou serem deliberadamente introduzidas para uso em plantações, plantas ornamentais, espécies de caça ou agentes de controle biológico (Ricklefs 2010). Atualmente, existem centenas de espécies exóticas distribuídas pelo mundo em decorrência da intensa e artificial introdução provocada pelo homem.

Os navios são considerados como uma das principais fontes de introdução de espécies exóticas, através da água de lastro. Segundo a ANTAQ (Agência Nacional de Transportes Aquaviários 2018), a utilização da água de lastro é fundamental aos navios, pois compensa a perda de peso gerada no desembarque de cargas. O transporte marinho é muito utilizado para fins lucrativos, resultando na redução ou eliminação de barreiras naturais que antigamente separavam os ecossistemas, favorecendo a introdução de espécies em habitats onde elas não são naturalmente encontradas (Barbieri 1998).

Darrigran (2002) relatou que, para uma espécie exótica ser bem-sucedida na invasão de novos habitats, ela depende principalmente de certas características, como alta taxa de reprodução, falta de predadores e vasta tolerância ambiental. Essas e outras características designam a espécie exótica como invasora, ameaçando desse modo, as espécies nativas e o equilíbrio do ecossistema. No ambiente aquático, a introdução de espécies pode gerar várias consequências para a biota nativa, podendo levar à remoção, predação e exclusão competitiva (Williamson 1996).

A literatura indica que espécies nativas são mais sensíveis a ambientes contaminados perante as invasoras, que mostram-se mais resistentes. Essa sensibilidade já foi observada por Karatayev e colaboradores (2009), onde constataram que mais de 35% das espécies nativas de invertebrados aquáticos na América do Norte só conseguem viver em áreas com excelente qualidade da água e são intolerantes à poluição orgânica. Em contraste, todos os invasores são tolerantes a pelo menos quantidades moderadas de poluição orgânica. Piola e Johnston (2006), realizaram estudos com espécies marinhas invasoras de *Bugula neritina*, comumente conhecido como briozoário marrom (invertebrados marinhos sésseis), e demonstraram que as espécies que eram provenientes de um porto poluído aumentaram a resistência ao cobre em relação às populações de uma área não poluída. Este aumento na resistência pode oferecer vantagens para

as espécies invasoras aumentando as suas possibilidades de se estabelecerem em um novo habitat.

Contaminação no meio ambiente

No mundo, existem milhares de substâncias tóxicas que têm a capacidade de comprometer a saúde dos organismos e do ecossistema em geral. Após a industrialização, elas começaram a ser mais utilizadas pelo homem. E, devido ao desenvolvimento e crescimento populacional, ocorreu um aumento do seu lançamento nos diversos compartimentos ambientais, resultando em inúmeros prejuízos aos seres vivos e ao ecossistema.

Para a realização desse estudo, foram escolhidos dois contaminantes de natureza distinta, o cobre que é um metal essencial presente nos organismos mas que possui potencial tóxico em concentrações elevadas (Nzengue et al. 2011) e o Roundup Transorb®, um agrotóxico que é muito utilizado atualmente. Há trabalhos que comprovam a alta toxicidade que esses contaminantes possuem e os malefícios que causam no meio ambiente. Gomes e colaboradores (2011) observaram que o cobre induziu estresse oxidativo nas brânquias de mexilhões devido à interferência do sistema de defesa antioxidante e inibição da acetilcolinesterase. Clements e colaboradores (1997) evidenciaram genotoxicidade em células de anfíbios quando expostos a formulações de glifosato.

Cobre

O cobre é um metal considerado composto químico inorgânico e um micronutriente essencial para os organismos, pois participa de uma variedade de processos bioquímicos e fisiológicos. Esse metal essencial desempenha um papel importante na manutenção das funções celulares, agindo como componente fundamental para muitas enzimas (Di Donato e Sarkar, 1997; Minghetti et al. 2008), porém, quantidades superiores às necessidades podem afetar a homeostase dos organismos e causar toxicidade (Nzengue et al. 2011). Muitos estudos ressaltam os efeitos que altas concentrações de cobre geram nos organismos e no meio ambiente. Prato e colaboradores (2013), observaram que o cobre diminuiu a taxa de sobrevivência, crescimento e reprodução de amphipoda *Gammarus aequicauda*. Viarengo e colaboradores (1996) verificaram estresse oxidativo e peroxidação lipídica induzida pelo cobre em células de mexilhões. Respostas genotóxicas em mexilhões de água doce, expostos ao cobre, foram observadas por Connors e Black (2004).

No que diz respeito ao aporte de metais em corpos aquáticos, sabe-se que eles são naturalmente incorporados aos sistemas por meio de processos geoquímicos. Fontes naturais de

cobre incluem as atividades vulcânicas e o desgaste de rochas e de solos devido ao intemperismo (Drever 1988). Nas últimas décadas, as atividades antropogênicas aumentaram em decorrência da urbanização e da industrialização. Em paralelo, houve um aumento nas atividades de mineração e incineração, gerando assim, um aumento nas quantidades de metais introduzidas em ambientes aquáticos (Brunner e Brown 1988).

O Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), através da Resolução nº 357/2005 “dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências.” Esta resolução estabelece o limite máximo permitido para o lançamento de cobre em ambientes dulcícolas no Brasil. E determina que para águas de classe I (destinadas ao abastecimento para consumo humano, com desinfecção; à preservação do equilíbrio natural das comunidades aquáticas e à preservação dos ambientes aquáticos em unidades de conservação de proteção integral) o limite de cobre dissolvido na água é 9 µg/L.

Roundup Transorb® (Glifosato)

A produção agrícola mundial baseada na utilização de agrotóxicos, que tem como finalidade o aumento da produtividade agrícola e eliminação de pragas, traz como resultado uma série de consequências adversas à saúde humana e ao ambiente. Seu uso ultrapassa as vantagens associadas a seu ganho de produtividade (Veiga et al. 2006). Os agrotóxicos são aplicados para atingir ervas invasoras (organismos alvos), mas possuem um grande potencial para atingir organismos não alvo, pois se movem para outros compartimentos ambientais, como águas superficiais e subterrâneas (Sabik et al. 2000). Eles podem alcançar o ambiente aquático de várias formas, tendo como exemplo a lixiviação, escoamentos superficiais, uso intensivo desses produtos de forma inadequada, dentre outras (Tomita e Beyruth 2002) (Fig. 1).

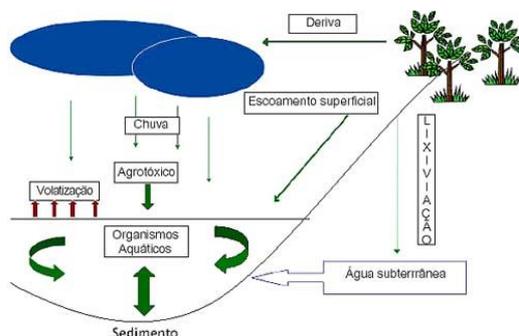


Fig. 1 Esquema mostrando as principais rotas dos agrotóxicos em ecossistemas aquáticos. (Imagem: Tomita, R. Y., Toxicologia de agrotóxicos em ambiente aquático, 2002).

Dentre os agrotóxicos existentes, encontra-se o glifosato, considerado um potente herbicida não seletivo (Quinn 1993; Gruys e Sikorski 1999) muito utilizado nas plantações de arroz, que é um dos principais alimentos para a nutrição humana. Por ser um alimento muito utilizado e com uma grande importância socioeconômica, os rizicultores investem largamente no uso de herbicidas visando o controle de pragas nas plantações.

A principal formulação do glifosato é o Roundup® – herbicida produzido pela Monsanto, empresa multinacional de agricultura. Há ainda uma outra formulação comercial denominada Roundup Transorb®, que também é um herbicida a base de glifosato, utilizado para combater e eliminar plantas invasoras (Rodriguez e Almeida, 1995). Enquanto que o Roundup apresenta apenas um surfactante na sua formulação, conhecido como polioxietileno-amina (POEA), a formulação Transorb®, além do POEA, possui também um outro surfactante não especificado pelo fabricante (Howe et al. 2004). De acordo com Cox (1998) a combinação desses dois surfactantes potencializa a ação tóxica, representando perigo ao meio ambiente e aos organismos. Moreno e colaboradores (2014), observaram genotoxicidade em peixes (*Prochilodus lineatus*) quando expostos a formulação comercial Roundup Transorb®. De acordo com Santos e Martinez (2014) a exposição ao Roundup em bivalves interferiu nas defesas oxidantes, levando à peroxidação lipídica.

A utilização dos agrotóxicos é cada vez mais preocupante pois traz efeitos adversos ao ambiente, afetando também os organismos que, dependendo da concentração, podem acabar expostos aos herbicidas utilizados na cultura do arroz, uma vez que para o plantio parte do corpo d'água é desviado para a irrigação da plantação, e posteriormente a água utilizada nesta lavoura é devolvida ao corpo d'água de origem. Por essa razão a rizicultura pode ser considerada responsável por grande parte dos agrotóxicos lançados em corpos d'água (Pinheiro et al. 2010).

Espécie invasora (*Limnoperna fortunei*) Dunker, 1857 (Mytilidae)

O mexilhão dourado (Fig. 2) é nativo de rios e riachos do continente asiático. A introdução desta espécie na América do Sul ocorreu em 1991 (Pastorino et al. 1993) de um modo não intencional, através de águas de lastros de navios (Darrigran e Pastorino 1995). A espécie possui desenvolvimento larval, auxiliando a dispersão nos ambientes aquáticos (Darrigran 2002). Podem atingir até 4 cm e vivem em ambientes dulcícolas ou com águas salobras (Darrigran e Ezcurra-De-Drago 2000). Morton (1973) descreveu que *Limnoperna fortunei* é denominado mexilhão dourado devido às suas conchas apresentarem uma coloração dourada em ambientes com águas claras.

Esta espécie possui três características que as denotam como invasoras: alta fecundidade, maturidade sexual precoce e vasta tolerância ambiental (Darrigran 2002). O mexilhão dourado, ao

contrário de outras espécies invasoras, foi incorporado na dieta de peixes na região Neotropical (Montalto et al. 1999; Lopes e Vieira 2012). Vieira e Lopes (2013), relataram que o mexilhão dourado foi considerado o alimento mais importante para a espécie de bagre *Pimelodus pintado*. Os mesmos autores observaram que o bagre só consumiu mexilhões dourados menores que 1,4 cm por estarem mais disponíveis no ambiente.



Fig. 2 *Limnoperna fortunei* (Mexilhão dourado). (Foto: Darrigran G., Professor of National University of La Plata, Argentina).

