



Universidade Estadual Paulista

Instituto de Biociências de Botucatu

Departamento de Bioestatística e Biodiversidade



Renan Augusto Pereira dos Santos

Dissertação de Mestrado

**MORFOLOGIA CELULAR E IMUNOLOGIA EM CRUSTÁCEOS
(DECAPODA: AEGLIDAE) ENDÊMICOS SUL-AMERICANOS: O STATUS DE
CONSERVAÇÃO DE ESPÉCIES EM BACIAS HIDROGRÁFICAS DOS
ESTADOS DE SÃO PAULO E PARANÁ**

Orientador: Prof. Dr. Antonio Leão Castilho

Coorientador: Prof. Dr. George Shigueki Yasui

Botucatu

2024

**MORFOLOGIA CELULAR E IMUNOLOGIA EM CRUSTÁCEOS
(DECAPODA: AEGLIDAE) ENDÊMICOS SUL-AMERICANOS: O STATUS DE
CONSERVAÇÃO DE ESPÉCIES EM BACIAS HIDROGRÁFICAS DOS
ESTADOS DE SÃO PAULO E PARANÁ**

Renan Augusto Pereira dos Santos

Orientador: Prof. Dr. Antonio Leão Castilho

Coorientador: Prof. Dr. George Shigueki Yasui

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Unesp – campus de Botucatu, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Zoologia).

Botucatu

2024

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Santos, Renan Augusto Pereira dos.

Morfologia celular e imunologia em crustáceos (Decapoda: Aeglidae) endêmicos sul-americanos : o status de conservação de espécies em bacias hidrográficas dos estados de São Paulo e Paraná / Renan Augusto Pereira dos Santos. - Botucatu, 2024

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu
Orientador: Antonio Leão Castilho
Coorientador: George Shigueki Yasui
Capes: 20400004

1. Apoptose. 2. Citometria de fluxo. 3. Crustáceos.
4. Imunologia. 5. Microscopia de fluorescência.

Palavras-chave: Apoptose; Citometria de fluxo; Crustáceos; Imunologia; Microscopia de fluorescência.

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE RENAN AUGUSTO PEREIRA DOS SANTOS, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (ZOOLOGIA), DO INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS - CÂMPUS DE BOTUCATU.

Aos 01 dias do mês de fevereiro do ano de 2024, às 14:00 horas, no(a) Sala da Pós-Graduação - Central de Aulas 2, realizou-se a defesa de DISSERTAÇÃO DE MESTRADO de RENAN AUGUSTO PEREIRA DOS SANTOS, intitulada **MORFOLOGIA CELULAR E IMUNOLOGIA EM CRUSTÁCEOS (DECAPODA: AEGLIDAE) ENDÊMICOS SUL-AMERICANOS: O STATUS DE CONSERVAÇÃO DE ESPÉCIES EM BACIAS HIDROGRÁFICAS DOS ESTADOS DE SÃO PAULO E PARANÁ**. A Comissão Examinadora foi constituída pelos seguintes membros: Prof. Dr. ANTONIO LEÃO CASTILHO (Orientador(a) - Participação Presencial) do(a) Departamento de Biodiversidade e Bioestatística / Instituto de Biociências - Unesp/ Câmpus de Botucatu, Profa. Dra. MARIANA VELLOSA CAPPARELLI (Participação Virtual) do(a) Instituto de Ciencias del Mar y Liminología / Universidad Autónoma Nacional de México, Prof. Dr. SANDRO SANTOS (Participação Virtual) do(a) Departamento de Ecologia e Evolução / Universidade Federal de Santa Maria. Após a exposição pelo mestrando e arguição pelos membros da Comissão Examinadora que participaram do ato, de forma presencial e/ou virtual, o discente recebeu o conceito final: APROVADO. Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelo(a) Presidente(a) da Comissão Examinadora.

Prof. Dr. ANTONIO LEÃO CASTILHO

Dedico este trabalho aos meus pais,
Francisco Pereira dos Santos e Tânia
Maria Pereira dos Santos, à minha família
e amigos. Tudo o que foi alcançado aqui
tem um pouco de todos vocês.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Antonio Leão Castilho (Tony) por ter me aceitado de volta no lab depois de 4 anos e meio da minha IC e por ter topado desenvolver um projeto que para nós era inédito, o que fez com que tivéssemos que estudar, desenvolver e aprimorar uma série de procedimentos. Obrigado por ter proporcionado todos os equipamentos necessários, além de veículos, participação em coleta, disponibilidade e todo o conhecimento disponível.

Ao meu coorientador, Prof. Dr. George Shigueki Yasui e à Dra. Lucia Suárez López por toda a ajuda no início do desenvolvimento do nosso protocolo de extração e análise de hemolinfa, além do auxílio para obtenção das imagens de microscopia ótica e de fluorescência. Agradeço também ao restante do pessoal do CEPTA (Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Peixes Continentais) por terem sido super solícitos no período em que estive por lá.

A todo o pessoal do lab pelos vários brainstorms elucidativos, ajuda com documentações, escrita e procedimentos da pós em geral, além dos vários rolês, churras, afters na Isa, futs, jogatinas e afins. Aqui cabem alguns agradecimentos especiais... à Isa pela ajuda com as imagens, logísticas, “manhas” da pós e de cultivo, experimentos de hemolinfa e por ser uma ótima companheira de sala e de condomínio. Ao Reba pela ajuda com tudo o que envolve estatística no meu projeto, além de várias caronas pra resolver coisas por aí. Ao Binho pela ajuda nas coletas, cuidados no cultivo e por ser um ótimo companheiro de condomínio também. Ao Jonas pela ajuda e conhecimento nas coletas, documentações e experimentos de hemolinfa. Ao Dino, pela oportunidade de desenvolver dois artigos bem legais. A todo o pessoal do “Escola de Verão”: Binho, Jonas, PH e Isadora por toda a ajuda com esse projeto. À Gesuza, Jubarte e Felipe pela ajuda com as

coletas. À Maggie e demais pessoas já citadas que aceitaram ser “suplentes *stricto sensu*” nas minhas bancas. Finalmente, a TODO o pessoal do lab pela amizaaaaade!!

Ao Silvio pela imensa ajuda com as coletas, conhecimento de campo e viagens pra entrega de amostras de água, Silvio foi uma grande descoberta do nosso lab nos últimos tempos. À Rose pela ajuda com documentações e procedimentos da pós. Ao Flávio pela ajuda com os reagentes químicos e concertos técnicos. Ao Prof. Marcos (Marquinhos) pela ajuda com os índices de qualidade de água e também ao pessoal do lab do Marquinhos (Gabriel, Rafa e Pavê) pela água destilada de lei. À Dona Maria e o resto do pessoal da limpeza por sempre deixarem os espaços em que a gente trabalha em ótimas condições, além de umas pipoquinhas eventualmente.

À Larissa pela imensa ajuda com o desenvolvimento, execução dos experimentos de hemolinfa e gráficos no FlowJo, além de ter participado da minha banca de qualificação com várias ótimas sugestões, essa foi uma parte importantíssima do meu projeto. À Gra pela ajuda com o desenvolvimento do protocolo de hemolinfa e análises no FlowJo.

Ao Allan e Thandy, da USP de São Carlos pelas análises de toxicidade da água, explicação do procedimento, envio de relatórios e por terem sido muito solícitos quando estive por lá. Ao Prof. Padilha e ao José do CEAQUIM (Centro de Apoio Químico ao Ensino, à Pesquisa e de Prestação de Serviços) pelas análises de substâncias tóxicas nas amostras de água. Ao pessoal da Controle Analítico pelas análises de surfactantes nas amostras de água.

Ao Prof. Dr. Gustavo Monteiro Teixeira (Guga) e à Dra. Larissa Dra. Larissa Ragozo Cardoso de Oliveira por terem aceitado fazer parte da minha banca de qualificação, dando ótimas sugestões e correções que aprimoraram bastante o meu texto.

Agradeço também ao Prof. Dr. Sandro Santos e à Prof^a. Dra. Mariana Velloso Capparelli por terem aceitado ser banca da minha defesa de dissertação.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Zoologia) pela oportunidade e instalações e ao Programa de Excelência Acadêmica (PROEX) da agência de fomento “Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior” (CAPES) processo número 88887.636676/2021-00, pela bolsa de mestrado.

Aos meus pais, que me apoiaram completamente quando tomei a decisão de voltar pra Botucatu para engatar um mestrado no finalzinho de um período complicado de pandemia, sempre me incentivaram, ajudaram e comemoraram comigo todas as minhas conquistas. À minha família, que também sempre me apoiaram em todas essas decisões.

Finalmente, aos meus amigos: de Sampa, do colégio, da república, da facul, de Botuca, do Kung Fu, ao Snake, meu companheiro de casa aqui em Botucatu... por terem participado e dado suporte em todo esse processo e claro, pela amizaaaade!! Muito obrigado!!

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	4
1. CONSIDERAÇÕES INICIAIS.....	8
2. RESUMO	10
3. ABSTRACT	11
4. INTRODUÇÃO	12
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	19
4.1. Caracterização das áreas de estudo	19
4.2. Amostragem biológica	21
4.3. Retirada da hemolinfa	25
4.4. Viabilidade celular dos hemócitos	26
4.5. Análises ambientais e componentes abióticos.....	29
6. RESULTADOS.....	37
5.1. Análises descritivas	37
5.2. Análises quantitativas.....	39
5.3. Análises ambientais e componentes abióticos.....	43
7. DISCUSSÃO	44
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS	48
9. REFERÊNCIAS	48

1. CONSIDERAÇÕES INICIAIS

Habitualmente, dissertações de mestrado são escritas na forma de capítulos, organizados já no formato de artigos científicos, visando uma praticidade para a posterior publicação dos resultados obtidos, além de uma melhor organização dos diversos temas trabalhados no projeto. Também é bastante frequente a escrita já em inglês, uma vez que é a língua universal da ciência, o que amplia as possibilidades de revistas a serem consideradas para a publicação, de forma a não somente se ater a revistas nacionais, mas também às internacionais, o que permite a divulgação global da pesquisa.

Este trabalho, no entanto, foi intencionalmente escrito como um “dossiê” sobre o assunto pesquisado, no formato de monografia, com uma introdução que esmiuça a premissa do trabalho, ou seja, o estudo de um gênero de crustáceos endêmicos da América do Sul, com várias espécies de ocorrência nacional distribuídas em sua maioria em áreas de Mata Atlântica, o bioma brasileiro mais degradado, e com um número expressivo de representantes figurando nas listas nacionais de espécies ameaçadas. Portanto, nosso propósito foi dar um passo adiante neste “universo” ainda pouco explorado do status de conservação de espécies neotropicais brasileiras de valor inestimável, por conta de seu elevado grau de endemismo.

Os principais mecanismos internacionais e nacionais utilizados para a avaliação do status de conservação de espécies foram descritos, além de uma introdução ao gênero *Aegla* de crustáceos estudados, sua distribuição e atual status de conservação das espécies, principais ameaças sofridas pelos crustáceos de água doce e formas de avaliação da ação do impacto antrópico sobre essa fauna. Na seção de Material e Métodos há uma descrição detalhada do protocolo desenvolvido para os principais experimentos laboratoriais abordados, além dos índices utilizados para descrição da qualidade da água dos ambientes para a sobrevivência da fauna. Os resultados foram apresentados de forma a representar

uma visão qualitativa, através de fotos de microscopia e uma visão quantitativa, através de gráficos, tabelas e análises estatísticas. Por fim, a discussão permeia tudo o que foi observado nos resultados para então chegar às conclusões.

A escolha da escrita nesse formato objetiva registrar pela primeira vez este tema em nosso laboratório, o Laboratório de Biologia de Invertebrados Aquáticos (LabIAqua), servindo de base para futuras pesquisas de alunos e alunas ingressantes e, assim, permitindo que qualquer pesquisador que queira reproduzir experimentos similares, tenha meios de replicar o protocolo inédito desenvolvido. O texto também foi trabalhado de forma a apresentar o tema para qualquer pessoa que não tenha contato prévio com as informações, incluindo a população em geral. Portanto, além da escrita em português, em alguns momentos exploramos com profundidade conceitos que normalmente seriam tomados como “de conhecimento comum para a comunidade científica”.

Futuramente o texto será dividido em duas produções bibliográficas, uma focada no protocolo de extração e análise de hemolinfa e outra voltada às análises de taxa de apoptose e morfologia das células do sistema imune de *Aegla* através da técnica de citometria de fluxo da hemolinfa e associação desses dados com os de qualidade da água, cumprindo o viés conservacional da premissa desse estudo.

Também será possível acrescentar as sugestões e correções da banca de defesa antes da consolidação do texto para armazenamento no repositório da Unesp, de forma que tanto o arquivo final, quanto os artigos a serem confeccionados, contemplarão os apontamentos colocados. Essa dissertação foi escrita de acordo com o enfoque do “Plano de Ação Nacional para Conservação dos Peixes e Eglas da Mata Atlântica Ameaçados de Extinção” (CEPTA, ICMBio) em conscientizar a população sobre esses animais, apresentando-os e discutindo as diversas ameaças a que estão submetidos, além de possíveis ações conservacionistas.

2. RESUMO

Análises de morfologia e viabilidade celular na hemolinfa são ferramentas empregadas com crustáceos para diagnosticar as condições biológicas de espécies ambientalmente impactadas através do “estado de saúde” dos animais. Os ecossistemas aquáticos neotropicais se destacam por concentrarem um maior número de espécies endêmicas ameaçadas de extinção por ações antrópicas. Com base nisso, a morfologia e taxa de apoptose dos hemócitos (células do sistema imune presentes na hemolinfa) dos anomuros de água doce *Aegla* spp. foram estudadas em áreas mais e menos impactadas por atividades humanas. As coletas dos espécimes foram realizadas em três locais: Riacho Pedra Preta (Avaré-SP); Salto Puxa Nervos (Tibagi-PR) e Rio Iapó (Castro-PR). A hemolinfa dos animais foi extraída para análise dos processos de apoptose através de citometria de fluxo e microscopia de fluorescência, utilizando um protocolo desenvolvido durante este projeto e foi feita uma descrição morfológica dos hemócitos através de microscopia óptica. Para a caracterização das áreas de estudo, foram realizadas análises de diversos parâmetros abióticos da água dos ambientes, além da presença e concentração de substâncias tóxicas. Foram observados e descritos 3 tipos celulares de hemócitos: hialinócitos, semigranulócitos e granulócitos. As taxas de apoptose se mostraram significativamente maiores nos espécimes de Avaré-SP em comparação com os de Castro-PR, entretanto, não houve diferenças significativas entre os espécimes de Tibagi-PR e demais locais. Avaré teve os piores índices de qualidade de água, enquanto Castro e Tibagi apresentaram qualidade regular. Portanto, a combinação das análises de hemolinfa com os fatores ambientais pôde fornecer o “espelhamento” do status ambiental vs status imunológico de *Aegla* spp, o que poderia ser replicado para outros crustáceos.

