

**Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Genética**

Caio Bruno Ribeiro Falcão

**Genética e conservação do guaiamum *Cardisoma
guanhumi* (Decapoda: Gecarcinidae) e dos seus habitats
em Pernambuco**

**Recife
2016**

Caio Bruno Ribeiro Falcão

**Genética e conservação do guaiamum *Cardisoma
guanhumi* (Decapoda: Gecarcinidae) e dos seus habitats
em Pernambuco**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Genética da Universidade Federal de
Pernambuco como parte dos requisitos exigidos para
obtenção do título de Doutor em Genética.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Augusto Torres

Coorientador: Prof.^a Dr.^a Mônica Lúcia Adam

Recife

2016

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Falcão, Caio Bruno Ribeiro

Genética e conservação do guaiamum *Cardisoma Guanhumi* (Decapoda: Gecarcinidae) /
Caio Bruno Ribeiro Falcão. – Recife: O Autor, 2016.
85 f.: il.

Orientadores: Rodrigo Augusto Torres, Mônica Lúcia Adam
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de
Biociências. Programa de Pós-graduação em Genética, 2016.
Inclui referências e anexos

1. Ecologia dos estuários 2. Toxicologia ambiental 3. Genética 4. Decápode –
Crustáceo I. Torres, Rodrigo Augusto (orient.) II. Adam, Mônica Lúcia
(coorient.) III Título.

577.786

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2016-189

Caio Bruno Ribeiro Falcão

Genética e conservação do guaiamum *Cardisoma guanhumi* (Decapoda: Gecarcinidae) e dos seus habitats em Pernambuco

Aprovado em 23 / 02 / 2016

Banca Examinadora:

Dr. Rodrigo Augusto Torres
Universidade Federal de Pernambuco

Dr^a. Ana Christina Brasileiro Vidal
Universidade Federal de Pernambuco

Dr. Valdir de Queiroz Balbino
Universidade Federal de Pernambuco

Dr. Alexandre Oliveira de Almeida
Universidade Federal de Pernambuco

Dr^a. Maria Raquel Moura Coimbra
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Recife

2016

“... ao Único que é digno de receber a honra e a glória, a força e o poder... ao Rei eterno e imortal, invisível, mas real... a Ele todo o louvor...”

Agradecimentos

Ao Deus soberano e eterno, Senhor e salvador, pelo infinito amor, graça e misericórdia.

À minha esposa, Livia Falcão, pelo amor, companheirismo e inestimável ajuda ao longo dos difíceis anos desta jornada.

Aos meus pais, Almir e Ruthmir Falcão, maiores responsáveis pelo caminho percorrido. Agradeço pelo amor, dedicação, torcida, suporte, orações, empenho e participação ativa neste trabalho final.

À minha irmã, Juliana Falcão, pelo amor, torcida, oração e suporte.

Aos professores Rodrigo Torres e Mônica Adam pela oportunidade, confiança, orientação, ajuda e disponibilidade.

Ao professor Marcelo Pinheiro pela parceria e ajuda imprescindíveis na realização do trabalho.

À professora Ana Christina Brasileiro e equipe pelo suporte e apoio na utilização do Laboratório de Genética e Biotecnologia Vegetal da UFPE.

Aos pastores e irmãos que acompanharam, torceram, vibraram e oraram em todo o tempo.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Genômica Evolutiva e Ambiental (LAGEA) pelas discussões, críticas, sugestões e apoio ao longo dos últimos quatro anos.

À Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) pelo financiamento e apoio ao projeto e aos recursos humanos.

Resumo

Os sistemas estuarinos da costa brasileira e sua fauna têm sido severamente impactados ao longo das últimas décadas. O *Cardisoma guanhumi* é um crustáceo difundido na culinária local do Nordeste do Brasil apresentando um grande valor de mercado, mas tem mostrado significativa diminuição nos seus estoques populacionais. A intensa captura de espécimes e a destruição de seus habitats incluiu *C. guanhumi* na Lista de Espécies da Fauna Ameaçadas de Extinção publicada em dezembro de 2014. Objetivando aferir a impactação sobre as populações de guaiamuns e sobre seus habitats ao longo de cinco estuários da costa pernambucana duas metodologias foram utilizadas: (i) análise de danificação genômica ao longo dos períodos de inverno e verão dos anos de 2012 e 2013, e (ii) avaliação de possíveis alterações da estrutura genética de *C. guanhumi* em um contexto espaço-temporal nos anos de 2012 e 2014. Os resultados das análises genotóxicas evidenciaram dano genômico no inverno do ano de 2012 que coincidiu com um rigoroso inverno e intensas chuvas atípicas para região. A avaliação da estruturação genética das populações nos dois anos não mostrou alterações significativas da diversidade genética nem mudança na estrutura da espécie. Os resultados obtidos sugerem que os manguezais/estuários pernambucanos têm recebido o aporte de componentes tóxicos, tendo em vista os danos genômicos detectados. Tais resultados alertam para a necessidade de uma maior atenção acerca da conservação dos manguezais/estuários pernambucanos.

Palavras-chave: ecotoxicologia; ensaio cometa; espécies ameaçadas; estrutura de populações; genotoxicidade; teste do micronúcleo.

Abstract

Estuarine systems along the Brazilian coast and its wildlife have been severely impacted over the past decades. *Cardisoma guanhumi* is a crustacean widespread in local gastronomy of northeastern Brazil presenting a great market value, but has shown significant decrease in their population stocks. Intense capture of specimens and the destruction of their habitats included *C. guanhumi* in the Endangered Fauna Species List published in December 2014. In order to assess the impact on the populations of blue crabs and about their habitats over five estuaries of the coast Pernambuco two methodologies were used: a genomic damage analysis over the winter and summer periods of the years 2012 and 2013 and an assessment of possible changes in the genetic structure of *C. guanhumi* in a space-time context in the years 2012 and 2014. The results of the analysis showed genomic genotoxic damage in the winter of 2012 year coincided with a harsh winter and heavy rains atypical for the region. The genetic structure of populations in both years showed no significant changes in the genetic diversity of the species or change in structure. The results suggest that mangroves / estuaries have received the injection of toxic components, considering the identified genomic damage. These results emphasize the need for greater attention on the conservation of Pernambuco estuaries.

Key words: ecotoxicology; comet assay; endangered species; population structure; genotoxicity; micronucleus.

Lista de Ilustrações

Figura 1. Célula micronucleada de <i>Cardisoma guanhumi</i> . Fonte: do autor.	22
Figura 2. Diferentes níveis de danificação genômica em células submetidas à técnica de Ensaio Cometa (Birimi, 2007).	23
Figura 1. Localização dos cinco sistemas estuarinos em estudo onde foram coletados os indivíduos de <i>Cardisoma guanhumi</i> ao longo dos anos de 2012 e 2013, a saber: Litoral Norte (Rios Goiana e Jaguaribe), Litoral Centro (Rio Capibaribe) e Litoral Sul (Rios Sirinhaém e Formoso), no estado de Pernambuco, Brasil. Direito de utilização da imagem gentilmente cedido por Gama-Maia and Torres, 2016. Retirada de Gama-Maia and Torres, 2016.	36
Figura 2. Análise da frequência de células micronucleadas (MN‰) observadas nos exemplares de <i>Cardisoma guanhumi</i> dos cinco manguezais analisados em comparação com o grupo controle no período de inverno do ano de 2012.	41
Figura 3. Análise temporal da frequência de células micronucleadas observadas nos exemplares de <i>Cardisoma guanhumi</i> dos cinco manguezais analisados nas estações climáticas de inverno e verão de 2012 e 2013.	42
Figura 4. Análise do índice de danificação genômica pelo ensaio cometa, observado nos exemplares dos cinco manguezais em comparação ao grupo controle, no período de inverno do ano de 2012.	44
Figura 5. Análise temporal do índice de danificação genômica observado pelo ensaio cometa nos três manguezais que indicaram elevação significativa no ID no inverno/2012 em comparação às estações climáticas de inverno e verão de 2012 e 2013.	46
Figura 6. Médias mensais dos índices pluviométricos ao longo de 2012 e 2013 (a) e soma dos índices pluviométricos diários em julho/12 e julho/13 (b) registrados em	46

sete postos de monitoramento pluviométrico disponibilizados no site da Agência Pernambucana de Águas e Climas (APAC - <http://www.apac.pe.gov.br/meteorologia/monitoramento-pluvio.php#>).

Figura 1. Localização dos cinco sistemas estuarinos em estudo onde foram coletados os indivíduos de *Cardisoma guanhumi* ao longo dos anos de 2012 e 2014: estuários dos Rios Goiana, Jaguaribe, Capibaribe, Sirinhaém e Formoso. Direito de utilização da imagem gentilmente cedido por Gama-Maia and Torres, 2016. Retirada de Gama-Maia and Torres, 2016. 65

Figura 2. Topologia Bayesiana para os indivíduos de *Cardisoma guanhumi* dos cinco estuários analisados no ano de 2012. As diferentes cores indicam os indivíduos dos diferentes manguezais analisados: Goi: Goiana (preto); Jag: Jaguaribe (rosa); Cap: Capibaribe (vermelho); Sir: Sirinhaém (verde); Rio: Rio Formoso (azul); SP: Jureia (amarelo). 70

Figura 3. Topologia de inferência Bayesiana para os indivíduos de *Cardisoma guanhumi* dos cinco estuários analisados no ano de 2014. As diferentes cores indicam os indivíduos dos diferentes manguezais analisados: Goi: Goiana (preto); Jag: Jaguaribe (rosa); Cap: Capibaribe (vermelho); Sir: Sirinhaém (verde); Rio: Rio Formoso (azul); SP: Jureia (amarelo). 71

Figura 4. Análise bayesiana da estrutura de populações (BAPS) dos indivíduos de *Cardisoma guanhumi* amostrados nos estuários analisados no ano de 2012.

Figura 5. BAPS dos indivíduos de *Cardisoma guanhumi* amostrados nos manguezais analisados no ano de 2014. 74

Figura 6. Gráficos de distribuição da análise de *mismatch* para os indivíduos de *Cardisoma guanhumi* dos estuários analisados para os anos de 2012 e 2014. 74

Lista de Tabelas

Tabela 1. Frequência de células micronucleadas (MN‰), registradas em exemplares de <i>Cardisoma guanhumi</i> capturados em cinco áreas de manguezal do Estado de Pernambuco e outra controle no Estado de São Paulo.	41
Tabela 2. Análise das células danificadas (%) e do índice de dano genômico (ID) registrados em exemplares de <i>Cardisoma guanhumi</i> capturados em cinco áreas de manguezal do Estado de Pernambuco e outra controle no Estado de São Paulo.	44
Tabela 1. Parâmetros genético-populacionais de <i>Cardisoma guanhumi</i> referentes aos estuários analisados nos períodos de 2012 e 2014.	69
Tabela 2. Análise de Variância Molecular para os indivíduos de <i>Cardisoma guanhumi</i> dos estuários analisados no ano de 2012.	72
Tabela 3. F_{STs} par-à-par de <i>Cardisoma guanhumi</i> dos estuários analisados no ano de 2012.	72
Tabela 4. Análise de Variância Molecular para os indivíduos de <i>Cardisoma guanhumi</i> dos estuários analisados para o ano de 2014.	73
Tabela 5. F_{STs} par-à-par de <i>Cardisoma guanhumi</i> dos estuários analisados no ano de de 2014.	73
Tabela 6. Testes de neutralidade para <i>Cardisoma guanhumi</i> dos estuários analisados no ano de 2012.	75
Tabela 7. Testes de neutralidade para <i>Cardisoma guanhumi</i> dos estuários analisados no ano de 2014.	75

Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos

Item	Definição
AMOVA	Análise de variância molecular
ANOVA	Análise de variância
APA	Área de Proteção Ambiental
BAPS	<i>Bayesian analysis of population structure</i> (Análise bayesiana da estrutura de populações).
Cap	Capibaribe
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeo trifosfato
DMSO	Sulfóxido de dimetilo
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
FST	Índice de fixação da variação genética entre subpopulações
Goi	Goiana
ID	Identificação
ID	Índice de danificação genômica
ISSR	<i>Inter simple sequence repeat</i>
Jag	Jaguaribe
Jur	Jureia
K	Número de populações genéticas
KCl	Cloreto de potássio
KH ₂ PO ₄	Fosfato de potássio monobásico
mtDNA	DNA mitocondrial
μL	Microlitro
μM	Micromolar

Mn	Micronúcleo
mM	Milimolar
NaCl	Cloreto de potássio
Ng	Nanogramas
Na ₂ HPO ₄	Fosfato de sódio dibásico
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
RAPD	<i>Random amplified polymorphic DNA</i> (Polimorfismo de DNA amplificado ao acaso).
Rio	Rio Formoso
Sir	Sirinhaém
TBE	Tampão Tris-Borato

Sumário

1. Introdução	14
2. Revisão da Literatura	
2.1 Ambientes estuarinos: importância e ameaças	17
2.2 Dano genômico e o monitoramento de espécies e ecossistemas	19
2.3 Erosão genética	23
2.4 <i>Cardisoma guanhumi</i>	25
3. Objetivos	
3.1 Objetivo geral	28
3.2 Objetivos específicos	28
4. Genotoxicidade espaço-temporal em sistemas estuarinos tropicais do Atlântico Ocidental: O uso potencial do caranguejo azul (<i>Cardisoma guanhumi</i>) como indicador ecológico perante uma perspectiva de flutuações climáticas	29
5. Análise espaço-temporal da diversidade genético-populacional de guaíamum (<i>Cardisoma guanhumi</i>) após um episódio de danificação genômica e como ferramenta de monitoramento de manguezais tropicais do Nordeste do Brasil	58
6. Discussão Geral	85
7. Conclusões	87
8. Referências Bibliográficas	88
9. Anexos	94
10. Currículo Lattes atualizado (correspondente ao período do curso)	98

1. Introdução

A grande preocupação com o *status* de conservação dos ambientes naturais resultou no crescente interesse do monitoramento da poluição dos ecossistemas aquáticos. A costa litorânea do Brasil é formada por ambientes diversificados, dentre os quais se destacam os ambientes estuarinos, ricos em biodiversidade e produtividade biológica. No entanto, o crescimento desorganizado das populações humanas e suas atividades associadas com agricultura, indústria e comércio têm acarretado grande dano à biodiversidade e sobrevivência das populações locais.

Ao longo das últimas décadas muitos estudos se esforçaram para identificar e quantificar danos decorrentes de compostos químicos liberados na natureza que conduzissem à mortalidade e morbidade de populações e espécies. Mais recentemente os pesquisadores começaram a tentar identificar com maior especificidade os efeitos subletais dos compostos que exercem dano genômico liberados na natureza. Deseja-se estimar as consequências da interação de tais compostos com células somáticas e reprodutivas que não conduzam à morte, mas diminuam o potencial de sobrevivência dos indivíduos. A interação entre os compostos químicos e o genoma pode conduzir à diminuição da variabilidade e diversidade genética das populações e consequentemente das espécies.

Embora muitos fatores estejam associados com a perda da biodiversidade, a contaminação química dos ambientes, incluindo os efeitos das exposições crônicas e agudas aos mais variados compostos, têm contribuído para o declínio e desaparecimento de muitas populações. As alterações nas frequências alélicas e genotípicas das populações podem estar direta ou indiretamente relacionadas à exposição de contaminantes. Pesquisas recentes têm se investigado a conexão entre a exposição aos

contaminantes e à potencial perda de variabilidade genética nas populações naturais. A perda da variabilidade genética, por sua vez, está intimamente relacionada com o declínio da diversidade e consequente vulnerabilidade às mudanças ambientais com aumento da probabilidade de extinção das espécies ou de parte das suas populações.

Os estudos de espécies naturais residentes em habitats específicos têm sido amplamente utilizados como modelo de avaliação da saúde do ecossistema em questão. Entender o nível de agressão a que têm sido submetidas as espécies animais e vegetais permite inferir o grau de impacto e nível de degradação ambiental local.

O guaíamum (*Cardisoma guanhumi*) é um crustáceo de ampla distribuição nos ecossistemas estuarinos ao longo da costa do Atlântico Ocidental de todo o continente americano. No Brasil, e mais especificamente no Nordeste, a pesca e comercialização do guaíamum são importantes fontes de renda de muitas populações ribeirinhas e, por vezes, única fonte de subsistência de comunidades de pescadores/catadores. Devido à grande pressão de pesca a que têm sido submetidas, as populações de guaíamum têm apresentado significativa redução dos seus estoques populacionais ao ponto da espécie ser incluída na Lista Brasileira de Espécies da Fauna sob Ameaça de Extinção divulgada em dezembro de 2014.

A utilização de metodologias capazes de inferir diferentes graus de danificação genômica dos indivíduos de guaíamum é capaz de evidenciar não apenas a ‘saúde’ das populações de *C. guanhumi*, mas também fornece um panorama dos sistemas estuarinos habitados pelos animais. Neste sentido, a utilização de testes específicos capazes de detectar macro e microlesões no genoma dos animais é de absoluta importância e utilidade. Destacam-se nesta abordagem, o Ensaio Cometa e o Teste do Micronúcleo.

Além da abordagem relativa aos parâmetros de dano ao genoma, destaca-se a importância do conhecimento da diversidade genética das populações e as possíveis

alterações na estrutura espaço-temporal frente a episódios de danificação genômica. Compreender a riqueza genética das populações de guaiamum ao longo dos estuários pernambucanos nos permite entender acerca da saúde dos ambientes estuarinos. Além disso, tal abordagem possibilita entender melhor o padrão da conectividade entre populações em pequena escala geográfica, e se o cenário observado se associa com fenômenos de dano ao genoma. Tais fatores se apresentam como essenciais para os planos de conservação da espécie localmente. Além disto, o conhecimento dos limites genéticos das populações é fundamental para os planos de reposição de estoque das populações ameaçadas a partir das populações vizinhas.

Tendo em vista que a compreensão dos mecanismos e efeitos que interferem na estabilidade genômica devem contribuir para a tomada de decisões relativas à manutenção da homeostase ambiental e das espécies, o presente estudo vem de encontro à necessidade do incremento no monitoramento e gestão aplicados a ambientes ameaçados testando as seguintes hipóteses: (i) *Cardisoma guanhumi* não está submetido a dano genômico espaço-temporalmente nos estuários pernambucanos e ii) *Cardisoma guanhumi* não apresenta alteração da estrutura genético-populacional espaço-temporalmente nos manguezais pernambucanos. Cabe destacar que tais hipóteses foram testadas frente a um cenário de perturbação sobre a paisagem adaptativa, perante a ocupação das zonas próximas aos sistemas de manguezais pela população humana. Tais achados são de suma importância para a elaboração e efetivação de medidas preventivas e preditivas, de remediação e preservação ambiental, conservação de espécies e saúde pública.

2. Revisão da Literatura

2.1 Ambientes estuarinos: importância e ameaças

Com cerca de 11.000 quilômetros de extensão, a costa litorânea do Brasil é uma das maiores entre todos os países do mundo e apresenta, ao longo de sua extensão, grande diversidade de ambientes e características fisionômicas e fisiográficas. Dentre os mais importantes, destacam-se os sistemas estuarinos. Estuários são ecossistemas costeiros de transição entre terra, rio e mar encontrados em regiões tropicais, subtropicais e temperadas ao redor do globo. Sua distribuição geográfica inclui as Américas, África, Ásia e Oceania. Os estuários estão entre os ecossistemas biologicamente mais produtivos do mundo e apresentam imensurável importância ecológica e econômica (Ghizelini *et al.*, 2012; Kalesowski and Adams, 2013; Scherer, 2013).

Ambientes estuarinos provêm grande diversidade de habitats, incluindo manguezais, gramíneas marinhas, bancos de areia e lama, canais hídricos profundos, afloramentos rochosos e ambientes de mar aberto. Esta variedade de habitats favorece uma vasta gama de nichos para colonização de diversas comunidades de organismos. Estuários são, portanto, ambientes complexos que apresentam grande biodiversidade, alta produtividade biológica, diversidade de habitats e uma complexa teia de interações entre fatores bióticos e abióticos (Sheaves, 2006; Barletta and Costa, 2009; Barbier *et al.*, 2011).

Além disso, os estuários têm demonstrado seu papel fundamental para os ecossistemas oceânicos, especialmente as plataformas costeiras, funcionando como local

de reprodução, desova e crescimento de muitas espécies marinhas e como habitat para espécies residentes (Martinho *et al.*, 2012; Costa *et al.*, 2013).

Apesar de toda riqueza e importância em biodiversidade, nas últimas décadas os estuários têm sofrido grande pressão antrópica. A maior parte dos ambientes estuarinos encontra-se em países em desenvolvimento que tem experimentado um acelerado processo de desenvolvimento costeiro. Ao longo da história de ocupação populacional no Brasil, o crescimento demográfico concentrou-se nas áreas litorâneas. Os grandes centros urbanos brasileiros, bem como os polos industriais, de distribuição e recepção de mercadorias (refinarias e portos, entre outros) ocupam as grandes planícies litorâneas. Além disto, a especulação imobiliária e a construção de complexos residenciais e de lazer tiveram crescimento exponencial nas últimas décadas (Araújo *et al.*, 2007; Bonfim *et al.*, 2012; Passos, 2013).

Devido à sua localização estratégica, os estuários acabaram por tornarem-se locais de grande importância econômica como fonte de provisões de produtos e serviços às populações costeiras. No entanto, juntamente com o crescimento econômico e populacional, os estuários têm sido severamente impactados tanto pela destruição direta causada pela destruição dos manguezais, bem como pela deposição de compostos químicos que culminam em efeitos biológicos, bioquímicos e até mesmo genéticos, causando graves distúrbios que ameaçam os processos ecológicos e, conseqüentemente, a exploração econômica dos recursos biológicos. Em última instância, a saúde humana também pode ser afetada pelo consumo de recursos pesqueiros contaminados (Dachs and Méjanelle, 2010; Seriani *et al.*, 2013).