Os ambientes aquáticos foram fortemente impactados com a presença do mexilhão dourado. Entre os danos gerados, destacam-se a obstrução de tubulação e aumento na corrosão de superfícies em que os mexilhões ficam aglomerados, gerando danos nas redes de abastecimento e tratamento de águas e aumento de gastos para o reparo (Darrigran 2002) e danos ao meio ambiente. Além de competir com as espécies nativas por espaço e alimento, acabam agindo de uma forma ainda mais danosa causando sufocamento, utilizando como substrato de fixação os bivalves nativos (e.g. *Anodontites trapesialis*) (Fig. 3), impedindo assim as trocas gasosas e a obtenção de alimentos (Amaral et al. 2008).



Fig. 3 *Limnoperna fortunei* utilizando como substrato de fixação o bivalve nativo *Anodontites trapesialis* (Foto: Tomaz Aguzzoli).

Espécie nativa (*Anodontites trapesialis*) Lamarck, 1819 (Mycetopodidae)

Anodontites trapesialis é um bivalve nativo da América do Sul que habita ambientes dulcícolas. Estes bivalves pertencem a família Mycetopodidae e tem como características a concha em forma de trapézio e a capacidade de atingir grandes tamanhos (13 cm de comprimento e 6,5 cm de altura) (fig. 4). De acordo com Amaral e colaboradores (2008), este molusco faz parte da cadeia alimentar de peixes, aves, mamíferos e seres humanos, por possuir alto teor de proteínas. Oliveira e colaboradores (2015) relataram que esta espécie é um modelo biológico eficiente na identificação de ambientes contaminados, o que a torna uma boa opção para o monitoramento de águas doces. Esta espécie foi introduzida não intencionalmente em tanques de cultivo de peixes, como ocorreu em Arroio Grande, no Estado do Rio Grande do Sul, onde foi coletada espécimes de *Anodontites trapesialis* para a realização do presente estudo.

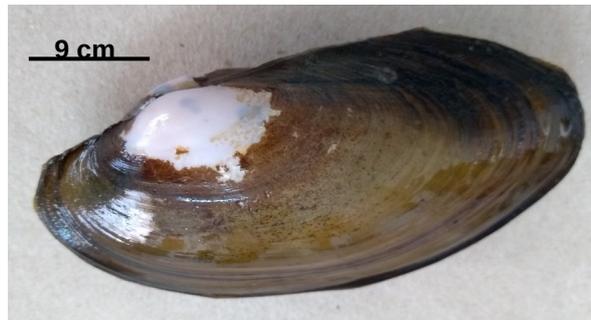


Fig. 4 Espécie nativa da América do Sul *Anodontites trapesialis* (Foto: Yasmin El Haj).

Ensaio de citotoxicidade

O teste de retenção do corante vermelho neutro permite avaliar a viabilidade celular, baseando-se na capacidade das células viáveis em incorporarem o corante nos lisossomas (Borenfreund e Puerner 1985). É um dos testes de citotoxicidade mais utilizados devido a sua simplicidade e precisão em gerar resultados reprodutíveis em laboratório além da eficiência em detectar substâncias tóxicas (Borenfreund e Puerner 1985; Repetto et al. 2008). É um método originalmente aplicado em células naturalmente isoladas, ou onde as amostras passam por dissociação celular, o que torna o procedimento muito trabalhoso, limitando o número de amostras processadas, de uma exposição *in vivo* ou *ex-vivo*.

Defesa celular

O mecanismo de resistência a multixenobióticos (MXR), atua na célula como forma de proteção contra possíveis ameaças. Perante a grande quantidade de contaminantes despejados no meio ambiente, essa via de defesa é de extrema importância para a extrusão de compostos tóxicos nas células. O MXR pode ser quantificado através do acúmulo do fluorescente Rodamina B, que é o substrato das proteínas de efluxo de xenobióticos (Kurelec et al. 2000). Esta resistência é dada pela presença de principalmente duas proteínas transmembranas da super-família ABC (*ATP Binding Cassete*), denominadas glicoproteínas P (Pgp) ou proteína ABCB, que faz o efluxo de xenobióticos e a MRP, ou ABCC, que utiliza a biotransformação do xenobiótico para facilitar o efluxo (Gottesman e Pastan 1993; Bard 2000). Essas proteínas são dependentes de ATP e evitam o acúmulo de xenobióticos, transportando-os para fora da célula (Kurelec 1995).

Uma segunda linha de defesa é ativada quando a Pgp não consegue eliminar todos os xenobióticos. Enzimas do sistema de biotransformação iniciam a metabolização ou biotransformação, que ocorre em duas fases, a fase I onde ocorre a hidroxilação via enzima citocromo P450 e o composto ainda é eliminado através da Pgp, e a fase II onde há a conjugação do xenobiótico pela glutionaSTransferase. Quando ocorre a fase II, o composto biotransformado é eliminado pela proteína ABCC (Bard 2000) (Fig. 5).

Estudos comprovam que ao invés da ativação dessas proteínas, onde elas conseguem fazer o efluxo das substâncias estranhas à célula, na presença de certos compostos químicos como os agrotóxicos, pode ocorrer inibição da atividade desses transportadores ABC (Kurelec 1995; Koehler et al. 1998), o que acaba representando a falha na capacidade de defesa celular.

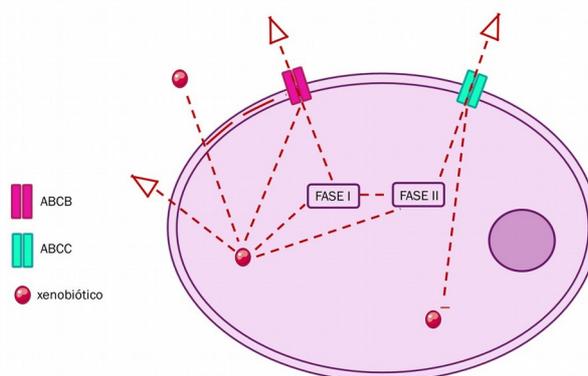


Fig. 5 Modelo do funcionamento do mecanismo de defesa das proteínas da super-família ABC na presença de um xenobiótico (Esquema: Fernanda Moreira Lopes).

Teste *Ex vivo*

Testes *in vitro* são ótimas alternativas para diminuir o uso de animais em laboratórios, substituindo-os ou servindo como estudo precedente ao teste *in vivo* (Rogerio et al. 2003) Esse método permite limitar o número das variáveis experimentais, sua execução é mais simples, mais rápida e gera menos resíduos quando comparadas ao teste *in vivo*. Dentre os testes *in vitro*, um modelo alternativo é chamado de *ex vivo*. Neste, os estudos são realizados com um órgão, tecido ou fragmento de tecido isolado, preservando em parte a integração entre as células.

HIPÓTESE

A hipótese deste trabalho é que espécie invasora possui uma maior tolerância a ambientes contaminados perante a nativa.

OBJETIVO GERAL

O objetivo do presente estudo foi comparar a resistência de um bivalve nativo da espécie *Anodontites trapesialis* perante outro de espécie exótica *Limnoperna fortunei* (mexilhão dourado), frente a contaminação ambiental, por meio de testes de citotoxicidade que possam indicar a espécie mais resistente à presença de dois contaminantes. Para isso, foi utilizado o modelo *ex vivo*, no qual brânquia e músculo foram expostos a dois estressores ambientais de naturezas distintas, no caso, os contaminantes cobre (metal) e Roundup Transorb® (herbicida/agrotóxico).

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- . Investigar a citotoxicidade do cobre e do Roundup Transorb® sobre as duas espécies, utilizando para tal dois tipos de tecidos distintos, um de interface com o ambiente (brânquia) e outro interno (músculo);
- . Verificar a capacidade de defesa celular destas espécies às substâncias tóxicas (cobre e Roundup Transorb®),
- . Avaliar se a defesa celular previne a citotoxicidade.

. Adaptação metodológica do ensaio de citotoxicidade da integridade lisossomal para o modelo *ex vivo*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agência Nacional de Transportes Aquaviários. Disponível em: http://www.antaq.gov.br/portal/MeioAmbiente_AguaDeLastro.asp Acesso em: 15 de fevereiro de 2018.

Amaral ACZ, Ribeiro CV, Mansur MCD, Santos SB, Avelar WEP, Matthews-Cascon H, Leite FPP, Melo GAS, Coelho PA, Buckup GB, Buckup L, Ventura CRR, Tiago CG (2008) A situação de ameaça dos invertebrados aquáticos no Brasil. Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção. Ministério do Meio Ambiente, Brasília, Brasil.: Série Biodiversidade 157-301

Barbieri E (1998) Biodiversidade: capitalismo verde ou ecologia social? São Paulo: Cidade nova, p.108

Bard S (2000) Multixenobiotic resistance as a cellular defense mechanism in aquatic organisms. *Aquatic Toxicology* 48:357-380

Borenfreund E, Puerner JA (1985) Toxicity determined *in vitro* by morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicology letters* 24:119-124

Brunner C, Brown C (1988) Hospital waste disposal by incineration. Waste streams, technology, and state requirements. *JAPCA* 38(10):1297-1309

Clements C, Ralph S, Petras M (1997) Genotoxicity of select herbicides in *Rana catesbeiana* tadpoles using the alkaline single-cell gel DNA electrophoresis (comet). *Environmental and Molecular Mutagenesis* 29:277-288

CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente (2005). Resolução nº 357, de 17 de março de 2005. Ministério do meio ambiente

Connors DE, Black MC (2004) Evaluation of Lethality and Genotoxicity in the Freshwater Mussel *Utterbackia imbecillis* (Bivalvia: Unionidae) Exposed Singly and in Combination to Chemicals Used in Lawn Care. Archives of Environmental Contamination and Toxicology 46:362–371

Cox C (1998) Glyphosate (Roundup). Journal of Pesticide Reform 18:3

Darrigran G, Ezcurra De Drago I (2000) Distribucion el *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857) (Mytilidae), en la cuenca del Plata. Region Neotropical. Medio Ambiente, Buenos Aires 13(2):75-79

Darrigran G (2002) Potential impact of filter-feeding invaders on temperate inland freshwater environments. Biological Invasions 4:145–156

Darrigran G, Pastorino G (1995) The recent introduction of Asiatic bivalve, *Limnoperna fortunei* (Mytilidae) into South America. The Veliger 38:183–187

Di Donato M, Sarkar B (1997) Copper transport and its alterations in Menkes and Wilson diseases. Biochimica Biophysica Acta 1360:3-16

Drever JI (1988) The geochemistry of natural waters. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, NJ, USA p. 437

Gomes T, Pinheiro JP, Cancio I, Pereira CG, Cardoso C, Bebianno MJ (2011) Effects of Copper Nanoparticles Exposure in the Mussel *Mytilus galloprovincialis*. Environmental Science Technology 45:9356–9362