Palavras-chave: apoptose; citometria de fluxo; crustáceos; imunologia; microscopia de fluorescência; status de conservação.

3. ABSTRACT

Analyses of morphology and cell viability in hemolymph are tools used with crustaceans to diagnose the biological conditions of environmentally impacted species by accessing their "health status". Neotropical aquatic ecosystems stand out for concentrating a greater number of endemic species threatened with extinction by human actions. Based on this, the morphology and apoptotic cell ratio of hemocytes (immune system cells present in the hemolymph) of freshwater anomura *Aegla* spp. were studied in areas more and less impacted by human activities. Specimens were collected in three locations: Riacho Pedra Preta (Avaré-SP); Salto Puxa Nervos (Tibagi-PR) and Rio Iapó (Castro-PR). The hemolymph of the animals was extracted for analysis of the apoptotic processes by flow cytometry and fluorescence microscopy, using a protocol developed during this project, and a morphological description of the hemocytes was made by optical microscopy. For the characterization of the study areas, analyses of several abiotic parameters of the water in the environments were carried out, in addition to the presence and concentration of toxic substances. Three types of hemocytes have been observed and described: hyalinocytes, semigranulocytes and granulocytes. The apoptotic ratios were significantly higher in the specimens from Avaré-SP compared to those from Castro-PR, however, there were no significant differences between the specimens from Tibagi-PR and other sites. Avaré had the worst water quality indexes, while Castro and Tibagi had regular quality. Therefore, the combination of hemolymph analysis with environmental factors could provide the "mirroring" of the environmental status vs immune status of *Aegla* spp, which could be replicated for other crustaceans.

Keywords: apoptosis; flow cytometry; Crustaceans; immunology; fluorescence microscopy; conservation status.

4. INTRODUÇÃO

A conservação e a preservação de espécies animais e vegetais exigem estratégias nos mais diversos níveis científicos/sociais para manutenção do equilíbrio trófico e da biodiversidade, permitindo o sustento e a coexistência harmônica entre humanos e animais. Alguns exemplos dessas estratégias seriam: ações de conscientização da sociedade sobre quais espécies convivem próximas aos humanos em áreas urbanas e rurais, os hábitos e principais ameaças a essas espécies, riscos para os humanos etc.

Um dos métodos mais utilizados para divulgar o status de conservação da biodiversidade mundial consiste na “Lista Vermelha” de espécies ameaçadas de extinção, criada pela União Internacional para a Conservação da Natureza (IUCN) (Peres et al. 2011). Essas listas providenciam informações sobre a biodiversidade, tamanho das populações, habitat e ecologia, uso e/ou comércio, ameaças e ações para a conservação de espécies de todos os grupos de animais (IUCN, 2023), e fazem uma estimativa da probabilidade ou risco relativo de extinção de um táxon, incluindo-os em categorias de risco (IUCN Standards and Petitions Committee, 2022).

Especificamente no Brasil, as Listas Nacionais de Espécies Ameaçadas de Extinção, publicadas pelo Ministério do Meio Ambiente (MMA), constituem uma das ferramentas mais importantes de conservação, baseando-se em aspectos ecológicos, sociais e econômicos para definir as espécies que as compõem (Peres et al. 2011). Com a criação do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio), o órgão passou a ser responsável por elaborar estratégias de conservação baseadas em informações sobre risco de extinção, taxonomia, distribuição geográfica, tendências populacionais, biologia reprodutiva, longevidade, principais ameaças, tipos de uso, áreas críticas e ações para a conservação das espécies (Peres et al. 2011).

Tais planos são elaborados para espécies encontradas nos mais variados ecossistemas e, entre eles, os de água doce se destacam por possuírem uma grande biodiversidade, com aproximadamente um terço de todos os vertebrados conhecidos, vivendo neles (Dudgeon et al. 2006). Segundo Balian et al. (2008), o número total de espécies descritas em água doce (aquática e semiaquática) é de aproximadamente 126.000, das quais 60,4% são insetos; 14,5% são vertebrados; 10% são crustáceos; 5% são aracnídeos e 4% são moluscos, com o restante distribuído entre outros grupos de invertebrados. No entanto, toda essa biodiversidade pode estar sendo submetida a diversos níveis de ação antrópica e subsequente estresse ambiental, por conta da construção de reservatórios d'água sem os devidos cuidados com o ambiente; da destruição das matas de galeria e o consequente processo de assoreamento de rios e lagos, além da poluição das águas; da introdução de espécies exóticas e da pesca, que acabam por deteriorar os ambientes aquáticos (Bond-Buckup et al. 2010).

Dentre os diversos animais que habitam as águas continentais, encontra-se o grupo de crustáceos do gênero *Aegla* Leach, 1821, pertencentes à família Aeglidae Dana, 1852. *Aegla* spp. são “caranguejos” anomuros dulcícolas e endêmicos da região sul da América do Sul, estando distribuídos por países como Brasil, Argentina, Chile, Uruguai, Paraguai e Bolívia (Martin e Abele 1986; Pérez-Losada et al. 2004). As espécies ocorrem em lagos, riachos, terras alagadiças e cavernas (Pérez-Losada et al. 2004) e diversos de seus representantes estão ameaçados de extinção (Santos et al. 2017). Com 93 espécies descritas (Páez et al. 2018; Trombetta et al. 2019; Marçal et al. 2020; Bueno et al. 2021; Marçal et al. 2021a; Marçal et al. 2021b), *Aegla* é provavelmente o gênero mais ameaçado entre os decápodes de água doce da América do Sul (Bueno et al. 2016), com 57 das 82 espécies (67%) avaliadas em 2017, consideradas ameaçadas segundo os critérios da IUCN (Santos et al. 2017). A categoria “ameaçada” da IUCN considera atualmente três

níveis distintos de proteção a espécies: criticamente em perigo, em perigo e vulnerável, de forma que das 82 espécies avaliadas, 17 estavam “criticamente em perigo”, 24 “em perigo” e 16 “vulneráveis” (Santos et al. 2017).

Considerando as 42 espécies de ocorrência nacional conhecidas até 2014, a Avaliação de 2010-2014 registrada no Livro Vermelho dos Crustáceos do Brasil afirma que um percentual de 62% se encontrava ameaçada, estando 19,05% “criticamente em perigo”, 28,57% “em perigo” e 14,26% “vulneráveis”, o que torna a conservação desse grupo uma ação emergencial (Pérez-Losada et al. 2004).

Na lista mais recente feita pelo Sistema de Avaliação do Risco de Extinção da Biodiversidade – SALVE (ICMBio, 2023), que contemplou 49 das 61 espécies brasileiras, 8 se encontram “criticamente em perigo”, 8 “em perigo” e 2 “vulneráveis”, totalizando 18 espécies ameaçadas (36,7%). Apesar da diminuição da porcentagem de fauna em risco, trata-se de espécies endêmicas presentes em sua maioria em áreas de Mata Atlântica, amplamente devastada no Brasil.

O status de conservação das espécies, como as da família Aeglidæ, é avaliado através de dados sobre sua distribuição espacial (extensão de ocorrência e/ou área de ocupação), padrões de distribuição (alto endemismo e/ou severa fragmentação no padrão de distribuição de espécies altamente endêmicas resultando em subpopulações reprodutivamente isoladas) e habitat e qualidade (contínua degradação das condições ambientais e perda de habitat) (IUCN Standards and Petitions Committee 2022; ICMBIO/MMA 2018; MMA 2014).

Dada a fragilidade e o preocupante status de ameaça mencionados, foi criado recentemente pelo ICMBio o “Plano de Ação Nacional (PAN) para Conservação dos Peixes e Eglas da Mata Atlântica Ameaçados de Extinção”, com vigência de 2019 a 2024,

que objetiva justamente atenuar o status de ameaça dessas espécies de *Aegla*. A criação desse PAN, vinculado ao Ministério do Meio Ambiente, enfatiza e justifica a necessidade de esforços em pesquisas conservacionistas para esse grupo animal.

Outro importante ponto ao se interpretar o status de preservação de uma espécie é o impacto antrópico na saúde e bem-estar dos animais. Nesse sentido, por exemplo, pode-se considerar trabalhos que avaliaram a ação de microplásticos nos mecanismos cognitivos de seleção de conchas por ermitões (Crump et al. 2020), além da fragmentação desses microplásticos através dos processos digestivos de crustáceos, contribuindo para a sua degradação no ambiente (Cau et al. 2020; Mateos-Cárdenas et al. 2020); a contaminação de estuários por metais pesados e seus efeitos nos mecanismos de osmorregulação e consumo de oxigênio de caranguejos *Brachyura* da fauna local (Capparelli et al. 2016); alterações comportamentais e fisiológicas em eglídeos causadas pelo aquecimento global e consequente aumento de temperatura das águas (Cogo et al. 2018); e ainda o efeito da poluição por metais e agroquímicos nos marcadores de estresse oxidativo em *Aegla* spp. (Piassão et al. 2019; Borges et al. 2022).

Considerando que os eglídeos são (1) encontrados em águas continentais e que a manutenção desses animais em laboratório é comprovadamente possível (Cogo e Santos 2013; Cogo et al. 2018); (2) já foram testados e usados em estudos de análise de impactos no ambiente, como os citados anteriormente; e (3) podem ser considerados modelos para a elaboração de protocolos de análise do “bem-estar” animal, seria possível então, medir a qualidade de vida de indivíduos que estejam sob impacto de distúrbios ambientais em seu habitat?

Uma possível abordagem para estudar os efeitos dos poluentes humanos nos crustáceos, bem como o seu status imunológico, envolve a observação de alguns parâmetros da hemolinfa, fluido transportador de nutrientes, hormônios e produtos do

metabolismo celular dos artrópodes (Grubhoffer et al. 2013). Analogamente aos hemogramas realizados em pacientes acometidos por doenças e alterações e que são fundamentais para diagnósticos e tomadas de decisão, essa análise em crustáceos também traz informações importantes acerca da saúde e potenciais estressores.

Em particular, a análise dos hemócitos dos eglídeos, células circulantes na hemolinfa e que fazem parte do processo de defesa do organismo, pode fornecer informações sobre o estado de saúde do animal (Cárdenas et al. 2000). Os hemócitos têm um papel vital no sistema imune dos crustáceos e nos decápodes, embora a morfologia das células varie, são habitualmente encontrados em 3 tipos celulares distintos: granulócitos, semigranulócitos e hialinócitos (Bauchau, 1981). É o caso tanto para decápodes marinhos, como o camarão branco chinês *Fenneropenaeus chinensis* (Osbeck, 1765) (Xing et al. 2017), o camarão-rosa *Farfantepenaeus paulensis* (Pérez Farfante, 1967) e o camarão-branco *Litopenaeus vannamei* Boone, 1931 (Bandeira et al. 2020), quanto para decápodes de água salobra, como o caranguejo *Carcinus aestuarii* Nardo, 1847 (Matozzo e Marin 2010) e de água doce, como o lagostin *Procambarus zonangulus* Hobbs & Hobbs, 1990 (Cárdenas et al. 2000).

A distinta morfologia dos hemócitos reflete suas variadas funções. Uma vez que os crustáceos não possuem processos de defesa adaptativa, como os mamíferos por exemplo, os hemócitos constituem as células imunocompetentes responsáveis por produzir uma resposta inata a, por exemplo, esporos de bactérias, fungos e vírus (Söderhäll et al. 1994; Guise et al. 2005). Os hialinócitos (sem ou com poucos grânulos e um núcleo ovoide ou fusiforme) têm envolvimento com a fagocitose; enquanto os granulócitos (repletos de grânulos em seu interior e um núcleo ovoide) podem desempenhar o armazenamento e liberação do sistema profenoloxidase, além da citotoxicidade. Já os semigranulócitos (com menos grânulos em seu interior em

comparação aos granulócitos) podem estar envolvidos na encapsulação de parasitas grandes demais para serem internalizados por um só hemócito e também no sistema profenoloxidase (Unestam e Söderhäll 1977; Ratcliffe e Rowley 1979; Smith e Söderhäll 1983a; Smith e Söderhäll 1983b; Kobayashi et al. 1990; Johansson et al. 2000; Xian et al. 2012, 2021).

O sistema profenoloxidase é um sistema de reconhecimento e ação contra partículas exógenas e estranhas aos crustáceos. Este processo de identificação das partículas se dá através de uma cascata de reações enzimáticas que envolvem a produção de melanina (Smith e Söderhäll 1983a; Söderhäll et al. 1994), cuja síntese em artrópodes está associada com respostas celulares a parasitas ou microrganismos invasores (Ratcliffe e Rowley 1979; Smith e Söderhäll 1983a). Ao limitar infecções nos períodos iniciais de exposição a agentes causadores de doenças (Guise et al. 2005), o sistema profenoloxidase é uma das razões pela qual o sistema imune dos crustáceos representa a sua primeira linha de defesa, uma vez que as barreiras físicas são vencidas (exoesqueleto), sendo, portanto, de extrema importância para a resistência a distúrbios ambientais.

Uma forma de se analisar a hemolinfa presente nos crustáceos foi descrita por Cárdenas et al. (2000), que testou a utilização da técnica de citometria de fluxo para estudar a imunidade celular em lagostins através das respostas dos hemócitos ao estímulo por um elemento presente nas paredes celulares de fungos. A citometria de fluxo se tornou essencial na pesquisa clínica humana e animal (Cárdenas et al. 2000), sendo empregada para obter informações sobre alguns processos biológicos, particularmente a morte celular (Galhardas 2014). Seu princípio consiste na passagem de partículas ou células em suspensão por um feixe luminoso na presença de filtros e detectores posicionados para captar sinais gerados pela interação entre os elementos e a luz. Esses sinais fornecem informações sobre as diferentes propriedades físico-químicas, morfológicas e estruturais

da célula. Os detectores são calibrados para medir a luz absorvida e emitida pela amostra em análise e o uso de marcadores fluorescentes estende as possibilidades de uso da técnica. Os sinais luminosos detectados são então transformados em impulsos elétricos e, posteriormente, em sinais digitais interpretados por um computador (Galhardas 2014; Bajgelman 2019).