A zona costeira pernambucana apresenta 187 km de extensão, distribuída por 21 municípios e abriga quase 45% da população do estado. Segundo o Programa de Gerenciamento Costeiro de Pernambuco - GERCO-PE (www.cprh.pe.gov.br) a zona

costeira do estado é dividida em três setores: NORTE (Goiana, Itamaracá, Igarassu, Abreu e Lima, Paulista, Itapissuma e Itaquitinga), METROPOLITANO (Olinda, Recife, Jaboatão dos Guararapes, São Lourenço da Mata, Camaragibe e Moreno) e SUL (Cabo de Santo Agostinho, Ipojuca, Sirinhaém, Rio Formoso, Tamandaré, Barreiros e São José da Coroa Grande) (Araújo *et al.*, 2007).

2.2 Dano genômico e o monitoramento de espécies e ecossistemas

Devido à grande importância dos sistemas estuarinos, muitos estudos têm objetivado avaliar as agressões antropogênicas nestes ecossistemas costeiros. A crescente preocupação pela qualidade dos ambientes tem resultado no crescimento do monitoramento da poluição nos ambientes marinhos (Bickham *et al.*, 2000; Picado *et al.*, 2007; Pinheiro *et al.*, 2013).

A grande quantidade de efluentes contaminados que desaguam nas regiões estuarinas pode causar danos diretos e indiretos às moléculas de DNA. Segundo Ohe *et al.*, (2004), a presença de compostos químicos dissolvidos nas águas costeiras pode produzir efeitos genotóxicos e mutagênicos nas espécies residentes. É sabido que a investigação dos danos às moléculas de DNA é de extrema importância, visto a necessidade da integridade destas moléculas para a homeostase celular e para a transmissão da informação genética à descendência (Klobucar *et al.*, 2012).

A genotoxicidade, ou seja, o efeito de causar danos ao genoma ocorre como consequência da ação de um agente tóxico que pode: (i) alterar a estrutura dos cromossomos conduzindo à quebra (clastogenicidade); (ii) alterar a sequência de pares de bases do DNA (mutagenicidade), ou ainda (iii) conduzir à segregação cromossômica anormal (aneugenicidade). Os compostos genotóxicos presentes na água são

caracterizados por possuírem atividade capaz de alterar informações codificadas no DNA (McGregor, 2000; Di Paolo, 2006).

Entre as mais proeminentes consequências dos efeitos dos danos genômicos causados por poluentes estão a redução na sobrevivência e no recrutamento, a diminuição do sucesso reprodutivo, a alteração das taxas de mutação e migração com possíveis efeitos na composição genética da população e, em última instância, a ameaça à continuidade das espécies (Waters, Stack and Jackson, 1999; Whitehead *et al.*, 2003; Ohe *et al.*, 2004; Frenzilli, Nigro and Lyons, 2009, Adam *et al.*, 2010). Mesmo concentrações muito baixas dos agentes genotóxicos nos ecossistemas são capazes de afetar diversos momentos na vida dos indivíduos, desde reprodução, embriogênese, desenvolvimento, crescimento e sobrevivência dos organismos, além de poderem estar envolvidos em processos carcinogênicos, defeitos hereditários e teratogênese (Di Paolo, 2006).

Devido ao crescente interesse na utilização de marcadores capazes de medir e estimar os efeitos causados pela exposição aos agentes contaminantes, diferentes metodologias de testes de sub-letalidade têm sido desenvolvidas, com destaque para abordagens genéticas. De forma geral, as metodologias para análise de danos no genoma utilizam dois parâmetros de danificação genômica nos indivíduos: as macrolesões e as microlesões.

As macrolesões são relativas ao efeito visível ao nível cromossômico. As metodologias para a análise de macrolesões requerem células em divisão e investigam a presença de alterações cromossômicas numéricas e estruturais, a troca de cromátides irmãs e micronúcleos.

Na categoria de microlesões, os efeitos operam nos níveis bioquímicos e moleculares. Os métodos de detecção das microlesões, que podem ser aplicados em

células interfásicas, incluem o ensaio cometa, a eletroforese em gel de agarose, a eluição alcalina, aloenzimas, e as mais diversas abordagens de análise de DNA (RAPD, RFLP, SSP, DNA fingerprint, SNPs, microarranjos de DNA, entre outros) (Brusick, 1978; Tice *et al.*, 2000; Belfiore e Anderson, 2001; Dixon *et al.*, 2002; Newton *et al.*, 2004; Aubrecht e Caba, 2005; Brendler-Schwaab *et al.*, 2005; Muller, 2006; Atienzar e Jha, 2006; Park e Choi, 2007).

O teste do micronúcleo se destaca entre as metodologias que detectam danos no genoma por ser um método que apresenta alta sensibilidade, baixo custo, amplo espectro de atuação em diferentes organismos, além de ser uma metodologia não invasiva e não letal (Lohmann, 1995; Carvalho *et al.*, 2002; Adam *et al.*, 2013). O referido teste tem sido utilizado em análises de dano genômico em espécies residentes nas zonas costeiras, incluindo ambientes estuarinos e manguezais por sua relativa rapidez, simplicidade e capacidade de identificar macrolesões no genoma (Heddle, 1973; Schmid, 1975; Siu *et al.*, 2004; Pinheiro *et al.* 2013). No entanto, é necessário um ciclo celular completo para que os micronúcleos sejam expressos. De modo geral, os micronúcleos podem se originar de regiões cromossômicas (cromossomos acêntricos, fragmentos cromatídicos produzidos por quebra cromossômica e cromossomos inteiros) que se atrasam e/ou migram irregularmente durante a anáfase devido a distúrbios do fuso mitótico (Figura 1) (Lindholm *et al.*, 1991; Ford and Corell, 1992; Catalán *et al.*, 1995; Falck *et al.*, 2002; Norppa and Falck, 2003).

Alguns micronúcleos podem também se originar de fragmentos derivados de pontes anafásicas quebradas, formadas por rearranjos cromossômicos, por exemplo, cromossomos dicêntricos (Comforth and Goodwin, 1991; Saunders *et al.*, 2000). Durante a telófase, essas regiões podem se fundir com o núcleo principal ou podem formar um ou mais núcleos secundários (micronúcleos) menores que o principal (Kehdy, 2003).

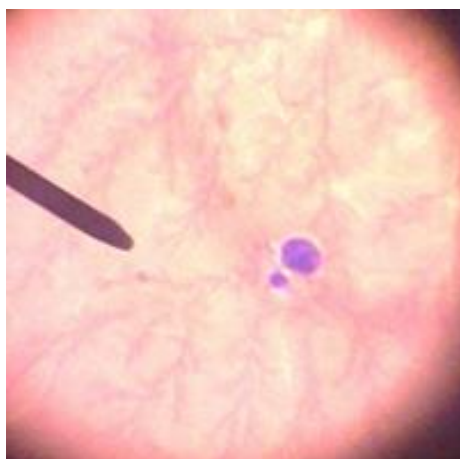


Figura 1. Célula micronucleada de *Cardisoma guanhumi*. Fonte: LAGEA.

Por outro lado, o ensaio cometa é uma técnica de maior sensibilidade para detectar microlesões genômicas. Esta metodologia permite a identificação de danos na maioria das células eucarióticas de forma individualizada (Singh *et al.*, 1988) e vem sendo utilizada como indicador ecológico para o diagnóstico e monitoramento de áreas costeiras (Davanzo *et al.*, 2013; Rocha *et al.*, 2015). Tais testes têm sido utilizados com sucesso no monitoramento ambiental em mamíferos, anfíbios, peixes e crustáceos possuindo uma ampla utilização estratégica no biomonitoramento de agentes genotóxicos (White *et al.*, 1998; Hartmann *et al.*, 2003; Frenzilli *et al.*, 2009; Nudi *et al.*, 2010; Arcaute *et al.*, 2014).

As vantagens do Ensaio Cometa incluem sua simplicidade, rápido desempenho e alta sensibilidade para vários tipos de danos no DNA (Silva *et al.*, 2003). Esta metodologia se baseia no fato de que o DNA danificado terá o seu padrão de migração em gel de eletroforese alterado. O DNA, contido em células de organismos eucariotos, possui alguns centímetros de comprimento, e para que seja acomodado no interior do núcleo, o qual possui entre 5 e 10 μm de largura, essa molécula tem que ser fortemente condensada. Danos impostos à molécula de DNA provocam um relaxamento desta condensação e, ocasionalmente, podem ocorrer quebras na estrutura molecular (Rojas *et al.*, 1999). Os

fragmentos de diversos tamanhos resultantes de tais quebras migrarão diferencialmente no gel em lâmina. A célula onde o DNA não se encontrar danificado, terá seu núcleo preservado durante a migração eletroforética e, portanto, manterá sua forma circular. Danos menores no DNA tenderão a migrar mais rapidamente do que os maiores. Ocorrendo um dano muito intenso, muitos fragmentos de diversos tamanhos serão formados e migrarão em velocidades diferentes, formando-se, então, a figura típica de uma cauda de cometa (Figura 2) (Olive *et al.*, 1990).

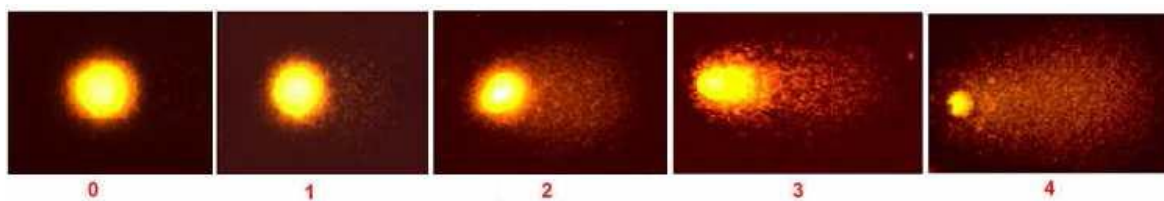


Figura 2. Diferentes níveis de danificação genômica em células submetidas à técnica de Ensaio Cometa (Birimi, 2007).

2.3 Erosão genética

A diversidade genética das espécies, definida como a magnitude da variabilidade genética nas populações, é fator essencial no processo evolutivo, uma vez que é a matéria-prima da adaptação às imposições seletivas dos ecossistemas. Além disso, se existe algum componente biológico mais importante a ser preservado, esse é a variação genética (Moritz, 2002), uma vez que está relacionada ao '*fitness*' dos indivíduos e atua no potencial evolutivo das espécies. As diferenças nas sequências codificadas nos genes dos indivíduos são capazes de alterar a capacidade e a forma de adaptação das populações às alterações ambientais (Hughes *et al.*, 2008).

Segundo Van Straalen and Timmermans (2002), a poluição pode interferir na diversidade genética afetando os quatro principais processos evolutivos: deriva genética, seleção, mutação e migração. Esta diminuição na diversidade genética das populações induzida por agentes tóxicos é conhecida como erosão genética. Os impactos da poluição na diversidade genética das espécies, no entanto, estão relacionados, também, a fatores como tamanho populacional, fluxo gênico entre diferentes populações e tamanho da área de ocupação (Giska *et al.*, 2015). Populações submetidas a impactos genotóxicos podem restabelecer seus níveis ecológicos de forma relativamente rápida a partir da remoção da fonte poluidora. Os danos citológicos podem retornar aos seus índices normais em períodos relativamente curtos, no entanto, os danos genéticos podem apresentar efeitos em longo prazo com perda de variabilidade e colapso das populações (Frankham, 2005; Chapman *et al.*, 2009; Pauls *et al.*, 2013).

A exposição de populações naturais a compostos químicos com ação genotóxica por longos períodos de tempo ou durante gerações consecutivas pode conduzir à redução na diversidade genética das populações. Nos casos de exposição crônica pode haver seleção de genótipos com tolerância química e consequente declínio de genótipos menos adaptados (Bickham *et al.*, 2000; Matson *et al.*, 2006; Nowak *et al.*, 2009).

A eliminação de genótipos menos adaptados à contaminação ambiental conduz, invariavelmente, à morte de indivíduos e diminuição do tamanho das populações. O aumento da morte de indivíduos de uma população e a redução do tamanho populacional efetivo com diminuição da diversidade genética podem conduzir as populações a processos de deriva genética e/ou gargalo gênico, contribuindo ainda mais para a redução na diversidade genética e consequente colapso das populações (Bickham *et al.*, 2000; Matson *et al.*, 2006; Nowak *et al.*, 2009).

Por outro lado, a exposição dos indivíduos de uma população a contaminantes com ação genotóxica pode conduzir ao aumento da taxa de mutação de forma a compensar a perda de diversidade genética. Os padrões de haplótipos encontrados nestas populações podem ser informativos na determinação se estas populações passaram por pontos de estrangulamento e/ou possuem taxas de mutação elevadas (Matson *et al.*, 2006; Giska *et al.*, 2015).

2.4 *Cardisoma guanhumi*

Cardisoma guanhumi (Latreille, 1825), também conhecido como caranguejo azul terrestre, é um crustáceo com ampla distribuição geográfica nas regiões tropicais ao longo da costa atlântica, desde os Estados Unidos ao sul do Brasil. Encontrado nas regiões de manguezais e estuários, este caranguejo constrói suas tocas nas regiões mais afastadas das fontes de água, ocupando as regiões de campos abertos e até mesmo florestas costeiras, sendo observados a até 5 km de distância dos rios. Apesar disso, a espécie é dependente da água salobra para completar o seu ciclo reprodutivo, onde fêmeas ovígeras (com cerca de 300.000 – 700.000 ovos) podem ser observadas nos períodos de reprodução (Gifford, 1962; Branco, 1991; Hostetler *et al.*, 1992).

Os indivíduos de *C. guanhumi* apresentam limitada capacidade de dispersão geográfica durante a vida adulta, tendo grande fidelidade às suas tocas durante a vida. Por este motivo, a dispersão da espécie é dependente dos estágios larvais iniciais, denominados de zoéas, que são carregados por centenas de quilômetros antes de serem recrutados em uma zona estuarina, já na forma de megalopa (Costlow Jr and Bookhout, 1968a; Costlow Jr and Bookhout, 1968b; Abrunhosa *et al.*, 2000; Forsee and Albrecht, 2012). Os indivíduos da espécie apresentam hábito semioturno e seus hábitos

alimentares são compostos, em sua maioria, por folhas, frutos e sementes das árvores que habitam os estuários e pequenos insetos e restos de outros animais em decomposição (Shimasaki *et al.*, 2012).

Os hábitos de *C. guanhumi*, assim como acontece para outros caranguejos, são essenciais para os ambientes em que se encontram. O hábito de forrageio influencia diretamente a composição e a estrutura da vegetação dos ambientes estuarinos. Além disso, a escavação de tocas para construção de abrigos e o revolver da serrapilheira em busca de alimentos influenciam nos padrões de aeração do solo e ciclagem dos nutrientes que favorecem o crescimento e estabelecimento da vegetação (Green *et al.*, 2008; Lindquist *et al.*, 2009).

Devido ao seu grande tamanho, que frequentemente excede 11 cm de largura de carapaça, e sabor agradável de sua carne, a espécie é um importante recurso pesqueiro de subsistência para inúmeras famílias que vivem nos entornos estuarinos e manguezais. Por conta disso, a espécie tem sido alvo de sobre-exploração. A grande pressão pesqueira sobre a espécie aliada à contínua degradação e destruição das áreas de manguezais tem causado uma notável e significativa redução no tamanho e na abundância de espécimes no litoral brasileiro. No Brasil, a espécie foi incluída na Lista Nacional das Espécies de Invertebrados Aquáticos e Peixes Sobreexplorados ou Ameaçados de Sobreexploração no ano de 2004 e, no fim de 2014, passou a integrar a Lista Brasileira de Espécies da Fauna sob Ameaça de Extinção – Peixes e Invertebrados Aquáticos na categoria Criticamente em Perigo (CR) de acordo com a Portaria nº 445 do Ministério do Meio Ambiente. Além disso, os estágios larvais iniciais de megalopa e juvenis da espécie mostraram-se sensíveis às descargas de contaminantes provenientes de carcinoculturas (Galli *et al.*, 2012).

Tendo em vista os atributos biológicos de *C. guanhumi* relacionados à sua capacidade sensitiva a perturbações ambientais, aos serviços ambientais de detritivoria (Bright and Hogue, 1972) e aqueles sobre a sua exploração, em meio a uma realidade de degradação dos ecossistemas de manguezal, é fundamental monitorar espaço-temporalmente uma espécie para o planejamento de conservação da espécie e de seus habitats. Além disso, o monitoramento temporal associado a diferentes regimes pluviométricos permite estabelecer possíveis 'valores de referência' para identificação de dano genômico como indicador ecológico. Além disso, tais indicadores permitem distinguir a influência de fatores ambientais (temperatura, altura de marés, índices pluviométricos) causados por exposição aos agentes genotóxicos (Lacaze *et al.*, 2011).

3. Objetivos

3.1 Objetivo geral

Avaliar espaço-temporalmente a ocorrência de dano genômico e de possível modificação da estrutura genético-evolutiva de *Cardisoma guanhumi* de cinco estuários do Estado de Pernambuco com a utilização de parâmetros de danificação genômica e genética de populações.

3.2 Objetivos específicos

1. Avaliar o dano genômico em hemolinfa de *Cardisoma guanhumi* pela metodologia do Teste do Micronúcleo e Ensaio Cometa, nos diferentes estuários, no período chuvoso (outono/inverno) e seco (primavera/verão) ao longo de dois anos consecutivos;
2. Avaliar a variabilidade genética de *Cardisoma guanhumi* por meio da análise do sequenciamento da região controle do DNA mitocondrial;
3. Avaliar a existência de correlação entre os índices de dano genômico e variabilidade genética de *Cardisoma guanhumi*;
4. Comparar/associar os diferentes níveis de impacto ambiental dos estuários pernambucanos, com os resultados de dano genômico e variação genética.

4. Capítulo I

Genotoxicidade espaço-temporal em sistemas estuarinos tropicais do Atlântico Ocidental: O uso potencial do caranguejo azul (*Cardisoma guanhumi*) como indicador ecológico perante uma perspectiva de flutuações climáticas

Spatial-temporal genotoxicity in tropical estuarine systems of the Western Atlantic: Potential use of the blue crab (*Cardisoma guanhumi*) as ecological indicator for monitoring tropical mangroves from Northeastern Brazil front a prospect of climate oscillations

Falcão, CBR^{1,4,5}; Pinheiro, MAA^{2,4}; Torres, RA^{1,4}; Adam, ML^{1,3,4,*};

¹ Laboratório de Genômica Evolutiva e Ambiental (LAGEA), Departamento de Zoologia, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Professor Moraes Rêgo 1235, CEP 50670-901, Cidade Universitária, Recife, Pernambuco, Brasil.

² Laboratório de Biologia de Crustáceos (LBC), Universidade Estadual Paulista ‘Julio Mesquita Filho’ - Campus Litoral Paulista (UNESP – IB/CLP), Praça Infante Dom Henrique s/nº CEP 11330-900, Parque Bitaru, São Vicente, São Paulo, Brasil.

³ Centro Acadêmico de Vitória (CAV), Universidade Federal de Pernambuco, Rua Alto do Reservatório, s/n – CEP 55608-680, Bela Vista, Vitória de Santo Antão, Pernambuco, Brasil.

⁴ Crusta – Grupo de Pesquisa em Biologia de Crustáceos.

⁵ Programa de Pós-graduação em Genética, Departamento de Genética, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Professor Moraes Rêgo 1235, CEP 50670-901, Cidade Universitária, Recife, Pernambuco, Brasil.

*Autor correspondente: mogabrod@gmail.com

Abstract

Estuarine systems comprise one of the most threatened ecosystems in the world, mainly due to population and industrial growth in their areas of occurrence. In these environments a lot of contaminants have been released which can lead to increase in genomic damage to the resident species with ensuing mutagenic and clastogenic effects. This study evaluates spatio-temporal possible genomic damage in *Cardisoma guanhumi* in order to infer the current status of conservation of this species, as well as environmental quality in five mangroves of northeastern Brazil. DNA damage was quantified by the micronucleus test and comet assay for analysis of macro and micro-lesions, respectively. The diagnosis of the species' conservation status, as well as the quality of the ecosystem where it lives, was assessed in two consecutive years (2012-2013), seasonal sampling (winter and summer), using two genetic tests (micronucleus, $n = 1,000$ Cels. / ind.; and comet, $n = 100$ cells. / ind.). Only in winter / 2012 there was a significant increase in the frequency of micronucleated cells and genomic damage index in estuaries, something that did not occur in other seasons analyzed. The genomic damage coincided with the harsh winter / 2012, atypical for the region under study, because of the water supply coming from the coastal rivers, which may have taken pollutants (industrial / household), significantly affecting this species in estuarine systems evaluated. The results confirm the resilience of this species and its environment to an atypical climatic episode, providing the environment an excessive amount of waste. Such evidence strengthens the power of genomic damage detection methods with use of this kind of crustacean, allowing a quick diagnosis, monitoring and prediction of the effects caused by climate oscillations over the estuarine systems in the Western Atlantic.

Keywords: blue crab, comet assay, estuaries, genomic damage, micronucleus test.

1. Introdução

Os sistemas estuarinos representam ecossistemas costeiros extremamente ameaçados, detendo expressiva importância econômica e localização estratégica para o estabelecimento humano e implantação de diversas atividades antrópicas. Devido às suas características geográficas os estuários são locais ideais ao estabelecimento e desenvolvimento de grandes centros urbanos, para atividades industriais e portuárias, marinas, fazendas de aquicultura, entre outros. Apesar disso, detêm expressiva fragilidade biológica, por ser um ecótono dotado de considerável diversidade biológica, com uso como sítio reprodutivo, trófico e para o crescimento de diversas espécies de água doce e marinhas. O desenvolvimento populacional e econômico humano tem promovido alterações aos estuários, seja por conversão de uso, perda da qualidade ambiental pela crescente contaminação por diversas fontes poluentes, ou mesmo por sua completa supressão (Anderson *et al.*, 1994; Kennish, 2002; Barbier, 2011; Elliott and Whitfield, 2011; Teichert *et al.*, 2016).