Gottesman MM, Pastan I (1993) Biochemistry of Multidrug Resistance Mediated by the Multidrug Transporter. Annual Review of Biochemistry 62:385–427

Gruys KJ, Sikorski JA (1999) Inhibitors of tryptophan, phenylalanine and tyrosine biosynthesis as herbicides. In: SINGH, B. K. Plant amino acids: biochemistry and biotechnology. Marcel Dekker 357-384

Howe CM, Berrill M, Pauli DB, Helbing CC, Werr K, Veldhoen N (2004) Toxicity of glyphosate-based pesticides to four North American frog species. *Environmental Toxicology Chemistry* 23:1928-1938

Karatayev AY, Burlakova LE, Padilla DK, Mastisky SE, Olenin S (2009) Invaders are not a random selection of species. *Biological Invasions* 11:2009–2019

Koehler A, Lauritzen B, Bahns S, George SG, Forlin L, Van Noorden CJF (1998) Clonal adaptation of cancer cells in flatfish liver to environmental contamination by changes in expression in P-gp related MXR, CYP450, GST-A and G6PDH activity. *Marine Environmental Research* 46:141–145

Kurelec B (1995) Inhibition of multixenobiotic resistance mechanism in aquatic organisms: ecotoxic consequences. *The Science of the Total Environment* 171:197-204

Kurelec B, Smital T, Pivcevic B, Eufemia N, Epel D (2000) Multixenobiotic Resistance, P-Glycoprotein, and Chemosensitizers. *Ecotoxicology* 9:307-327

Lopes MN, Vieira JP (2012) Predadores potenciais para o controle do mexilhão-dourado. p. 357-363. *In: Santos CP, Pereira D, Paz ICP, Zurita LM, Mansur MCD, Raya Rodriguez MT, Nerhke MV, Bergonci PA (EDS) Moluscos límnicos invasores no Brasil: biologia, prevenção e controle. Porto Alegre, Redes Editora p.412*

Minghetti M, Leaver MJ, Caerpene E, George SG (2008) Cooper transporter 1, metallothionein and glutathione reductase genes are differentially expressed in tissues of sea bream (*Sparus aurata*) after exposure to dietary of waterborne copper. *Comparative Biochemistry Physiology Part C*, 147(4):450-459

Montalto L, Oliveiros OB, Drago EI, Demonte LD (1999) Peces del rio Parana Medio predadores de una especie invasora: *Limnoperna fortunei* (Bivalvia, Mytilidae). *Revista de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral* 3:85-101

Moreno NC, Sofia SH, Martinez CBR (2014) Genotoxic effects of the herbicide Roundup Transorb(®) and its active ingredient glyphosate on the fish *Prochilodus lineatus*. *Environmental toxicology and pharmacology* 37:448–454

Morton B (1973) Some aspects of the biology and functional morphology of the organs of feeding and digestion of *Limnoperna fortunei* (Dunker) (Bivalvia Mytilacea). *Malacologia* 12:265–281

Nzengue Y, Candéias SM, Sauvaigo S, Douki T, Favier A, Rachidi W, Guiraud P (2011) The Toxicity redox mechanisms of cadmium alone or together with copper and zinc homeostasis alteration: Its redox biomarkers. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. 25(3):171-80

Oliveira P, Lopes-Lima M, Machado J, Guilhermino L (2015) Comparative sensitivity of European native (*Anodonta anatina*) and exotic (*Corbicula fluminea*) bivalves to mercury. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 167:191-198

Pastorino G, Darrigran G, Martin SM, Lunaschi L (1993) *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857) (Mytilidae), nuevo bivalvo invasor en aguas del Rio de la Plata. *Neotropica* 39:101-102

Pinheiro A, Silva MR, Kraisch R (2010) Presença de pesticidas em águas superficiais e subterrâneas na bacia do Itajaí, SC. *Rega* 7:17-26

Piola RF, Johnston EL (2006) Differential tolerance to metals among populations of bryozoan *Bugula neritina*. *Marine Biology* 148:997–1010

Prato E, Parlapiano I, Biandolino F (2013) Ublethal effects of copper on some biological traits of the amphipod *Gammarus aequicauda* reared under laboratory conditions. *Chemosphere* 93:1015–1022

Quinn JP (1993) Interactions of the herbicides glyphosate and glufosinate (phosphinothricin) with the soil microflora. In: ALTMAN, J. (Ed.) Pesticides interactions in crop production – beneficial and deleterious effects. Boca Raton: CTC Press 245-265

Repetto G, Del PA, Zurira JL (2008) Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability / cytotoxicity. Journal Nature Protocols 3:1125–1131

Ricklefs RE (2010) A Economia da Natureza. 6ª ed, Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro

Rodriguez BN, Almeida FS (1995) Guia de herbicidas. 3. ed. rev. ampl. Londrina p. 675

Rogero SO, LugãoAB, Ikeda TI, Cruz ÁS (2003) Teste *in vitro* de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. Materials Research 6:317–320

Sabik H, Jeannot R, Rondeau B (2000) Multiresidue methods using solid-phase extraction techniques for monitoring priority pesticides, including triazines and degradation products, in ground and surface waters. Journal of Chromatography A 885:217-236

Santos KC, Martinez CBR (2014) Genotoxic and biochemical effects of atrazine and Roundup, alone and in combination on the Asian clam *Corbicula fluminea*. Ecotoxicology and Environmental Safety 100:7–14

Tomita RY., Beyruth Z (2002) Toxicologia de agrotóxicos em ambiente aquático. O Biológico 64:(2)35-142

Veiga CFM, Vieira JR, Morgado IV (2006) Diagnóstico da cadeia produtiva da cana-de-açúcar do estado do Rio de Janeiro: relatório de Pesquisa, Rio de Janeiro: FAERJ: SEBRAE/RJ, p.107

Viarengo A, Pertic M, Mancinelli G, Burlundo B, Canesi L, Orunesu M (1996) *In Viva* Effects of Copper on the Calcium Homeostasis Mechanisms of Mussel Gill Cell Plasma Membranes. Comparative Biochemistry and Physiology 113(3):421-425

Vieira JP, Lopes MN (2013) Size-selective predation of the catfish *Pimelodus pintado* (Siluriformes: Pimelodidae) on the golden mussel *Limnoperna fortunei* (Bivalvia: Mytilidae). *Zoologia* 30(1):43-48

Williamson M. (1996) *Biological invasions*. Chapman & Hall, London

CAPÍTULO 1

Tolerância de bivalve nativo e invasor perante a contaminação ambiental

Manuscrito a ser submetido, para a revista Archives of Environmental Contamination and Toxicology.

El Haj, Y^a.; Souza, M.M^{ab}

^a Programa de Pós-Graduação em Biologia de Ambientes Aquáticos Continentais, Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Rio Grande / RS, Brasil

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

Resumo

A literatura indica que espécies exóticas possuam uma maior tolerância a estressores ambientais quando comparadas a espécies nativas. Nas últimas décadas, o uso de contaminantes introduzidos no meio ambiente aumentou em decorrência da industrialização. Objetiva-se, com este trabalho, verificar a resistência de moluscos bivalves de água doce de espécie nativa (*Anodontites trapesialis*) e exótica (*Limnoperna fortunei*) à contaminação química, através do método ex vivo/in vitro. Brânquia e músculo foram expostos a dois tipos diferentes de estressores ambientais, cobre (metal) e Roundup Transorb® (herbicida). Os tecidos foram submetidos ao teste de citotoxicidade vermelho neutro, no qual avalia a Integridade lisossomal e ao teste MXR (Resistência a Multixenobióticos) o qual avalia a defesa celular. Na espécie exótica, apenas cobre 9000 µg/L e Roundup Transorb® 5000 µg/L foram citotóxicas. Na espécie nativa, foi observada citotoxicidade do cobre de 900 e 9000 µg/L e do Roundup Transorb® de 50 e 5000 µg/L. Os resultados foram iguais em ambos os tecidos. As proteínas ABC, responsáveis pela extrusão dos contaminantes (defesa celular), mostraram-se inibidas quando expostas aos contaminantes em ambas as espécies, logo, a citotoxicidade pode estar relacionada com a falta de capacidade da defesa celular. Nosso resultado indica que brânquia e músculo portaram-se da mesma maneira, não havendo diferença de sensibilidade entre os tecidos. Em relação a integridade lisossomal, a espécie nativa foi mais sensível em apontar maior número de situações com citotoxicidade, onde houve maior número de condições em que a defesa celular foi inibida.

Palavras-chave: *Limnoperna fortunei*, *Anodontites trapesialis*, ex-vivo, citotoxicidade, MXR.

Introdução

Espécies exóticas são aquelas que se instalam em locais onde não são naturalmente encontradas. De acordo com Darrigran (2002), espécies exóticas apresentam quatro características que as classificam como invasoras: Maturidade sexual precoce, alta fecundidade, vasta tolerância ambiental e falta de predadores. Essas espécies podem chegar acidentalmente, como no lastro dos navios, ou serem deliberadamente introduzidas para uso em plantações, plantas ornamentais, espécies de caça ou agentes de controle biológico (Ricklefs 2010). Estudos indicam que espécies nativas não possuem tolerância para ambientes contaminados, sendo assim, mais sensíveis em relação às espécies exóticas. Karatayev e colaboradores (2009), observaram que mais de 35% das espécies nativas de invertebrados aquáticos na América do Norte só conseguem viver em áreas com excelente qualidade da água e são intolerantes à poluição orgânica. Em contraste, os invasores parecem ser mais tolerantes a pelo menos quantidades moderadas de poluentes orgânicos. De acordo com Piola e Johnston (2006), estudos realizados com espécies marinhas invasoras de *Bugula neritina*, comumente conhecido como briozoário marrom (invertebrados marinhos sésseis), demonstraram que os exemplares que eram provenientes de um porto poluído aumentaram a resistência ao cobre em relação às populações de um local não poluído.

Ambientes dulcícolas podem ser facilmente afetados pelas atividades antrópicas, a agricultura é uma atividade que contribui para a contaminação das águas e conseqüentemente dos organismos. O Roundup Transob® é uma formulação comercial do glifosato – um potente herbicida não seletivo (Quinn 1993; Gruys e Sikorski 1999), utilizado na rizicultura, que tem como objetivo atingir organismos alvos, como as ervas daninhas, porém, possuem um grande potencial para atingir organismos não-alvos, pois se movem para outros compartimentos ambientais, como águas superficiais e subterrâneas (Sabik et al. 2000). Modesto e Martinez (2010) verificaram que uma das formulações comerciais do glifosato, o Roundup, induziu a inibição da acetilcolinesterase em peixes, organismos não-alvos. Santos e colaboradores (2005) verificaram que o Roundup Transob® apresentou maiores efeitos tóxicos no crescimento da bactéria simbiótica *Bradyrhizobium* em comparação com o glifosato puro que exerceu efeitos mínimos. Pressupõe-se que este aumento na toxicidade seja referente aos surfactantes presentes nas formulações comerciais, especialmente o Roundup Transob® que apresenta uma mistura de surfactantes – POEA e outro surfactante não especificado pelo fabricante (Howe et al. 2004).

