

RESPOSTA AOS PARECERISTAS:

**Parecerista 2:**

1. Resultados para hepatopâncreas:



Figura 1: Cortes histológicos do epitélio do hepatopâncreas do caranguejo de mangue *Ucides cordatus* do grupo controle, submetido a 96h (teste agudo) em água do mar a 20 ppmil. Aumento 400x.

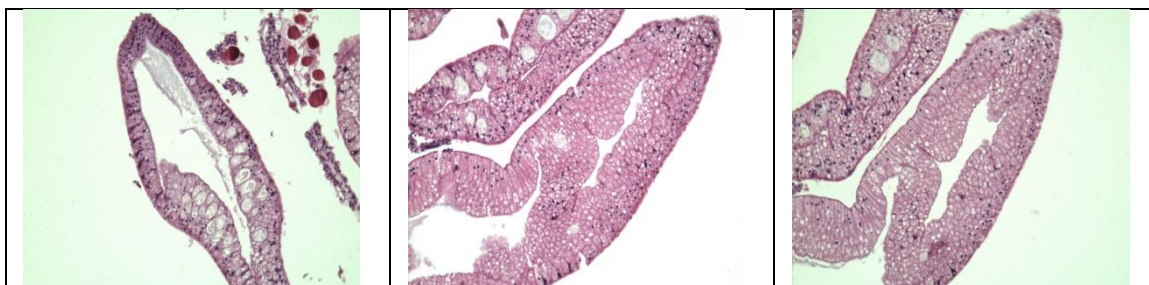


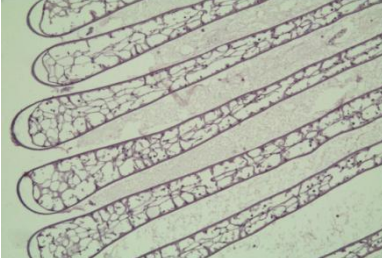







Figura 2: Cortes histológicos do epitélio do hepatopâncreas do caranguejo de mangue *Ucides cordatus* do grupo experimental, submetido a 96h (teste agudo) em água do mar enriquecida com 5mg de  $\text{CuSO}_4/\text{L}$ . Aumento 200x.

2. Resultados para histologia das brânquias:

		<p><b>Controle</b>, aumento de 20X – as figuras ao lado apresentam lamelas regulares, com vacúolo que “segue” a projeção lamelar.</p>
		<p><b>Controle</b>, aumento de 10X</p>
		<p><b>Experimental</b>, aumento de 20X. Além de apresentar menor espaço entre vacúolo e lamelas, há formação de vacúolos intracelulares maiores do que apresentados no controle.</p>
		<p><b>Experimental</b>, aumento de 40x. Nestas figuras fica evidenciado o edema da projeção das lamelas e aumento dos vacúolos intracelulares.</p>
		<p>Estreitamento das lamelas (20x e 10x, respectivamente), dificultando provavelmente a difusão do oxigênio.</p>

## Discussão:

Os resultados obtidos até o presente momento não indicam alteração marcante da histologia do epitélio do hepatopâncreas quando se compara entre grupos controle e experimental. O que é possível observar é o aumento da área dos vacúolos no grupo experimental, exposto a 5mg de CuSO<sub>4</sub>/L. Outros trabalhos mostram que o epitélio em animais expostos ao cobre apresentam desestruturação do hepatopâncreas, o que não é possível observar nos nossos resultados (Yang et al., 2007). Ainda outros trabalhos mostram que ocorrem lesões necróticas, separação das células da lâmina basal do órgão, e a formação de infiltração hemocética nos sinos intestinais em camarões (Li et al., 2007). O caranguejo de mangue aqui estudado pode apresentar maior tolerância aos efeitos deletérios do cobre, e como estes foram expostos ao Cu via água contaminada, os efeitos se tornam mais evidentes provavelmente em brânquias, que estão diretamente expostas ao meio aquático. Observamos esse efeito maior do acúmulo de Cu em brânquias e menor em hepatopâncreas de outros caranguejos de mangue estudados anteriormente (ver Sá et al, 2008).