Embora possa ser um processo passivo de caráter degenerativo que ocorre em situações de lesão celular e infecção (Grivicich et al. 2007), a morte celular também pode ser um evento ativo. Animais multicelulares muitas vezes precisam se livrar de células potencialmente perigosas que possam ameaçar sua homeostase (Hengartner 2000) e uma das formas de fazerem isso é através do mecanismo conhecido como apoptose, termo cunhado em 1972 por Kerr, Wyllie e Currie para indicar um tipo comum de morte celular programada (Kerr et al. 1972; Hengartner 2000).

Nos animais que vivem em ambientes aquáticos, este processo apoptótico pode ser influenciado, entre outros fatores, por poluentes presentes na água. Alguns estudos constataram que crustáceos submetidos a diferentes concentrações de nitrito, o poluente mais comum observado em sistemas de aquicultura, apresentaram um aumento no seu número de células em apoptose (Xian et al. 2011; Guo et al. 2013). A mesma situação foi observada em crustáceos expostos a diversas concentrações de cobre, um metal pesado (Xian et al. 2010; Guo et al. 2017). Portanto, a análise do processo apoptótico nas células da hemolinfa dos crustáceos pode fornecer uma indicação do estado de saúde desses animais. Nesse sentido, a utilização de alguns marcadores celulares pode auxiliar na detecção de células apoptóticas ou até mesmo já necrosadas.

Considerando o status de conservação preocupante de crustáceos endêmicos, como os eglídeos, além de sua existência em ambientes aquáticos mais e menos impactados pelas atividades humanas, os objetivos deste trabalho foram:

- (1) analisar as taxas de apoptose dos hemócitos das espécies de *Aegla* estudadas, identificando células vivas, em estágios iniciais de apoptose e já mortas;
- (2) descrever a morfologia dos tipos de hemócitos presentes na hemolinfa de *Aegla*;
- (3) associar dados bióticos e abióticos dos locais de coleta para identificar alguns dos efeitos das atividades humanas na fauna de crustáceos de água doce.

Além disso, esperava-se através da análise da hemolinfa por citometria de fluxo:

- (1) encontrar mais hemócitos vivos na hemolinfa dos indivíduos de ambientes menos impactados por algum tipo de ação antrópica;
- (2) encontrar mais hemócitos em estágio de apoptose e necrose nos indivíduos de ambientes considerados mais degradados.

Este trabalho contribui para a conservação *in situ* e *ex situ* de *Aegla* spp. ao elaborar um protocolo de análise de hemolinfa análogo ao hemograma feito no sangue dos humanos, uma ferramenta universal para acompanhar o status imunológico dos animais *in loco* e em laboratório, sendo essencial para tomadas de decisão de cunho conservacionista que antecedem extinções não desejadas. Tanto o protocolo, quanto a descrição da morfologia dos tipos de hemócitos e suas taxas de apoptose constituem dados inéditos para Aeglidae.

5. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Caracterização das áreas de estudo

As amostragens foram realizadas em três locais que correspondem à distribuição geográfica previamente publicada dos eglídeos (Wolf 2018): um ponto no Riacho Pedra Preta (23°09'S-48°46'O, altitude 635 m), na cidade de Avaré, estado de São Paulo; e mais dois pontos localizados no estado do Paraná: Salto Puxa Nervos (24°56'S-50°52'O,

altitude 785 m), na cidade de Tibagi e Rio Iapó (24°81'S-49°85'O, altitude 1001 m), na cidade de Castro.

Riacho Pedra Preta (Avaré - SP)

Área com ampla ocorrência de mata ripária e alternância entre trechos lóticos e lânticos, além da presença de gado nos arredores. O riacho possui várias áreas de abrigo para os animais, constituídas por rochas.

Salto Puxa Nervos (Tibagi - PR)

Localizada dentro de uma fazenda privada, a cachoeira fica numa região com fragmentos de vegetação original, composta por floresta ombrófila mista, estepes e cerrado e conta com a presença de gado nas proximidades. Os arredores do rio apresentam mata ripária, a cobertura vegetal do local é fechada e o rio também possui alternância de trechos lóticos e lânticos e presença de áreas de abrigo para os animais.

Rio Iapó (Castro - PR)

Localizado abaixo de uma rodovia, o trecho do rio possui uma faixa descontínua de mata ripária ao seu redor, além de gramíneas e fica numa área desmatada. Nos arredores há plantações em terras irregulares ou desmatadas. A cidade de Castro tem uma economia baseada em atividades de agricultura, pecuária de leite e de corte, criação de porcos e aves e extração de minérios (Fasolo et al. 2002) e sua vegetação é composta pelo bioma Mata Atlântica (Floresta Ombrófila Densa com remanescentes de Floresta Ombrófila Mista) (Denadai et al. 2022).

4.2. Amostragem biológica

Os espécimes de *Aegla* spp. foram obtidos por meio de coleta passiva, utilizando armadilhas de plástico perfuradas e em formato retangular [medidas aproximadas: 24 cm x 17 cm x 7 cm (comprimento x largura x altura)]. Estas foram distribuídas aleatoriamente nos pontos amostrais no final da tarde e inspecionadas no início da manhã seguinte afim de verificar os indivíduos capturados, uma vez que as atividades comportamentais exploratórias em eglídeos são mais notórias em período noturno, como demonstrado por Sokolowicz et al. (2007) para *Aegla longirostri* Bond-Buckup & Buckup, 1994 e para *Aegla castro* Schmitt, 1942 (De Almeida et al. 2021). Cada armadilha contém uma abertura para a entrada dos animais, que foram atraídos pelo odor da isca (ração de gato sabor peixe) colocada dentro de uma pequena vasilha de plástico perfurado (figura 1).

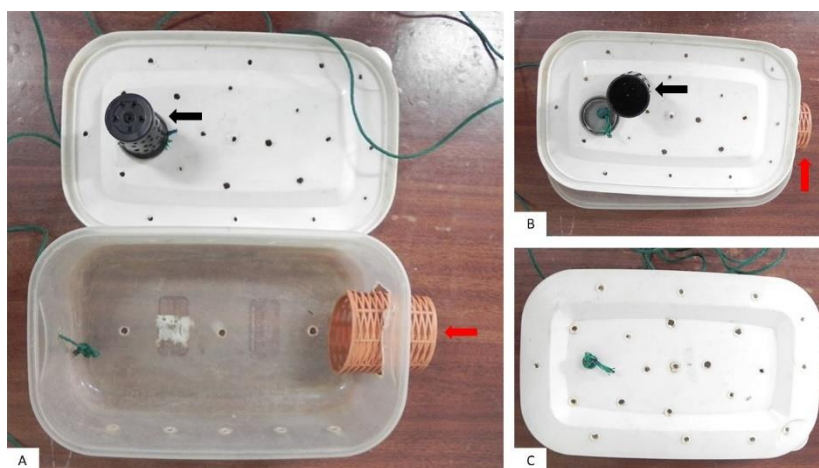


Figura 1. Armadilha para as coletas dos animais. A: Armadilha aberta com a seta preta indicando o depósito onde a isca é colocada e a seta vermelha indicando o local de entrada dos animais. B: Seta preta indicando o depósito de isca aberto e a seta vermelha indicando o local de entrada dos animais. C: Armadilha fechada.

A entrada da armadilha fica posicionada na direção oposta à corrente d'água, permitindo que o animal perceba a presença do alimento e se desloque em direção a ele,

entrando na armadilha, que foi montada com uma inclinação, de forma que uma vez dentro da caixa, o animal não consiga mais sair. Essa metodologia já vem sendo empregada para a realização de estudos com eglídeos e tem como principal estratégia, atrair aleatoriamente os indivíduos pelo odor da ração sem saciá-los (Bueno et al. 2007; Grabowski et al. 2013; da Silva et al. 2016). Na ausência ou baixo número de indivíduos capturados na coleta passiva, os animais foram coletados ativamente com uma rede em D (figura 2) e peneiras.



Figura 2. Rede em D utilizada para as capturas ativas de animais.

Os animais foram mantidos em laboratório por 1 a 3 dias, em aquários aerados, equipados com um sistema de recirculação constante, com temperatura entre 15 e 20°C e rochas para abrigo (figura 3), e foram alimentados com ração Tetra Color Bits. A água utilizada nos aquários foi obtida do ambiente de origem, a temperatura do ar no entorno foi mantida entre 20 e 21°C e foi feito um controle de fotoperíodo (12h de luz e 12h de escuridão) (adaptado de Cogo et al. 2018).



Figura 3. Aquário montado com filtro modular de 3 níveis, contando com barreira física (malha), biológica (bactérias nitrificantes) e química (carvão ativado), bomba circulante de água com mangueira de ar acoplada e rochas do ambiente original como abrigos naturais, além de abrigos artificiais feitos de pedaços de cano PVC.

Espécimes de três regiões distintas foram coletados durante o outono de 2023, com um deles identificado em nível de espécie e dois em nível de gênero, sendo eles: *Aegla* sp. (figura 4); *Aegla castro* Schmitt, 1942 (figura 5), ambas coletadas em 16 e 17 de maio de 2023 e *Aegla* sp. (figura 6), coletadas em 29 e 30 de maio de 2023. O número de animais amostrados foi: 9 espécimes de *Aegla castro*; 19 de *Aegla* sp. coletada em Tibagi e 18 de *Aegla* sp. coletada em Avaré, totalizando 46 espécimes. Para essas amostragens biológicas, contamos com autorização com finalidade científica do MMA/ICMBIO/SISBIO e COTEC.



Figura 4. Espécimes de *Aegla* sp. coletados na cidade de Tibagi - PR. A: macho vista dorsal. B: macho vista ventral, sem a presença de pleópodes no pléon. C: fêmea vista dorsal. D: fêmea vista ventral, com a presença de pleópodes no pléon (seta branca). Barra de escala branca – 1 cm.



Figura 5. *Aegla castro* coletada na cidade de Tibagi - PR. A: vista dorsal. B: vista ventral. Barra de escala branca – 1 cm.



Figura 6. *Aegla* sp. coletada em Avaré - SP. A: vista dorsal. B: vista ventral. Barra de escala branca – 1 cm.

4.3. Retirada da hemolinfa

A hemolinfa foi extraída da base do 4º pereópode de ambos os lados dos animais (adaptado de Gollas-Galván et al. 1997), totalizando aproximadamente 300 µl de cada um dos espécimes. Foi utilizada uma agulha hipodérmica de 26G ½ 13x0,45 mm com o bisel sempre voltado para cima, acoplada a uma seringa de 1 ml contendo um volume de solução anticoagulante/nutritiva refrigerada de Alsever (8 g/L de citrato de sódio, 20,5

g/L de glicose, 4,2 g/L de cloreto de sódio e pH de 7,5) (Xian et al. 2010, 2011, 2012, 2021; Zhou et al. 2017; Guo et al. 2013, 2017) igual ao volume de hemolinfa coletada e essa mistura foi imediatamente suspensa em 1800 µl de solução de Alsever (AS) devidamente refrigerada.

Esse procedimento se deve ao fato de os crustáceos apresentarem uma rápida capacidade de coagulação por conta de possuírem um sistema circulatório aberto, de forma que qualquer injúria ao seu exoesqueleto poderia causar uma massiva perda de hemolinfa (Söderhäll et al. 1994; Vazquez et al. 2009). Foram utilizados apenas indivíduos no período de intermuda, em que o exoesqueleto se mantém rígido, constituindo a primeira linha de defesa destes espécimes, que fica periodicamente enfraquecida durante a ecdise, quando aumentam as oportunidades de patógenos circundantes invadirem a cavidade do corpo (Moret et al. 2010).

4.4. Viabilidade celular dos hemócitos

Para a viabilidade celular em termos qualitativos, foi utilizado o kit LIVE/DEAD Sperm Viability (Thermofisher, USA). Uma alíquota de aproximadamente 100 µL foi diluída 20x (maiores detalhes, ver Guise et al. 2005) e corada com Iodeto de Propídio e SYBR-14 de acordo com as instruções do fabricante. Essa amostra corada foi empregada para análise através de microscopia de fluorescência em um microscópio (Nikon Ni, Tokyo, Japan) dotado de um conjunto de filtros específicos para SYBR-14 (excitação/emissão: 488/610 nm) e Iodeto de Propídio (493/636).

As imagens foram projetadas através de uma câmera tipo CCD (DiSR2, Nikon, Tokyo, Japan) e capturadas pelo software Nis-Ar Elements (Nikon, Tokyo, Japan), com os hemócitos marcados de verde com o SYBR-14 representando células vivas, uma vez

que esse é um corante de núcleo celular, permeável à membrana plasmática. Já as células mortas foram coradas de vermelho com o Iodeto de Propídio, que também marca o núcleo celular, mas que por conta de sua não permeabilidade à membrana, só consegue entrar caso o citoplasma já esteja rompido, indicando a morte celular. Essa mesma amostra foi caracterizada morfológicamente através de microscopia de Contraste Interferencial Diferencial (DIC).

A contagem celular foi feita numa câmara de Neubauer utilizando o corante Azul de Tripán, responsável por marcar o núcleo de células mortas ao entrar em seu citoplasma rompido, nunca ultrapassando 1×10^6 células. A viabilidade celular em termos quantitativos foi analisada através da análise de hemócitos apoptóticos através da citometria de fluxo, utilizando o kit de detecção de apoptose por Anexina V-FITC/IP (BD Pharmingen, BD Biosciences), seguindo as instruções do fabricante.

Para isso, após a contagem celular, um eppendorf com a mistura de hemolinfa e solução anticoagulante/nutritiva foi separado e adicionado a 1 mL de uma solução de formaldeído 4% por 30 minutos, para que fosse feito o controle de morte, de modo a calibrar o citômetro. Em seguida, todos os eppendorfs com a mesma mistura, inclusive o do controle de morte, foram centrifugados em modo spin (meio minuto, a 8°C em velocidade de 10.000 RPM) e o volume final foi ressuspensionado em 100 µl de solução de Alsever/tampão de anexina (BD Pharmingen, BD Biosciences) na proporção 9/1. O controle de morte foi dividido em quatro tubos, sendo: 1 não marcado; 1 marcado com 5 µl de Anexina V-FITC; 1 marcado com 2 µl de Iodeto de Propídio e 1 marcado tanto com Anexina, quanto Iodeto de Propídio e cada um desses tubos foi também ressuspensionado em 100 µl de solução de Alsever/tampão de anexina na proporção 9/1.