Outras atividades econômicas, como a indústria, geram contaminação por metais traços nos ambientes aquáticos. O cobre é um micronutriente essencial para os organismos, pois participa de uma variedade de processos bioquímicos e fisiológicos (Di Donato e Sarkar 1997).

Esse metal essencial desempenha um papel importante na manutenção das funções celulares, agindo como componente fundamental para muitas enzimas (Di Donato e Sarkar 1997; Minghetti et al. 2008), porém, quantidades superiores às necessidades podem afetar a homeostase dos organismos e causar toxicidade (Nzengue et al. 2011). Gomes e colaboradores (2011) observaram que o cobre induziu estresse oxidativo nas brânquias de mexilhões devido à interferência do sistema de defesa antioxidante e inibição da acetilcolinesterase.

Estudos *in vitro/ex vivo* são métodos alternativos que vem sendo utilizados com maior frequência, pois diminuem o uso de animais em laboratórios (Rogerio et al. 2003). A peculiaridade do *ex vivo* é a utilização do órgão, tecido ou fragmento de tecido isolado em detrimento de células isoladas, preservando interações celulares. Sua utilização oferece muitas vantagens, como geração de poucos resíduos, resultados rápidos, baixo custo e facilidade de reproduzir os experimentos, pois as variáveis são controladas nos laboratórios (Bols et al. 2005).

Um dos testes de citotoxicidade bastante utilizado é o teste de retenção do corante vermelho neutro, que permite avaliar a viabilidade celular, baseando-se na capacidade das células viáveis reterem o corante nos lisossomos (Borenfreund e Puerner 1985). Este é um teste eficaz para selecionar substâncias que possuem um potencial citotóxico (Repetto et al. 2008). Ao longo das últimas décadas a integridade lisossomal vem sendo avaliada em ensaios com células isoladas, em microplaca avaliando-se o conteúdo total de corante retido, ou com auxílio de microscópio avaliando-se o tempo de retenção do corante pelos lisossomos (Borenfreund e Puerner 1985; Lowe et al. 1995). Em ecotoxicologia utilizou-se bastante, na década de 90 e início deste século, a análise do tempo de retenção do corante em hemócitos de invertebrados aquáticos, no entanto este método é bastante trabalhoso, por envolver o acompanhamento das amostras por pelo menos 1 h no microscópio, além de ser uma análise qualitativa. Diante disso, foi adaptado o método que analisa quantitativamente (por espectrofotometria) o conteúdo do corante em células isoladas, na microplaca, para a realização em amostras de tecido (sem realizar dissociação celular).

Embora a exposição a diferentes contaminantes possa causar efeitos nocivos nos organismos, as células possuem um mecanismo de resistência a multixenobióticos (MXR), que atua como forma de proteção contra possíveis ameaças, fazendo o transporte dos contaminantes para fora da célula (Kurelec et al. 1995). O MXR pode ser quantificado através do acúmulo do fluorescente Rodamina B, que é o substrato das proteínas ABC (*ATP Binding Cassete*), que fazem transporte à custa de gasto de ATP (Kurelec et al. 2000).

A hipótese do presente trabalho é que a espécie invasora do estudo apresenta uma maior tolerância a ambientes aquáticos contaminados perante a nativa, que apresenta uma sensibilidade maior.

Considerando estes fatores, o objetivo do presente estudo foi comparar a resistência de um bivalve nativo da espécie *Anodontites trapesialis*, perante outro da espécie exótica/invasora *Limnoperna fortunei* (mexilhão dourado), frente a contaminação ambiental, utilizando o método *ex vivo* onde brânquia e músculo foram expostos a dois estressores ambientais de naturezas distintas, no caso, os contaminantes cobre (metal) e Roundup Transorb® (herbicida/agrotóxico).

Para isso, foi adaptado o método de integridade lisossomal em células isoladas para a utilização em tecido, permitindo investigar a citotoxicidade. A capacidade de defesa celular foi verificada e também foi investigado se a defesa celular previne a citotoxicidade.

Materiais e Métodos

Obtenção dos Animais e Manutenção

Os bivalves de água doce da espécie nativa *Anodontites trapesialis* foram obtidos na Barragem do Arroio Chasqueiro (Arroio Grande – RS). A espécie exótica *Limnoperna fortunei*, mais conhecida como mexilhão dourado, foi coletada no primeiro levante do canal da Corsan (localizado na região da Palma, 32°3'14.39"S e 52°22'18.28"O) na cidade de Rio Grande – RS.

Após a obtenção, os animais foram levados ao Biotério Aquático do ICB (FURG) e mantidos em aquários com temperatura ambiente em torno de 20 °C, aeração, fotoperíodo 12/12 h claro-escuro e alimentados com ração para peixes de água doce.

Tratamento *Ex vivo*

Tecidos dos bivalves de ambas as espécies foram submetidos às condições experimentais adotando o modelo de exposição *ex vivo*. Esse método se enquadra como modelo *in vitro*, pois os tecidos em estudo foram isolados e submetidos aos diferentes tratamentos, sendo assim, é um modelo com preservação das interações celulares do tecido. Na espécie exótica foi utilizado tecido (brânquia e músculo) de 10 animais para exposição a cada contaminante. Já na espécie nativa, por se tratar de uma espécie relativamente grande (podendo atingir até 13 cm de comprimento e 6,5 de largura), foram utilizados fragmentos dos tecidos (brânquia e músculo), sendo assim, os tecidos eram oriundos de sete animais por tratamento. Todos os tecidos foram pesados e o tamanho foi padronizado para cada espécie. O peso tecidual da espécie invasora ficou em torno de 0,015 à 0,030 gramas e da espécie nativa 0,075 à 0,090 gramas. A escolha dos

contaminantes, de duas naturezas químicas distintas (metal e organofosforado), além da relevância regional, deve-se também ao conhecimento prévio de sua toxicidade, onde, estudos *in vitro*, já evidenciaram a toxicidade de cobre e de Roundup em hepatócitos de *zebrafish* e microalgas (Goulart et al. 2015; Guidony 2016), e ainda pela melhor caracterização do modelo diante de naturezas químicas distintas.

Os tecidos (brânquia e músculo) foram expostos aos contaminantes, cobre e Roundup Transorb® por 15 h. O tempo de exposição foi estabelecido após um teste piloto de viabilidade dos tecidos em solução salina. A escolha da brânquia se deu em função do seu contato direto com a água, sendo assim, mais passível à contaminação. No caso do músculo adutor, este é um tecido de não interface com o meio e de maior massa. Assim, testou-se dois contaminantes de naturezas químicas diferentes e dois tecidos de características também distintas.

Integridade Lisossomal

O ensaio vermelho neutro (EVN) consiste no uso de um corante que avalia a integridade dos lisossomos. O corante é um composto lipofílico que se difunde passivamente através das membranas celulares (Lowe et al. 1995). O corante vermelho neutro tem sido utilizado como indicador de citotoxicidade. Este corante vital é adicionado às amostras e sua captação e retenção pelas células viáveis é quantificada por espectrofotometria, através de um leitor automático de microplacas (Babich e Borenfreund 1991). Ainda não há dados na literatura sobre este ensaio utilizando o modelo *ex vivo*. Logo, foi adaptado o método de análise da integridade lisossomal para o uso em fragmento de tecido em detrimento das células isoladas, para isso, foram feitos testes para determinar a melhor concentração do corante e o melhor tempo de incubação.

Durante o processo de adaptação do método, foram testadas diferentes concentrações do corante vermelho neutro para averiguar a melhor concentração a ser utilizada no tecido. As concentrações testadas de 40 (utilizada no método com células isoladas), 100 e 200 µg/mL demonstraram um baixo teor do corante, indicando que para tecido, essas concentrações não são ideais. Nas duas concentrações maiores testadas, 400 e 600 µg/mL foi registrado o teor máximo do corante. Determinando assim, que essas concentrações são indicadas para o desenvolvimento da metodologia com tecido isolado.

Para análise do tempo de incubação do corante vermelho neutro no tecido, três diferentes tempos foram testados (1 h, 2 h e 3 h). Em 2 h e 3 h houve aumento significativo de corante nas amostras de tecido, mostrando que, o tempo de incubação em ambos torna-se eficaz. Porém, a maior retenção do corante, dentre os tempos testados, ocorreu em 3 h de incubação. Desta forma, no tempo

de 2 h, utilizado na metodologia, houve retenção significativa e assim foi adotado para todas as condições, favorecendo a realização do protocolo, sem prolongar o ensaio.

Na tentativa de otimizar o processamento de várias amostras foi avaliada ainda a inserção de uma etapa de congelamento, para isso foi feito um outro teste para avaliar a eficácia do congelamento dos tecidos. A etapa do congelamento foi fundamental e mostrou-se eficaz na realização dos testes de citotoxicidade e defesa celular, pois permitiu que os ensaios fossem feitos em duas etapas, possibilitando processar um número maior de amostras em um menor período de tempo.

Após essas etapas, que definiram as condições adequadas (concentração, tempo de incubação do corante vermelho neutro e congelamento eficaz), conseguimos adaptar o método e prosseguir com os ensaios de citotoxicidade e defesa celular onde brânquia e músculo de ambos bivalves foram expostos aos contaminantes.

Após exposição aos contaminantes por 15 h, os tecidos foram incubados com vermelho neutro durante 2 h. Em seguida, foram lavados com solução salina e fixados em formaldeído (0,5% em 1% CaCl₂) durante 1 h. Depois da fixação, removeu-se o fragmento do tecido do formaldeído, e, então foi introduzida uma etapa: o congelamento (até por uma semana, sem comprometer o ensaio). Por conseguinte, o método seguiu e finalizou-se igualmente ao original, com uma extração do corante em álcool ácido (1% ácido acético em 50% de álcool etílico), agora com a produção de um homogeneizado (em álcool ácido), cujo sobrenadante foi analisado em espectrofotômetro de microplaca de 550nm.

O método original do ensaio, aplicado em células isoladas, utiliza a concentração de 40 µg/mL do corante vermelho neutro. Como adaptamos o método para tecido, testamos cinco concentrações diferentes, incluindo a utilizada no método original (40, 100, 200, 400 e 600 µg/mL), tendo como objetivo, identificar a concentração que melhor penetra no tecido. Os tecidos ficaram incubados no vermelho neutro durante 2 h. Também testamos três diferentes tempos de fixação do vermelho neutro (1, 2 e 3 h), no método original o corante permanece na célula por 3 h. No método adaptado, o tempo de incubação do corante no tecido foi escolhida como 2 h. Outro teste realizado, foi o do congelamento, onde, tecido branquial fresco da espécie nativa (preparado no dia) e tecidos previamente incubados e que estavam congelados, ambos incubados com o vermelho neutro por 2 h, foram comparados. A etapa do congelamento mostrou-se eficaz, sem interferir na retenção do corante.