Para as brânquias, ocorreu evidente diminuição de espaço entre as lamelas e acúmulo de vacúolos intracelulares (Yang et al., 2007). Essas alterações levam a mudanças na difusão de oxigênio através das lamelas, como também dificuldades no transporte iônico (Bavan & Geraldine, 2000).

3. Quanto à exposição dos animais a dietas com cobre, houve a tentativa de se realizar o experimento, sem sucesso. O que ocorre é que esses animais não se alimentam fora do meio aquático em laboratório. O Cu foi adicionado à carne moída e oferecida aos animais no seco. Após 3 horas os animais não se alimentaram. Desse modo, fica difícil esse tipo de experimento com dietas colocadas no meio líquido, pois o Cu se dissolve do alimento e se perde na água, juntamente com o próprio alimento, sendo inviável o procedimento. Havíamos observado em publicação anterior com Cu em dietas de três caranguejos: *Sesarma rectum*, *Goniopsis cruentata* e *Neohelice granulata*, que os caranguejos mais terrestres se alimentavam melhor fora d'água, exemplo visto para *Sesarma rectum* (Sá et al., 2008). O caranguejo aqui estudado vive em tocas no mangue com água no fundo e levam os alimentos para a toca. Portanto, a alimentação desses animais no seco se tornou inviável. Desse modo só foi realizado a exposição dos animais ao cobre na água.

## **Parecerista 1:**

1. As mudanças em relação aos gradientes de sacarose ocorreram pois uma aluna de IC, que se encontra agora no mestrado, comprovou que os novos gradientes separavam melhor as células (10, 20, 30 e 40% de sacarose), do que os gradientes anteriores. Esse trabalho se encontra submetido à Revista "Invertebrate Cell and Developmental Biology" sob o título: Separation and viability of gill and hepatopancreatic cells of

- a mangrove crab *Ucides cordatus* - Ortega, P; Granado e Sá, M; Custódio, M. R. e Zanotto, F. P. desde Novembro de 2010.
2. Os motivos relacionados à mudança na forma de administração do cobre, não mais em dieta, estão explicados acima (item 2).
  3. Os caranguejos utilizados nos experimentos eram todos machos, em intermuda, adultos e não estavam em fase de reprodução. Porém não foi medido o tamanho da carapaça, **somente o peso, que se encontra no relatório, juntamente com o número de animais utilizados.**
  4. Quanto ao Relatório Síntese do Projeto de Pesquisa, é muito difícil conseguir publicar o trabalho feito com projeto Mackpesquisa dentro de 1 ano, portanto, o que foi colocado como resumo e publicações se referem todos à exposição ao cobre em caranguejos de mangue e esses trabalhos todos formam um contínuo, que deram origem às novas idéias e novas sequencias de experimentos. Não foi colocado no relatório com nenhuma intenção diferente desta. O trabalho com hepatopancreas e branquias, que é parte do Doutorado de uma aluna minha, Marina Granado e Sá, se encontra em preparação no presente momento e será publicado, pois os resultados são originais e inéditos: COPPER TRANSPORT IN GILL CELLS OF A MANGROVE CRAB *Ucides cordatus*. Sá, M.G.; Zanotto, F.P. a ser submetido ao American Journal of Physiology.

#### REFERENCIAS:

- Bhavan P. S., Geraldine P. (2000). Histopathology of the hepatopancreas and gills of the prawn *Macrobrachium malcolmsonii* exposed to endosulfan. *Aquatic Toxicology* 50 (2000) 331–339.
- Li N., Yunlong Z., Jian Y. (2007). Impact of Waterborne Copper on the Structure of Gills and Hepatopancreas and Its Impact on the Content of Metallothionein in Juvenile Giant Freshwater Prawn *Macrobrachium rosenbergii* (Crustacea: Decapoda). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 52, 73–79.
- Sá, M. G., Valente, W. C., Zanotto, F. P. (2008). Dietary copper absorption and excretion in three semi-terrestrial grapsoid crabs with different levels of terrestrial adaptation. *Comparative Biochemistry and Physiology. C, Toxicology & Pharmacology.* , 148, p.112 – 116.
- Yang Z., Zhao Y., Li N., Yang J. (2007). Effect of Waterborne Copper on the Microstructures of Gill and Hepatopancreas in *Eriocheir sinensis* and Its Induction of Metallothionein Synthesis. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 52, 222–228.