A proteína Anexina V se mostrou útil na detecção de células apoptóticas e sua conjugação com o corante Isotiocianato de Fluoresceína (FITC) permite identificar e

quantificar células em apoptose através da citometria de fluxo. Essa proteína interage com a fosfatidilserina, um fosfolípido originalmente presente na camada interna da membrana plasmática, mas que é externalizado durante os estágios iniciais da apoptose. Portanto, se for utilizada em associação com o Iodeto de Propídio, um marcador nuclear fluorescente capaz de identificar os estágios finais da apoptose, permite a detecção de células viáveis, células apoptóticas em estágio inicial e células apoptóticas em estágio final, ou mesmo já mortas (Van Engeland et al. 1998; Galhardas 2014).

Os demais tubos com a solução foram marcados com 5 µl de Anexina V-FITC e 2 µl de Iodeto de Propídio e incubados por 15 min no escuro junto aos tubos do controle de morte, cobertos por um papel alumínio, para então serem completados com 200 µl da solução de Alsever/ tampão de anexina e analisados no citômetro de fluxo. A Anexina V-FITC é capaz de identificar as células em estágios iniciais de apoptose. O Iodeto de Propídio é capaz de corar núcleos celulares através da utilização de marcadores celulares que ao serem atingidos por um espectro de luz, emitem fluorescência, permitindo identificar as células de interesse, no caso os hemócitos em estágios finais de apoptose, que devem aparecer nas leituras dos lasers (Braga et al. 2016).

As taxas de apoptose obtidas para os 3 locais foram confrontadas com os valores de um Índice de Qualidade das Águas para cada um destes ambientes, de forma a comparar o observado em cada um deles em termos de qualidade da água, com as proporções de hemócitos viáveis ou não. Os dados foram testados quanto a sua normalidade através do Teste de Shapiro-Wilk e quanto a sua homoscedasticidade através do Teste de Levene, para determinar se eram paramétricos ou não-paramétricos. Como os dados se mostraram paramétricos, foi feita uma análise de variância (ANOVA), determinando a existência de diferenças entre as taxas de apoptose dos 3 locais e um pós-

teste de comparações múltiplas (Tukey), para avaliar entre quais conjuntos de dados essas diferenças existiam.

As análises qualitativas foram conduzidas no Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Peixes Continentais (CEPTA) do ICMBio, em Pirassununga, sob a orientação do Prof. Dr. George Shigueki Yasui e da Dra. Lucia Suárez López.

Já as análises quantitativas foram conduzidas no Laboratório de Microbiologia e Imunologia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Campus de Botucatu, utilizando um protocolo desenvolvido durante este estudo, sob a coordenação do Prof. Dr. Antonio Leão Castilho, Prof. Dr. George Shigueki Yasui, Profa. Dra. Graziela Gorete Romagnoli Castilho e da Dra. Larissa Ragozo Cardoso de Oliveira, além do citômetro de fluxo FACSCanto II (BD Biosciences) dotado de um conjunto de filtros para a leitura e consolidação dos histogramas. A análise de dados do citômetro e construção de gráficos de pontos foram feitos através do software FlowJo, versão vX.10.6 (Tree Stars Inc.).

4.5. Análises ambientais e componentes abióticos

A água dos ambientes foi coletada em galões de plástico, refrigerada e analisada de acordo com os parâmetros do IPMCA Índice de Variáveis Mínimas para a Preservação da Vida Aquática (CETESB 2021) e que leva em consideração a presença e concentração de contaminantes químicos tóxicos (cobre, zinco, chumbo, cromo, mercúrio, níquel, cádmio e surfactantes), seu efeito sobre os organismos aquáticos (toxicidade) e duas das variáveis consideradas essenciais para a biota (pH e oxigênio dissolvido). Os valores foram analisados de acordo com uma tabela de comparação (tabela 1) e para o cálculo do IPMCA foi utilizada a equação:

$$IPMCA = VE \times ST$$

Onde:

VE: valor da maior ponderação do grupo de variáveis essenciais;

ST: valor médio das três maiores ponderações do grupo de substâncias tóxicas.

Este valor é um número inteiro e o critério de arredondamento deve ser o seguinte: valores menores que 0,5 são arredondados para baixo e valores maiores ou iguais a 0,5 para cima. Cada variável do IPMCA é enquadrada em ponderações numéricas de 1 a 3 que correspondem a padrões de qualidade de água estabelecidos pela Resolução CONAMA nº 357/2005 e padrões preconizados pelas legislações americana (USEPA, 1991) e francesa (Code Permanent: Environment et Nuisances, 1986). Esses documentos estabelecem limites máximos permissíveis de substâncias químicas na água para evitar toxicidade crônica e aguda à biota aquática (CETESB, 2021)

Para as análises de metais, foram utilizados 100 mL de água refrigerada de cada um dos locais de coleta. As determinações de cobre, zinco, chumbo, cromo, níquel e cádmio foram feitas por espectrometria de absorção atômica com atomização em forno de grafite, utilizando espectrômetro SHIMADZU AA-6800, equipado com um corretor de absorção de fundo com lâmpada de deutério e sistema auto reverso (SR), tubo pirolítico de grafite com plataforma integrada e amostrador automático ASC-6100. As medidas de absorbâncias dos padrões e amostras foram feitas utilizando lâmpada de cátodo oco Shimadzu e operada com corrente mínima de 12 mA e corrente máxima de 400 mA (corrente utilizada na correção de fundo – BG).

As condições de análises utilizadas foram as seguintes: gás de arraste – argônio ultra puro com vazão constante de 1 L min⁻¹ utilizado durante todo o programa de aquecimento, exceto na etapa de atomização, durante a qual o fluxo de gás foi

interrompido; tubo de grafite pirolítico de grafite com plataforma integrada – revestida com tungstênio atuando como modificador químico permanente; modificador químico coinjectado – foi utilizada uma solução contendo íons Paládio (Pd^{2+}) que atuaram junto com os padrões e/ou via amostrador automático do espectrômetro; programação de temperatura do forno de grafite: Temperatura de Secagem – 90°C , 10 s; 220°C , 10 s; Temperatura de Pirólise – 800°C , 10 s, 1200°C , 10 s; Temperatura de Atomização – 2200°C , 5 s e finalmente, Temperatura de Limpeza – 2400°C , 10 s (Leite et al. 2019).

As determinações de mercúrio foram feitas utilizando o mesmo equipamento, mas com algumas modificações nas condições experimentais: modificador químico coinjectado – foi utilizada solução contendo íons Zr (Zr^{4+}); programação de temperatura do forno de grafite: Temperatura de Secagem – 90°C , 5 s; 120°C , 5 s; Temperatura de Pirólise – 250°C , 5 s, 800°C , 5 s; Temperatura de Atomização – 1600°C , 2 s e Temperatura de Limpeza – 1800°C , 5 s (Bittarello et al. 2020). As leituras de absorbância foram medidas em área de pico.

Para as análises de toxicidade foram utilizados microcrustáceos da espécie *Ceriodaphnia silvestrii* cultivados nas instalações do Núcleo de Ecotoxicologia e Ecologia Aplicada da Universidade de São Paulo (NEEA-USP). O processo de cultivo ocorreu em béqueres de 1 L, cobertos por vidro de relógio, mantidos a 25°C e com fotoperíodo de 12h:12h. Para esse processo, a água utilizada apresentou pH entre 7,0 e 7,6 (pHmetro B374- Micronal) e dureza de 40 a 48 mg CaCO_3 L⁻¹. O meio era renovado três vezes por semana, quando era também feita a alimentação dos organismos através de uma mistura de alga *Raphidocelis subcapitata* cultivada em meio L. C. Oligo ($\sim 6 \times 10^4$ células L⁻¹) e alimento composto (1 mL L⁻¹), contendo leveduras e ração de peixe fermentada. A avaliação da sensibilidade dos organismos foi feita com NaCl como substância de referência, conforme descrito na carta-controle do NEEA-USP.

Os ensaios de ecotoxicidade aguda foram executados seguindo os procedimentos detalhados na norma NBR 13373:2017 (ABNT, 2017). Utilizaram-se recipientes plásticos de 50 mL nos quais foram adicionados 10 mL da amostra, juntamente com cinco organismos neonatos (entre 6 e 24 h de idade). Para cada condição investigada, foram estabelecidas quatro réplicas. A duração do ensaio foi de 48 h, com a temperatura mantida a $25 \pm 2^\circ\text{C}$, sob um ciclo de iluminação de 12 h: 12 h e com luminosidade artificial entre 100 e 1000 lx. O endpoint do ensaio baseou-se na observação da imobilidade dos organismos neonatos, sendo considerada a imobilização como um indicativo de mortalidade. Para garantir a validade do ensaio, foi estabelecido que a mortalidade dos organismos nas amostras de controle deveria ser inferior a 20%.

Os testes de avaliação da toxicidade crônica foram feitos conforme a NBR 13373:2017 (ABNT, 2017), em copos plásticos de 50 mL, com 15 mL de amostra e um organismo neonato adicionado, com cinco réplicas. O teste teve duração de 8 dias, a $25 \pm 2^\circ\text{C}$, com fotoperíodo de 12h:12h, com luminosidade artificial entre 100 e 1000 lx, com adição de ração fermentada (fermento biológico e ração de peixe Tetramin®) e 1×10^5 células mL⁻¹ de cultura de alga *R. subcapitata*. O endpoint de toxicidade crônica foi dado pela reprodução dos organismos, considerando os neonatos gerados nas ninhadas. O ensaio foi considerado válido, pois houve mortalidade inferior a 20% dos organismos presentes nas amostras do controle e número médio de neonatos produzidos por fêmea no controle igual ou maior que quinze (15).

Para as análises de surfactantes foi utilizado o método 5540 C da Standard Methods For the Examination of Water and Wastewater (SMEWW, 2017) para surfactantes aniônicos como Substâncias Ativas do Azul de Metileno (MBAS). Essas substâncias provocam a transferência do azul de metileno, um corante catiônico, de uma solução aquosa para um líquido orgânico imiscível após o equilíbrio. Isso ocorre através

da formação de pares iônicos pelo ânion MBAS e pelo cátion azul de metileno. A intensidade da cor azul resultante na fase orgânica é uma medida de MBAS. O método compreende três extrações sucessivas de meio aquoso ácido contendo excesso de azul de metileno em clorofórmio (CHCl₃), seguidas por uma retrolavagem aquosa e medição da cor azul no CHCl₃ por espectrofotometria a 652 nanômetros.

Na tabela 1, ambientes de nível A indicam águas com características desejáveis para a sobrevivência e reprodução dos organismos aquáticos, atendendo aos padrões de qualidade da Resolução CONAMA n° 357/2005 para águas classes 1 e 2 (destinadas, entre outras funções, à proteção das comunidades aquáticas), com exceção do oxigênio dissolvido para classe 1, cujo valor é $\geq 6,0 \text{ mg L}^{-1} \text{ O}_2$. Os de nível B partilham das mesmas condições, entretanto nestes a reprodução pode ser afetada a longo prazo. Ambientes de nível C indicam características na água que podem comprometer a sobrevivência dos organismos aquáticos (CETESB 2021). Os níveis B e C foram estabelecidos de acordo com os limites obtidos das legislações francesa e americana (CODE PERMANENT: ENVIRONMENT ET NUISANCES, 1986; USEPA, 1991).

Também foi avaliado o IET, Índice do Estado Trófico de Carlson modificado por (Lamparelli 2004), composto pelo Índice de Estado Trófico para o fósforo [IET(PT)] e para a clorofila [IET(CL)], com os valores de fósforo representando o potencial de eutrofização, por ele ser o agente causador do processo, e os valores de clorofila indicando o consequente nível de crescimento das algas (CETESB, 2021). Para o cálculo do IET foram utilizadas as equações:

$$IET (CL) = 10 \times \left(6 - \left(\frac{-0,7 - 0,6 \times (\ln CL)}{2} \right) \right) - 20$$

$$IET (PT) = 10 \times \left(6 - \left(\frac{0,42 - 0,36 \times (\ln PT)}{2} \right) \right) - 20$$

Onde:

PT: concentração de fósforo total medida à superfície da água, em $\mu\text{g.L}^{-1}$;

CL: concentração de clorofila *a* medida à superfície da água, em $\mu\text{g.L}^{-1}$;

ln: logaritmo natural.

Para conseguir o valor final do IET, foi feita uma média aritmética simples, com arredondamento da primeira casa decimal, dos índices de fósforo total e clorofila *a*, seguindo a equação:

$$IET = \left[\frac{IET (PT) + IET (CL)}{2} \right]$$

O valor final do IET foi analisado de acordo com uma tabela de comparação (tabela 2) e depois transposto para valores possíveis de serem utilizados na análise do IVA, Índice de Qualidade das Águas para Proteção da Vida Aquática e de Comunidades Aquáticas (tabela 3).

Tabela 1: Variáveis componentes do IPMCA e suas ponderações (adaptado de CETESB 2021).

Grupos	Variáveis	Níveis	Faixa de variação	Ponderação
Variáveis Essenciais (VE)	OD (mg/L)	A	$\geq 5,0$	1
		B	$3,0 < 5,0$	2
		C	$< 3,0$	3
	pH (Sorensen)	A	6,0 a 9,0	1
		B	$5,0 < 6,0$ e $> 9,0$ a 9,5	2
		C	$< 5,0$ e $> 9,5$	3
	Toxicidade	A	Não Tóxico	1
		B	Efeito Crônico	2
		C	Efeito Agudo	3
Substâncias Tóxicas (ST)	Cádmio (mg/L)	A	$\leq 0,001$	1
		B	$> 0,001$ a 0,005	2
		C	$> 0,005$	3
	Cromo (mg/L)	A	$\leq 0,05$	1
		B	$> 0,05$ a 1,00	2
		C	$> 1,00$	3
	Cobre dissolvido (mg/L)	A	$\leq 0,009$	1
		B	$> 0,009$ a 0,05	2
		C	$> 0,05$	3
	Chumbo Total (mg/L)	A	$\leq 0,01$	1
		B	$> 0,01$ a 0,08	2
		C	$> 0,08$	3
	Mercúrio (mg/L)	A	$\leq 0,0002$	1
		B	$> 0,0002$ a 0,001	2
		C	$> 0,001$	3
	Níquel (mg/L)	A	$\leq 0,025$	1
		B	$> 0,025$ a 0,160	2
		C	$> 0,160$	3
	Surfactantes* (mg/L)	A	$\leq 0,5$	1
		B	$> 0,5$ a 1,0	2
		C	$> 1,0$	3
	Zinco (mg/L)	A	$\leq 0,18$	1
		B	$> 0,18$ a 1,00	2
		C	$> 1,00$	3

* Substâncias tensoativas que reagem com azul de metileno

Tabela 2: Classificação do Estado Trófico para rios segundo Índice de Carlson Modificado (adaptado de CETESB 2021).