Cobre e Roundup Transorb®

A faixa de concentração do cobre foi de 0 a 9000 µg/L (0; 9; 90; 900; 9000 µg/L) e do glifosato, no produto formulado Roundup Transorb®, foi de 0 a 50000 µg/L (0; 50; 500; 5000; 50000 µg/L) foi utilizada inicialmente nos testes de citotoxicidade na espécie exótica. Já para a espécie nativa, as concentrações utilizadas foram (0; 9; 900; 9000 µg/L) para o cobre e (0; 50; 5000; 50000 µg/L) para o glifosato. Nós optamos não utilizar a concentração de 90 µg/L (cobre) e 500 µg/L (glifosato) utilizadas na espécie exótica, em função dos resultados de citotoxicidade não apresentarem efeitos e para utilizar um número menor de animais da espécie nativa. Essas concentrações foram escolhidas a partir das concentrações da Resolução nº 357/2005 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), que estabelece os padrões de qualidade ambiental para as diferentes classes de água, visando a preservação dos ambientes aquáticos. Para ambientes dulcícolas o valor máximo permitido para águas de classe I para o cobre é 9 µg/L e glifosato 65 µg/L, que foram então usadas como referência para definição das demais concentrações.

Com base nos resultados de citotoxicidade, foram definidas as concentrações a serem utilizadas no ensaio de resistência a xenobióticos para cada tecido de cada espécie. As concentrações escolhidas para a espécie exótica foram 0; 9 e 900 µg/L para o cobre e 0; 50 e 5000 µg/L para o glifosato. Para a espécie nativa as concentrações definidas para o cobre foram 0; 9; 900 e 9000 µg/L e para o glifosato 0; 50; 5000 e 50000 µg/L. A escolha dessas concentrações para o teste de defesa celular foi baseada no CONAMA e nos resultados de citotoxicidade, onde escolhemos concentrações que foram citotóxicas e não citotóxicas.

Resistência a Multixenobióticos (MXR)

A Resistência a Multixenobióticos (MXR) atua nas células como forma de proteção contra possíveis ameaças, evitando o acúmulo de substâncias estranhas à célula, transportando-as para fora (Kurelec 1992). Para isso se realiza um ensaio que utiliza um fluorescente (Rodamina B, 10 µM) como substrato das proteínas ABC. O acúmulo de fluorescente informa indiretamente a atividade da proteína (menos fluorescente acumulado nas células, proteínas mais ativas).

Os tecidos submetidos a condições experimentais foram incubados por 2 h em solução salina com rodamina B, em seguida os tecidos foram lavados com solução salina sem rodamina. O excesso de salina foi removido com papel-filtro e imediatamente congelados (mesma etapa utilizada na realização do teste de citotoxicidade, adaptada aqui no método original). Posteriormente, os tecidos foram homogeneizados com água destilada, após centrifugação (7500 g, por 5 min), o sobrenadante foi analisado em fluorimetria (485nm de excitação e 590nm de

emissão). O ensaio de acúmulo de rodamina em tecidos de animais submetidos a tratamentos ou de tecidos expostos a condições experimentais, já é conhecido na literatura (Kurelec et al. 2000), servindo de referência para a adaptação do ensaio de toxicidade.

Análise Estatística

Foram calculados a média e o erro padrão da média ($X \pm SE$) dos resultados para apresentação em gráficos e para análise estatística. As análises de citotoxicidade e da atividade das proteínas de defesa foram comparadas nos dois tipos de tecidos, das duas espécies expostas aos dois contaminantes. De acordo com a análise de interesse foi utilizado *ANOVA* de 1 fator, seguido do teste de comparação múltipla Tuckey. Foram considerados resultados estatisticamente diferentes aqueles com $p \leq 0,05$.

Resultados

Concentrações do vermelho neutro

Por meio do método adaptado para tecido, que verifica a integridade lisossomal, podemos observar que a concentração de 40 $\mu\text{g/mL}$ (que é utilizada em células isoladas no método original), demonstra uma baixa retenção do vermelho neutro nos tecidos. O mesmo ocorre nas concentrações de 100 e 200 $\mu\text{g/mL}$. Houve uma máxima retenção do corante nas concentrações de 400 e 600 $\mu\text{g/mL}$ ($p < 0,001$). A partir desse resultado, foi selecionada a concentração de 400 $\mu\text{g/mL}$, pois o corante conseguiu penetrar bem em ambos os tecidos (Fig. 1).

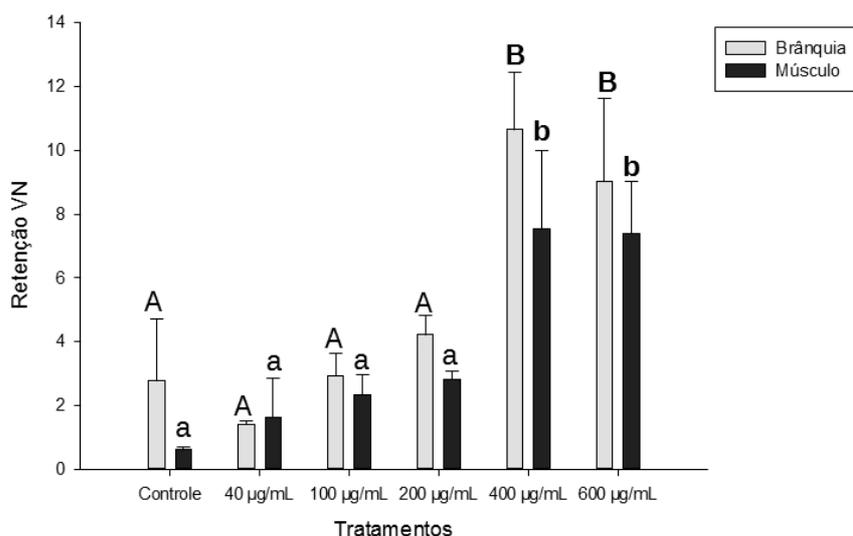


Fig. 1 Integridade lisossomal em brânquia e músculo de *Limnoperna fortunei* – o gráfico representa a retenção do vermelho neutro (VN, absorvância) e os tratamentos com as diferentes concentrações do corante VN, sendo zero o grupo controle. Letras diferentes significam médias que possuem diferença estatística ($p < 0,05$).

Teste do tempo e congelamento (vermelho neutro)

No teste do tempo houve diferença estatística ($p=0,002$), mostrando que quanto maior o tempo, maior a retenção do corante. Na etapa do congelamento, as médias das amostras testadas com o vermelho neutro, antes e após congelamento, foram semelhantes (2,883 e 2,8325, respectivamente).

Citotoxicidade do Cobre: *Limnoperna fortunei* e *Anodontites trapesialis*

Na análise da integridade lisossomal dos tecidos da espécie invasora, brânquia e músculo, expostos ao cobre, a maior concentração testada (9000 $\mu\text{g/L}$) mostrou-se citotóxica em relação aos outros tratamentos ($p<0,001$, $n= 9-10$) ($F=7,888$ e $10,002$, respectivamente). Nos resultados referentes à integridade lisossomal da espécie nativa *Anodontites trapesialis*, os tecidos (brânquia e músculo) expostos ao cobre, apontaram citotoxicidade nas concentrações de 900 e 9000 $\mu\text{g/L}$ em relação às demais condições ($p=0,006$ brânquia e $p=0,022$ músculo, $n= 5-7$) ($F= 6,016$ e $4,076$, respectivamente) (Fig. 2).

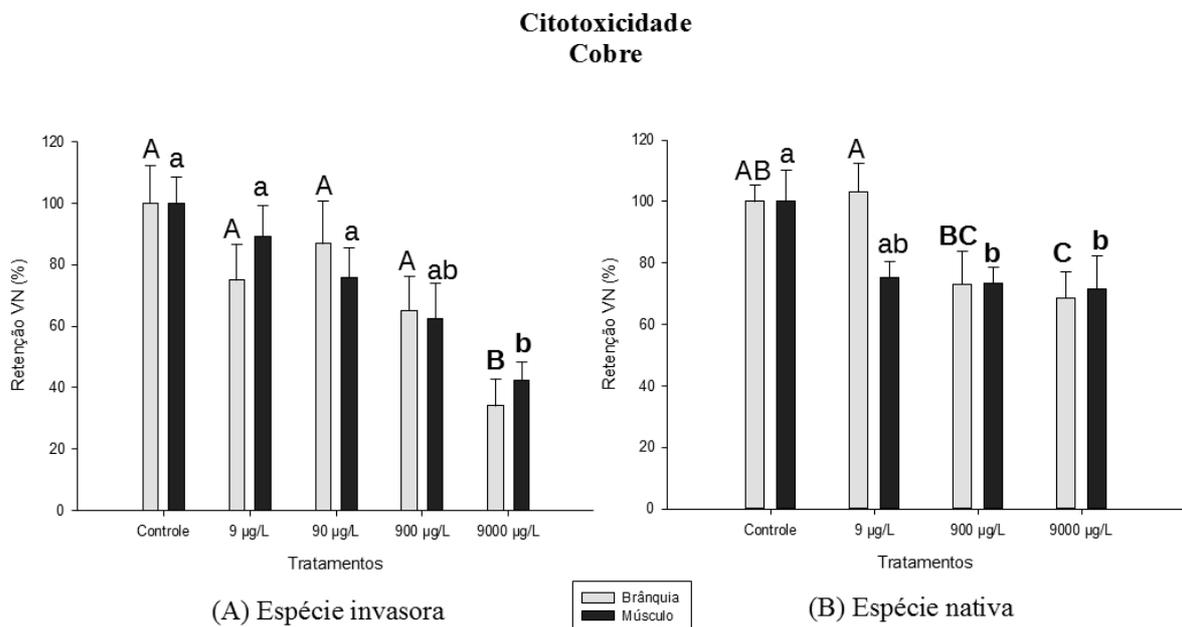


Fig. 2 Citotoxicidade em brânquia e músculo de *Limnoperna fortunei* (A) e *Anodontites trapesialis* (B) – o gráfico representa a relação entre a retenção do vermelho neutro (VN) (%) e os tratamentos com diferentes concentrações de cobre ($\mu\text{g/L}$), sendo zero o grupo controle. Letras diferentes significam médias que possuem diferença estatística ($p<0,05$).

