

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 01/02/2026.



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.

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 Ila 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: Aegliidae) 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>