A região costeira do Brasil apresenta um longo histórico de adensamento populacional humano, que ocorreu de forma caótica e não planejada, particularmente associado aos estuários e seus manguezais. A zona costeira do Estado de Pernambuco (Nordeste do Brasil), por exemplo, apresenta 187 km de extensão, distribuídos por 21 municípios, que abriga aproximadamente 45% da população do estado (Araújo *et al.*, 2007). Tal fato promoveu uma elevada pressão antrópica sobre os manguezais, em especial às áreas de *apicum*, uma das principais feições deste ecossistema que vem sendo sistematicamente suprimidas, apesar de sua relevância biológica. Importante destacar que o *apicum* atua como importante área de amortização dos manguezais, detendo uma flora e fauna particular, muito sensível às alterações por pressões antrópicas. Entre as principais fontes de agressão ambiental estão sua conversão como viveiros escavados de carcinicultura e para construções de veraneio e turísticas (Kennish, 2002).

A grande quantidade de efluentes contaminados que desaguam nas regiões estuarinas podem aumentar a probabilidade de danos (diretos e/ou indiretos) às moléculas de DNA, evidenciando efeitos mutagênicos (alteração na sequência de bases da molécula de DNA), clastogênicos (alteração na estrutura dos cromossomos) e aneugênicos (segregação cromossômica anormal). Entre as mais proeminentes consequências desses efeitos estão: a redução na sobrevivência e no recrutamento; diminuição do sucesso reprodutivo; alteração das taxas de mutação, migração e composição genética da população; e ameaças à conservação e continuidade das espécies (Waters, Stack and Jackson, 1999; Whitehead *et al.*, 2003; Ohe *et al.*, 2004; Frenzilli, Nigro and Lyons, 2009, Adam *et al.*, 2010; Thomas *et al.*, 2014).

Nos últimos anos percebe-se um crescente interesse na utilização de marcadores genéticos capazes de quantificar os efeitos de exposição aos contaminantes, com diferentes métodos de sub-letalidade. No caso do teste por micronúcleos, tais análises de dano genômico têm sido frequentes em zonas costeiras, em especial em estuários e manguezais, devido a sua relativa rapidez, simplicidade, baixo custo e ótima capacidade discriminante na identificação de macrolesões genômicas (Heddle, 1973; Schmid, 1975; Siu *et al.*, 2004; Pinheiro *et al.*, 2013). No entanto, é necessário um ciclo celular completo para que os micronúcleos sejam expressos, ao contrário do ensaio cometa, que apresenta maior sensibilidade à detecção de microlesões genômicas. Assim, o ensaio cometa permite identificar danos na maioria das células eucarióticas de forma individualizada (Singh *et al.*, 1988), com validação de seu uso como indicador ecológico na diagnose e monitoramento de áreas costeiras (Davanso *et al.*, 2013; Rocha *et al.*, 2015). Pelo exposto, estes testes têm sido utilizados com sucesso no monitoramento ambiental em vários animais vertebrados, como mamíferos, anfíbios e peixes (Frenzilli *et al.*, 2009; Arcaute *et al.*, 2014; Thomas *et al.*, 2014), como também em invertebrados, como os crustáceos (Nudi *et al.*, 2010; Pinheiro *et al.*, 2013).

Cardisoma guanhumi (Latreille, 1825), também conhecido como caranguejo azul terrestre, é um crustáceo com ampla distribuição geográfica tropical no Atlântico Ocidental, desde os Estados Unidos ao sul do Brasil. Ocorre em regiões arenosas dos sistemas estuarinos, seja na transição entre os manguezais e as áreas mais emersas (*apicum* de manguezal), onde ocorre rarefação arbórea (p. ex., áreas de restinga), ou mesmo dentro de bosques de Mata Atlântica. Ali escava tocas até 150 m de distância dos rios, onde ainda recebe seu efeito, embora tenha dependência da água salobra para o desenvolvimento de seus ovos e larvas onde fêmeas ovígeras com 300.000 – 700.000 ovos podem ser observadas nos períodos de reprodução (Gifford, 1962; Hostetler *et al.*, 1992). *Cardisoma guanhumi* apresenta reduzida capacidade de dispersão geográfica durante sua vida adulta, tendo grande fidelidade às suas tocas durante a vida. Por este motivo, a dispersão é dependente de seus estágios larvais iniciais (zoeas), que são carregados por centenas de quilômetros até que o recrutamento ocorra em áreas estuarinas no último estágio larval (megalopa) (Costlow Jr. and Bookhout, 1968a,b; Abrunhosa *et al.*, 2000; Forsee and Albrecht, 2012).

Devido ao grande tamanho na fase adulta, que geralmente excede 11 cm de largura de carapaça (Brasil/ Ibama, 2011), bem como o sabor agradável de sua carne, *C. guanhumi* detém importância pesqueira de subsistência para inúmeras famílias que habitam áreas estuarinas (Amaral and Jablonski, 2005; Amaral *et al.*, 2015). Assim, a grande pressão pesqueira sobre esta espécie, aliada à contínua degradação e supressão de seu habitat, tem promovido uma notável redução no tamanho e estoque deste recurso no litoral brasileiro. Em 2004 esta espécie foi incluída na Lista Brasileira de Invertebrados Aquáticos e Peixes Sobreexplotados ou Ameaçados de Sobreexploração, passando, em 2014, à categoria “Criticamente em Perigo” (CR), figurando da Lista Brasileira de Espécies da Fauna sob Ameaça de Extinção (MMA, 2014).

Sabe-se que os estágios larvais (zoeas e megalopas), bem como os estágios juvenis da espécie são mais sensíveis às descargas de contaminantes provenientes de complexos industriais, portuários, de esgotos domésticos não tratados e, sobretudo, oriundos de carcinoculturas (Galli *et al.*,

2012). Mesmo os adultos de *C. guanhumi* podem se mostrar sensíveis às perturbações relacionadas à contaminação terrestre, de onde provém seu alimento (Bright and Hogue, 1972), assim como decorrentes da degradação dos sistemas estuarinos pelos vários impactos antrópicos. Neste sentido esta espécie assume relevância notável em monitoramentos espaço-temporais, com vistas à sua conservação e dos habitats que ocupa, particularmente associando diferentes regimes pluviométricos aos “valores de referência” de danos genômicos. O uso destes indicadores ecológicos permite distinguir a influência de alguns fatores ambientais (p. ex., térmicos, de amplitude de maré e pluviométricos) causados por exposição aos agentes genotóxicos (Lacaze *et al.*, 2011).

O presente estudo objetivou obter indicativos ecológicos de natureza genômica a fim de diagnosticar e monitorar o *status* de conservação de *Cardisoma guanhumi* (Latreille, 1825) de cinco sistemas estuarinos tropicais do estado de Pernambuco, no Nordeste do Brasil. A utilização de uma espécie residente na paisagem adaptativa dos estuários é importante também para evidenciar o *status* de conservação dos próprios manguezais. Além disso, este estudo permitiu prever a magnitude dos indicadores ecológicos de dano genômico a serem esperados na comunidade de organismos aquáticos da zona costeira, tomando como exemplo *C. guanhumi*, ao longo de ciclos climáticos contíguos e oscilantes, e com diferentes regimes de intervenção antrópica.

2. Metodologia

2.1. Áreas de estudo e amostragem

Cinco sistemas estuarinos tropicais do Estado de Pernambuco, nordeste brasileiro, foram selecionados e distribuídos em três regiões litorâneas: **1) Litoral Norte**, representado pelo Rio

Goiana e Rio Jaguaribe; **2) Litoral Centro**, com o Rio Capibaribe (região metropolitana do Recife; marco central do litoral pernambucano) e **3) Litoral Sul**, compreendendo o Rio Sirinhaém e Rio Formoso (Figura 1). Estes foram selecionados por apresentarem diferentes graus de conservação, seguindo informações disponibilizadas pela Agência Estadual de Meio Ambiente de Pernambuco (CPRH, 2010).

No litoral norte do Estado de Pernambuco existem áreas preservadas, com manutenção de sua biodiversidade, apesar da crescente poluição industrial/doméstica e supressão/aterro de seus manguezais (Rio Goiana), exploração pesqueira predatória (Rio Jaguaribe) e ameaça pela carcinocultura e indústria automobilística. No litoral centro, por efeito da malha urbana do Recife (capital do Estado de Pernambuco), os sistemas estuarinos e de manguezal (Rio Capibaribe) historicamente são os mais afetados por desmatamentos, aterros, crescimento imobiliário e implantação de vias públicas. E por fim, no litoral sul do estado são detectados bons índices de conservação da fauna e flora, como constatado no Rio Sirinhaém e Rio Formoso, embora neste último esteja ameaçado pela crescente exploração pesqueira predatória (CPRH, 2010). Para composição do grupo controle foram amostrados 10 espécimes no Estuário do Rio Una, na Estação Ecológica Juréia-Itatins, uma Unidade de Conservação (UC) localizada no litoral centro-sul do Estado de São Paulo, Sudeste do Brasil, como parte de um Mosaico de UCs (Lino and Albuquerque, 2007). Por conta de tal situação, a área é colonizada por comunidades tradicionais, totalizando cerca de 200 famílias e 2.000 pessoas, detendo conservação ambiental ímpar e isenta de contaminantes (Pinheiro *et al.*, 2013).

Foram amostrados, para análise, 200 exemplares de *Cardisoma guanhumi*, sendo 10 para cada sistema estuarino, em duas estações climáticas (inverno: julho-agosto; e verão: dezembro-janeiro), em dois anos amostrais (2012 e 2013). Os animais foram capturados com auxílio de pescadores locais, empregando armadilhas artesanais do tipo “ratoeiras” contendo frutas cítricas como isca atrativa. Os animais selecionados foram conduzidos ao laboratório e a coleta da

hemolinfa foi realizada em um período inferior à 24 h após a coleta, a fim de minimizar possíveis alterações decorrentes do afastamento das condições do habitat natural da espécie.

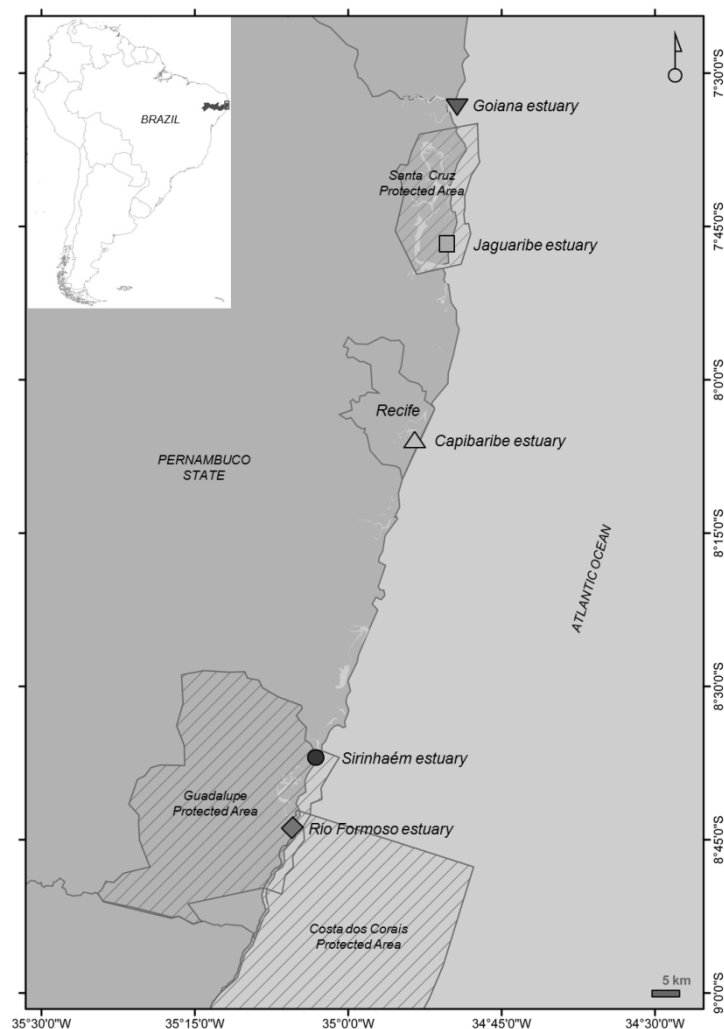


Figura 1. Localização dos cinco sistemas estuarinos em estudo onde foram coletados os indivíduos de *Cardisoma guanhumi* ao longo dos anos de 2012 e 2013, a saber: Litoral Norte (Rios Goiana e Jaguaribe), Litoral Centro (Rio Capibaribe) e Litoral Sul (Rios Sirinhaém e Formoso), no estado de Pernambuco, Brasil. Direito de utilização da imagem gentilmente cedido por Gama-Maia and Torres, 2016. Retirada de Gama-Maia and Torres, 2016.

2.2. Teste do Micronúcleo (MN)

O teste do micronúcleo (MN) e a análise dos dados foram conduzidos segundo os protocolos de Siu *et al.*, (2004) e de Heddle (1973)/Schmid (1975), respectivamente, com algumas poucas

modificações para o crustáceo em questão. A avaliação dos hemócitos foi realizada após a confecção de esfregaços de hemolinfa obtida pela punção por uma seringa (1 mL com agulha 29G), na membrana de articulação entre o carpo e própodo do terceiro par de pereiópodos. Para cada exemplar foram produzidas duas lâminas de esfregaço de hemolinfa, que foram secas em temperatura ambiente (20 min), fixadas com metanol absoluto e coradas com Giemsa (puro), com duração de 5 min para cada procedimento. Foram considerados micronúcleos os fragmentos nucleares sem conexão com o núcleo principal, possuindo mesma coloração/intensidade do núcleo e com tamanho inferior ao terço do tamanho nuclear, de acordo com os critérios indicados por Moron *et al.* (2006). Foram analisadas 1.000 células por indivíduo, em microscópio óptico, sendo contabilizadas com contador manual aquelas micronucleadas em relação ao total (MN‰).

2.3. Ensaio Cometa

O ensaio cometa foi conduzido de acordo com o protocolo adaptado de Singh *et al.*, (1988). Antes da coleta da hemolinfa foi preparada uma solução anticoagulante (0,49 M de NaCl, 30 mM de citrato trisódico e 10 mM EDTA – de acordo com Klobucar *et al.*, 2012). Seringas (1 mL com agulha 29G), foram preenchidas com 200 µL de solução anticoagulante e 400 µL de hemolinfa de cada animal, sendo a mistura transferida para um tubo coletor de 1,5 mL. Desta solução, cerca de 70 µL foram homogeneizados com 100 µL de agarose (0,5%) de baixo ponto de fusão (*low melting*), a 37°C. Cerca de 170 µL dessa solução (hemolinfa + anticoagulante + 0,5% agarose de baixo ponto de fusão) foram espalhados sobre duas lâminas previamente cobertas com 1,5% agarose diluída em PBS (KCl + KH₂PO₄ + NaCl + Na₂HPO₄) e deixadas em descanso por 24 h, sendo cobertas com lamínulas e colocadas em refrigerador (15 min). Após a polimerização da agarose as lamínulas foram retiradas e as lâminas imersas em solução de lise [1 mL de Triton X-100, 10 mL de DMSO e 89 mL de solução de lise, com pH 10, contendo: 2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, 8 g de

NaOH em 890 mL de água ultrapura], no mínimo durante 24 h em geladeira. Após a lise, as lâminas foram incubadas em 300 mM NaOH + 1 mM de tampão de EDTA (pH>13) por 20 min, para desnaturação das moléculas de DNA, sendo, em seguida, submetidas a uma eletroforese (40 V a ~300 mA, por 20 min). Após a corrida, as lâminas foram neutralizadas em uma solução de 0,4 M de Tris (15 min) e fixadas em etanol 96~100% (5 min). Após secarem as lâminas foram coradas com *GelRed* e analisadas em microscópio de fluorescência, sob aumento de 400x. Um total de 100 nucleóides celulares foram analisados para cada indivíduo, com o dimensionamento do dano celular estabelecido segundo cinco classes: 0 (sem danos) ou variando de I a IV (diferentes níveis de danos), de acordo com a migração do material nuclear fragmentado em relação ao tamanho do núcleo restante. Assim, foi estabelecido o Índice de Dano Genômico (ID), determinado pela multiplicação do número de células de cada classe pelo valor da classe, dividido pelo número de indivíduos analisados em cada ponto de coleta, onde: $ID = (n^{\circ} \text{ de células com nível de danificação } 0 \times 0 + n^{\circ} \text{ de células com nível de danificação } I \times 1 + \dots + n^{\circ} \text{ de células com nível de danificação } IV \times 4) / n^{\circ} \text{ de indivíduos amostrados}$ (Collins, 2004).

2.4. Monitoramento Pluviométrico

O registro pluviométrico diário foi obtido em estações meteorológicas próximas (<60 Km) a cada um dos sistemas estuarinos e seus manguezais, durante o período de estudos (janeiro/2012 a dezembro/2013). Estes dados foram obtidos no site da Agência Pernambucana de Águas e Climas (APAC, 2015), referentes a sete postos de monitoramento para quatro dos manguezais estudados: Rio Goiana (Posto Itapirema), Rio Jaguaribe (Postos de Igarassu, Barra do Catucá e Usina São José), Rio Capibaribe (Postos do Alto da Brasileira e Várzea) e Rio Formoso (Posto da Usina Cucaú). Não foi possível obter dados para o estuário do Rio Sirinhaém.

A pluviosidade em cada ano (2012 e 2013) foi calculada pela média dos valores mensais de cada um dos sete postos de monitoramentos e serviu para confrontar a oscilação anual durante o período de estudo. Os valores mensais foram obtidos pelo somatório dos dados diários obtidos mensalmente, visando avaliar possíveis refinamentos na oscilação pluviométrica mensal. A pluviosidade sazonal também foi avaliada pelo agrupamento do volume de chuvas para o inverno e verão, com o cálculo da média para cada estação climática, utilizando os dados obtidos nos sete postos de monitoramento.

2.5. Análises estatísticas

Os dados obtidos pelo teste do micronúcleo e ensaio cometa foram analisados com o software *GraphPad Prism* (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). A normalidade dos dados foi verificada pelo teste de Shapiro-Wilk, enquanto a homocedasticidade das variâncias foi executada pelo teste de Bartlett. Os dados com distribuição normal foram avaliados por ANOVA, com o confronto entre as médias “a posteriori” por Tukey. Nos casos de distribuição não-normal e variância não-homogênea os dados foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis, seguido de aplicação do teste de comparação múltipla de Dunn. Todos os testes estatísticos foram baseados nos indicativos apresentados por Sokal and Rohlf (2012). As diferenças foram consideradas estatisticamente diferentes quando os valores foram significativos a 5, 1 e 0,1%.

3. Resultados

3.1. Teste do Micronúcleo (MN)

Uma análise holística dos dados obtidos, independente da estação climática ou ano de amostragem, não evidenciou diferença significativa das médias de frequências de células micronucleadas (MN‰) para *C. guanhumi* entre os estuários em estudo ($F = 0,784$; $P = 0,562$). No entanto, houve variação significativa deste parâmetro em função do mês ($F = 20,109$; $P = 0,0000$), estação climática ($F = 27,489$; $P = 0,0000$) e ano amostral ($F = 61,766$; $P = 0,0000$). De modo geral, a média de MN‰ durante o inverno foi 4,3 vezes superior à de verão ($1,56 \pm 0,20$ MN‰ e $0,36 \pm 0,08$ MN‰, respectivamente; $F = 27,489$; $P = 0,0000$).

Uma variação expressiva de MN‰ foi perceptível durante o inverno/2012 (Tabela 1), onde foi constatada diferença significativa entre as médias em função dos estuários avaliados ($F = 7,169$; $P = 0,0000$). Neste caso as maiores médias foram registradas nos estuários dos rios Goiana, Capibaribe, Sirinhaém e Formoso (Figura 2), que não diferiram entre si, mas apenas quando confrontadas às menores médias obtidas para o estuário de Jaguaribe e do grupo controle (Estação Ecológica da Juréia), que foram similares entre si. No entanto, não houve diferença estatística entre as médias de MN‰ para os diferentes estuários nas demais estações climáticas analisadas (verão/2012; inverno e verão/2013). Verificou-se, também, que a análise do ciclo temporal completo evidenciou uma redução significativa de MN‰ a partir dos dados de inverno/2012 em relação às estações climáticas subsequentes (Figura 3).

Tabela. 1. Frequência de células micronucleadas (MN‰), registradas em exemplares de *Cardisoma guanhumi* capturados em cinco áreas de manguezal do Estado de Pernambuco (Goiana, Jaguaribe, Capibaribe, Sirinhaém e Formoso) e outra controle no Estado de São Paulo (Estação Ecológica Jureia-Itatins). Onde: N, número de animais analisados; Min, valor mínimo; Max, valor máximo; X, média aritmética; ER, erro padrão da média.