MXR do Cobre: *Limnoperna fortunei* e *Anodontites trapesialis*

Quanto ao estudo da resistência a multixenobióticos, a atividade das proteínas ABC mostrou-se inibida na brânquia da espécie invasora *Limnoperna fortunei* na concentração de 900 $\mu\text{g/L}$ ($p=0,028$, $n= 7-8$) ($F= 4,281$). Houve inibição de MXR no tecido branquial da espécie nativa *Anodontites trapesialis* exposta ao cobre em todos os tratamentos (9, 900 e 9000 $\mu\text{g/L}$) ($p=0,011$, $n= 7$) ($F= 4,611$). No músculo houve inibição na menor concentração (9 $\mu\text{g/L}$) ($p=0,035$, $n= 4-7$) ($F= 3,593$) (Fig. 3).

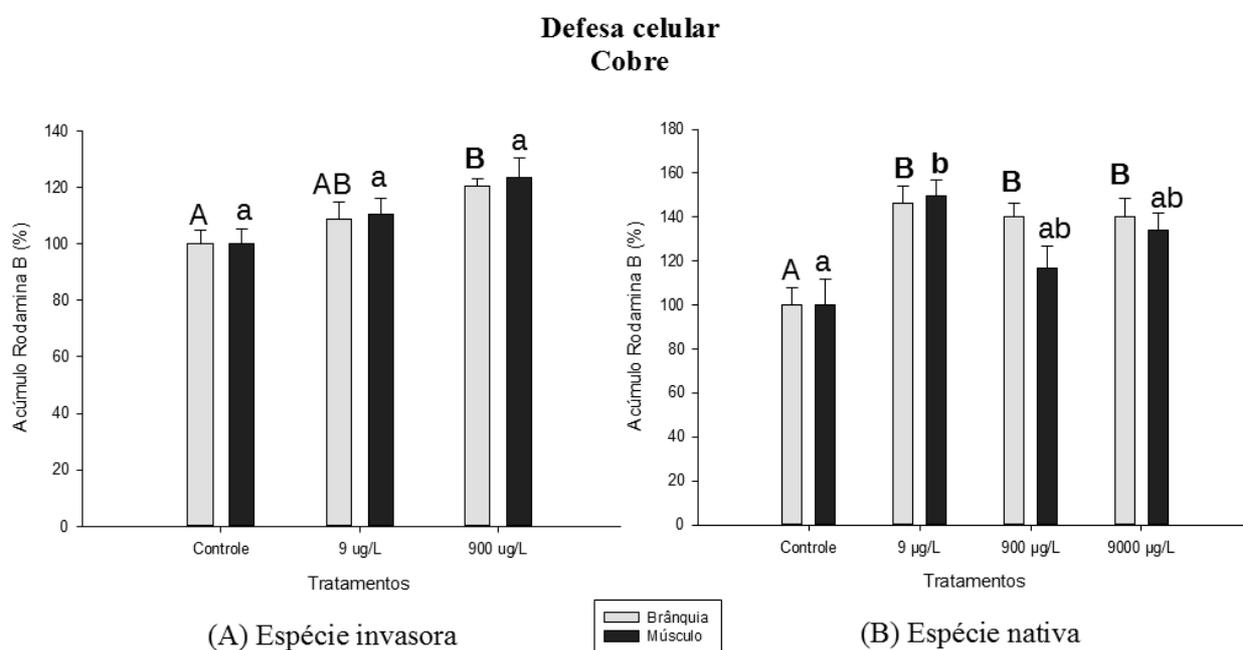


Fig. 3 Atividade das proteínas ABC em brânquia e músculo de *Limnoperna fortunei* (A) e *Anodontites trapesialis* (B) – as barras estão representadas pelas médias (\pm SE) do acúmulo de Rodamina B (%) em relação as diferentes concentrações de cobre ($\mu\text{g/L}$), sendo zero o grupo controle. Letras diferentes significam médias que possuem diferença estatística ($p<0,05$).

Citotoxicidade do Roundup Transorb®: *Limnoperna fortunei* e *Anodontites trapesialis*

Na análise da integridade lisossomal dos tecidos da espécie invasora *Limnoperna fortunei*, (brânquia e músculo), expostos ao Roundup Transorb®, mostraram-se citotóxicos na concentração de 5000 µg/L em relação aos outros tratamentos ($p < 0,001$ brânquia e $p = 0,002$ músculo, $n = 9-10$) ($F = 12,040$ e $5,53$, respectivamente). Nos resultados referentes à integridade lisossomal da espécie nativa *Anodontites trapesialis*, os tecidos (brânquia e músculo), expostos ao Roundup Transorb®, apresentaram citotoxicidade nas concentrações de 50 µg/L e 5000 µg/L em relação às demais condições ($p = 0,014$ brânquia e $p = 0,007$ músculo, $n = 3-6$) ($F = 4,722$ e $6,583$, respectivamente) (Fig. 4).

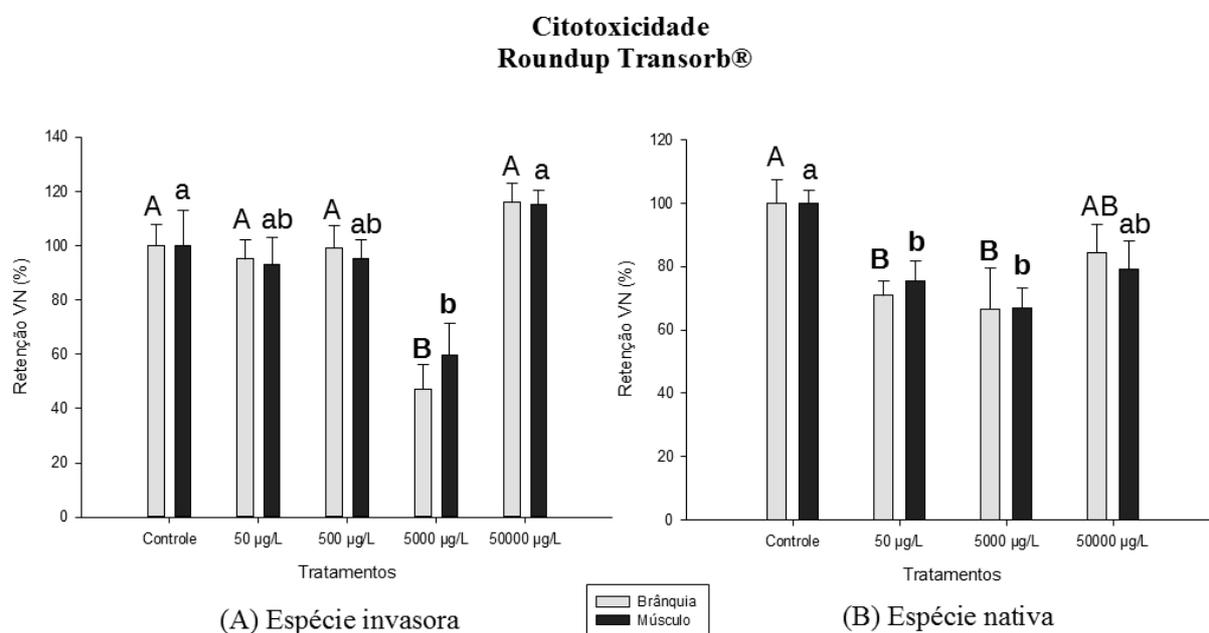


Fig. 4 Citotoxicidade em brânquia e músculo de *Limnoperna fortunei* (A) e *Anodontites trapesialis* (B) – o gráfico representa a relação entre a retenção do vermelho neutro (VN) (%) e os tratamentos com diferentes concentrações de Roundup Transorb® (µg/L), sendo zero o grupo controle. Letras diferentes significam médias que possuem diferença estatística ($p < 0,05$).

MXR do Roundup Transorb®: *Limnoperna fortunei* e *Anodontites trapesialis*

A espécie invasora *Limnoperna fortunei*, exposta ao pesticida Roundup Transorb®, mostrou inibição da atividade das proteínas extrusoras no músculo, na concentração de 5000 µg/L ($p=0,002$, $n= 7-9$) ($F= 8,925$). Houve inibição da defesa celular na brânquia, da espécie nativa *Anodontites trapesialis*, na concentração de 5000 µg/L ($p=0,012$, $n= 3-4$) ($F= 6,157$) (Fig. 5).

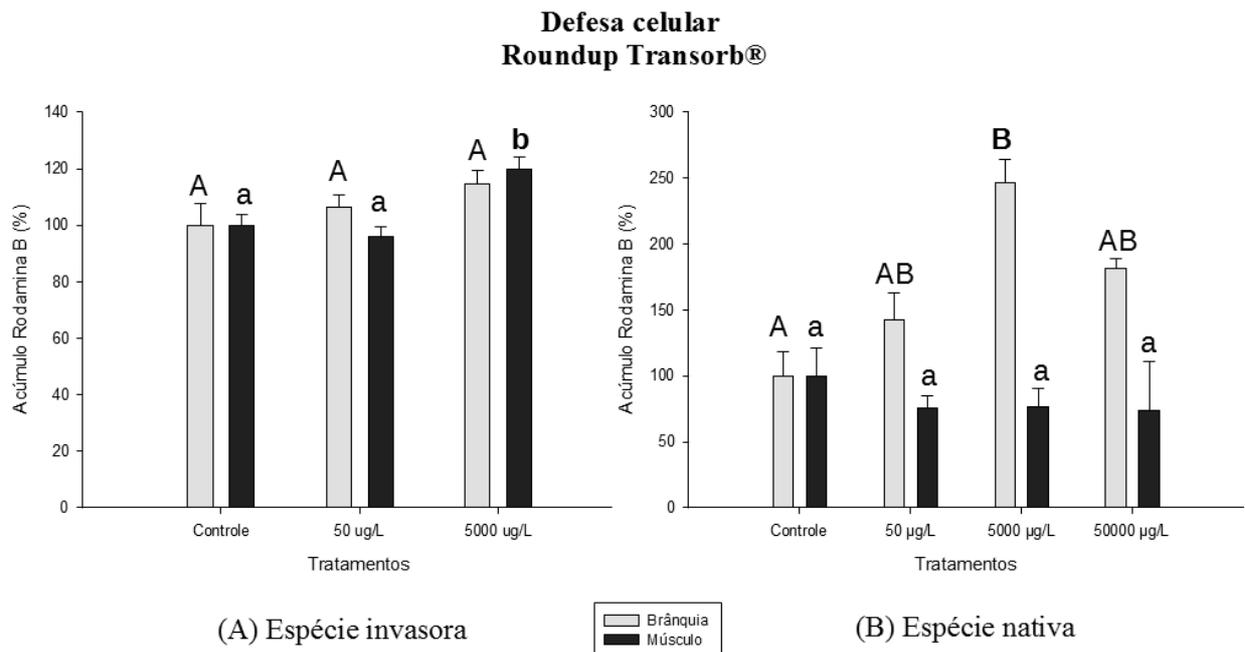


Fig. 5 Atividade das proteínas ABC em brânquia e músculo de *Limnoperna fortunei* (A) e *Anodontites trapesialis* (B) – as barras estão representadas pelas médias (\pm SE) do acúmulo de Rodamina B (%) em relação as diferentes concentrações de Roundup Transorb® (µg/L), sendo zero o grupo controle. Letras diferentes significam médias que possuem diferença estatística ($p<0,05$).