Categoria (Estado trófico)	Ponderação	P-total – P (mg.m ⁻³)	Clorofila <i>a</i> (mg.m ⁻³)
Ultraoligotrófico	$IET \leq 47$	$P \leq 13$	$CL \leq 0,74$
Oligotrófico	$47 < IET \leq 52$	$13 < P \leq 35$	$0,74 < CL \leq 1,31$
Mesotrófico	$52 < IET \leq 59$	$35 < P \leq 137$	$1,31 < CL \leq 2,96$
Eutrófico	$59 < IET \leq 63$	$137 < P \leq 296$	$2,96 < CL \leq 4,7$
Supereutrófico	$63 < IET \leq 67$	$296 < P \leq 640$	$4,7 < CL < 7,46$
Hipereutrófico	$IET > 67$	$640 < P$	$7,46 < CL$

Tabela 3: Classificação do IET para cálculo do IVA (adaptado de CETESB 2021).

Categoria (Estado Trófico)	Ponderação
Ultraoligotrófico	0,5
Oligotrófico	1
Mesotrófico	2
Eutrófico	3
Supereutrófico	4
Hipereutrófico	5

O pH, oxigênio dissolvido e concentração de clorofila na água foram medidos através de uma sonda multiparâmetros MANTA 2 da marca Eureka em maio e dezembro de 2023. A presença e concentração dos metais, assim como a concentração de fósforo total foram analisadas pelo Centro de Apoio Químico ao Ensino, à Pesquisa e de Prestação de Serviços (CEAQUIM) da Unesp Campus de Botucatu. A presença e concentração de surfactantes foram analisadas pelo laboratório Controle Analítico e as toxicidades aguda e crônica foram avaliadas pelo Núcleo de Ecotoxicologia e Ecologia Aplicada da USP Campus de São Carlos, utilizando o microcrustáceo *Ceriodaphnia silvestrii* Daday, 1902.

Os resultados obtidos das análises citadas foram comparados com tabelas de valores de referência presentes no Relatório de Qualidade das Águas Interiores do estado de São Paulo (CETESB 2021) para determinação dos níveis de contaminação e o IVA, Índice de Qualidade das Águas para Proteção da Vida Aquática e de Comunidades Aquáticas, foi determinado através da equação: $IVA = (IPMCA \times 1,2) + IET$, com os valores comparados com uma tabela de Classificação do IVA (tabelas 4 e 5).

Tabela 4: Cálculo do IVA integrando os valores do IET com os valores do IPMCA (adaptado de CETESB 2021).

IPMCA						
IET	Ponderação	1	2	3	4	5 a 9
	0,5	1,7	2,9	4,1	5,3	7,7- 11,3
	1	2,2	3,4	4,6	5,8	8,2 – 11,8
	2	3,2	4,4	5,6	6,8	9,2 – 12,8
	3	4,2	5,4	6,6	7,8	10,2 – 13,8
	4	5,2	6,4	7,6	8,8	11,2 – 14,8
	5	6,2	7,4	8,6	9,8	12,2 – 15,8

Tabela 5: Classificação do IVA (adaptado de CETESB 2021).

Categoria	Ponderação
Ótima	$IVA \leq 2,5$
Boa	$2,6 \leq IVA \leq 3,3$
Regular	$3,4 \leq IVA \leq 4,5$
Ruim	$4,6 \leq IVA \leq 6,7$
Péssima	$6,8 \leq IVA$

6. RESULTADOS

5.1. Análises descritivas

Na figura 7 podemos ver imagens obtidas através de microscopia de fluorescência de hemócitos vivos e mortos, sem nenhum tipo de marcação, além dos mesmos hemócitos corados com os marcadores fluorescentes SYBR-14 e Iodeto de propídio. Foram observados três tipos de hemócitos na hemolinfa dos animais: granulócitos, células repletas de pequenos grânulos citoplasmáticos, geralmente com formato de gota e possuindo um núcleo circular não centralizado e pequeno; semigranulócitos, células com uma quantidade menor de grânulos no seu interior, projeções citoplasmáticas e um núcleo ovoide, relativamente grande e não centralizado; e hialinócitos, células de tamanho menor com formato circular, sem presença de grânulos citoplasmáticos e um grande núcleo central e esférico (figura 8). Esses três tipos de hemócitos foram observados na citometria de fluxo, através das análises de tamanho (FSC-A) e granulosidade (SSC-A) (figura 9).

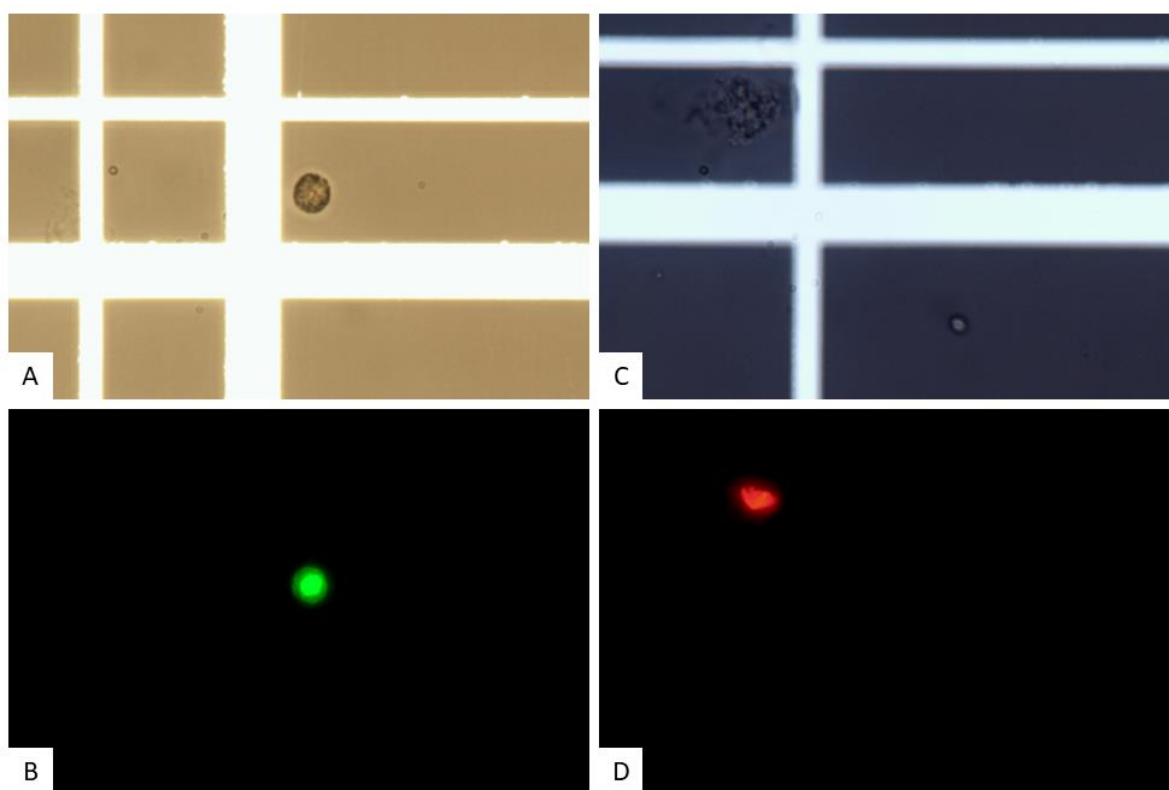


Figura 7. Microscopia de fluorescência dos hemócitos da hemolinfa de espécimes de *Aegla* sp. coletados em Avaré - SP. A: Célula viva. B: Mesma célula marcada com SYBR-14. C: Célula morta. D: Mesma célula marcada com Iodeto de Propídio.

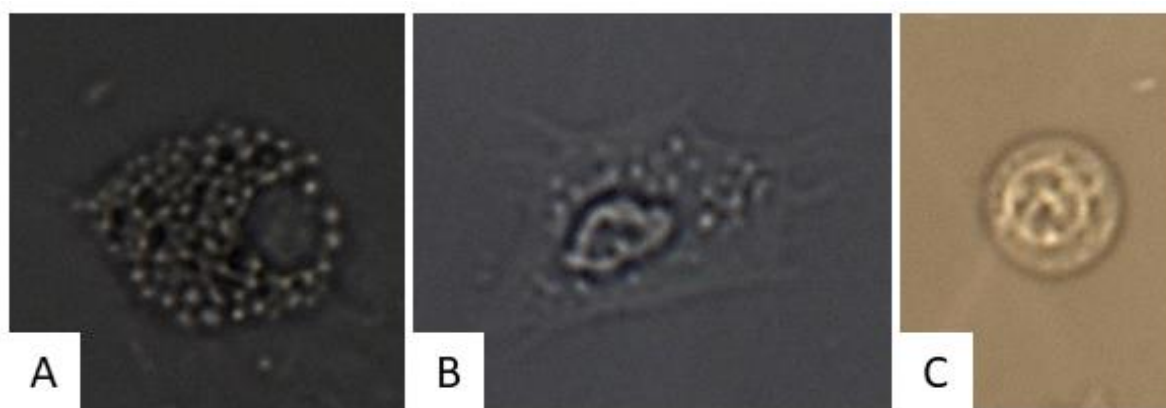


Figura 8. Hemócitos encontrados na hemolinfa de espécimes de *Aegla* sp. coletados em Avaré - SP. A: Granulócito. B: Semigranulócito. C: Hialinócito.

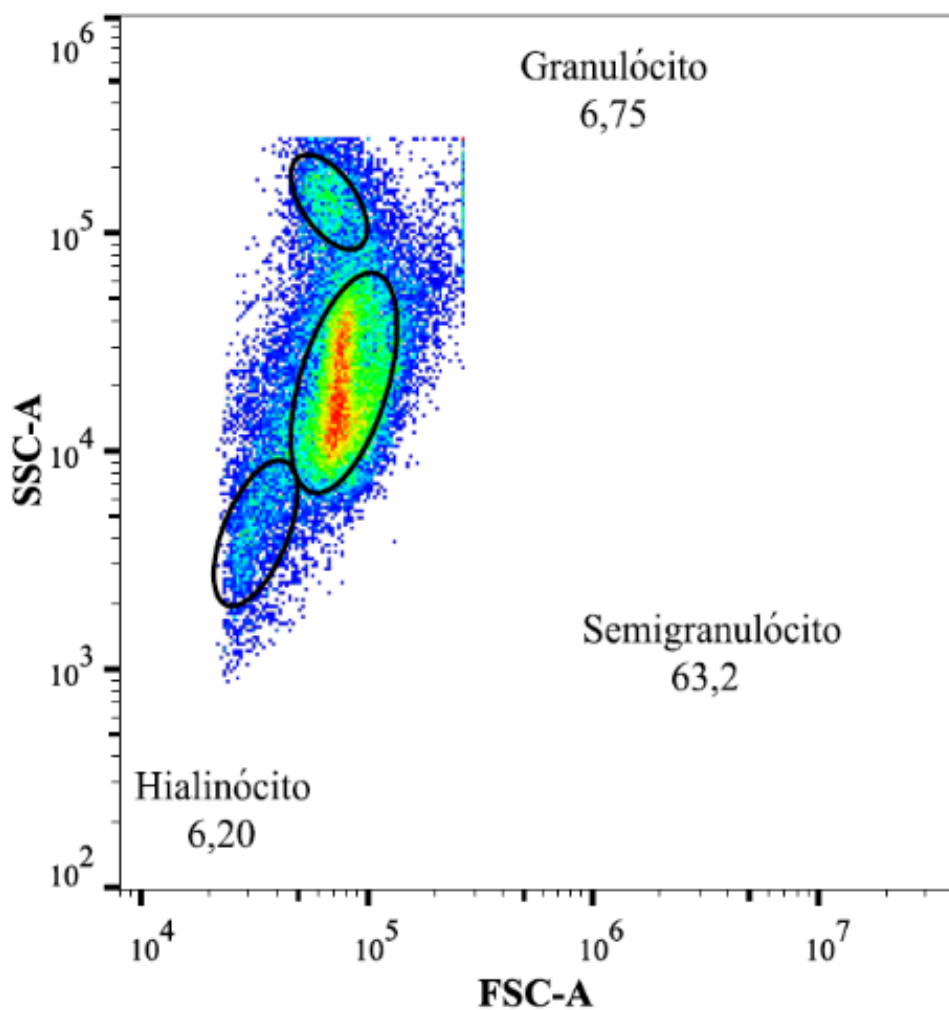


Figura 9. Gráfico de pontos dos 3 tipos de hemócitos de *Aegla* sp. coletada no Riacho Pedra Preta em Avaré - SP. O eixo FSC-A (forward scatter height) representa o tamanho celular, enquanto o eixo SSC-A (size scatter height) representa a granulosidade.

5.2. Análises quantitativas

Foram analisados:

- 9 espécimes de *Aegla castro* obtidos do Rio Iapó em Castro – PR, 7 machos, 1 fêmea e 1 fêmea ovígera, com o comprimento da carapaça variando entre 14,9 mm e 26,3 mm;

- 19 espécimes de *Aegla* sp. obtidos do Salto Puxa Nervos em Tibagi – PR, sendo 15 machos, 3 fêmeas e 1 fêmea ovígera e com o comprimento da carapaça variando entre 14,7 mm e 25,2 mm;
- 18 espécimes de *Aegla* sp. obtidos do Riacho Pedra Preta em Avaré – SP, todos machos e com o comprimento de carapaça variando entre 14,2 mm e 22,4 mm.

A hemolinfa de um animal de cada um dos locais de coleta foi utilizada como controle de morte para a citometria de fluxo.

As taxas de apoptose inicial, final e necrose calculadas através de gráficos de pontos de hemócitos marcados com Anexina V-FITC e Iodeto de Propídio, foram representadas pelos hemócitos nos quadrantes B, C e D (figura 10). Os espécimes de *Aegla castro* coletados em Castro - PR apresentaram uma média de 27,16% de taxa de apoptose + necrose (soma das porcentagens dos quadrantes B, C e D); *Aegla* sp. coletada em Tibagi - PR apresentou um valor de 34,43% e *Aegla* sp. coletada em Avaré – SP, 42,35% (figura 10).