Local	Mês/Ano	N	Min	Max	X ± ER
Goiana	jul/12	10	1	8	4,100 ± 0,657
	dez/12	9	0	2	0,556 ± 0,242
	jul/13	8	0	1	0,125 ± 0,125
	dez/13	10	0	0	0,000 ± 0,000
Jaguaribe	jul/12	10	0	4	1,700 ± 0,423
	dez/12	8	0	4	1,125 ± 0,549
	jul/13	9	0	1	0,333 ± 0,167
	dez/13	10	0	0	0,000 ± 0,000
Capibaribe	jul/12	10	1	7	3,600 ± 0,600
	dez/12	10	0	3	0,400 ± 0,306
	jul/13	10	0	1	0,100 ± 0,100
	dez/13	9	0	0	0,000 ± 0,000
Sirinhaém	jul/12	8	1	8	3,500 ± 0,824
	dez/12	9	0	1	0,444 ± 0,176
	jul/13	8	0	0	0,000 ± 0,000
	dez/13	9	0	1	0,111 ± 0,111
Rio Formoso	jul/12	9	0	5	2,667 ± 0,553
	dez/12	9	0	3	1,000 ± 0,373
	jul/13	5	0	1	0,200 ± 0,200
	dez/13	10	0	1	0,100 ± 0,100
Jureia	jul/12	10	0	1	0,200 ± 0,133

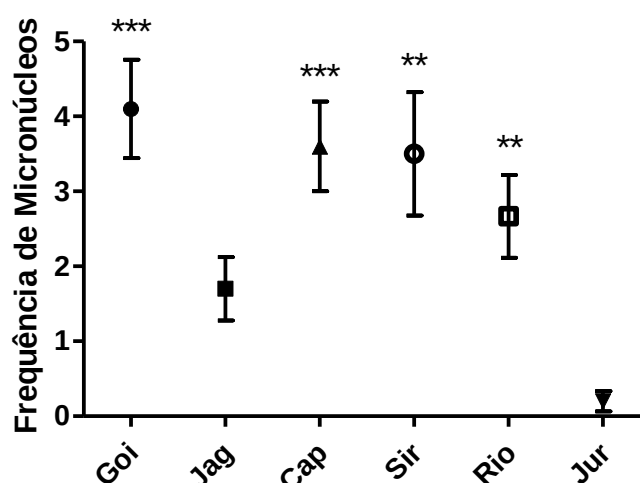


Figura 2. Análise da frequência de células micronucleadas (MN‰) observadas nos exemplares de *Cardisoma guanhumi* dos cinco manguezais analisados (Goi: Goiana; Jag: Jaguaribe; Cap: Capibaribe; Sir: Sirinhaém; Rio: Rio Formoso) em comparação com o grupo controle (Jur: Jureia) no período de inverno do ano de 2012 (**= $p < 0,01$, ***= $p < 0,001$ em comparação ao grupo controle da Jureia). Pontos = média; Linhas = erro padrão da média.

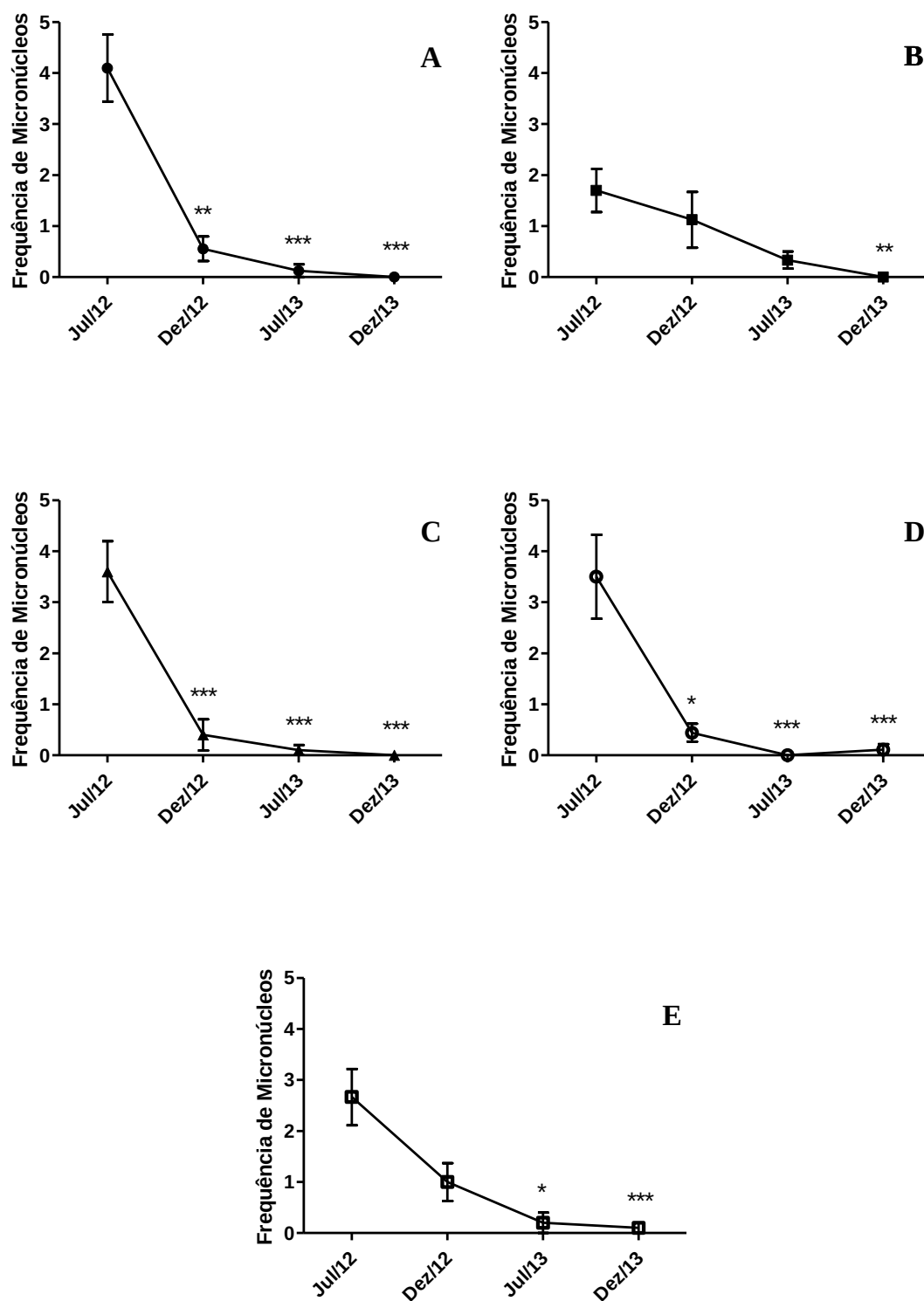


Figura 3. Análise temporal da frequência de células micronucleadas observadas nos exemplares de *Cardisoma guanhumi* dos cinco manguezais analisados (A, Goiana; B, Jaguaribe; C, Capibaribe; D, Sirinhaém (D); e E, Rio Formoso), nas estações climáticas de inverno e verão de 2012 e 2013. Os valores de significância (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$) sempre confrontam a média da estação de referência com a estação do inverno/2012 (Jul/12). Pontos = média; Linhas = erro padrão da média.

3.2. Ensaio Cometa

O dano genômico pelo Ensaio Cometa (Tabela 2) mostrou uma elevação nos exemplares durante o inverno/2012, especificamente nos manguezais dos rios Goiana, Jaguaribe e Capibaribe, que diferiram dos manguezais do litoral Sul do Estado de Pernambuco (Sirinhaém e Formoso) ($P < 0,001$), os quais, por sua vez, guardaram similaridade com o manguezal controle (Figura 4). Contrariamente, não houve alteração significativa no índice de danificação genômica em relação ao grupo controle no mesmo período amostral. Também não houve alteração significativa para os exemplares dos cinco estuários nas demais estações climáticas analisadas (verão de 2012, inverno e verão de 2013). Além disso, uma análise holística do ciclo temporal de estudos indicou um declínio significativo no nível de danificação genômica constatado no inverno/2012, ao longo das demais estações climáticas (Figura 5).

Tabela 2. Análise das células danificadas (%) e do índice de dano genômico (ID) registrados em exemplares de *Cardisoma guanhumi* capturados em cinco áreas de manguezal do Estado de Pernambuco (Goiana, Jaguaribe, Capibaribe, Sirinhaém e Formoso) e outra controle no Estado de São Paulo (Estação Ecológica Juréia-Itatins).

Estuário	Período	N	Células Danificadas (%)	ID
Goiana	Inverno 2012	10	66.8	116.9
	Verão 2012	9	20.7	36.5
	Inverno 2013	10	15.8	27.8
	Verão 2013	10	5.1	9.8
Jaguaribe	Inverno 2012	10	72.0	121.8
	Verão 2012	10	2.0	2.8
	Inverno 2013	10	19.0	25.6
	Verão 2013	10	8.8	15.2
Capibaribe	Inverno 2012	10	49.8	99.6
	Verão 2012	9	8.7	14.5
	Inverno 2013	10	4.0	4.9
	Verão 2013	9	4.9	6.0
Sirinhaém	Inverno 2012	6	18.7	21.0
	Verão 2012	10	21.8	55.8
	Inverno 2013	10	9.0	12.4
	Verão 2013	9	7.1	10.0
Rio Formoso	Inverno 2012	10	13.0	16.4
	Verão 2012	8	24.4	33.4
	Inverno 2013	10	23.2	42.7
	Verão 2013	10	15.8	28.0
Juréia	Outubro 2012	12	5.0	7.5

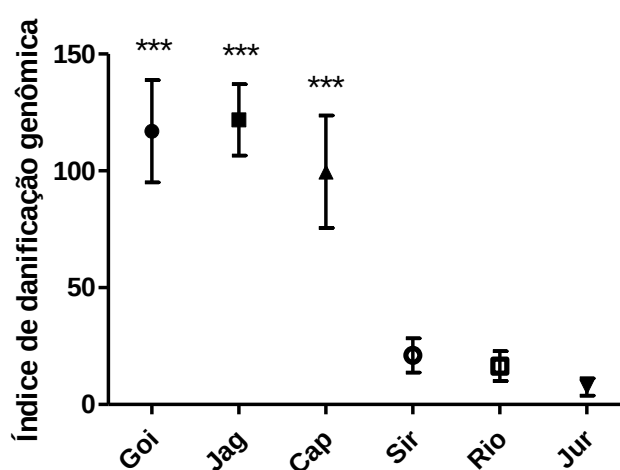


Figura 4. Análise do índice de danificação genômica pelo ensaio cometa, observado nos exemplares dos cinco manguezais (Goi: Goiana; Jag: Jaguaribe; Cap: Capibaribe; Sir: Sirinhaém; e Rio: Rio Formoso) em comparação ao grupo controle (Jur: Jureia), no período de inverno do ano de 2012 (*** $p < 0,001$). Pontos = média; Linhas = erro padrão da média.

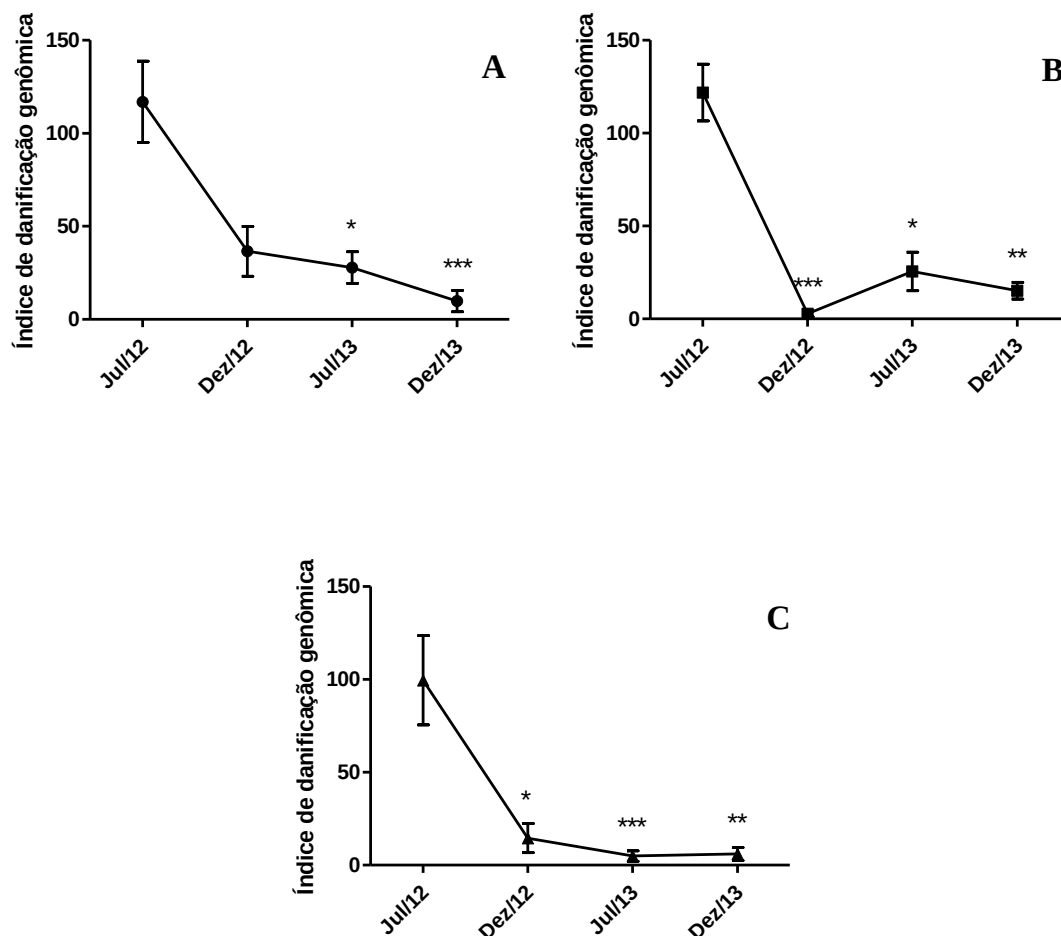


Figura 5. Análise temporal do índice de danificação genômica observado pelo ensaio cometa nos três manguezais que indicaram elevação significativa no ID no inverno/2012 (A, Goiana; B Jaguaribe; e C, Capibaribe), em comparação às estações climáticas de inverno e verão de 2012 e 2013. Os valores de significância (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$) sempre confrontam a média da estação de referência com a estação do inverno/2012 (Jul/12). Pontos = média; Linhas = erro padrão da média.

3.3. Monitoramento Pluviométrico

A média do volume total de chuvas, para os sete postos de monitoramento, que incidiram sobre os estuários/manguezais analisados não apresentou diferença entre os anos de 2012 ($109,1 \pm 28,35\text{mm}$) e 2013 ($158,9 \pm 34,34\text{mm}$) (Figura 6-A). Apesar disso, a média do quantitativo pluviométrico foi maior em julho/2013 em comparação a julho/2012 ($356,0 \pm 29,12\text{mm}$ e $265,0 \pm 17,02\text{mm}$, respectivamente; $p = 0,007$). No entanto, o somatório dos valores pluviométricos

diários dos dois meses (jul/12 e jul/13) mostrou um evento com maior volume de chuvas no início de julho/2012 (632,5mm), duas vezes superior ao dia de maior intensidade de chuvas de julho/2013.

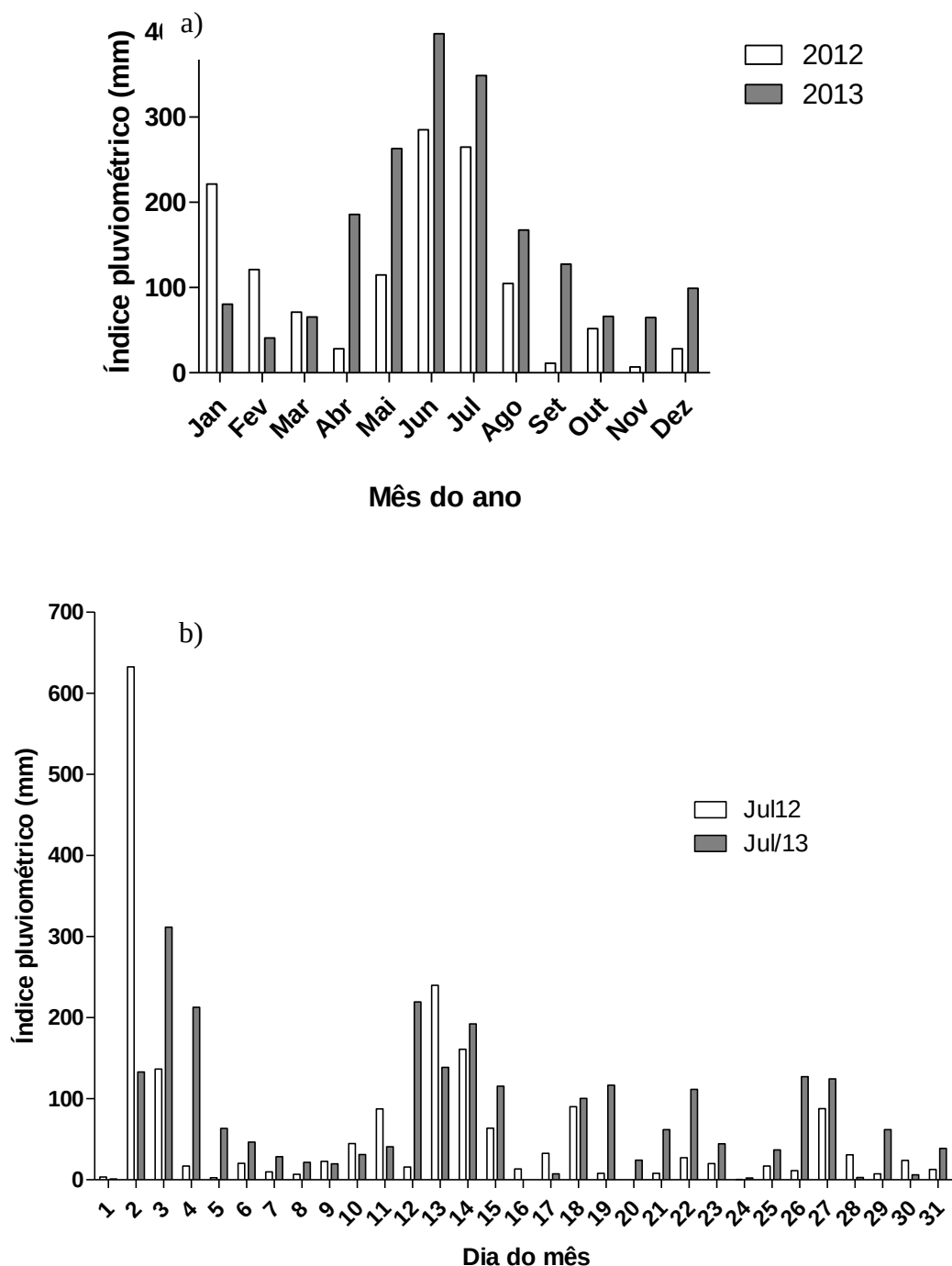


Figura 6. Médias mensais dos índices pluviométricos ao longo de 2012 e 2013 (a) e soma dos índices pluviométricos diários em julho/12 e julho/13 (b) registrados em sete postos de monitoramento pluviométrico disponibilizados no site da Agência Pernambucana de Águas e Climas (APAC - <http://www.apac.pe.gov.br/meteorologia/monitoramento-pluvio.php#>), a saber: Goiana ('Itapirema'); Igarassu ('Igarassu', 'Barra do Catucá' e 'Usina São José'); Recife ('Alto da Brasileira' e 'Várzea'); e Rio Formoso ('Usina Cucaú').

4. Discussão

A análise pluviométrica registrada nos municípios pernambucanos, onde ocorrem os manguezais em estudo, evidencia um padrão com maior incidência de chuvas durante os meses de inverno, que se assemelha a outros estados do nordeste brasileiro. O litoral pernambucano, especificamente, apresenta aumento gradativo de precipitação a partir de fevereiro (50-100 mm), atingindo níveis máximos de pluviosidade em junho (>600 mm), com subsequente diminuição nos meses seguintes. A plena estação chuvosa que acomete o litoral pernambucano no mês de junho está relacionada à posição e intensidade da Alta pressão do Atlântico Sul e à temperatura do Atlântico Sul (http://www.mma.gov.br/estruturas/sqa_sigercom/_publicacao/78_publicacao12122008091035.pdf) .

A análise diagnóstica e o monitoramento sobre o *status* de conservação de *C. guanhumi* ao longo dos cinco manguezais do Nordeste do Brasil mostraram, para ambos os métodos (micronúcleo e cometa), um aumento significativo dos danos genômicos durante o inverno/2012. Os valores significativos de dano genômico (MN‰) nos exemplares dos manguezais pernambucanos analisados sugere que as populações locais de *C. guanhumi* foram submetidas à exposição por contaminantes em nível expressivo. É sabido que o rápido crescimento das populações humanas apresenta, como consequência, a liberação de contaminantes potencialmente genotóxicos e carcinogênicos, que encontram como destino final os ambientes costeiros, incluindo manguezais e estuários (Jha, 2008; Frinhani and Carvalho, 2010). Os estuários/manguezais dos rios Goiana (cidade de Goiana, no litoral norte de Pernambuco) e Capibaribe (cidade do Recife, no litoral central e capital de Pernambuco) têm sido alvo de carga poluidora de origem industrial, doméstica e hospitalar, além do corte e aterro de áreas de manguezal para a implantação de projetos de carcinicultura (Dantas, 2008; Araújo and Oliveira, 2013). Por outro lado, os estuários dos rios

Formoso e Sirinhaém estão inseridos em duas Áreas de Proteção Ambiental (APA Estadual de Guadalupe e APA Federal Costa dos Corais), embora sujeitas a um amplo cultivo histórico de cana-de-açúcar, que ocupa os quase 100 km que ligam estes municípios à cidade do Recife. Logo, os altos valores de frequência das células micronucleadas (MN‰), observados no inverno/2012, devem estar associados ao regime de despejo de diferentes contaminantes provenientes da circunvizinhança dos estuários/manguezais estudados. Vários trabalhos têm associado o aumento de MN‰ nos organismos marinhos com a exposição continuada aos contaminantes, por períodos maiores que 96 horas (Nudi *et al.*, 2010; Erbe *et al.*, 2011). No entanto, quando consideradas as demais estações climáticas analisadas, os valores de MN‰ não diferiram em relação ao grupo controle. Tais evidências sugerem que diferenças nos níveis de precipitação pluviométrica ao longo dos anos podem influenciar na fixação/dispersão dos contaminantes nos ambientes costeiros, especialmente os manguezais.

Diversos trabalhos realizados em ambientes costeiros tropicais do Brasil e em outros locais do mundo têm mostrado que ambientes de manguezais sob intensa perturbação fixam compostos contaminantes de várias classes, muitos deles com comprovada associação ao dano genômico (Danvanso *et al.*, 2013; Oliveira *et al.*, 2014; Carreira *et al.*, 2015; Sukhdhane *et al.*, 2015). Portanto, análises da constituição química do sedimento no entorno das tocas dos caranguejos poderiam reforçar a hipótese aqui sustentada, sobre uma associação direta entre a frequência de macrolesões do DNA e a ocorrência de forte perturbação química nos manguezais estudados.