Discussão

A vasta tolerância ambiental que as espécies invasoras parecem apresentar, já foi evidenciada por Oliveira e colaboradores (2015), que avaliaram a sensibilidade de bivalves da espécie nativa *Anodonta anatina* e da espécie invasora *Corbicula fluminea* expostos ao mercúrio (31000 e 50000 µg/L) por 96 h. Através de análises de mortalidade e biomarcadores de estresse oxidativo, os autores observaram mortalidade induzida pelo metal na espécie nativa (72h-CL₁₀ e 72h-CL₅₀ de 14000 µg/L e 49600 µg/L, respectivamente), enquanto que na espécie invasora, nenhuma mortalidade foi verificada em 96 h de exposição. Durante a exposição, os autores observaram que a espécie invasora manteve a concha fechada e ativou mecanismos contra o estresse oxidativo, reduzindo assim, a exposição ao mercúrio. Na espécie nativa, esse comportamento não foi observado, o que poderia contribuir para uma maior sensibilidade ao metal perante a espécie invasora. Weir e Salice (2012), avaliaram a tolerância de caracóis invasores da espécie *Melanoides tuberculatus* e da espécie nativa *Biomphalaria glabrata*, a dois estressores antropogênicos de naturezas distintas (cádmio 500 e 2000 µg/L e o inseticida malation 10000 e 20000 µg/L). Os testes demonstraram que a espécie invasora foi mais tolerante a todos os contaminantes, corroborando com o trabalho de Allah e colaboradores (1997), que evidenciaram uma maior sensibilidade da espécie nativa *Biomphalaria glabrata* a metais pesados.

Como já mencionado, o cobre é um metal essencial, porém, se torna tóxico aos organismos em concentrações acima das necessárias para realizar suas funções celulares. A citotoxicidade do cobre já foi relatada em vários estudos. Falfushynska e colaboradores (2012) avaliaram respostas moleculares em moluscos bivalves de água doce (*Anodonta anatina*) coletados em um local poluído e outro local sem indícios de poluição. Os animais de ambos os locais foram expostos a 10000 µg/L de cobre por 14 dias. Esta exposição gerou genotoxicidade nos dois grupos. As respostas moleculares que indicaram a toxicidade foram: elevação de caspases (enzimas apoptóticas), citotoxicidade (baixa estabilidade da membrana lisossomal), baixo nível de glutathione e dano oxidativo em lipídios e proteínas. Pytharopoulou e colaboradores (2013) descreveram que a exposição ao cobre (100 µg/L) em mexilhões marinhos por 15 dias, gerou estresse oxidativo na brânquia e glândula digestiva, afetando várias etapas da síntese proteica. Dados da literatura mostram que estresse oxidativo pode levar a dano lisossomal, quando Regoli (2000) analisou populações de bivalves de água doce, em ambientes conhecidamente impactados, registrou uma correlação negativa entre a capacidade antioxidante e integridade lisossomal.

De acordo com os resultados apresentados nesse trabalho, o cobre só começou a causar citotoxicidade a partir das maiores concentrações (9000 µg/L espécie invasora) e (900 e 9000 µg/L espécie nativa), portanto a espécie nativa mostrou-se mais sensível. As menores concentrações

testadas, incluindo a permitida pelo Conama, não causaram citotoxicidade aos bivalves de água doce, indicando que as concentrações ambientalmente relevantes não danificaram o lisossomo, porém, é necessária a realização de outras análises em diferentes alvos para um resultado mais detalhado da toxicocinética e toxicodinâmica dos contaminantes nos organismos.

Referente à defesa celular, a atividade das proteínas ABC responsáveis pelo efluxo de contaminantes, denominada como mecanismo de resistência a multixenobióticos (MXR) já foi evidenciada em diversos organismos aquáticos, incluindo mexilhões (Bielen et al. 2014; Smital et al. 2004). Esse mecanismo atua como primeira linha de defesa contra substâncias que possam causar algum tipo de toxicidade e age fazendo a extrusão do contaminante, através de, principalmente, duas proteínas da super-família ABC (Pgp/ABCB e MRP/ABCC) (Gottesman e Pastan 1993; Bard 2000).

De acordo com a legislação brasileira do meio ambiente (Conama resolução 357/2005), a concentração máxima de cobre que pode ser liberado em ambientes dulcícolas sem causar danos à biota é de 9 µg/L. O resultado deste trabalho aponta que, na espécie invasora, houve inibição das proteínas de defesa na brânquia (900 µg/L). Na espécie nativa houve inibição das proteínas ABC no músculo (9 µg/L)

Katsumiti e colaboradores (2018) determinaram a citotoxicidade e mecanismos de defesa (MXR) em mexilhões expostos a três formas de cobre por 24 h: iônico (20, 200, 1000, 1500 e 2000 µg/L), nanopartículas de óxido de cobre (Nps CuO) (50, 500, 2750 e 5000 µg/L) e óxido de cobre (100, 1000, 5000, 7500 e 10000 µg/L). No tecido branquial, o cobre iônico apresentou maior citotoxicidade seguido por NPs CuO e óxido de cobre. A atividade de MXR aumentou no tecido branquial exposto as três formas de cobre: iônico (aumento de MXR em todas as concentrações), NPs CuO (2750 µg/L) e óxido de cobre (10000 µg/L), indicando que todas as formas de cobre induziram a atividade de MXR em células branquiais.

Outro contaminante, muito utilizado na cultura do arroz e que tem como finalidade combater plantas invasoras é o Roundup transorb®, um pesticida formulado a base de glifosato. É um herbicida que possui grande potencial de atingir organismos não alvos, por conter na sua formulação, surfactantes que facilitam o transporte (através de lixiviações), até os ambientes aquáticos (Howe et al. 2004; Tomita e Beyruth 2002). Os resultados de citotoxicidade da espécie invasora, expostas a este contaminante, mostraram dano lisossomal durante a exposição à concentração de 5000 µg/L (em ambos os tecidos). Na espécie nativa, a exposição ao pesticida gerou citotoxicidade (em ambos os tecidos) nas concentrações de 50 µg/L (concentração menor que a permitida pelo CONAMA, a permitida é 65 µg/L) e 5000 µg/L.

Quando os tecidos foram expostos ao pesticida Roundup Transorb®, foi observado inibição de MXR no músculo da espécie invasora e no tecido branquial da espécie nativa na concentração de

5000 µg/L. Já foi observado por Santos e Martinez (2014), que o glifosato (2000 e 10000 µg/L Roundup) não exerceu efeito sobre a acumulação de rodamina B (substrato das proteínas ABC) nas brânquias e glândulas digestivas do molusco invasor de água doce *Corbicula fluminea*. Goulart e colaboradores (2015), evidenciaram inibição das proteínas ABC em hepatócitos de *zebrafish* quando expostos ao Roundup Transorb® (67,7 µg/L, concentração ambientalmente segura de acordo com o Conama), e onde ocorre inibição de MXR verifica-se citotoxicidade em três alvos diferentes (lisossomo, mitocôndria e membrana celular).

Neste trabalho, com base no acúmulo de rodamina B (substrato das proteínas de defesa ABC), em ambas as espécies estudadas, as proteínas mostraram-se inibidas na presença do metal e do agrotóxico. Smital e colaboradores (2004), observaram que alguns contaminantes produzidos pelo homem (e.g pesticidas) conseguem inibir o mecanismo de resistência a multixenobióticos (MXR), mesmo em concentrações ambientalmente relevantes.

Nem todas as concentrações testadas (de ambos contaminantes), foram citotóxicas aos bivalves. De acordo com Fukuda (1991) e Schwake e colaboradores (2013), os lisossomos estão ligados a processos de fagocitose, autofagia, e também eliminação de metabólitos e até xenobióticos. Essa pode ser uma hipótese para explicar a não citotoxicidade de algumas concentrações.

Quanto à sensibilidade dos diferentes tecidos, esperávamos que a brânquia apresentasse mais situações de citotoxicidade em função do seu contato direto com a água. E que o músculo, por possuir uma maior massa e ser um tecido de não interface com o ambiente, seria menos passível à contaminação. Já foi evidenciado por Santos e Martinez (2014) que as brânquias do molusco invasor *Corbicula fluminea*, expostos à mistura dos herbicidas (2 µg/L atrazina + 2000 µg/L roundup e 10 µg/L atrazina + 10000 µg/L roundup) por 96 h apresentaram diminuição de MXR e redução na atividade da Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD), parâmetros envolvidos na biotransformação (responsável pela eliminação de xenobióticos). Esse resultado mostra que, o tecido branquial foi mais suscetível à ação dos herbicidas, apresentando um maior número de alterações nas enzimas de biotransformação quando comparada com a glândula digestiva, que não apresentou diferenças significativas nas análises de EROD e MXR. Entretanto, nos nossos resultados, percebemos que na análise de citotoxicidade (integridade lisossomal), ambos os tecidos (brânquia e músculo), de ambas as espécies (invasora e nativa), responderam da mesma forma.

É visível que na análise de citotoxicidade através da integridade lisossomal, a espécie invasora apresentou uma maior resistência perante a nativa, por suportar concentrações consideradas seguras pela legislação brasileira e outras concentrações elevadas de dois contaminantes de naturezas distintas. Essa resistência à contaminação já foi observada por Bielen e colaboradores (2016), onde a espécie invasora de bivalve de água doce *Sinanodonta woodiana* e a espécie nativa *Anodonta*

anatina foram expostas a condições de estresse térmico e concentração elevada do metal zinco (500 µg/L). A espécie invasora apresentou maior tolerância devido à diminuição do acúmulo de Rodamina B (substrato das proteínas ABC) no mexilhão exposto ao zinco, indicando eficiência na extrusão do contaminante, além de apresentar maior tolerância a temperatura. A espécie invasora se mostra mais resistente quando comparada à nativa e esta resistência na maioria dos casos é reflexo da não inibição das proteínas ABC.