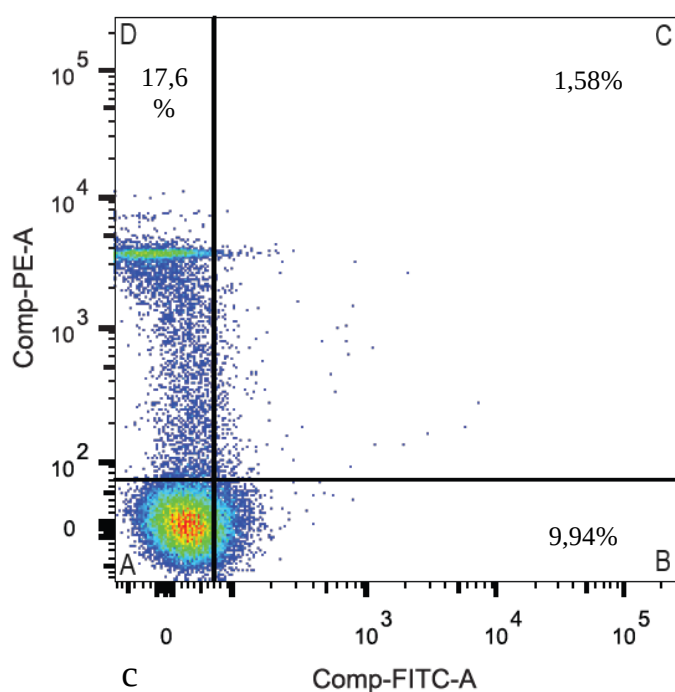
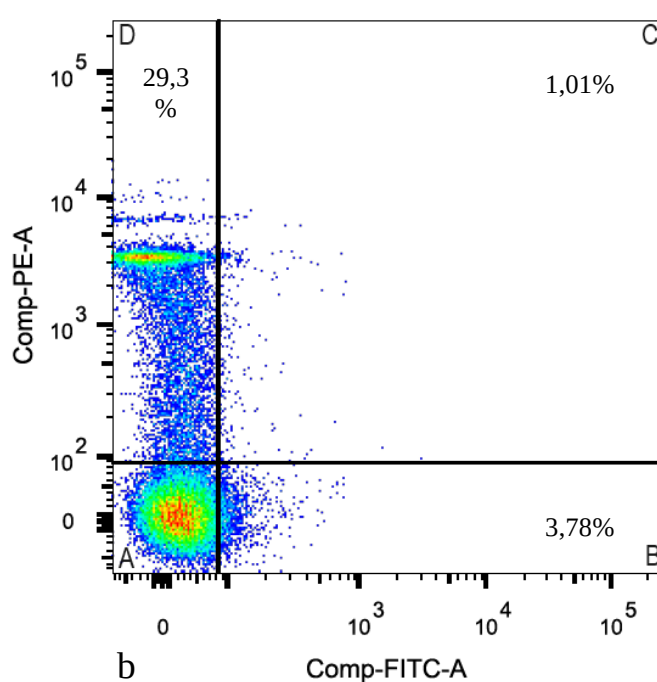
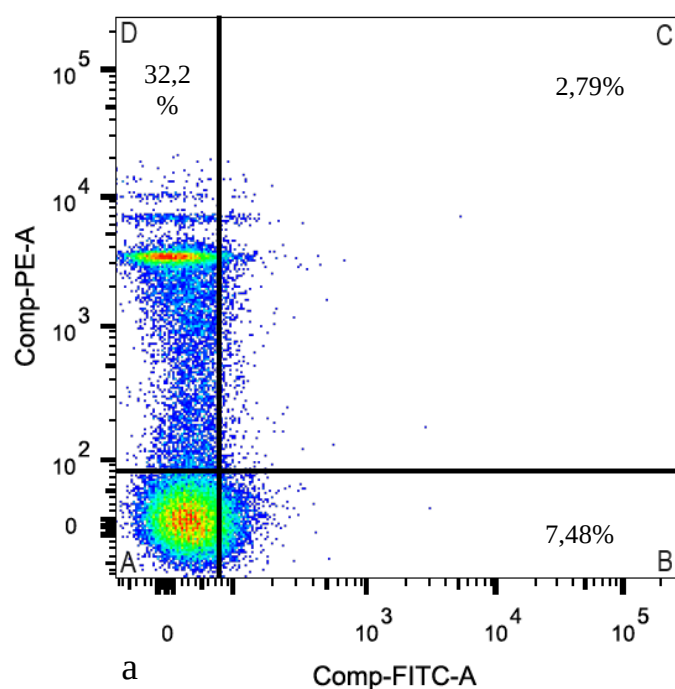


Figura 10. Análise de citometria dos hemócitos dos espécimes de *Aegla* spp. coletados, marcados com Anexina V-FITC (Comp-FITC-A) e Iodeto de Propídio (Comp-PE-A) e as respectivas porcentagens de células em cada quadrante. **a:** *Aegla* sp. de Avaré/SP. **b:** *Aegla* sp. de Tibagi/PR. **c:** *Aegla castro* de Castro/PR. Células vivas (FITC-A-/PE-A-) estão no quadrante A; células em estágios iniciais de apoptose (FITC-A+/PE-A-), no quadrante B; células em estágios finais de apoptose (FITC-A+/PE-A+), no quadrante C e células em necrose (FITC-A-/PE-A+), no quadrante D.

Os dados de taxa de apoptose foram testados quanto a sua normalidade através do Teste de Shapiro-Wilk e apresentaram uma distribuição normal com valor de $p = 0,35$. Para testar a homoscedasticidade foi utilizado o Teste de Levene, determinando dados paramétricos com valor de $p = 0,40$. Foi feita então uma análise de variância (ANOVA) que demonstrou diferenças entre os conjuntos de dados analisados dos 3 locais de coleta (Avaré, Salto Puxa Nervos e Castro), com valor de $p < 0,05$ e um pós-teste de comparações múltiplas (Tukey), indicando similaridade entre as taxas de apoptose dos animais coletados em Avaré e no Salto Puxa Nervos ($p > 0,05$); semelhança entre Castro e Salto Puxa Nervos ($p > 0,05$) e diferença entre Avaré e Castro ($p < 0,05$) (figura 11).

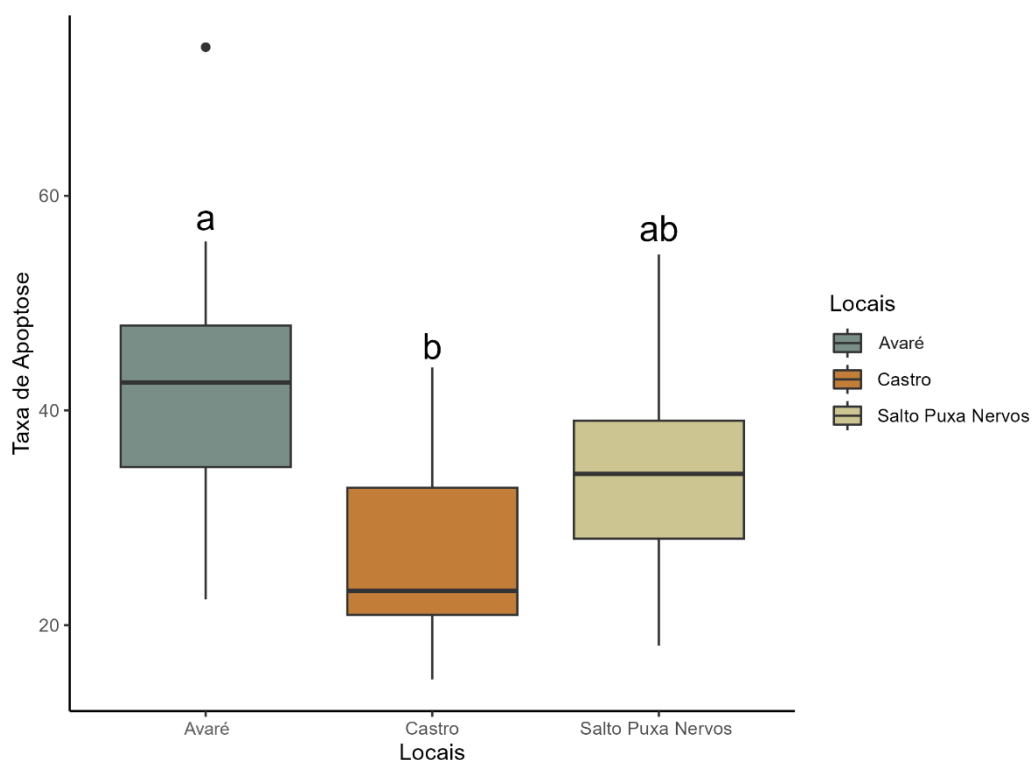


Figura 11. Boxplot representando a taxa de apoptose dos espécimes de Avaré, Castro e Salto Puxa Nervos. As linhas horizontais em negrito dentro das caixas representam as medianas, ou seja, o valor central entre as medidas, com 50% delas sendo maiores ou menores do que ele; a parte superior das caixas representa o limite de 75% dos valores e a parte inferior, de 25%. Os valores máximos e mínimos encontrados são representados pelas linhas verticais ligadas às caixas e o ponto acima da caixa de Avaré representa um outlier. A distribuição indica uma diferença entre as taxas de apoptose de Avaré (a) e Castro (b) e semelhanças tanto entre as taxas de apoptose de Avaré (a) e Salto Puxa Nervos (ab), quanto entre Castro (b) e Salto Puxa Nervos (ab). Letras iguais indicam semelhança enquanto letras diferentes indicam diferença entre os conjuntos de dados.

5.3. Análises ambientais e componentes abióticos

Os parâmetros ambientais do IPMCA foram compilados em uma tabela em que estão presentes os resultados dos 3 pontos de coleta (tabela 6). As concentrações foram comparadas com os valores de referência da tabela 1 para determinação das ponderações. Para os valores de OD, toxicidade e substâncias tóxicas, com exceção do Cromo, todos os ambientes apresentaram ponderação 1. No caso do Cromo, todos os ambientes apresentaram ponderação 2. Para pH, Tibagi e Castro apresentaram ponderação 2, enquanto Avaré apresentou ponderação 3.

Tabela 6: Descrição dos parâmetros de água do IPMCA (Índice de Variáveis Mínimas para a Preservação da Vida Aquática) analisados para a determinação do IVA de cada um dos ambientes.

Fatores abióticos	Avaré	Tibagi	Castro
OD (mg/L)	9,2	8,3	5,5
pH (Sorensen)	4,9	5,0	5,1
Toxicidade	Não tóxico	Não tóxico	Não tóxico
Cádmio (mg/L)	n.d.	n.d.	n.d.
Cromo (mg/L)	0,1683	0,0922	0,1483
Cobre dissolvido (mg/L)	0,0064	0,0048	0,0037
Chumbo Total (mg/L)	n.d.	n.d.	n.d.
Mercúrio (mg/L)	n.d.	n.d.	n.d.
Níquel (mg/L)	0,0038	0,0037	0,0038
Surfactantes (mg/L)	< 0,01	< 0,01	< 0,01
Zinco (mg/L)	0,1028	0,0644	0,1097

n.d. não detectado

Os parâmetros ambientais do IET também foram organizados em uma tabela composta pelos resultados dos 3 ambientes de coleta (tabela 7) com o ajuste de suas ponderações de acordo com a tabela 3 para a adequação ao cálculo do IVA.

Tabela 7: Descrição dos parâmetros de água do IET (Índice do Estado Trófico) analisados para a determinação do IVA de cada um dos ambientes.

Locais	Clorofila <i>a</i> µg/L	Fósforo total µg/L	IET clorofila <i>a</i>	IET fósforo	IET total	Ponderação
Avaré	0,621	179,53	45,97	60,90	53	2
Salto Puxa Nervos	0,72	414,1	47,26	65,24	56	2
Castro	1,41	351,3	53,07	64,38	59	2

Os valores obtidos para o IVA foram de 5,6 para o Riacho Pedra Preta em Avaré – SP, classificando-o como um ambiente ruim; 4,4 para o Salto Puxa Nervos em Tibagi - PR, classificando-o como regular; e 4,4 para o Rio Iapó em Castro - PR, também regular. Para a determinação desses valores, foi utilizada a tabela 4 e os resultados foram comparados com a tabela 5 para a determinação da qualidade ambiental.

7. DISCUSSÃO

Foram encontrados os 3 tipos de hemócitos habitualmente encontrados em decápodes (granulócitos, semigranulócitos e hialinócitos) e as taxas de apoptose variaram nas espécies dos diferentes ambientes. A figura 11 apontou diferenças significativas nas taxas de apoptose dos espécimes coletados em Avaré – SP, que apresentam os maiores valores de morte celular, quando comparados com os de Castro - PR, que apresentam os menores valores. Já as taxas de apoptose nos espécimes de Tibagi – PR apresentam semelhanças tanto com Avaré, quanto com Castro, constituindo valores intermediários entre os dois locais. Duas das variáveis essenciais que compõem o IVA, o Oxigênio Dissolvido e a Toxicidade, indicaram condições desejáveis para a sobrevivência dos organismos aquáticos nos três locais analisados, no entanto, a variável pH obteve classificação de nível B em Castro e no Salto Puxa Nervos e nível C em Avaré.

A família Aeglidae é considerada uma boa indicadora de qualidade ambiental (Bond-Buckup et al. 2010) por conta de seu papel na ciclagem de nutrientes de matéria orgânica em ambientes de água doce (Cogo e Santos 2013), além de alta demanda por oxigênio dissolvido (Dalosto e Santos 2011), uma condição contemplada nos ambientes estudados, apesar dos níveis consideravelmente mais baixos em Castro (próximos do nível B), o que poderia ter relação com a menor abundância de espécimes encontrados no local. No entanto, níveis de pH ligeiramente ácidos (entre 6,2 e 6,6) se mostraram desfavoráveis à presença de *Aegla rostrata* Jara, 1977, uma espécie chilena (Correa-Araneda et al. 2010). Embora a existência de espécimes de *Aegla* sp. tenha sido confirmada no Riacho Pedra Preta, em Avaré, os espécimes dessa região apresentaram as maiores taxas de apoptose, o que poderia estar relacionado aos baixos valores de pH (média de 4,9).