O aumento na frequência e no índice de dano genômico, observados pelo ensaio cometa nos animais provenientes dos manguezais dos rios Goiana e Capibaribe, corroboraram os resultados obtidos pelo teste do micronúcleo no inverno/2012. Os diferentes tipos de lesões encontrados, que variaram desde microlesões até macrolesões, evidenciam uma grande perturbação na dinâmica dos manguezais dos estuários. Tais resultados coincidem com o aumento do processo de industrialização da região, que vem abrigando a instalação de um complexo, com mais de 90

indústrias do Setor Automotivo. O ensaio cometa mostrou, também, um pronunciado aumento de microlesões no DNA naqueles animais provenientes do manguezal do Rio Jaguaribe, algo que não havia sido detectado pelo teste de micronúcleos, que caracteriza as macrolesões. Apesar da baixa incidência de células micronucleadas no Jaguaribe, foi observada uma alta incidência de células em avançado grau de deterioração. Assim, a presença de microlesões (Ensaio Cometa), combinadas à ausência das macrolesões (Teste Micronúcleo) e incidência de deterioração celular nos indivíduos de *C. guanhumi* no Rio Jaguaribe (localizado entre os rios Goiana e Capibaribe, que apresentaram lesões por micronúcleos), pode ser resultado de indução da morte celular. Resultados similares foram obtidos nos estudos de Arcaute *et al.* (2014), onde poucas células foram capazes de completar um ciclo de divisão celular e evidenciar uma incidência de células micronucleadas.

O ensaio cometa revelou, também, valores não significativos para os animais provenientes dos manguezais do litoral sul. Tais diferenças podem ser explicadas pelas características específicas de cada método, ressaltando-se, por exemplo, uma maior sensibilidade à detecção de lesões genômicas do ensaio cometa (Cotelle and Férard, 1999; Jha, 2008). Além disto, os experimentos de Sponchiado *et al.*, (2011) mostraram que o aumento no dano genômico detectável pelo ensaio cometa ocorre nos primeiros dias de exposição, mas já se reverte a partir do 10º dia. Isto se deve, provavelmente, à habilidade de reparo do DNA, que pode ocorrer de minutos a horas (Collins and Horvathova, 2001; Schmezer *et al.*, 2001). Os resultados do ensaio cometa com células de lagosta também indicam um aumento na capacidade de estabilização do dano genômico frente à uma exposição prolongada aos contaminantes (Klobucar *et al.*, 2012). Embora não haja uma explicação definitiva para tais resultados, as evidências sugerem ausência de danificação genômica detectável pelo ensaio cometa nos estuários do litoral sul, devido ao maior tempo decorrido entre o episódio de intensa pluviosidade no início de julho e a captura dos animais avaliados. Além disto, as diferentes metodologias aqui empregadas respondem de formas particulares às diferentes classes de contaminantes com diferentes efeitos genotóxicos.

A progressiva diminuição de danos genômicos subsequentes ao inverno/2012 reforça a provável ocorrência de um evento pontual. Considerando o natural aumento do índice pluviométrico nos períodos de inverno nos estuários do Estado de Pernambuco, qualquer associação ‘direta’ de aumento do dano genômico com a estação de maior precipitação deveria mostrar resultados semelhantes para o inverno/2013, algo que não ocorreu. Os estudos de Winter *et al.* (2004) e Lacaze *et al.* (2011) também não mostraram diferenças nos índices de dano genômico nos animais expostos durante os períodos de inverno e verão, evidenciando falta de relação ‘obrigatória’ entre danificação genômica e uma estação climática particular. No entanto, esse fenômeno é possível em regiões caracterizadas por um regime pluviométrico similar ao do Estado Pernambuco, com o inverno coincidente às maiores chuvas. Desta forma, mesmo que tais eventos ocorram esporadicamente, apresentam uma relação de susceptibilidade em relação às estações climáticas, visto que no nordeste brasileiro grandes incidências pluviométricas que ocorram além do inverno são improváveis e ainda carecem de registros.

Numa análise mensal do volume de chuvas, verifica-se, inclusive, que no inverno/2013 ela foi maior do que no inverno do ano anterior. No entanto, uma análise diária da precipitação em julho dos dois anos revela que apesar do menor volume de chuvas no inverno/2012, ele foi concentrado em um único dia, e não distribuído uniformemente como em 2013. O grande volume de águas ocorrido em julho/2012 causou inundações e transbordamento dos rios de seus leitos em várias cidades do Estado de Pernambuco e promoveu a lavagem dos solos em áreas agrícolas. Isto fez com que águas não tratadas fossem carregadas e misturadas com a dos rios e galerias pluviais, inundando os manguezais com um grande volume de contaminantes de origem variada. A correlação positiva entre eventos de grande precipitação pluviométrica e elevação na incidência de danos genômicos apoia achados anteriores (Werner *et al.*, 2002; Whitehead *et al.*, 2004; Polard *et al.*, 2011), que evidenciaram o aumento da presença de agrotóxicos e maior incidência de dano genômico após o intenso aumento do índice pluviométrico. Tais evidências sugerem que este seja o

modelo mais adequado para a diagnose e monitoramento de espécies endêmicas de manguezais tropicais, que estão sujeitos a regimes de perturbações, mesmo que numa escala temporal muito pequena.

Os dados obtidos no presente estudo sugerem que os índices de genotoxicidade para *C. guanhumi* estão mais associados ao volume de chuvas que incide de forma concentrada no Estado de Pernambuco, do que o volume de chuva precipitado uniformemente. A abordagem aqui demonstrada permite, então, argumentar em favor de um cenário preditivo global sobre os efeitos danosos (e eventualmente letais) sobre populações de espécies, comunidades bióticas e seus ecossistemas envolvidos em episódios de intenso volume de águas. Esta mesma abordagem reforça cenários similares já observados na literatura (Galloway, 2006).

Além disto, a diminuição nos índices de dano genômico revelou, ainda, uma interessante particularidade ecológica da espécie estudada. Uma análise global dos resultados revela o ótimo potencial de resiliência populacional de *C. guanhumi*, que foi capaz de se recuperar das perturbações sofridas no inverno/2012, em um curto período de tempo, e progressivamente ao longo das amostragens/2013. Evidências recentes mostraram, também, uma reversão do dano genômico em peixes logo após a interrupção da exposição dos espécimes aos xenobióticos (Groff *et al.*, 2010; Mohanty *et al.*, 2011; Hasue *et al.*, 2013). A combinação de tais evidências reforça a hipótese de um evento pontual de carreamento de compostos genotóxicos para os estuários no inverno/2012.

A diminuição no dano genômico nos animais analisados ao longo de todo período amostral coincide com a diminuição nos índices diários de pluviosidade, seguida de uma provável diminuição no aporte de poluentes nos estuários analisados ao longo de todo o período. Assim, *C. guanhumi* pode ser considerada uma boa espécie bioindicadora, com recomendação de seu uso na diagnose e monitoramento de sistemas estuarinos e de manguezais tropicais, devido à sua sensibilidade às perturbações ambientais mesmo em curta escala temporal, bem como por sua resiliência. A alta sensibilidade e resiliência aos xenobióticos são características que permitem

indicar o caranguejo azul (*C. guanhumi*) como potencial sentinela da qualidade ambiental de sistemas estuarinos tropicais do Atlântico Ocidental, o mesmo ocorrendo com o caranguejo-uçá (*Ucides cordatus*), neste caso mais restrito aos manguezais nesta mesma distribuição geográfica (Nudi *et al.*, 2010; Pinheiro *et al.*, 2013).

A diagnose e monitoramento ambiental são aspectos relevantes tanto ao conhecimento do *status* de conservação de uma espécie como ao planejamento de ações conservacionistas. Como já demonstrado, a relação entre dano genômico e diminuição do ‘*fitness*’ dos animais tem sido amplamente demonstrado ao longo dos anos. Entre os impactos comumente relacionados aos danos por efeitos mutagênicos ou clastogênicos está o aumento da frequência de perda gamética por morte celular, a diminuição do sucesso reprodutivo, alteração no crescimento dos indivíduos, anomalias fisiológicas entre outros (Anderson and Wild, 1994; Anderson *et al.*, 1994; Matson *et al.*, 2006). Além disto, diversos estudos têm mostrado a relação entre as lesões ao DNA e alterações na estrutura genética das populações. As diversas agressões à estrutura e sequência dos ácidos nucleicos podem causar diminuição da variabilidade genética das populações, com seleção dos genótipos mais resistentes aos contaminantes e desaparecimento daqueles menos tolerantes (Bickham *et al.*, 2000; Whitehead *et al.*, 2003; Wolf, Blust and Backeljau, 2004, Thomás *et al.*, 2014). Apesar de *C. guanhumi* ter mostrado, após o inverno/2012, bons índices de recuperação aos danos genômicos sofridos, a análise genotóxica não foi capaz de avaliar sozinha os possíveis danos sofridos pela população desta espécie. Assim, estudos complementares que pretendam avaliar o *status* de conservação de *C. guanhumi* devem considerar os resultados aqui obtidos.

É difícil relacionar a incidência direta de danificação genômica a determinados compostos químicos potenciais, sem que um ‘screening’ das principais fontes e tipos de poluentes seja efetuado, bem como outros que monitorem sua flutuação ao longo de diferentes estações e regimes pluviométricos. Estes estudos são essenciais ao acompanhamento dos danos genômicos em animais de manguezal nos períodos subsequentes à incidência de intenso fluxo pluviométrico, conforme

evidenciado no presente estudo. A implantação de tal monitoramento permitiria a obtenção de resultados e seu uso pelos órgãos competentes para traçar medidas conservacionistas para minimizar possíveis danos causados após estes eventos em ecossistemas tão ameaçados e relevantes como os estuarinos e manguezais.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) pelo suporte financeiro para o desenvolvimento deste trabalho. C.B.R. Falcão é especialmente grato à FACEPE pelo suporte financeiro do doutorado. R.A. Torres e M.A.A. Pinheiro são especialmente gratos ao CNPq pela parceria de pesquisa provida (Número dos processos 306099/2011-0, 301208/2012-3, e 302813/2010-1, respectivamente). Este estudo é uma contribuição do INCT AmbTropic – Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Ambientes Marinhos Tropicais CNPq/FAPESB. Processos: 565054/2010-4 e 8936/2011.

Referências bibliográficas

- Abrunhosa FA, Mendes LN, Brito LT, Oliveira YS, Ogawa CY and Ogawa M (2000) Cultivo do Caranguejo Terrestre *Cardisoma guanhumi* (Latreille, 1825) do Ovo ao Estágio Juvenil. Revista Científica de Produção Animal, 2(2).
- Adam ML, Torres RA, Sponchiado G, Motta TS Oliveira CMR, Carvalho-Filho MA and Correia MTS (2010) Environmental degradation at a public park in southern Brazil as revealed through a genotoxicity test (MN) on peripheral blood cells from *Poecilia vivipara* (Teleostei). Water Air Soil Pollut 211(1):61-68.
- Amaral ACZ and Jablonski S (2005) Conservação da biodiversidade marinha e costeira no Brasil. Megadiversidade1(1):43-51.
- Amaral MRX, Albrecht M, McKinley AS, Carvalho AMF, Junior SCS and Diniz FM (2015) Mitochondrial DNA Variation Reveals a Sharp Genetic Break within the Distribution of the Blue Land Crab *Cardisoma guanhumi* in the Western Central Atlantic. Molecules 20:15158-15174.

- Anderson S and Wild GC (1994) Linking Genotoxic Responses and Reproductive Success in Ecotoxicology. *Environ Health Perspect* 102(suppl12):3-8.
- Anderson S, Sadinski W, Shugart L, Brussard P, Depledge M, Ford, Hose J, Stegemen J, Suk W, Wirgin I and Wogan G (1994) Genetic and Molecular Ecotoxicology: a research framework. *Environ Health Perspect* 102(suppl12):3-8.
- APAC – Agência Pernambucana de Águas e Clima (<http://www.apac.pe.gov.br/meteorologia/monitoramento-pluvio.php#>).
- Araújo MCB, Souza ST, Chagas ACO, Barbosa SCT and Costa MF (2007) Análise da Ocupação Urbana das Praias de Pernambuco, Brasil. *JICZM* 7(2):97-104.
- Araújo MC and Oliveira MBM (2013) Monitoring of water quality of a stream at the Federal University of Pernambuco, Brazil. *Rev Ambient Água* 8(3):247-257.
- Arcaute CR, Pérez-Iglesias JM, Nikoloff N, Natale GS, Soloneski S and Larramendy ML (2014) Genotoxicity evaluation of the insecticide imidacloprid on circulating blood cells of Montevideo tree frog *Hypsiboas pulchellus* tadpoles (Anura, Hylidae) by comet and micronucleus bioassays. *Ecol Indic* 45:632–639.
- Barbier EB, Hacker SD, Kennedy C, Koch EW, Stier AC and Silliman BR (2011) The value of estuarine and coastal ecosystem services. *Ecol Monogr* 81(2):169–193.
- Bickham JW, Sandhu S, Herbert PDN, Chikhi L and Athwal R (2000) Effects of chemical contaminants on genetic diversity in natural populations: implications for biomonitoring and ecotoxicology. *Mut Res* 463:33-51.
- Botelho ERO, Santos MF and Souza JRB (2001) Aspectos populacionais do guaiamum, *Cardisoma guanhumi* Latreille, 1825, do estuário do Rio Una (Pernambuco Brasil). *Boletim Técnico Científico, CEPENE*, 9(1):123-146.
- Brasil. IBAMA (2011) Proposta de Plano Nacional de Gestão para o uso sustentável do Caranguejo-Uçá, do Guaiamum e do Siri-azul. Dias-Neto, J. (Org.). Brasília: Série Plano de Gestão Recursos Pesqueiros, 4:156 p
- Bright DB and Hogue CL (1972) A synopsis of the burrowing land crabs of the world and list of their arthropod symbionts and burrow associates. *Contributions in science* 220.
- Carreira RS, Albergaria-Brabosa ACR, Arguelho MLPM and Garcia CAB (2015) Evidence of sewage input to inner shelf sediments in the NE coast of Brazil obtained by molecular markers distribution. *Mar Pollut Bull* 90(1-2):312-316.
- Collins AR (2004) The Comet Assay for DNA Damage and Repair, Principles, Applications, and Limitations. *Mol Biotechnol*, 26:249-61.
- Collins AR and Horvathova E (2001) Oxidative DNA damage, antioxidants and DNA repair: applications of the comet assay. *Biochem Soc Trans* 29:337–341.
- Costlow Jr JD and Bookhout CG (1968a) The complete larval development of the land-crab, *Cardisoma guanhumi* Latreille in the laboratory (Brachyura, Gecarcinidae). *Crustaceana Supplement*, 259-270.
- Costlow Jr JD and Bookhout CG (1968b) The Effect of Environmental Factors on Development of the Land-Grab, *Cardisoma guanhumi* Latreille. *Amer Zool* 8(3):399-410.
- Cotelle S and Ferard JF (1999) Comet assay in genetic ecotoxicology: a review. *Environ Mol Mutagen* 34:246–255.
- CPRH – Agência Estadual de Meio Ambiente/PE, 2010; http://www.cprh.pe.gov.br/perfis_ambientais/areas_estuarinas/39751%3B33012%3B1802%3B0%3B0.asp.
- Davanso MB, Moreira LB, Pimentel MF, Costa-Lotufo LV and Abessa DMS (2013) Biomarkers in mangrove root crab *Goniopsis cruentata* for evaluating quality of tropical estuaries. *Mar Environ Res* 91:80-88.

- Dantas DV (2008) Variação espaço-temporal das espécies da família Ariidae (Siluriformes) no estuário do rio Goiana (PE/PB – Brasil). 63fls. Dissertação (Mestrado em Oceanografia)-Centro de tecnologia e Geociências, Universidade Federal de Pernambuco, Recife.
- Elliott M and Whitfield AK (2011) Challenging paradigms in estuarine ecology and management. *Estuar Coast Shel* 94:306-314.
- Erbe MCL, Ramsdorf WA, Vicari T and Cestari, MM (2011) Toxicity evaluation of water samples collected near a hospital waste landfill through bioassays of genotoxicity piscine micronucleus test and comet assay in fish *Astyanax* and ecotoxicity *Vibrio fischeri* and *Daphnia magna*. *Ecotoxicology* 20:320–328.
- Forsee RA and Albrecht M (2012) Population estimation and site fidelity of the land crab *Cardisoma guanhumi* (Decapoda: Brachyura: Gecarcinidae) on Vieques Island, Puerto Rico. *J Crustacean Biol* 32(3):435-442.
- Frenzilli G, Nigro M and Lyons BP (2009) The Comet assay for the evaluation of genotoxic impact in aquatic environments. *Mut Res* 681:80-92.
- Frinhani EMD and Carvalho EF (2010) Monitoramento da qualidade das águas do Rio do Tigre, Joaçaba, SC. *Unoesc & Ciência – ACET* 1(1):49-58.
- Galli OB, Fujimoto RY and Abrunhosa FA (2012) Acute toxicity of sodium metabisulphite in larvae and post-larvae of the land crab, *Cardisoma guanhumi*. *Bull Environ Contam Toxicol* 89(2):274-280.
- Galloway TS (2006) Biomarkers in environmental and human health risk assessment. *Mar Pollut Bull* 53:606–613.
- Gama-Maia DJ and Torres RA (2016) Fine scale genetic-structuring, divergent selection, and conservation prospects for the overexploited crab *Cardisoma gnanhumi* in tropical mangroves from Northeastern Brazil. *J Mar Biol Assoc UK* (In Press).
- Gifford CA (1962) Some observations on the general biology of the land crab, *Cardisoma gnanhumi* (Latreille), in south Florida. *Biol Bull* 123(1):207-223.
- Groff AA *et al.*, (2010) UVA/UVB-induced genotoxicity and lesion repair in *Colossoma macropomum* and *Arapaima gigas* Amazonian fish. *J. Photochem. Photobiol B Biol* 99:93–99.
- Hasue FM *et al.*, (2013) Assessment of genotoxicity and depuration of anthracene in the juvenile coastal fish *Trachinotus carolinus* using the comet assay. *Braz J Oceanogr* 61(4):215-222
- Heddle JA (1973) A rapid in vivo test for chromosomal damage. *Mut Res* 18:187-190.
- Heiveil JS, LaPilusa TL and Turner LM (2014) Characterization of microsatellite markers from the commodity species *Cardisoma gnanhumi* Latreille and the Christmas Island blue crab (*Discoplax celeste*). *Conserv Genet Resour* 6:99–101.
- Hostetler ME, Mazzotti FJ and Taylor AT (1991) Blue Land Crab (*Cardisoma gnanhumi*). *Wec* 30 of University of Florida, 2 p.
- Jha AN (2008) Ecotoxicological applications and significance of the comet assay. *Mutagenesis* 23(3):207–221.
- Kennish MJ (2002) Environmental threats and environmental future of estuaries. *Environ Conserv* 29(1):78-107.
- Klobucar GIV, Malev O, Srut M, Stambuk A, Lorenzon S, Cvetkovic Z, Ferrero EA and Maguire I (2012) Genotoxicity monitoring of freshwater environments using caged crayfish (*Astacus leptodactylus*). *Chemosphere* 87:62–67.
- Lacaze E, Devaux A, Mons R, Bony S, Garric J, Geffard A and Geffard O (2011) DNA damage in caged *Gammarus fossarum* amphipods: A tool for freshwater genotoxicity assessment. *Environ Pollut* 159(6):1682:1691.
- Lino CF and Albuquerque JL (2007) Mosaicos de unidades de conservação no corredor da Serra do Mar. São Paulo: Conselho Nacional da Reserva da Biosfera da Mata Atlântica, 96 p.
- Matson CW, Lambert MM, McDonald TJ, Autenrieth RL, Donnelly KC, Islamzadeh A, Politov DI