Conclusão

A utilização de substâncias tóxicas pelo homem assim como a introdução de espécies exóticas que possuem capacidade de tornarem-se invasoras é crescente e preocupante. O resultado do presente trabalho aponta que, além da competição por espaço, alimento ou agindo ainda de uma forma mais danosa, quando utilizam bivalves nativos como substrato de fixação, causando sufocamento (e.g., mexilhão dourado) (Amaral et al. 2008), as espécies invasoras são mais resistentes à poluição perante a nativa, conseguindo assim, suportar ambientes contaminados sem causar danos na sua fisiologia. Em síntese, a espécie nativa apresentou mais situações com inibição das proteínas ABC, refletindo assim na maior citotoxicidade dos contaminantes testados, o que reforça a ideia de maior sensibilidade de espécie nativa quando comparada com a invasora. De acordo com Lajtner e Crncan (2011), quando há competição em ambientes contaminados entre espécies diferentes, a espécie que apresentar maior tolerância poderá eventualmente eliminar a espécie mais sensível. Portanto, é fundamental que haja uma fiscalização intensa na utilização de substâncias químicas para que o seu descarte seja manuseado de forma correta, assim o meio ambiente não será tão impactado, preservando os organismos que ali vivem e evitando a perda da biodiversidade.

Considerações finais e perspectivas

Com base nos resultados de citotoxicidade e defesa celular confirmamos a hipótese testada, de que a espécie invasora é mais resistente à presença de contaminantes ambientais do que a espécie nativa. Desta forma, corroborando os indicativos encontrados na literatura sobre resistência de espécies invasoras diante de variáveis ambientais. As fontes antropogênicas como mineração e uso de agrotóxicos além de impactarem negativamente os ambientes dulcícolas, também colaboram para o sucesso na invasão de espécies. Por conseguinte, outras espécies e análises precisam ser testadas para tornar a conclusão mais robusta.

Referências

Allah AT, Wanas MWS, Thompson SN (1997) Effects of heavy metals on survival and growth of *Biomphalaria glabrata* Say (Gastropoda: Pulmonata) and interaction with schistosome infection. *The Journal of Molluscan Studies* 63:79–86

Amaral ACZ, Ribeiro CV, Mansur MCD, Santos SB, Avelar WEP, Matthews-Cascon H, Leite FPP, Melo GAS, Coelho PA, Buckup GB, Buckup L, Ventura CRR, Tiago CG (2008) A situação de ameaça dos invertebrados aquáticos no Brasil. Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção. Ministério do Meio Ambiente, Brasília, Brasil.: Série Biodiversidade 157-301

Babich H, Borenfreund E (1991) Cytotoxicity and genotoxicity assays with cultured fish cells: A review. *Toxicology in vitro* 5(1):91-100

Bard S (2000) Multixenobiotic resistance as a cellular defense mechanism in aquatic organisms. *Aquatic Toxicology* 48:357–389

Bielen A, Bosnjak I, Sepcic K, Jaklic M, Cvitanic M, Lusic J, Lajtner J, Simcic T, Hudina S (2016) Differences in tolerance to anthropogenic stress between invasive and native bivalves. *Science of the Total Environment* 543:449–459

Bielen A, Vladusic T, Kuharic N, Hudina S, Sver L, Likic S (2014) First evidence of the presence of multixenobiotic resistance mechanism activity in freshwater invasive species, signal crayfish *Pacifastacus leniusculus* (Dana, 1852). *Periodicum Biologorum* 116:1–7

Bols NC, Dayeh VR, Lee LEJ, Schirmer K (2005) Use of fish cell lines in the toxicology and ecotoxicology of fish. Piscine cell lines in environmental toxicology, in: *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes* 6:43–84 Chapter 2

Borenfreund E, Puerner JA (1985) Toxicity determined *in vitro* by morphological alterations and neutral red absorption. *Journal Toxicology letters* 24:119-124

CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente (2005). Resolução nº 357, de 17 de março de 2005. Ministério do meio ambiente

Darrigran G (2002) Potential impact of filter-feeding invaders on temperate inland freshwater environments. *Biological Invasions* 4:145–156

Di Donato M, Sarkar B (1997) Copper transport and its alterations in Menkes and Wilson diseases. *Biochimica Biophysica Acta* 1360:3-16

Falfushynska HI, Gnatyshyna LL, Stoliar OB (2013) Effect of *in situ* exposure history on the molecular responses of freshwater bivalve *Anodonta anatina* (*Unionidae*) to trace metals. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 89:73–83

Fukuda M (1991) Lysosomal Membrane Glycoproteins. *The Journal Of Biological Chemistry* 266:(32) 21327-21330

Gomes T, Pinheiro JP, Cancio I, Pereira CG, Cardoso C, Bebianno MJ (2011) Effects of Copper Nanoparticles Exposure in the Mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Environmental Science Technology* 45:9356–9362

Gottesman MM, Pastan I (1993) Biochemistry of Multidrug Resistance Mediated by the Multidrug Transporter. *Annual Review Biochemistry* 62:385–427

Goulart TLS, Boyle RT, Souza MM (2015) Cytotoxicity of the association of pesticides Roundup Transorb® and Furadan 350 SC® on the *zebrafish* cell line, *ZF-L*. *Toxicology in Vitro* 29:1377-1384

Gruys KJ, Sikorski JA (1999) Inhibitors of tryptophan, phenylalanine and tyrosine biosynthesis as herbicides. In: SINGH, B. K. *Plant amino acids: biochemistry and biotechnology*. Marcel Dekker 357-384

Guidony NSP (2016) Efeitos tóxicos do cobre e atrazina, isolados e combinados, sobre dois modelos biológicos: microalga e hepatócitos de *zebrafish* (ZF-L). Dissertação de mestrado em Biologia de Ambientes Aquáticos Continentais da Universidade Federal do Rio Grande, Brasil

Howe CM, Berrill M, Pauli DB, Helbing CC, Werr K, Veldhoen N (2004) Toxicity of glyphosate-based pesticides to four North American frog species. *Environmental Toxicology Chemistry* 23:1928-1938

Karatayev AY, Burlakova LE, Padilla DK, Mastisky SE, Olenin S (2009) Invaders are not a random selection of species. *Biological Invasions* 11:2009–2019

Katsumiti A, Thorley AJ, Arostegui I, Reip P, Valsami-Jones E, Tetley ET, Cajaraville MP (2018) Cytotoxicity and cellular mechanisms of toxicity of CuO NPs in mussel cells *in vitro* and comparative sensitivity with human cells. *Toxicology in Vitro* 48:146–158

Kurelec B (1992) The multixenobiotic resistance mechanism in aquatic organisms. *Critical Reviews in Toxicology* 22(1):23-43

Kurelec B (1995) Inhibition of multixenobiotic resistance mechanism in aquatic organisms: ecotoxic consequences. *The Science of the Total Environment* 171:197-204

Kurelec B, Smital T, Pivcevic B, Eufemia N, Epel D (2000) Multixenobiotic Resistance, P-Glycoprotein, and Chemosensitizers. *Ecotoxicology* 9:307-327

Lajtner J, Crncan P (2011) Distribution of the invasive bivalve *Sinanodonta woodiana* (Lea, 1834) in Croatia. *Aquatic Invasions* 6(1):119-124

Lowe DM, Soverchiab C, Moore MN (1995) Lysosomal membrane responses in the blood and digestive cells of mussels experimentally exposed to fluoranthene. *Aquatic Toxicology* 33:105-112

Minghetti M, Leaver MJ, Caerpene E, George SG (2008) Cooper transporter 1, metallothionein and glutathione reductase genes are differentially expressed in tissues of sea

breem (*Sparus aurata*) after exposure to dietary of waterborne copper. *Comparative Biochemistry Physiology Part C*, 147(4):450-459

Modesto KA, Martinez CBR (2010) Roundup causes oxidative stress in liver and inhibits acetylcholinesterase in muscle and brain of the fish *Prochilodus lineatus*. *Chemosphere*, 78:294-299

Nzengue Y, Candéias SM, Sauvaigo S, Douki T, Favier A, Rachidi W, Guiraud P (2011) The Toxicity redox mechanisms of cadmium alone or together with copper and zinc homeostasis alteration: Its redox biomarkers. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. 25(3):171-80

Oliveira P, Lopes-Lima M, Machado J, Guilhermino L (2015) Comparative sensitivity of European native (*Anodonta anatina*) and exotic (*Corbicula fluminea*) bivalves to mercury. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 167:191-198

Piola RF, Johnston EL (2006) Differential tolerance to metals among populations of bryozoan *Bugula neritina*. *Marine Biology* 148:997–1010

Pytharopoulou S, Kournoutou GG, Leotsinidis M, Georgiou CD, Kalpaxis DL (2013) Cadmium versus copper toxicity: Insights from an integrated dissection of protein synthesis pathway in the digestive glands of mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Journal of Hazardous Materials* 260:263– 271

Quinn JP (1993) Interactions of the herbicides glyphosate and glufosinate (phosphinothricin) with the soil microflora. In: ALTMAN, J. (Ed.) *Pesticides interactions in crop production – beneficial and deleterious effects*. Boca Raton: CTC Press 245-265

Regoli F (2000) Total oxyradical scavenging capacity (TOSC) in polluted and translocated mussels: a predictive biomarker of oxidative stress. *Aquatic Toxicology* 50:351-361

Repetto G, Del PA, Zurira JL (2008) Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability / cytotoxicity. *Journal Nature Protocols* 3:1125–1131

Ricklefs RE (2010) *A Economia da Natureza*. 6^a ed, Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro

Rogero SO, LugãoAB, Ikeda TI, Cruz ÁS (2003) Teste *in vitro* de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. *Materials Research* 6:317–320

Sabik H, Jeannot R, Rondeau B (2000) Multiresidue methods using solid-phase extraction techniques for monitoring priority pesticides, including triazines and degradation products, in ground and surface waters. *Journal of Chromatography A* 885:217-236

Santos JB, Ferreira EA, Kasuya MCM, Silva AA, Procópio SO (2005) Tolerance of Bradyrhizobium strains to glyphosate formulations. *Crop Protection*, 24:543–547

Santos KC, Martinez CBR (2014) Genotoxic and biochemical effects of atrazine and Roundup, alone and in combination on the Asian clam *Corbicula fluminea*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 100:7–14

Schwake M, Schroder B, Saftig P (2013) Lysosomal Membrane Proteins and Their Central Role in Physiology. *Traffic* 14:739–748

Smital T, Luckenbach T, Saureborn R, Hamdoun AM, Vega RL, Epel D (2004) Emerging contaminants—pesticides, PPCPs, microbial degradation products and natural substances as inhibitors of multixenobiotic defense in aquatic organisms. *Mutation Research. Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 552:101–117

Tomita RY., Beyruth Z (2002) Toxicologia de agrotóxicos em ambiente aquático. *O Biológico* 64:(2)35-142

Weir SM, Salice CJ (2012) High tolerance to abiotic stressors and invasion success of the slow growing freshwater snail, *Melanoides tuberculatus*. *Biological Invasions* 14:385–394