Valores de pH ácidos apareceram como fator limitante em crustáceos, sendo prejudiciais a distribuição de anfípodes (Stephenson e Mackie, 1986; Taylor et al. 1994), sobrevivência, crescimento e desenvolvimento do exoesqueleto em *Macrobrachium rosenbergii* (Kawamura et al. 2015) e crescimento e reprodução em *Heterocypris incongruens* (Ramdohr, 1808). Devido à baixa concentração de carbonato de cálcio (CaCO_3), um dos principais constituintes do exoesqueleto dos crustáceos, em água doce, os animais presentes nestes ambientes dependem das concentrações de cálcio (Ca^{2+}) e bicarbonato (HCO_3^-) na água circundante para formar este envoltório (Whiteley, 2011; Kim et al. 2015). A reação entre esses dois elementos, capaz de formar o CaCO_3 é denominada calcificação e depende de um meio alcalino para acontecer (Wood e Cameron, 1985), com pHs ácidos diminuindo as concentrações desses compostos.

Alguns poluentes, como o sulfureto, o cobre e o nitrito podem interferir na contagem total de hemócitos (THC), fazendo-a diminuir, uma vez que eles começam a

entrar em apoptose, situação que, aliada ao possível comprometimento do sistema profenoloxidase, faz com que os animais possam ficar mais suscetíveis a infecções (Cheng et al. 2007; Xian et al. 2010, 2011, 2012; Guo et al. 2013, 2017). Os resultados da análise da presença e concentração de substâncias tóxicas na água, no entanto, indicaram que os 3 ambientes se enquadram no Nível de contaminação A para todas elas, com exceção do cromo, para o qual se enquadram no Nível B. Além disso não foi reportada toxicidade das amostras de água para os organismos nela viventes, de forma que para esses parâmetros, as águas apresentam condições desejáveis para a sobrevivência dos organismos aquáticos.

Foram analisados machos e fêmeas, entretanto, a diferença entre os sexos não foi reportada como uma causadora de alterações nas contagens totais de hemócitos (THC), como observaram Cheng & Chen (2001, 2002) ao não encontrarem diferenças no THC entre machos e fêmeas de *Macrobrachium rosenbergii* (De Man, 1879) e Sawyer et al. (1970), em *Callinectes sapidus* Rathbun, 1896. Os estudos sobre taxa de apoptose também não discriminam sexos nos espécimes analisados (Xian et al. 2010, 2011, 2012, 2021; Zhou et al. 2017; Guo et al. 2013, 2017).

Os níveis de fósforo total na água também foram um ponto de destaque, visto que todos os pontos apresentaram concentrações eutróficas ou até supereutróficas. A eutrofização é um problema de escala global, por conta de seu envolvimento com a utilização de fertilizantes à base de nitrogênio e fósforo na agricultura e agropecuária e o despejo destes nas águas de rios (Howarth et al. 2002; Mainstone e Parr 2002), o que poderia ser a razão dos valores encontrados para o fósforo, visto que os 3 locais analisados possuíam estoques de gado nos seus arredores. Com o fósforo servindo como nutriente, o fitoplâncton, assim como algas e plantas aquáticas crescem a uma taxa maior do que a normal, de forma a bloquear a luz solar, impedindo a fotossíntese abaixo da superfície

(Khan e Ansari 2005). Além disso, ao morrerem, essas plantas e algas são decompostas por bactérias que utilizam o oxigênio dissolvido na água para realizarem esse processo, diminuindo ainda mais seus níveis (Khan e Ansari 2005).

Em rios e riachos rasos, no entanto, o processo de eutrofização é mais difícil de se estabelecer, pois a luz ainda consegue atingir as camadas mais profundas, além da constante movimentação da água auxiliar na difusão do oxigênio atmosférico para a água (Dodds 2006). Embora os níveis de fósforo estivessem altos em todos os ambientes analisados, as taxas de oxigênio dissolvido se mostraram ótimas em todos eles. Além disso, num corpo de água em que a eutrofização ainda não esteja estabelecida, os níveis de clorofila *a* não coincidem com os níveis de fósforo, indicando um estado melhor do que o refletido pelo fósforo, como indicado na tabela 7 em comparação com a tabela 2 (CETESB 2021). Apesar disso, Castro se classificou como um ambiente mesotrófico muito próximo de eutrófico, o que aliado a circulação de água mais baixa do que nos outros 2 locais, poderia explicar as menores taxas de oxigênio dissolvido observadas.

Além das diferenças ambientais, há também a diferença de táxons tratados, uma vez que foram coletadas possivelmente três espécies distintas: *Aegla castro* no Rio Iapó em Castro – PR, uma espécie ainda não definida de *Aegla* sp. no Salto Puxa Nervos em Tibagi – Pr, e outra espécie de *Aegla* sp. nas mesmas condições no Riacho Pedra Preta, em Avaré – SP. Embora em termos morfológicos os eglídeos apresentem um morfotipo geral relativamente conservador, de forma que o design corpóreo das espécies seja muito semelhante (Jara et al. 2003), é possível que cada uma apresente características fisiológicas particulares, podendo essa também ser uma razão para as diferentes taxas de apoptose encontradas.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Concluindo, foram observados os três tipos celulares habitualmente encontrados para hemócitos em decápodes e, embora as análises de água demonstrem uma “fotografia” do ambiente no momento da retirada da água e não um panorama completo anual, os quadros encontrados com relação ao IVA das amostras parecem refletir as diferentes taxas de apoptose observadas nos espécimes coletados. Foi encontrada uma média menor de hemócitos em apoptose tanto no Rio Iapó, em Castro – PR, quanto no Salto Puxa Nervos – PR, ambientes em melhores condições ambientais do que Avaré – SP, onde foi encontrada uma média maior de apoptose.

Embora diversos fatores, tais como: pHs ácidos, menores concentrações de oxigênio dissolvido e possíveis diferenças imunológicas entre espécies do gênero *Aegla*, possam influenciar nas diferentes taxas de apoptose de hemócitos, bem como na abundância de espécimes encontrados nos ambientes de coleta, este estudo demonstra que mesmo em um local com maior abundância de indivíduos, como é o caso de Avaré, os espécimes podem não estar tão saudáveis, com uma alta taxa de apoptose de hemócitos. Esta seria mais uma possível maneira de medir o nível de estresse dos crustáceos, de forma a integrar e complementar os atuais métodos utilizados para avaliar o status de conservação desses animais.

9. REFERÊNCIAS

ABNT, 2017. Associação Brasileira de Normas Técnicas. Ecotoxicologia aquática Toxicidade crônica — Método de ensaio com *Ceriodaphnia* spp. (Crustacea, Cladocera). NBR13373.

- Bajgelman MC (2019) Principles and applications of flow cytometry. In: Data Processing Handbook for Complex Biological Data Sources. Elsevier, pp 119–124
- Bauchau AF (1981) Crustaceans. In: Invertebrate Haemocytes. Academic Press.
- Balian E v, Segers H, Lévêque C, Martens K (2008) The Freshwater Animal Diversity Assessment: An overview of the results. *Hydrobiologia* 595:627–637. <https://doi.org/10.1007/s10750-007-9246-3>
- Bandeira PT, Vernal J, Matos GM, et al (2020) A Type IIa crustin from the pink shrimp *Farfantepenaeus paulensis* (crusFpau) is constitutively synthesized and stored by specific granule-containing hemocyte subpopulations. *Fish Shellfish Immunol* 97:294–299. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.12.055>
- Bittarello AC, Vieira JCS, Braga CP et al (2020). Metalloproteomic approach of mercury-binding proteins in liver and kidney tissues of *Plagioscion squamosissimus* (corvina) and *Colossoma macropomum* (tambaqui) from Amazon region: Possible identification of mercury contamination biomarkers. *Science of The Total Environment* 711:134547. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134547>
- Bond-Buckup G, Jara CG, Buckup L, et al (2010) New species and new records of endemic freshwater crabs from the atlantic forest in southern brazil (Anomura: Aeglidae). *Journal of Crustacean Biology* 30:495–502. <https://doi.org/10.1651/09-3186.1>
- Borges ACP, Piassão JFG, Albani SM, et al (2022) Multiple metals and agricultural use affects oxidative stress biomarkers in freshwater *Aegla* crabs. *Brazilian Journal of Biology* 82:e230147. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.230147>
- Braga KM da S, Pimenta V de SC, Rodrigues FA, et al (2016) CITOMETRIA DE FLUXO: HISTÓRICO, PRINCÍPIOS BÁSICOS E APLICAÇÕES EM PESQUISA. *Enciclopédia Biosfera* 13:304–319. https://doi.org/10.18677/enciclopedia_biosfera_2016_027

- Brasil. Ministério do Meio Ambiente (MMA). Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA). Resolução CONAMA N° 357, de 17/03/2005.
- Bueno SL de S, Wolf MR, Shimizu RM (2021) Reassessing the current conservation status of the freshwater aeglid, *Aegla jaragua* Moraes, Tavares and Bueno, 2016 (Decapoda: Anomura: Aeglidae) as critically endangered a ten-year case study. In: Recent Advances in Freshwater Crustacean Biodiversity and Conservation. CRC Press, pp 347-374.
- Bueno SL de S, Shimizu RM, Moraes JCB (2016) A remarkable anomuran: The taxon *Aegla* Leach, 1820. Taxonomic remarks, distribution, biology, diversity and conservation. In: A Global Overview of the Conservation of Freshwater Decapod Crustaceans. Springer International Publishing, pp 23–64
- Bueno SLS, Shimizu RM, da Rocha SS (2007) ESTIMATING THE POPULATION SIZE OF *Aegla Franca* (DECAPODA: ANOMURA: AEGLIDAE) BY MARK-RECAPTURE TECHNIQUE FROM AN ISOLATED SECTION OF BARRO PRETO STREAM, COUNTY OF CLARAVAL, STATE OF MINAS GERAIS, SOUTHEASTERN BRAZIL. JOURNAL OF CRUSTACEAN BIOLOGY 27:553–559
- Capparelli M v., Abessa DM, McNamara JC (2016) Effects of metal contamination *in situ* on osmoregulation and oxygen consumption in the mudflat fiddler crab *Uca rapax* (Ocypodidae, Brachyura). Comparative Biochemistry and Physiology Part – C: Toxicology and Pharmacology 185–186:102–111. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2016.03.004>
- Cárdenas W, Jenkins JA, Dankert JR (2000) A flow cytometric approach to the study of crustacean cellular immunity. J Invertebr Pathol 76:112–119. <https://doi.org/10.1006/jipa.2000.4960>
- Cau A, Avio CG, Dessì C, et al (2020) Benthic Crustacean Digestion Can Modulate the Environmental Fate of Microplastics in the Deep Sea. Environ Sci Technol 54:4886–4892. <https://doi.org/10.1021/acs.est.9b07705>

CETESB (2021) Qualidade das águas interiores no estado de São Paulo 2021: Apêndice E Índices de Qualidade das Águas

Cheng SY, Hsu SW, Chen JC (2007) Effect of sulfide on the immune response and susceptibility to *Vibrio alginolyticus* in the kuruma shrimp *Marsupenaeus japonicus*. Fish Shellfish Immunol 22:16–26. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2006.03.008>

Cheng W, Chen JC (2001) Effects of intrinsic and extrinsic factors on the haemocyte profile of the prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. Fish Shellfish Immunol 11:53-63. <https://doi.org/10.1006/fsim.2000.0293>

Cheng W, Chen JC (2002) Effects of environmental factors on the immune responses of freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* and other decapod crustaceans. Journal of the Fisheries Society of Taiwan 29:1-19.

CODE PERMANENT: Environment et Nuisances. Editions Legislatives et Administratives. Paris, França. Vol 1 e 2. 1784p.

Cogo GB, Biasi C, Severo ES, et al (2018) Environmental warming induces behavioral and metabolic changes in a freshwater crustacean - Aeglids as a model organism. Ann Limnol 54:1-7. <https://doi.org/10.1051/limn/2017032>

Cogo GB, Santos S (2013) The role of aeglids in shredding organic matter in neotropical streams. Journal of Crustacean Biology 33:519–526. <https://doi.org/10.1163/1937240x-00002165>

Correa-Araneda F, Contreras A, De Los Ríos P (2010) Amphipoda and Decapoda as potential bioindicators of water quality in an urban stream (38°S, Temuco, Chile). Crustaceana 83:897–902. <https://doi.org/10.1163/001121610X502948>

Crump A, Mullens C, Bethell EJ, et al (2020) Microplastics disrupt hermit crab shell selection. Biol Lett 16:20200030. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2020.0030>

- da Silva AR, Wolf MR, Castilho AL (2016) Reproduction, growth and longevity of the endemic South American crab *Aegla marginata* (Decapoda: Anomura: Aeglidae). *Invertebr Reprod Dev* 60:59–72. <https://doi.org/10.1080/07924259.2016.1140088>
- Dalosto M, Santos S (2011) Differences in oxygen consumption and diel activity as adaptations related to microhabitat in Neotropical freshwater decapods (Crustacea). *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology* 160:461–466. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2011.07.026>
- De Almeida KCR, Moreira JMNC, Páez FP, et al (2021) Natural diet of the endemic freshwater crab *Aegla castro* Schmitt, 1942 (Decapoda: Anomura: Aeglidae). *Journal of Crustacean Biology* 41:1-6. <https://doi.org/10.1093/jcbiol/ruab015>
- Denadai AC, Costa VE, Wolf MR, et al (2022) Isotopic signature and the trophic interactions of *Aegla castro* Schmitt, 1942 (Crustacea: Anomura: Aeglidae). *Nauplius* 30:e2022024. <https://doi.org/10.1590/2358-2936e2022024>
- Dodds WK (2006) Eutrophication and trophic state in rivers and streams. *Limnol Oceanogr* 51:671–680. https://doi.org/10.4319/lo.2006.51.1_part_2.0671
- Dudgeon D, Arthington AH, Gessner MO, et al (2006) Freshwater biodiversity: Importance, threats, status and conservation challenges. *Biol Rev Camb Philos Soc* 81:163–182. <https://doi.org/10.1017/S1464793105006950>
- Fasolo PJ, Carvalho AP, Potter RO, et al (2002) Caracterização dos Solos do Município de Castro, PR. Rio de Janeiro
- Galhardas MJD (2014) Contribuição para o estudo da Anexina V na Apoptose celular em Concentrados de Eritrócitos. Universidade Atlântica
- Gollas-Galván T, Hernández-López J, Vargas-Albores F (1997) Effect of Calcium on the Prophenoloxidase System Activation of the Brown Shrimp (*Penaeus californiensis*, Holmes). *Biochem Physiol* 117:419–425