- and Bickham JW (2006) Evolutionary Toxicology: Population-Level Effects of Chronic Contaminant Exposure on the Marsh Frogs (*Rana ridibunda*) of Azerbaijan. *Environ Health Perspect* 114:547–552.
- MMA (2004) Ministério do Meio Ambiente. Lista Nacional das Espécies sobreexploradas ou ameaçadas de sobreexploração. In: Lista Nacional de Espécies de Invertebrados Aquáticos e Peixes Ameaçados de Extinção. Instrução Normativa nº 5, de 21 de maio de 2004. Ministério do Meio Ambiente. Brasília. Diário Oficial da União nº 102, de 28 de maio de 2003, Seção 1, páginas 136-142.
- Mohanty G, Mohanty J, Nayak AK, Mohanty S and Dutta SK (2011) Application of comet assay in the study of DNA damage and recovery in rohu (*Labeo rohita*) fingerlings after an exposure to phorate, an organophosphate pesticide. *Ecotoxicology* 20:283–292.
- Nudi AH, Wagener ALR, Francioni E, Sette CB, Sartori AV and Scofield AL (2010) Biomarkers of PAH sexposure in crabs *Ucides cordatus*: Laboratory assay and field study. *Environ Res* 110:137-145
- Ohe T, Watanabe T, Wakabayashi K (2004) Mutagens in surface water: a review. *Mutat Res* 567:109–149.
- Oliveira DD, Souza-Santos LP, Silva HK and Macedo SJ (2014) Toxicity of sediments from a mangrove forest patch in an urban area in Pernambuco (Brazil). *Ecotoxicol Environ Saf* 104:373-378
- Pinheiro, MAA, Duarte LFA, Toledo TR, Adam ML and Torres RA (2013). Habitat monitoring and genotoxicity in *Ucides cordatus* (Crustacea: Ucridae), as tools to manage a mangrove reserve in southeastern Brazil. *Environ Monit Assess* 185(10):8273-8285.
- Polard T, Jean S, Gauthier L, Laplanche C, Merlina G, Sánchez-Pérez JM and Pinelli E (2011) Mutagenic impact on fish of runoff events in agricultural areas in south-west France. *Aquat Toxicol* 101:126-134.
- Rocha AJS, Botelho MT, Hasue FM, Passos MJACR, Vignardi CP, Ngan PV and Gomes V (2015) Genotoxicity of shallow waters near the Brazilian Antarctic station "Comandante Ferraz" (EACF), Admiralty Bay, King George Island, Antarctica. *Braz J Oceanogr* 63(1).
- Schmezer P *et al.*, (2001) Rapid screening assay for mutagen sensitivity and DNA repair capacity in human peripheral blood lymphocytes. *Mutagen* 16(1):25–30.
- Schmid W (1975) The micronucleus test. *Mut Res* 31:9-15.
- Singh NP, McCoy MT, Tice RR and Schneider EL (1988) A simple technique for the quantification of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 175:184-191.
- Siu WHL, Jia C, Luca-Abboty SB, Richardson BJ and LAM PKS (2004) Micronucleus induction in gill cells of green-lipped mussels (*Perna viridis*) exposed to mixtures of polycyclic aromatic hydrocarbons and chlorinated pesticides. *Environ Toxicol Chem* 232:1317-1325.
- Sokal RR, and Rohlf FJ (2012) Biometry: the principles and practice of statistics in biological research. 4th edition. New York: W. H. Freeman and Co., 937p.
- Sponchiado G, Reynaldo EMFL, Andrade ACB, Vasconcelos EC, Adam ML and Oliveira CMR (2011) Genotoxic Effects in erythrocytes of *Oreochromis niloticus* exposed to nanograms-per-liter concentration of 17 β -Estradiol (E2): an assessment using micronucleus test and comet assay. *Water Air Soil Pollut* 218:353–360.
- Sukhdhane KS, Pandey PK, Vennila A, Purushothaman CS and Ajima MNO (2015) Sources, distribution and risk assessment of polycyclic aromatic hydrocarbons in the mangrove sediments of Thane Creek, Maharashtra, India. *Environ Monit Assess* 187(2015):1–14.
- Teichert N, Borja A, Chust G, Uriarte A and Lepage M (2016) Restoring fish ecological quality in estuaries: Implication of interactive and cumulative effects among anthropogenic stressors. *Sci Total Environ* 542:383–393

- Thomas EG, Srut M, Stambuk A, Klobucar GIV, Seitz A and Griebeler EM (2014) Effects of Freshwater Pollution on the Genetics of Zebra Mussels (*Dreissena polymorpha*) at the Molecular and Population Level. *Bio Med Res Int* 2014:1-11
- Waters MD, Stack HF b and Jackson MA (1999). Genetic toxicology data in the evaluation of potential human environmental carcinogens. *Mut Res* 437:21-49.
- Werner I, Deanovic LA, Hinton DE, Henderson JD, de Oliveira GH, Wilson BW, Krueger W, Wallender WW, Oliver MN and Zalom FG (2002) Toxicity of Stormwater Runoff After Dormant Spray Application of Diazinon and Esfenvalerate (Asana®) in a French Prune Orchard, Glenn County, California, USA. *Bull. Environ Contam Toxicol* 68:29–36.
- Whitehead A, Anderson SL, Kuivila KM, Roach JL and May B (2003) Genetic variation among interconnected populations of *Catostomus accidentalis*: implications for distinguishing impacts of contaminants from biogeographical structuring. *Mol Ecol* 12:2817-2833.
- Whitehead A, Kuivila MK, Orlando JL, Kotelevtsev S and Anderson SL (2004) Genotoxicity in native fish associated with agricultural runoff events. *Environ Toxicol Chem* 23(12):2868-2877.
- Winter MJ, Day N, Hayes RA, Taylor EW, Butler PJ and Chipman JK (2004) DNA strand breaks and adducts determined in feral and caged chub (*Leuciscus cephalus*) exposed to rivers exhibiting variable water quality around Birmingham, UK. *Mut Res* 552:163–175.
- Wolf HD, Blust R and Blackeljaui T (2004). The population genetic structure of *Littorina littorea* (Mollusca: Gastropoda) along a pollution gradient in the Scheldt estuary (The Netherlands) using RAPD analysis. *Sci Total Environ* 325:59–69.

5. Capítulo II

Análise espaço-temporal da diversidade genético-populacional de guaiamum (*Cardisoma ganhum*) após um episódio de danificação genômica e como ferramenta de monitoramento de manguezais tropicais do Nordeste do Brasil.

Spatio-temporal population genetic analyses in the overexploited blue crab (*Cardisoma ganhum*) after a remarkable enviromental perturbation with genome damaging in tropical mangroves.

Falcão, CBR^{1,4,5}; Pinheiro, MAA^{2,4}; Adam, ML^{1,3,4}; Torres, RA^{1,4,*}

¹ Laboratório de Genômica Evolutiva e Ambiental (LAGEA), Departamento de Zoologia, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Professor Moraes Rêgo 1235, CEP 50670-901, Cidade Universitária, Recife, Pernambuco, Brasil.

² Laboratório de Biologia de Crustáceos (LBC), Universidade Estadual Paulista ‘Julio Mesquita Filho’ - Campus Litoral Paulista (UNESP – IB/CLP), Praça Infante Dom Henrique s/nº CEP 11330-900, Parque Bitaru, São Vicente, São Paulo, Brasil.

³ Centro Acadêmico de Vitória (CAV), Universidade Federal de Pernambuco, Rua Alto do Reservatório, s/n – CEP 55608-680, Bela Vista, Vitória de Santo Antão, Pernambuco, Brasil.

⁴ Crusta – Grupo de Pesquisa em Biologia de Crustáceos.

⁵ Programa de Pós-graduação em Genética, Departamento de Genética, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Professor Moraes Rêgo 1235, CEP 50670-901, Cidade Universitária, Recife, Pernambuco, Brasil.

*Autor correspondente: rodrigotorres@ufpe.br

Abstract

The genetic diversity of the species is an essential factor in the evolutionary process, since it is the raw material of adaptation to the selective imposition of ecosystems. Many studies have used genetic markers in animal species aiming to measure damage to the genome as a result of the disturbance to homeostasis of ecosystems. Such damage can lead to a decrease in genetic diversity of populations and to the collapse of populations and species. The blue crab (*C. guanhumi*) has an extensive distribution along the Brazilian coast, presents great economic importance in the region and is included in the current Species List of Endangered Fauna. A recent study showed that some populations of blue crab suffered heavy aggression on cells genome during the winter of 2012 year, probably caused by toxic pollutants presents on the water. In order to evaluate possible changes of variation and genetic structure of *C. guanhumi* in a spatio-temporal context, we analyzed genetic-population structure in the periods before and after the genotoxic events with about 150 individuals in each period. The animals were collected in the estuaries of rivers Goiania and Jaguaribe (north coast), Capibaribe (center), Sirinhaém and Formoso (south coast) of Pernambuco's state. The genetic structure of populations in the two years (2012 and 2014) showed similar results, indicating neither significant change in the genetic variation nor changes in the genetic structure of the species after the genomic damage suffered. We emphasize here the resilience of the species, since the genomic damage detected in the winter of 2012 does not associate to the loss of genetic diversity of populations. The maintenance of genetic diversity of populations of blue crab is related to the high gene flow and high dispersal ability of species through the planktonic larval stage.

Keywords: blue crab, ecotoxicology, endangered species, estuaries, population structure.

1. Introdução

Os ambientes costeiros estão entre os mais ameaçados ecossistemas naturais devido às suas características peculiares que despertam grande interesse das populações humanas. Entre estes, os estuários são locais de extrema importância servindo como berçários naturais onde muitas espécies desovam e desenvolvem os primeiros estágios de vida, contribuindo para a grande diversidade biológica altamente adaptada para sobreviver às flutuações de salinidade e nível de água. O posicionamento geográfico estratégico dos estuários os confere grande potencial econômico acarretando o desenvolvimento de indústrias, fábricas e instalações portuárias que necessitam de rápido escoamento de seus produtos. Os estuários também são de grande interesse para desenvolvimento de centros urbanos, dado o desenvolvimento econômico destas regiões e os valores agregados à beleza natural (Anderson *et al.*, 1994; Kennish, 2002; Barbier, 2011; Elliott and Whitfield, 2011).

No entanto, o desenvolvimento de centros urbanos e polos industriais trazem consigo uma gama de poluentes decorrentes das ações antropogênicas tais como os esgotamentos sanitários, liberações de efluentes provenientes de produções industriais e crescente acúmulo de lixo. As atividades agropecuárias também contribuem para a liberação de substâncias tóxicas que têm como destino final os estuários. Os compostos químicos liberados na natureza que atingem os estuários podem provocar diversos tipos de danos aos indivíduos, incluindo danos celulares e fisiológicos que interferem no desenvolvimento, crescimento e sobrevivência dos animais. Além disso, os compostos químicos podem causar danos moleculares nos indivíduos. A interação de compostos químicos com o material genético dos organismos pode conduzir a eventos mutagênicos, aneugênicos e/ou clastogênicos com possíveis efeitos na diversidade genética das populações com consequente alteração da estrutura genético-populacional (Waters, Stack and Jackson, 1999;

Whitehead *et al.*, 2003; Ohe *et al.*, 2004; Frenzilli, Nigro and Lyons, 2009, Adam *et al.*, 2010; Wirgin *et al.*, 2015).

A diversidade genética das espécies, definida como a magnitude da variabilidade genética nas populações, é fator essencial no processo evolutivo, uma vez que é a matéria prima da adaptação às imposições seletivas dos ecossistemas. A diversidade genética está relacionada ao *fitness* dos indivíduos e atua no potencial adaptativo das espécies. As diferenças nas sequências codificadas nos genes dos indivíduos são capazes de alterar a capacidade e a forma de adaptação das populações às alterações ambientais (Hughes *et al.*, 2008). Segundo Van Straalen and Timmermans (2002) a poluição pode interferir na diversidade genética afetando os quatro principais processos evolutivos: deriva genética, seleção, mutação e migração. Esta diminuição na diversidade genética das populações induzida por agentes tóxicos é conhecida como erosão genética. Os impactos da poluição na diversidade genética das espécies estão relacionados também a fatores como tamanho populacional, fluxo gênico entre diferentes populações e tamanho da área de ocupação segundo Giska *et al.* (2015). Populações submetidas a impactos genotóxicos podem restabelecer seus níveis ecológicos de forma relativamente rápida a partir da remoção da fonte poluidora. Os danos citológicos podem reaver seus índices normais em períodos relativamente curtos, no entanto, os danos genéticos podem apresentar efeitos em longo prazo com perda de variabilidade e colapso das populações (Chapman *et al.*, 2009; Frankham, 2005; Pauls *et al.*, 2013).

Um estudo recente de Falcão & cols. (dados não publicados) avaliou a danificação genômica em cinco populações de guaiamum de cinco estuários (municípios de Goiana, Jaguaribe, Recife, Sirinhaém e Formoso) do estado de Pernambuco, nordeste do Brasil, ao longo de dois ciclos climáticos (inverno e verão dos anos de 2012 e 2013) através de duas diferentes metodologias (teste do micronúcleo e ensaio cometa). Os resultados mostraram a ocorrência de danificação genômica para todos os cinco estuários no inverno do ano de 2012 decorrentes de um evento atípico de grande pluviosidade que atingiu o estado em junho daquele ano. O carreamento de compostos provenientes

dos esgotamentos sanitários, indústrias e atividades agrícolas nos arredores dos estuários seriam os responsáveis pelas lesões no genoma dos animais. Apesar da diminuição dos padrões de danificação genômica nas amostragens subsequentes e o retorno do nível de danificação a valores de referência, os testes de genotoxicidade não possibilitaram inferir se a danificação genômica foi capaz de alterar a diversidade e a estrutura genética das populações.

O guaiamum (*C. guanhumi*), também conhecido como caranguejo azul, é um crustáceo de extensa distribuição na costa brasileira e de grande importância econômica na região. Os indivíduos ocupam as áreas mais afastadas das fontes de água e podem ser encontrados num raio de até 5 km de distância das mesmas. Apesar da baixa capacidade de dispersão geográfica que os indivíduos adultos apresentam ao longo de toda a vida, as fêmeas da espécie se utilizam das regiões alagadas para liberarem as larvas durante o período de reprodução. As larvas liberadas nas correntes de águas são carregadas por longas distâncias até se fixarem em outras zonas estuarinas e completarem seu ciclo de desenvolvimento (Gifford, 1962; Costlow Jr and Bookhout, 1968a; Costlow Jr and Bookhout, 1968b; Hostetler *et al.*, 1992; Abrunhosa *et al.*, 2000; Forsee and Albrecht, 2012).

Devido ao seu grande tamanho e sabor apreciado na culinária local, a espécie tem sido alvo de intensa pesca ao longo dos anos. A forte pressão de captura e a diminuição de seus habitats naturais fizeram com que a espécie fosse incluída na Lista Nacional das Espécies de Invertebrados Aquáticos e Peixes Sobreexplotados ou Ameaçados de Sobreexploração no ano de 2004 e, no fim de 2014, passasse a integrar a Lista Nacional Oficial de Espécies da Fauna Ameaçadas de Extinção – Peixes e Invertebrados Aquáticos na categoria Criticamente em Perigo (CR) de acordo com a Portaria nº 445 do Ministério do Meio Ambiente (Botelho *et al.*, 2001; Amaral and Jablonski, 2005; Galli *et al.*, 2012; Heilveil *et al.*, 2014).

Considerando a danificação genômica sofrida pelas populações de guaiamum residentes ao longo dos cinco principais complexos estuarinos do estado de Pernambuco e o atual e crescente nível de destruição dos ambientes litorâneos, fazem-se necessários estudos que monitorem espaço-

temporalmente espécies e ambientes, principalmente os de importância econômica. Com o objetivo de aferir o impacto sobre as populações de guaiamuns e sobre seus habitats e o acompanhamento de possíveis eventos de erosão genética das populações ao longo de dois ciclos climáticos influenciados pela danificação genômica ocorrida no período de inverno do ano de 2012, realizou-se um estudo para avaliar possíveis alterações da variação e estrutura genética de *C. guanhumi* em um contexto espaço-temporal.

2. Metodologia

2.1. Áreas de estudo e amostragem

Foram definidos cinco sistemas de manguezais tropicais do Nordeste do Brasil como áreas de estudo: dos rios Goiana e Jaguaribe (litoral Norte), do rio Capibaribe (região metropolitana do Recife; marco central do litoral) e rios Sirinhaém e Formoso (litoral Sul) conforme amostragem do estudo de danificação genômica realizado previamente (Figura 1). Tais manguezais foram selecionados conforme os diferentes níveis de conservação, segundo dados da CPRH- Agência Estadual de Meio Ambiente/PE (2010). Foi amostrado um total de 300 exemplares: 150 indivíduos (30 de cada estuário) no inverno do ano de 2012 e 150 indivíduos (30 de cada estuário) no inverno do ano de 2014, oriundos novamente destes mesmos cinco sistemas estuarinos.

Os estuários/manguezais do litoral Norte do estado de Pernambuco (rios Goiana e Jaguaribe) ainda mantem-se preservados e apresentam em suas margens alguma diversidade de fauna e flora. No entanto, o primeiro tem sido alvo de grande poluição de origem industrial e doméstica, além de corte e aterro de áreas de manguezais, enquanto o segundo tem sofrido com a exploração pesqueira predatória. Ambos têm sido ameaçados pela implantação de projetos de carcinicultura, e mais

recentemente, da indústria automobilística. As áreas estuarinas e de manguezal do rio Capibaribe estão entre as mais agredidas pela expansão urbana. Por localizarem-se na capital do estado, têm sido historicamente afetadas pelos desmatamentos, aterros, crescimento imobiliário e implantação de vias públicas. Os estuários do litoral sul do estado (rios Sirinhaém e Formoso) apresentam bons índices de conservação com fauna e flora exuberante e diversificada. O segundo, no entanto, tem sido ameaçado pela crescente exploração pesqueira predatória (CPRH – Agência Estadual de Meio Ambiente/PE, 2010).

Em cada uma dessas regiões, os animais foram capturados com auxílio de pescadores locais, por meio de armadilhas artesanais do tipo ‘ratoeiras’. Para composição do grupo controle foram amostrados quinze indivíduos oriundos da Estação Ecológica da Juréia, na região costeira do Sul do estado de São Paulo, Sudeste do Brasil. A Estação Ecológica Jureia-Itatins é uma área de proteção ambiental que apresenta rígido controle de segurança e recebe uma menor pressão antropogênica significativa, resultando na manutenção e conservação deste ambiente.

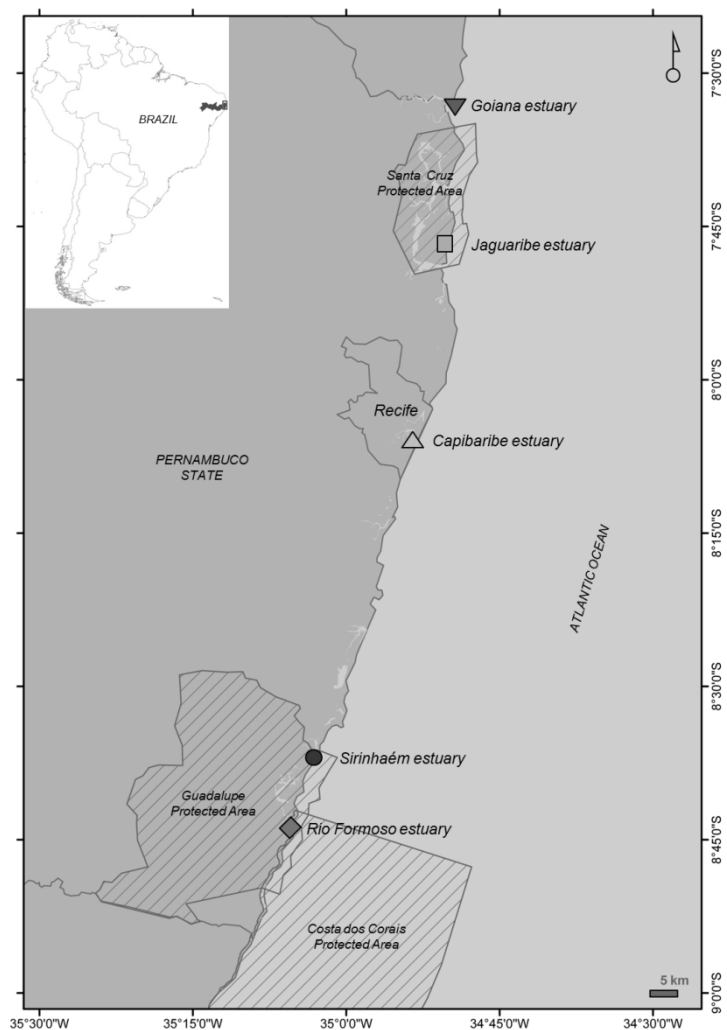


Figura. 1. Localização dos cinco sistemas estuarinos em estudo onde foram coletados os indivíduos de *Cardisoma guanhumi* ao longo dos anos de 2012 e 2014: estuários dos Rios Goiana, Jaguaribe, Capibaribe, Sirinhaém e Formoso. Direito de utilização da imagem gentilmente cedido por Gama-Maia and Torres, 2016. Retirada de Gama-Maia and Torres, 2016.

2.2 Extração, amplificação e sequenciamento de DNA

Foram coletadas amostras do tecido muscular dos pereiópodes (cerca de 2 cm³) como fonte de material genético para as extrações de DNA. Tais amostras foram imersas em Etanol 96% e depositadas em freezer a -20° C. A extração do DNA foi conduzida através de kits de extração de DNA (Qiagen) seguindo as instruções do manual e o produto das extrações foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1% e visualizada sob luz ultravioleta.

A amplificação da Região Controle do DNA mitocondrial foi realizada utilizando-se os iniciadores 12SUCAF3 (5'- CCA GTA NRC CTA CTA TGT TAC GAC TTA T -3') e ILEUCAR3 (5' – GCT AYC CTT TTA AAT CAG GCA C – 3') segundo o trabalho de Oliveira-Neto *et al.* (2007). As soluções de PCR com volume de 25µL apresentaram em suas concentrações finais: 6mM de MgCl₂, 0.25mM de cada dNTP, 0.1u/µl de Taq polimerase (Invitrogen), 1x tampão, 2uM de cada primer e 1.2µg/mL de DNA. A amplificação foi realizada através de um programa que incluía 95° por 2 minutos, seguido por 35 ciclos de 95° por 20 segundos, 56° por 30 segundos e 72° por 90 segundos, seguido de um ciclo final de 72° por 2 minutos (Oliveira-Neto *et al.*, 2008).

Após a amplificação os produtos foram novamente submetidos à eletroforese em gel de agarose e visualizados sob luz UV para verificação do sucesso das amplificações. Os produtos gerados foram purificados com ExoSap-IT (USB) e submetidos ao sequenciamento utilizando o *Kit BigDye Terminator* (www.appliedbiosystems.com) em um sequenciador de DNA automatizado modelo ABI 3500 (Applied Biosystem) utilizando os *primers* internos ILEUCAR2 (5' – CCT TTT AAA TCA GGC ACT ATA – 3') e DLUSSAF1 (5' – GTA TAA CCG CGA ATG CTG GCA C – 3') (Oliveira-Neto *et al.*, 2007).

2.3 Análise dos dados

As sequências da Região Controle do DNA mitocondrial foram visualizadas e editadas utilizando o software CodonCode Aligner 5.1.5 (CodonCode Corporation, Dedham, Massachusetts). As sequências consenso foram alinhadas através do Clustal W utilizado o software MEGA v5.05 (Tamura *et al.*, 2011) com penalidade de abertura e extensão de gaps de 15 e 6.66 respectivamente. Após a edição, as sequências foram submetidas ao algoritmo BlastN (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para verificação das natureza das sequências.