- Grabowski RC, Santos S, Castilho AL (2013) Reproductive ecology and size of sexual maturity in the anomuran crab *Aegla parana* (Decapoda: Aeglidae). *Journal of Crustacean Biology* 33:332–338. <https://doi.org/10.1163/1937240X-00002148>
- Grivicich I, Regner A, da Rocha AB (2007) Morte Celular por Apoptose. *Revista Brasileira de Cancerologia* 53:335–343
- Grubhoffer L, Rudenko N, Vancova M, et al (2013) Circulatory system and hemolymph. In: *Biology of Ticks*. pp 258–286
- Guisse S de, Morsey B, Maratea J, et al (2005) Development of assays to evaluate cellular immune functions in the American lobster (*Homarus americanus*). *J Shellfish Res* 24:705–711. [https://doi.org/10.2983/0730-8000\(2005\)24\[705:DOATEC\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.2983/0730-8000(2005)24[705:DOATEC]2.0.CO;2)
- Guo H, Li K, Wang W, et al (2017) Effects of Copper on Hemocyte Apoptosis, ROS Production, and Gene Expression in White Shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Biol Trace Elem Res* 179:318–326. <https://doi.org/10.1007/s12011-017-0974-6>
- Guo H, Xian JA, Li B, et al (2013) Gene expression of apoptosis-related genes, stress protein and antioxidant enzymes in hemocytes of white shrimp *Litopenaeus vannamei* under nitrite stress. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology* 157:366–371. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2013.03.001>
- Hengartner MO (2000) The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407:770–776
- Howarth RW, Sharpley A, Walker D (2002) Sources of Nutrient Pollution to Coastal Waters in the United States: Implications for Achieving Coastal Water Quality Goals. *Estuaries* 25:656–676
- ICMBio (2023). Sistema de Avaliação do Risco de Extinção da Biodiversidade – SALVE. Disponível em: <https://salve.icmbio.gov.br/>
- ICMBIO/MMA (2018) Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção Volume I, 1 ed. Brasília

- IUCN (2023) Background & History. Disponível em: <https://www.iucnredlist.org/>
- IUCN Standards and Petitions Committee (2022) Guidelines for Using the IUCN Red List Categories and Criteria
- Jara CG, Perez-Losada M, Crandall KA (2003) A new species of freshwater anomuran crab of the genus *Aegla* Leach, 1821 (Crustacea: Decapoda: Aeglidae) from the Nahuelbuta Coastal Range, Chile. PROCEEDINGS OF THE BIOLOGICAL SOCIETY OF WASHINGTON 116:933–942
- Johansson MW, Keyser P, Sritunyalucksana K, Söderhäll K (2000) Crustacean haemocytes and haematopoiesis. Aquaculture 191:45–52
- Kawamura G, Bagarinao T, Yong ASK, Chen CY, Noor SNM, Lim LS (2015) Low pH Affects Survival, Growth, Size Distribution, and Carapace Quality of the Postlarvae and Early Juveniles of the Freshwater Prawn *Macrobrachium rosenbergii* de Man. Ocean Science Journal 50:371-379. <http://dx.doi.org/10.1007/s12601-015-0034-0>
- Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR (1972) APOPTOSIS: A BASIC BIOLOGICAL PHENOMENON WITH WIDE-RANGING IMPLICATIONS IN TISSUE KINETICS. Br J Cancer 26:239–257
- Khan FA, Ansari AA (2005) Eutrophication: An Ecological Vision. Botanical Review 71:449–482
- Kim Y, Mo Hh, Son J, Lee YS, Lee SE, Cho K (2015) Interactive effects of water pH and hardness levels on the growth and reproduction of *Heterocypris incongruens* (Crustacea: Ostracoda). Hydrobiologia 753:97-109. <https://doi.org/10.1007/s10750-015-2199-z>
- Kobayashi M, Johansson MW, Söderhäll K (1990) The 76 kD cell-adhesion factor from crayfish haemocytes promotes encapsulation in vitro. Cell Tissue Res 260:13–18
- Lamparelli MC (2004) Grau de trofia em corpos d’água do Estado de São Paulo: avaliação dos métodos de monitoramento. Instituto de Biociências - Universidade de São Paulo

- Leite LAR, Januário FF, Padilha PM, do Livramento ETC, Azevedo RK, Abdallah VD (2019). Heavy Metal Accumulation in the Intestinal Tapeworm *Proteocephalus macrophallus* Infecting the Butterfly Peacock Bass (*Cichla ocellaris*), from Southeastern Brazil. Bull Environ Contam Toxicol 103: 670–675. <https://doi.org/10.1007/s00128-019-02704-z>
- le Moullac G, Haffner P (2000) Environmental factors affecting immune responses in Crustacea. Aquaculture 191:121–131
- Mainstone CP, Parr W (2002) Phosphorus in rivers ecology and management. Sci Total Environ 282–283:25–47
- Marçal IC, Páez FP, Da Silva PF, et al (2021b) Cryptic diversity among populations of *Aegla* Leach, 1820 (Decapoda: Anomura: Aeglidae) from Tibagi River basin, Paraná state, Brazil, with descriptions of three new species. J Nat Hist 55:2145–2171. <https://doi.org/10.1080/00222933.2021.1984599>
- Marçal IC, Páez FP, Souza-Shibatta L, et al (2021a) *Aegla buenoi*. sp. (Decapoda: Anomura): first record of aeglid crab from Cinzas River basin, Brazil. Zootaxa 5005:291–303. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.5005.3.4>
- Marçal IC, Páez FP, Souza-Shibatta L, et al (2020) Taxonomic revision of *Aegla lata* Bond-Buckup & buckup, 1994 (Decapoda: Anomura: Aeglidae), with the description of a new species of *Aegla* Leach, 1820 from the Upper Paraná Ecoregion, Brazil. Journal of Crustacean Biology 40:425–434. <https://doi.org/10.1093/jcbiol/ruaa024>
- Martin JW, Abele LG (1986) Phylogenetic Relationships of the Genus *Aegla* (Decapoda: Anomura: Aeglidae), with Comments on Anomuran Phylogeny. Journal of Crustacean Biology 6:576–616
- Mateos-Cárdenas A, O'Halloran J, van Pelt FNAM, Jansen MAK (2020) Rapid fragmentation of microplastics by the freshwater amphipod *Gammarus duebeni* (Lillj.). Sci Rep 10:12799. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-69635-2>

- Matozzo V, Marin MG (2010) First cytochemical study of haemocytes from the crab *Carcinus aestuarii* (Crustacea, Decapoda). *European Journal of Histochemistry* 54:44–49.
<https://doi.org/10.4081/ejh.2010.e9>
- MMA (2014) Fauna brasileira ameaçada de extinção
- Moret Y, Rigaud T, Motreuil S, et al (2010) Condition-dependent ecdysis and immunocompetence in the amphipod crustacean, *Gammarus pulex*. *Biol Lett* 6:788–791.
<https://doi.org/10.1098/rsbl.2010.0234>
- Páez FP, Marçal IC, Souza-Shibatta L, Gregati RA, Sofia SH, Teixeira GM (2018) A new species of *Aegla* Leach, 1820 (Crustacea, Anomura) from the Iguaçu River basin, Brazil. *Zootaxa* 4527:335–346. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4527.3.3>
- Peres MB, Vercillo EU, Dias BFS (2011) Avaliação do Estado de Conservação da Fauna Brasileira e a Lista de Espécies Ameaçadas: o que significa, qual sua importância, como fazer? *Biodiversidade Brasileira* 45–48
- Pérez-Losada M, Bond-Buckup G, Jara CG, Crandall KA (2004) Molecular systematics and biogeography of the southern South American freshwater “crabs” *Aegla* (Decapoda: Anomura: Aeglididae) using multiple heuristic tree search approaches. *Syst Biol* 53:767–780.
<https://doi.org/10.1080/10635150490522331>
- Piassão JFG, Gasparin BR, Martins MC, et al (2019) ANÁLISE DA BIOACUMULAÇÃO DE METAIS E BIOMARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO EM CRUSTÁCEOS DO GÊNERO AEGLA (CRUSTACEA, ANOMURA). *Perspectiva* 43:111–122
- Ratcliffe NA, Rowley AF (1979) A COMPARATIVE SYNOPSIS OF THE STRUCTURE AND FUNCTION OF THE BLOOD CELLS OF INSECTS AND OTHER INVERTEBRATES. *Dev Comp Immunol* 3:189–243

- Santos S, Bond-Buckup G, Gonçalves AS, Bartholomei-Santos ML, Buckup L, Jara CG (2017) Diversity and conservation status of *Aegla* spp. (Anomura, Aeglidae): an update. *Nauplius* 25:e2017011
- Sawyer TK (1970) Hemocyte Values in Healthy Blue Crabs, *Callinectes sapidus*, and Crabs Infected with the Amoeba, *Paramoeba pernicioso*. *Journal of Invertebrate Pathology* 15:440-446. [https://doi.org/10.1016/0022-2011\(70\)90188-6](https://doi.org/10.1016/0022-2011(70)90188-6)
- SMEWW (2017) Standard methods for the examination of water and wastewater. 23rd edition. Washington, D.C., American Public Health Association.
- Smith VJ, Söderhäll K (1983a) β -1, 3 GLUCAN ACTIVATION OF CRUSTACEAN HEMOCYTES IN VITRO AND IN VIVO. *Biol Bull* 164:299–314. <https://doi.org/10.2307/1541146>
- Smith VJ, Söderhäll K (1983b) Induction of degranulation and lysis of haemocytes in the freshwater crayfish, *Astacus astacus* by components of the prophenoloxidase activating system in vitro. *Cell Tissue Res* 233:295–303
- Söderhäll K, Cerenius L, Johansson MW (1994) The Prophenoloxidase Activating System and Its Role in Invertebrate Defence. *Ann N Y Acad Sci* 712:155–161
- Sokolowicz CC, Ayres-Peres L, Santos S (2007) Atividade nictimeral e tempo de digestão de *Aegla longirostri* (Crustacea, Decapoda, Anomura). *Iheringia Ser Zool* 97:235–238
- Stephenson M, Mackie GL (1986) Lake acidification as a limiting factor in the distribution of the freshwater amphipod *Hyalella azeta*. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 43:288–292. <https://doi.org/10.1139/f86-037>
- Taylor EJ, Rees EM, Pascoe, D (1994) Mortality and a drift-related response of the freshwater amphipod *Gammarus pules* (L.) exposed to natural sediments, acidification and copper. *Aquatic Toxicology* 29:83–101. [https://doi.org/10.1016/0166-445X\(94\)90050-7](https://doi.org/10.1016/0166-445X(94)90050-7)

- Trombetta AS, Páez FP, Santos S, Teixeira GM (2019) *Aegla nebeccana* n. sp. (Crustacea, Aeglidae) from Ivaí basin, Paraná, Brazil. *Zootaxa* 4712:138–150. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4712.1.10>
- Unestam T, Söderhäll K (1977) Soluble fragments from fungal cell walls elicit defense reactions in crayfish. *Nature* 267:45–46. <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/267045a0>
- UNITED STATES. Environmental Protection Agency (USEPA) (1991). Water Quality Criteria Summary (Poster). Office of Science and Technology, Health and Ecological Criteria Division. Ecological Risk Assessment Branch (WH-550-D) Washington, DC. May, 1991.
- van Engeland M, Nieland LJW, Ramaekers FCS, et al (1998) Annexin V-Afinity Assay: A Review on an Apoptosis Detection System Based on Phosphatidylserine Exposure. *Cytometry* 31:1-9. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0320\(19980101\)31:1<1::AID-CYTO1>3.0.CO;2-R](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0320(19980101)31:1<1::AID-CYTO1>3.0.CO;2-R)
- Vazquez L, Alpuche J, Maldonado G, et al (2009) Immunity mechanisms in crustaceans. *Innate Immun* 15:179–188. <https://doi.org/10.1177/1753425909102876>
- Whiteley NM (2011) Physiological and ecological responses of crustaceans to ocean acidification. *Marine Ecology Progress Series* 430:257-271. <https://doi.org/10.3354/meps09185>
- Wolf MR (2018) Estudo sobre os decápodes anomúros *Aegla* castro Schmitt, 1942 (Crustacea: Aeglidae) nas bacias do Paranapanema e Tibagi: trata-se de um táxon amplamente distribuído ou um complexo de espécies crípticas? Universidade Estadual Paulista
- Wood CM, Cameron JN (1985) Temperature and the physiology of intracellular and extracellular acid–base regulation in the blue crab *Callinectes sapidus*. *Journal of Experimental Biology* 114:151–179. <https://doi.org/10.1242/jeb.114.1.151>

Xian JA, Wang AL, Chen XD, et al (2011) Cytotoxicity of nitrite on haemocytes of the tiger shrimp, *Penaeus monodon*, using flow cytometric analysis. *Aquaculture* 317:240–244. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.03.026>

Xian JA, Wang AL, Hao XM, et al (2012) In vitro toxicity of nitrite on haemocytes of the tiger shrimp, *Penaeus monodon*, using flow cytometric analysis. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology* 156:75–79. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2012.04.001>

Xian JA, Wang AL, Ye CX, et al (2010) Phagocytic activity, respiratory burst, cytoplasmic free-Ca²⁺ concentration and apoptotic cell ratio of haemocytes from the black tiger shrimp, *Penaeus monodon* under acute copper stress. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology* 152:182–188. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2010.04.003>

Xian JA, Zheng PH, Lu YP, et al (2021) Flow cytometric analysis of morphologic and immunological characterisation of the tiger shrimp *Penaeus monodon* haemocytes. *Aquac Rep* 20:100748. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2021.100748>

Xing J, Chang Y, Tang X, et al (2017) Separation of haemocyte subpopulations in shrimp *Fenneropenaeus chinensis* by immunomagnetic bead using monoclonal antibody against granulocytes. *Fish Shellfish Immunol* 60:114–118. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.11.034>

Zhou M, Wu ZH, Liang RS, Gu N (2017) Effects of dietary taurine, carnitine and cholesterol supplementation on growth performance and immunological status of *Litopenaeus vannamei* under cold exposure. *Aquac Res* 48:1279–1290. <https://doi.org/10.1111/are.12970>