Os parâmetros diversidade genética como número sítios conservados e polimórficos, sítios informativos e número de singletons (polimorfismo em uma única base) foram obtidos utilizando o software MEGA v5.05 (Tamura *et al.*, 2011). O número de haplótipos (H), diversidade haplotípica (Hd), número de sítios polimórficos (Nsp) e diversidade nucleotídica (π) foram obtidos através dos softwares Arlequin v.3.5 (Excoffier and Lischer, 2010) e DnaSP v5.0 (Librado and Rozas, 2009). A inspeção sobre o suporte estatístico das diferenças observadas nos parâmetros de diversidade genética entre os anos de 2012 e 2014 foi realizada utilizando o software GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Para definição do modelo evolutivo que melhor explicasse a variação dos sítios foi utilizado o software JModeltest (Posada, 2008) através do critério de informação Akaike (Akaike, 1974). As relações evolutivas das populações de guaiamum foram obtidas através da inferência Bayesiana utilizando o software Bayesian Evolutionary Analysis Sampling Trees (BEAST) (Drummond and Rambaut, 2007). As relações genealógicas entre os haplótipos foram recuperadas utilizando o programa Haplotype Viewer (<http://www.cibiv.at/~greg/haploviewer>).

A Análise de Variância Molecular (AMOVA) (Excoffier *et al.*, 1992) para verificação da estruturação genética das populações, assim como a diferenciação genética par-a-par a partir do índice de fixação (F_{ST}) (Wright, 1951) em termos temporais, foram realizadas através do software Arlequin v3.5 (Excoffier and Lischer, 2010). A significância estatística das estruturas foi obtida em 10.000 permutações. A estrutura genética das populações foi adicionalmente testada em termos temporais através do software Bayesian Analysis of Population Structure (BAPS) (Corander and Marttinen, 2006). O suporte estatístico sobre as diferenças entre as frequências dos perfis genéticos observados temporalmente foi avaliado pelo teste t utilizando o software GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

Os testes de neutralidade D de Tajima (Tajima, 1989) e F_s de Fu (Fu, 1997) foram conduzidos através do software Arlequin v3.5 (Excoffier and Lischer, 2010) para examinar a

história demográfica das populações com base em 10.000 replicações. As análises de distribuição *mismatch* foram realizadas através do software DnaSP v5.0 (Librado and Rozas, 2009) para comparar a distribuição do número de diferenças de mutações esperadas vs observadas entre os haplótipos (Rogers and Harpending, 1992).

3. Resultados

3.1 Análise das sequências

A região controle dos indivíduos de *C. guanhumi* foi investigada ao longo de dois períodos de amostragem perfazendo um total de 315 indivíduos sequenciados, sendo 163 sequências no ano de 2012 e 152 no ano de 2014. Nas duas amostragens foi obtido um fragmento de 523pb. Para o ano de 2012 foram observados 344 sítios conservados e 178 sítios polimórficos, dos quais 131 considerados informativos evolutivamente e 47 singletons. Para o ano 2014, foram observados 357 sítios conservados e 166 sítios polimórficos, sendo 132 sítios informativos e 34 singletons.

As 163 amostras do ano de 2012 revelaram um total de 157 haplótipos enquanto as 152 amostras do ano de 2014 revelaram um total de 151 haplótipos, sem predominância de nenhum haplótipo. A diversidade haplotípica (H_d) nos estuários analisados variou entre 0,995 para o estuário do rio Jaguaribe e 1,0 para os estuários dos rios Capibaribe, Sirinhaém e a Jureia enquanto a diversidade nucleotídica (π) variou de 0,037 (Sirinhaém) a 0,040 (Goiana) para o ano de 2012. Para o ano de 2014, a diversidade haplotípica foi igual a 1,0 para todos os estuários enquanto a diversidade nucleotídica variou entre 0,036 no estuário do rio Goiana e 0,042 no estuário do rio Sirinhaém. Todos os valores obtidos estão sumarizados na Tabela 1.

Tabela 1. Parâmetros genético-populacionais de *Cardisoma guanhumi* referentes aos estuários analisados nos períodos de 2012 e 2014.

Localidade	Região	Ano	N	Nh	Hd	π
Goiana	Norte PE	2012	30	29	0,998	0,040
Jaguaribe	Norte PE	2012	30	28	0,995	0,038
Capibaribe	Centro PE	2012	30	30	1	0,039
Sirinhaém	Sul PE	2012	29	29	1	0,037
Rio Formoso	Sul PE	2012	29	28	0,997	0,039
Jureia	SP	2012	15	15	1	0,038
Goiana	Norte PE	2014	29	29	1	0,036
Jaguaribe	Norte PE	2014	23	23	1	0,040
Capibaribe	Centro PE	2014	27	27	1	0,039
Sirinhaém	Sul PE	2014	28	28	1	0,042
Rio Formoso	Sul PE	2014	30	30	1	0,040

N: número de indivíduos; Nh: número de haplótipos; Hd: diversidade haplotípica; π : diversidade nucleotídica.

3.2 Inferência Bayesiana

O modelo evolutivo que melhor se ajustou à variação dos nucleotídeos foi o TVM+I+G (*Transversion model+invariant sites+gamma distribution*). As topologias Bayesianas mostraram a ausência de diferenciação genética entre os espécimes dos estuários analisados temporalmente (Figuras 2 e 3).

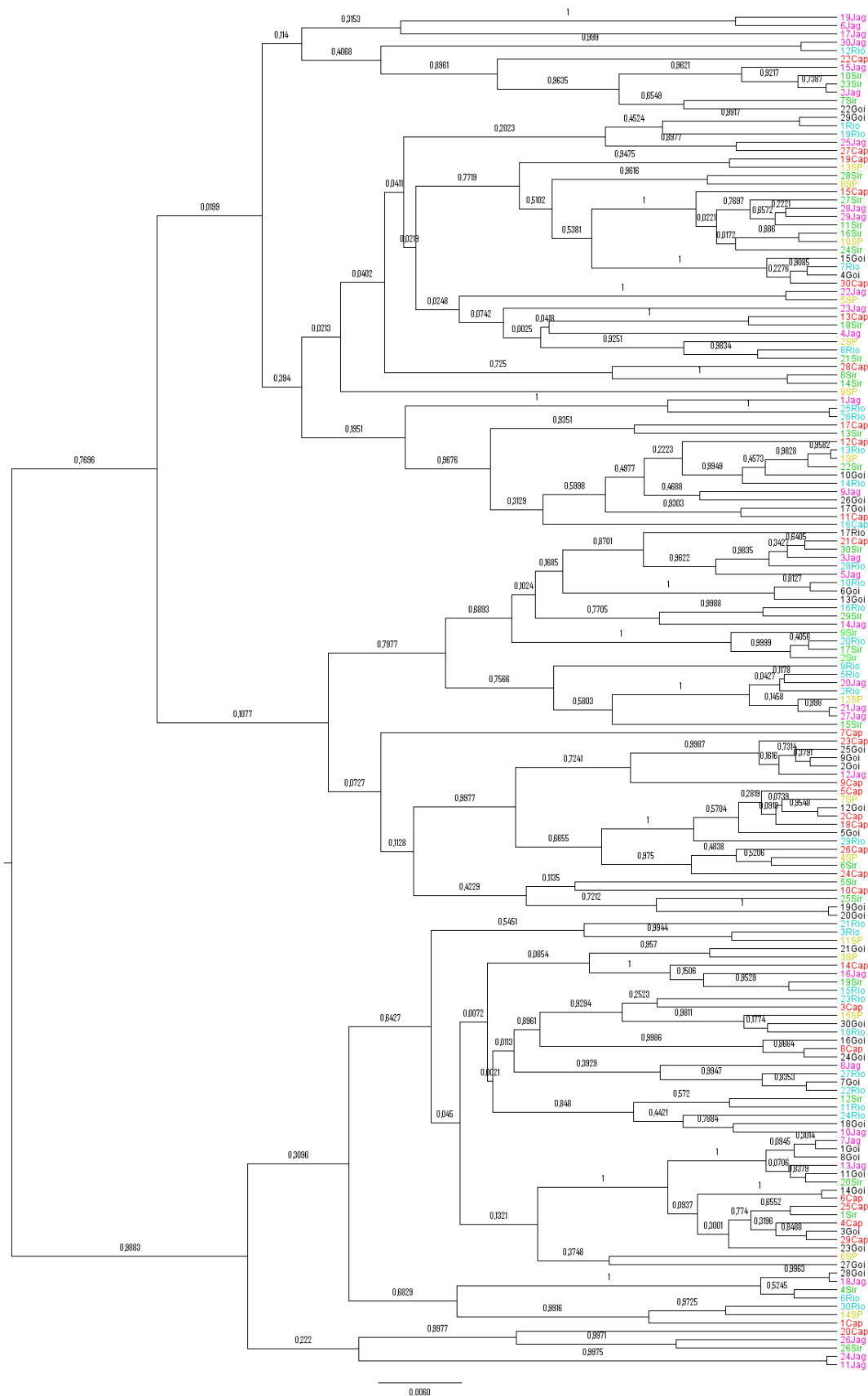


Figura 2. Topologia Bayesiana para os indivíduos de *Cardisoma guanhum* dos cinco estuários analisados no ano de 2012. As diferentes cores indicam os indivíduos dos diferentes manguezais analisados: Goi: Goiana (preto); Jag: Jaguaribe (rosa); Cap: Capibaribe (vermelho); Sir: Sirinhaém (verde); Rio: Rio Formoso (azul); SP: Jureia (amarelo).

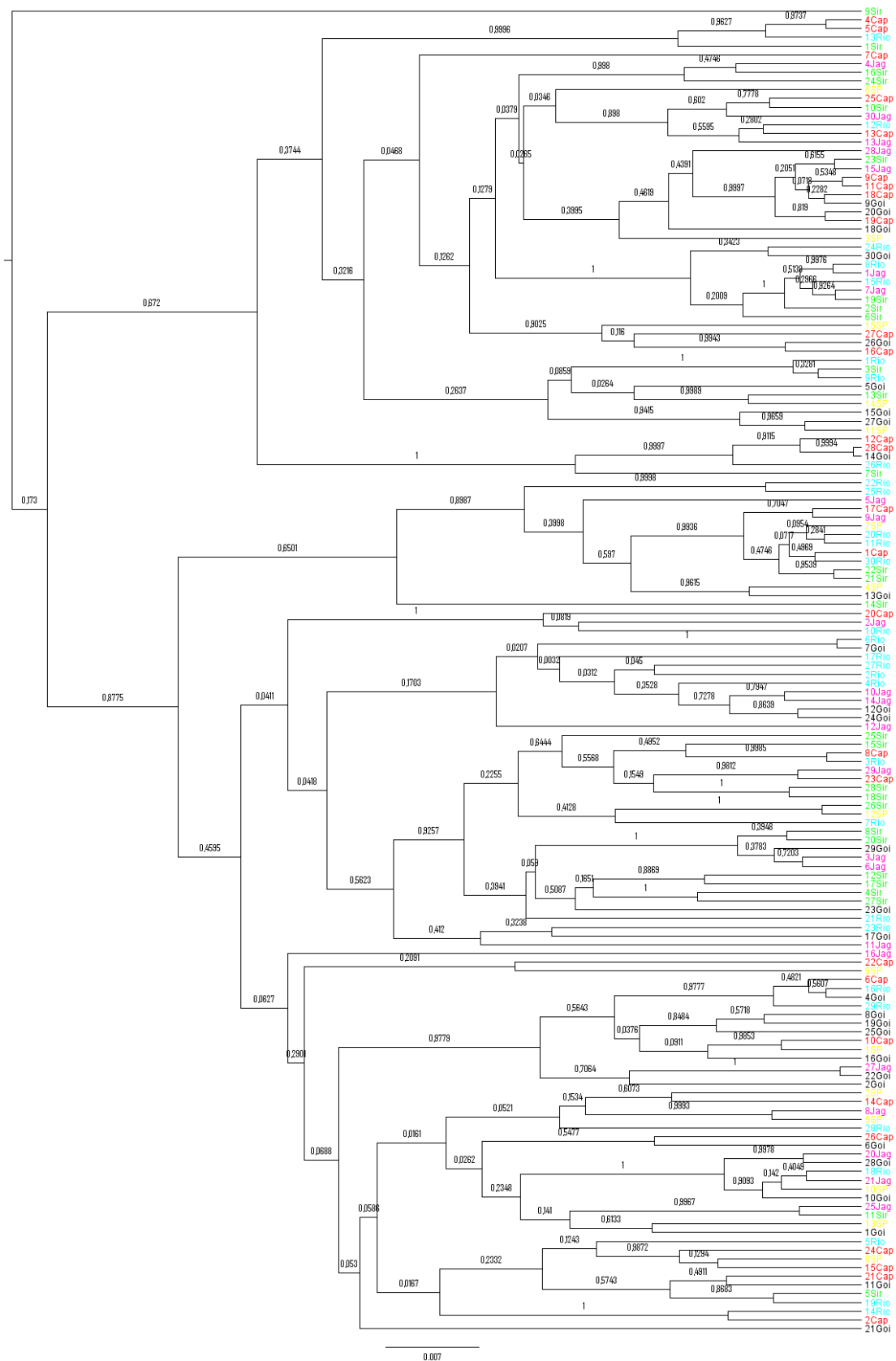


Figura 3. Topologia de inferência Bayesiana para os indivíduos de *Cardisoma guanhumii* dos cinco estuários analisados no ano de 2014. As diferentes cores indicam os indivíduos dos diferentes manguezais analisados: Goi: Goiana (preto); Jag: Jaguaribe (rosa); Cap: Capibaribe (vermelho); Sir: Sirinhaém (verde); Rio: Rio Formoso (azul); SP: Jureia (amarelo).

3.3 Análises de estrutura populacional

A Análise de Variância Molecular (AMOVA) evidenciou, para os anos de 2012 e 2014, que mais de 99% da variação genética estava localizada entre os indivíduos dentro das populações amostradas e menos de 1% da variação encontrava-se entre as populações. O índice médio de fixação (Φ_{ST}) foi de 0,00133 para o ano de 2012 e de -0,00010 para o ano de 2014 (Tabelas 2 e 3). As comparações par-a-par entre os diferentes estuários também evidenciaram baixos valores de F_{ST} e ausência de estruturação entre as populações dos períodos analisados (Tabelas 4 e 5).

Tabela 2. Análise de Variância Molecular para os indivíduos de *Cardisoma guanhumi* dos estuários analisados para o ano de 2012.

Fonte da Variação	d. f.	Soma dos quadrantes	Componentes da variância	Porcentagem da variação
Entre as populações	5	2,585	0,00067 Va	0,13
Dentro das populações	157	78,366	0,49914 Vb	99,87
Total	162	80,951	0,49981	
Índice de Fixação	Φ_{ST} :	0,00133		

Tabela 3. F_{STs} par-à-par de *Cardisoma guanhumi* dos estuários analisados no ano de 2012.

Estuário	Goiana	Jaguaribe	Capibaribe	Sirinhaém	Rio Formoso	Jureia
Goiana	-					
Jaguaribe	0,00234	-				
Capibaribe	0,00115	0,00230	-			
Sirinhaém	0,00115	0,00115	0,00000	-		
Rio Formoso	0,00123	0,00353	0,00123	0,00123	-	
Jureia-SP	0,00119	0,00238	0,00000	0,00000	-0,00103	-

Tabela 4. Análise de Variância Molecular para os indivíduos de *Cardisoma guanhumi* dos estuários analisados para o ano de 2014.

Fonte da Variação	d. f.	Soma dos quadrantes	Componentes da variância	Porcentagem da variação
Entre as populações	5	2,493	-0,00005 Va	-0,01
Dentro das populações	146	73,000	0,50000 Vb	100,01
Total	151	75,493	0,49995	
Índice de Fixação	Φ_{ST} :	-0,00010		

Tabela 5. F_{STs} par-à-par de *Cardisoma guanhumi* dos estuários analisados no ano de de 2014.

Estuário	Goiana	Jaguaribe	Capibaribe	Sirinhaém	Rio Formoso	Jureia
Goiana	-					
Jaguaribe	0,00000	-				
Capibaribe	-0,00128	0,00000	-			
Sirinhaém	0,00000	0,00000	0,00000	-		
Rio Formoso	0,00000	0,00000	0,000000	0,00000	-	
Jureia-SP	0,00000	0,00000	0,00000	0,000000	0,000000	-

3.4 Rede de haplótipos e Análise Bayesiana de Estrutura Populacional (BAPS)

A rede haplótipos das sequências de *C. guanhumi* (não mostrada) mostrou as relações genealógicas entre os haplótipos e mostrou ausência de subdivisões genealógicas espaço-temporalmente entre os anos de 2012 e 2014.

A Análise Bayesiana de Estrutura Populacional (BAPS) evidenciou três perfis genéticos ($K=3$) ao longo das seis populações amostradas para o ano de 2012, como também para 2014 (Figuras 4 e 5). Foi observada uma sutil diferença na distribuição dos mesmos perfis genéticos ao longo dos manguezais amostrados entre os anos de 2012 e 2014. O teste t revelou a inexistência de suporte estatístico perante as diferenças nas frequências dos perfis genéticos observados temporalmente.

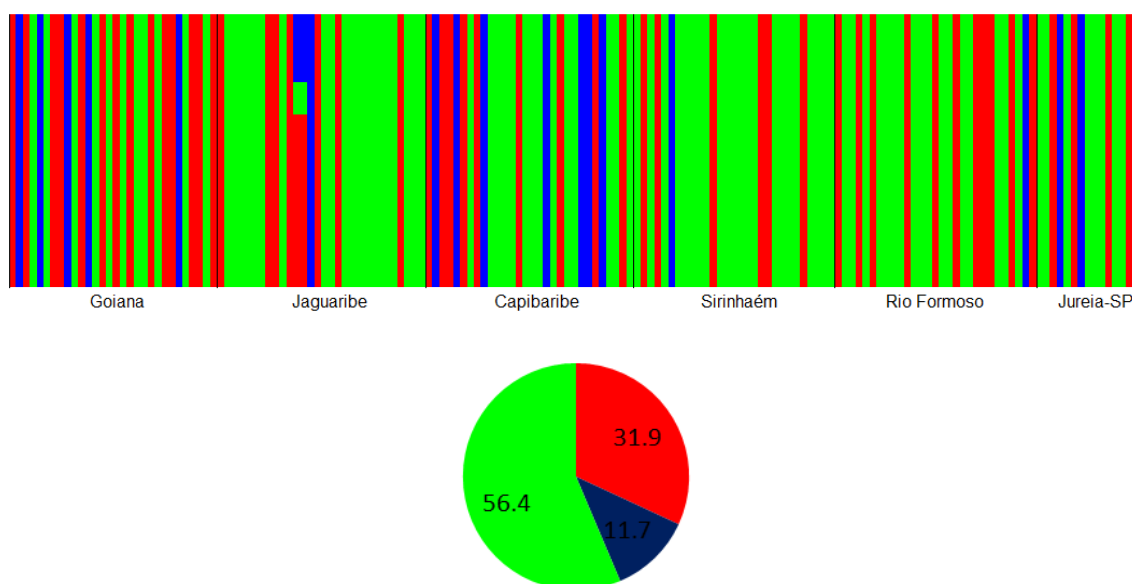


Figura 4. BAPS dos indivíduos de *Cardisoma guanhumi* amostrados nos estuários analisados no ano de 2012. Cada barra vertical representa a designação genética de um indivíduo amostrado. O gráfico circular abaixo indica a frequência de cada perfil genético observado no ano de 2012.

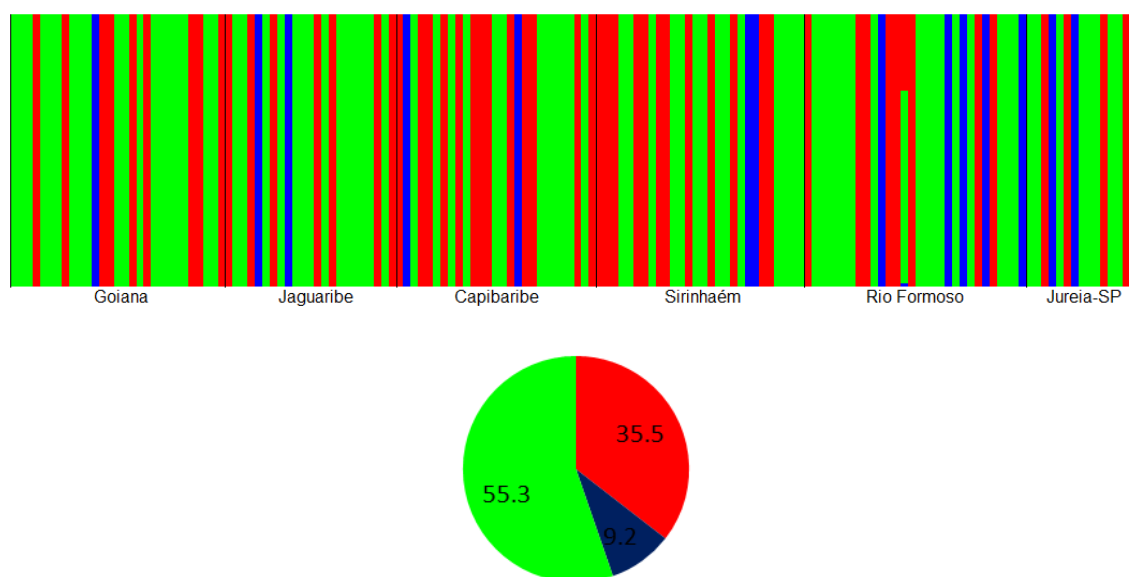


Figura 5. BAPS dos indivíduos de *Cardisoma guanhumi* amostrados nos manguezais analisados no ano de 2014. Cada barra vertical representa a designação genética de um indivíduo amostrado. O gráfico circular abaixo indica a frequência de cada perfil genético observado no ano de 2014.

3.6 Testes de neutralidade e distribuição *mismatch*.

Os testes de neutralidade D de Tajima e FS de Fu apresentaram valores negativos. Os valores de Tajima, apesar de negativos, não apresentaram significância ($p < 0,05$) para os anos de

2012 e 2014. Os valores de FS de Fu, além de negativos, apresentaram significância para todos os estuários nos dois anos analisados (Tabelas 6 e 7).

Tabela 6. Testes de neutralidade para os indivíduos de *Cardisoma guanhumi* dos estuários analisados para o ano de 2012. Goi: Goiana; Jag: Jaguaribe; Cap: Capibaribe; Sir: Sirinhaém; Rio: Rio Formoso; SP: Jureia.

Estatística	Goi	Jag	Cap	Sir	Rio	Jur	Mean	s. d.
Teste D de Tajima								
Tamanho da amostra	30	30	30	29	29	15	27.16667	5.98052
S	101	105	113	99	103	80	100.16667	10.99848
Pi	22.88736	21.80460	22.96782	21.66749	22.62069	22.51429	22.41037	0.54993
Tajima D	-0.61238	-0.84483	-0.92701	-0.71966	-0.73663	-0.63058	-0.74518	0.12205
p-value	0.30100	0.21500	0.17200	0.26700	0.25900	0.26200	0.24600	0.04545
Teste FS de Fu								
Número de alelos	29	28	30	29	28	15	26.5000	5.68331
Theta-pi	22.88736	21.80460	22.96782	21.66749	22.62069	22.51429	22.41037	0.54993
Exp. número de alelos	19.45656	19.16148	19.47783	18.68524	18.94724	11.69745	17.90597	3.05628
FS	-10.8804	-9.04288	-13.83953	-13.61363	-10.23370	-3.87646	-10.24778	3.65173
p-value	0.00000	0.00500	0.00000	0.00000	0.00400	0.02000	0.00483	0.00776

Tabela 7. Testes de neutralidade para os indivíduos de *C. guanhumi* dos estuários analisados para o ano de 2014. Goi: Goiana; Jag: Jaguaribe; Cap: Capibaribe; Sir: Sirinhaém; Rio: Rio Formoso; SP: Jureia.

Estatística	Goi	Jag	Cap	Sir	Rio	Jur	Mean	s. d.
Teste D de Tajima								
Tamanho da amostra	29	23	27	28	30	15	25.33333	5.60952
S	100	92	95	95	112	80	95.66667	10.44350
Pi	20.02709	21.69960	21.16239	23.24339	21.58391	21.80000	21.58606	1.04070
D de Tajima	-0.93834	-0.55719	-0.64042	-0.28221	-0.97659	-0.63565	-0.67173	0.25735
p-value	0.17200	0.31600	0.27300	0.44800	0.17700	0.29600	0.28033	0.10208
Teste FS de Fu								
Número de alelos	29	23	27	28	30	15	25.33333	5.60952
Theta-pi	20.02709	21.69960	21.16239	23.24339	21.58391	21.800000	21.58606	1.040070
Exp. número de alelos	18.22922	15.94187	17.68643	18.65148	19.09921	11.62050	16.87145	2.79556
FS	-14.44316	-8.93965	-12.19308	-12.11402	-14.50515	-3.98628	-11.03023	4.005594
p-value	0.00000	0.00500	0.00000	0.00200	0.00000	0.03400	0.00683	0.01345

As curvas de distribuição da análise de *mismatch* realizadas para os indivíduos de *C. guanhumi* dos anos de 2012 e 2014 mostraram-se contínuas sugerindo uma expansão populacional recente para as populações amostradas (Figura 6).

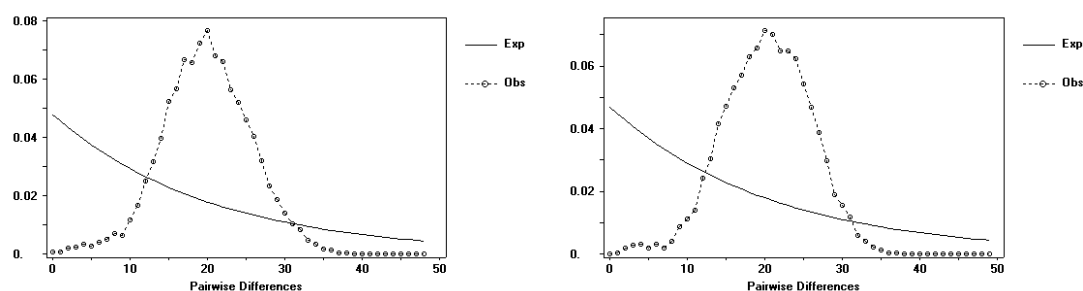


Figura 6. Gráficos de distribuição da análise de *mismatch* para os indivíduos de *Cardisoma guanhumí* dos estuários analisados para os anos de 2012 e 2014.

4. Discussão

O sequenciamento da região controle do DNA mitocondrial das amostras de *C. guanhumí* nos dois anos de amostragem mostrou uma alta diversidade haplotípica tanto para o ano de 2012 como para o ano de 2014. Apesar da intensa danificação genômica sofrida no inverno do ano de 2012 por essas populações (Falcão & cols – dados não publicados), não houve perda significativa de variabilidade genética que refletisse em diminuição da riqueza alélica com consequente diminuição do número de haplótipos das populações. Tal como a diversidade haplotípica, a diversidade nucleotídica também foi alta para ambos os períodos amostrados. Os valores de diversidade haplotípica e nucleotídica foram mais altos, inclusive, quando comparados com outras espécies de caranguejos analisados ao redor do mundo (Oliveira-Neto *et al.*, 2007; Cho *et al.*, 2009; Guo *et al.*, 2011). Assim como na diversidade haplotípica, a alta diversidade nucleotídica reforça a ausência de perda de diversidade genética em função dos danos genotóxicos a que foram submetidas as populações. Os altos índices de diversidade haplotípica e nucleotídica encontrados nos estudos com crustáceos decápodos em diferentes partes do mundo utilizando o mtDNA, podem estar relacionados às altas taxas de mutação do marcador escolhido (Avise *et al.*, 1984; Guo *et al.*, 2011). Trabalhos utilizando marcadores microssatélites em peixes mostraram resultados diferentes para as espécies. Enquanto o estudo de Paris *et al.* 2015 evidenciou a diminuição da diversidade genética, o trabalho de Vega-Retter *et al.* (2014) não detectou nenhuma alteração na diversidade

das populações de regiões poluídas quando comparados com regiões com menor grau de poluição. Stambuk *et al.* (2013) utilizando marcadores microsatélites em uma espécie de mexilhão encontraram ainda maior diversidade genética em populações ocupando regiões mais poluídas quando comparadas a regiões com menores índices de poluição.

A topologia Bayesiana mostrou a ausência de diferenciação genética temporal entre os espécimes dos estuários analisados, mesmo depois de um evento de perturbação intensa no ecossistema. A ausência de diferenciação entre as populações de guaiamum é de semelhante ocorrência entre espécies de crustáceos que apresentam, durante o seu desenvolvimento, um ciclo larval planctônico (Silva *et al.*, 2010; Wieman *et al.*, 2014). As larvas de *C. guanhumi* recém-eclodidas (zoéas) são liberadas no estuário e são conduzidas por influência das correntes costeiras, por um período de 30 a 40 dias, até alcançarem uma zona de assentamento (Costlow and Bookhout, 1968; Hostetler, 1991). Tal atributo biológico mantém um fluxo genético constante entre as populações (Arnault *et al.*, 1999; Evans *et al.*, 1983; Berckmoes *et al.*, 2005; Britto *et al.* 2011). Assim, o intenso fluxo gênico entre as diferentes populações e o grande número de larvas liberadas, que pode chegar a 700.000 larvas por fêmea (Hostetler, 1991), podem explicar a ausência de diferenciação genética entre as populações, como também a manutenção da variabilidade genética das populações mesmo frente a uma perturbação ambiental como demonstrado pelos trabalhos de Costa *et al.* (2013) e Lagisz *et al.* (2010) com invertebrados terrestres e Stambuk *et al.* (2013) utilizando mexilhões. Tal potencial evolutivo (variação genética) de *C. guanhumi* perante esse fenômeno de forte alteração do ambiente indica a grande capacidade de resiliência da espécie mediante grande habilidade adaptativa.

A inalteração da estruturação genética indicada pelas topologias bayesianas foi apoiada pela análise molecular de variância (amova) e pelas redes haplotípicas temporais obtidas. A indiferenciação genética observada entre as diferentes populações de *C. guanhumi*, juntamente com os baixos valores de F_{ST} reforçam o alto fluxo gênico que ocorre entre as populações e o modelo

stepping stones de relacionamento espacial entre os manguezais amostrados, tal como sugerido por outros pesquisadores (Oliveira-Neto *et al.*, 2008; Amaral *et al.*, 2015). A falta de estruturação genética aqui observada, influenciada pela eficiente dispersão larval (Pfeiler *et al.*, 2005; Wieman *et al.*, 2014; Yednock and Neigel, 2014), é fortemente suportada por vários estudos com crustáceos decápodes que tem sido realizado nos últimos anos, incluindo *Ucides cordatus* que vive em simpatria com *C. guanhumi* (Oliveira-Neto *et al.* 2007; Britto *et al.* 2011). Portanto a manutenção da estrutura genética de *C. guanhumi*, mesmo perante a uma perturbação reforça a resiliência da espécie, capaz de manter inalterada a sua estrutura genética mesmo diante de um evento de perturbação genômica.

Os valores negativos encontrados nos testes D de Tajima e FS de Fu juntamente com as curvas de história demográfica do gráfico de *mismatch* para ambas as análises dos anos de 2012 e 2014, evidenciam que as populações de guaíamum do estado de Pernambuco têm experimentado um momento de expansão populacional (Pfeiler *et al.*, 2005; Wieman *et al.*, 2014). Tais dados demonstram que os danos ao genoma dos indivíduos decorrente do grande aporte de águas contaminadas nos estuários no inverno de 2012 não causaram alteração no perfil de expansão populacional. Os resultados aqui encontrados estão em concordância com estudos anteriores que mostram expansão populacional em espécies de dispersão planctônica (McMillen-Jackson and Bert, 2004; Amaral *et al.*, 2015).

Variação genética é o material bruto do processo evolutivo/adaptativo, já que gargalos genéticos normalmente estão associados com perda de desempenho adaptativo (Frankham *et al.*, 2008). Em *C. guanhumi* tem sido mostrado altos índices de variação genética, tanto em dados mitocondriais (Oliveira-Neto *et al.*, 2008; Amaral *et al.*, 2015) quanto em setores genômicos nucleares (Gama-Maia and Torres, no prelo). Os resultados aqui obtidos reforçam a alta variação genética da espécie, dado que no geral cada exemplar é uma variação haplotípica diferente, mesmo após uma perturbação ambiental intensa. O conjunto destas evidências reforça a habilidade

adaptativa da espécie frente à exploração comercial histórica, bem como ao conjunto de estressores químicos resultantes da oscilação climática oriunda da precipitação de 2012.

Por outro lado, bem recentemente um estudo utilizando marcadores do tipo *inter simple sequence repeats* (ISSR) observou um padrão de estruturação genético-populacional em *C. guanhumi* ao longo dos mesmos manguezais aqui estudados (Gama-Maia and Torres, no prelo). Assim, estas evidências de estruturação genético-populacional em *C. guanhumi* estão em desacordo com os resultados aqui obtidos e também com as evidências encontradas por Oliveira-Neto *et al.* (2008) e Amaral *et al.* (2015) também utilizando mtDNA. Circunstâncias contrastantes similares foram também observadas em *Ucides cordatus* em estudos utilizando marcadores ISSR e mtDNA (Britto *et al.* 2011; Oliveira-Neto *et al.* 2007). Isso pode sugerir o efeito do marcador molecular utilizado. Marcadores moleculares ISSRs podem acessar loci sob seleção positiva, apresentando significativas diferenças nas suas frequências (Gama-Maia and Torres, no prelo), quando comparados a análises de loci neutros ou regiões mitocondriais (Vasemägi *et al.*, 2005; Pampoulie *et al.*, 2006).

A análise Bayesiana de estruturas populacionais mostrou a inexistência de alterações na quantidade de perfis genéticos nas duas amostragens (2012 e 2014). A existência de três perfis genéticos nas duas análises reforça a manutenção da diversidade genética em termos quantitativos, mesmo após o dano genômico a que foram submetidas as populações. Porém, foi observada uma alteração qualitativa de perfis genéticos nos indivíduos de *C. guanhumi* ao longo dos cinco estuários analisados no estado de Pernambuco, sugerindo uma variação ‘estabilizada’ dos perfis dos indivíduos ao longo do tempo. A manutenção, em ambas as análises, dos três perfis genéticos em todas as populações amostradas, corroborou os resultados de fluxo gênico constante entre as populações. Isto ressalta o fato de que a constante troca de informação genética das populações, principalmente em espécies com período larval planctônico longo, possa alterar a composição genética das populações embora uma alteração na estrutura global não seja identificada em duas

amostragens temporais com curto espaço de tempo como a realizada aqui (Francisco and Robalo, 2015). Isto reforça, também, a necessidade de considerarem-se as alterações temporais nas constituições genéticas das espécies em pesquisas de estruturação populacional, como evidenciado por Francisco e Robalo (2015).

Os resultados aqui obtidos permitem inferir que, apesar do forte impacto devido à exploração comercial e também devido à perturbação ambiental por contaminantes no inverno do ano de 2012, a diversidade genética das populações parece não ter sido afetada em termos quantitativos. Já em termos qualitativos foi observada uma mudança nos perfis genéticos das populações dos manguezais do litoral de Pernambuco, corroborando intenso fluxo gênico e sugerindo flutuações nos perfis genéticos destas populações. Diante disto, as medidas de conservação destes sistemas estuarinos devem levar em conta tais evidências para formulação, acompanhamento e avaliação de medidas de caráter conservacionistas para a espécie.

5. Referências

- Abrunhosa FA, Mendes LN, de Brito LT, de Oliveira YS, Ogawa CY and Ogawa M (2000) Cultivo do Caranguejo Terrestre *Cardisoma guanhumi* (Latreille, 1825) do Ovo ao Estágio Juvenil. Revista Científica de Produção Animal, 2(2):190-197.
- Adam ML, Torres RA, Sponchiado G, Motta TS Oliveira CMR, Carvalho-Filho MA and Correia MTS (2010) Environmental degradation at a public park in southern Brazil as revealed through a genotoxicity test (MN) on peripheral blood cells from *Poecilia vivipara* (Teleostei). Water Air Soil Pollut 211(1): 61-68.
- Akaike H (1974) A new look at the statistical model identification. IEEE T Automat Contr 19(6).
- Amaral ACZ and Jablonski S (2005) Conservação da biodiversidade marinha e costeira no Brasil. Megadiversidade 1(1):43-51.
- Amaral MRX, Albrecht M, McKinley AS, Carvalho AMF, Junior SCS and Diniz FM (2015) Mitochondrial DNA Variation Reveals a Sharp Genetic Break within the Distribution of the Blue Land Crab *Cardisoma guanhumi* in the Western Central Atlantic. Molecules 20:15158-15174.
- Anderson S and Wild GC (1994) Linking Genotoxic Responses and Reproductive Success in Ecotoxicology. Environ Health Perspect 102(suppl12):3-8.
- Arnault S, Bourles B, Gouriou Y and Chuchla R (1999) Intercomparison of upper layer circulation of the western equatorial Atlantic Ocean: In situ and satellite data. J Geophysical Res 104:171-194

- Awise JC, Neigel JE and Arnold J (1984) Demographic influences on mitochondrial DNA lineage survivorship in animal populations. *J Mol Evol* 20:99-105.
- Barbier EB, Hacker SD, Kennedy C, Koch EW, Stier AC and Silliman BR (2011) The value of estuarine and coastal ecosystem services. *Ecol Monogr* 81(2):169-193.
- Berckmoes V, Scheirs J, Jordaens K, Blust R, Backeljau T and Verhagen R (2005) Effects of environmental pollution on microsatellite DNA diversity in wood mouse (*Apodemus sylvaticus*) populations. *Environ Toxicol Chem*. 24(11):2898-907.
- Botelho ERO, Santos MF and Souza JRB (2001) Aspectos populacionais do guaiamum, *Cardisoma guanhumi* Latreille, 1825, do estuário do Rio Una (Pernambuco Brasil). *Boletim Técnico Científico, CEPENE* 9(1):123-146.
- Britto FB, Mendes DSF, Ogawa M, Cintra IHA and Diniz FM (2011) Single primer-based DNA amplification as a suitable and low-cost tool for assessing genetic diversity in mangrove crabs. *Genet Mol Res* 10(4):4084-4092.
- Chapman JR, Nakagawa S, Coltman DW, Slaters J and Sheldon BC (2009) A quantitative review of heterozygosity-fitness correlations in animal populations. *Mol Ecol* 18:2746–2765.
- Cho EM, Min GS, Kanwal S, Hyun YS, Park SW and Chung KW (2009) Phylogenetic analysis of mitochondrial DNA control region in the swimming crab, *Portunus trituberculatus*. *Anim Cells Syst* 13:305–314.
- Corander J and Marttinen P (2006) Bayesian identification of admixture events using multi-locus molecular markers. *Mol Ecol* 15:2833-2843.
- Costa D, Timmermans MJTN, Sousa JP, Ribeiro R, Roelofs D and Van Straalen NM (2013) Genetic structure of soil invertebrate populations: Collembolans, earthworms and isopods. *Appl Soil Eco* 68:61-66.
- Costlow Jr JD and Bookhout CG (1968a) The complete larval development of the land-crab, *Cardisoma guanhumi* Latreille in the laboratory (Brachyura, Gecarcinidae). *Crustaceana*. Supplement, 259-270.
- Costlow Jr JD and Bookhout CG (1968b) The Effect of Environmental Factors on Development of the Land-Grab, *Cardisoma guanhumi* Latreille. *Amer Zool* 8(3):399-410.
- Drummond AJ and Rambaut A (2007) BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evol Biol* 7:214.
- Durrant CJ, Stevens JR, Hogstrand C and Bury NR (2011) The effect of metal pollution on the population genetic structure of brown trout (*Salmo trutta* L.) residing in the River Hayle, Cornwall, UK. *Environ Pollut* 159:3595–3603
- Elliott M and Whitfield AK (2011) Challenging paradigms in estuarine ecology and management. *Estuar Coast Shel* 94:306-314.
- Evans DL, Signorini SR and Miranda LB (1983) A note on the transport of the Brazil current. *J Phys Oceanogr* 13:1732-1738.
- Excoffier L, Smouse P and Quattro J. (1992) Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131:479-491.
- Excoffier L and Lischer HE (2010) Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol Ecol Resour* 10(3):564-567.
- Forsee RA and Albrecht M (2012) Population estimation and site fidelity of the land crab *Cardisoma guanhumi* (Decapoda: Brachyura: Gecarcinidae) on Vieques Island, Puerto Rico. *Journal of Crustacean Biology* 32(3):435-442.
- Francisco SM and Robalo JI (2015) Genetic Structure and Effective Population Size through Time: A Tale on Two Coastal Marine Species with Contrasting Life-History Patterns. *J Phylogen Evolution Biol* 3:3.
- Frankham R (2005) Stress and adaptation in conservation genetics. *J Evol Biol* 18:750–755.

- Frankham R, Ballou JD, and Briscoe DA (2008). Fundamentos da Genética da Conservação. Sociedade Brasileira de Genética. 262pp
- Frenzilli G, Nigro M and Lyons BP (2009) The Comet assay for the evaluation of genotoxic impact in aquatic environments. *Mut Res* 681:80-92.
- Fu X-Y (1997) Statistical test of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics* 147:915–925.
- Galli OB, Fujimoto RY and Abrunhosa FA (2012) Acute toxicity of sodium metabisulphite in larvae and post-Larvae of the land crab, *Cardisoma guanhumi*. *B Environ Contam Tox* 89(2):274-280.
- Gama-Maia DJ and Torres RA (2016) Fine scale genetic-structuring, divergent selection, and conservation prospects for the overexploited crab *Cardisoma guanhumi* in tropical mangroves from Northeastern Brazil. *J Mar Biol Assoc UK* (In Press).
- Gifford CA (1962) Some observations on the general biology of the land crab, *Cardisoma guanhumi* (Latreille), in south Florida. *Biological Bulletin* 123(1):207-223.
- Guo E, Liu Y, Cui Z, Li X, Cheng Y and Wu X (2012) Genetic variation and population structure of swimming crab (*Portunus trituberculatus*) inferred from mitochondrial control region. *Mol Biol Rep* 39:1453-63.
- Heilveil JS, LaPilusa TL and Turner LM (2014) Characterization of microsatellite markers from the commodity species *Cardisoma guanhumi* Latreille and the Christmas Island blue crab (*Discoplax celeste*). *Conservation Genet Resour* 6:99–101.
- Hostetler ME, Mazzotti FJ, Taylor AT (1991) Blue Land Crab (*Cardisoma guanhumi*). *Wec* 30 of University of Florida, 2 p.
- Hughes AR, Inouye BD, Johnson MTJ, Underwood N and Vellend M (2008) Ecological consequences of genetic diversity. *Ecol Lett* 11:609–623.
- Kennish MJ (2002) Environmental threats and environmental future of estuaries. *Environ Conserv* 29(1):78-107.
- Lagisz M, Wolff K, Sanderson RA and Laskowski (2010) Genetic population structure of the ground beetle, *Pterostichus oblongopunctatus*, inhabiting a fragmented and polluted landscape: evidence for sex-biased dispersal. *J Insect Sci* 10:105.
- Librado P and Rozas J (2009) DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25(11):1451-52.
- McMillen-Jackson and Bert TM (2004) Mitochondrial DNA variation and population genetic structure of the blue crab *Callinectes sapidus* in the eastern United States. *Mar Biol* 145(4):769-777.
- MMA (2004) Ministério do Meio Ambiente. Lista Nacional das Espécies sobreexplotadas ou ameaçadas de sobreexploração. In: Lista Nacional de Espécies de Invertebrados Aquáticos e Peixes Ameaçados de Extinção. Instrução Normativa nº 5, de 21 de maio de 2004. Ministério do Meio Ambiente. Brasília. Diário Oficial da União nº 102, de 28 de maio de 2003, Seção 1, páginas 136-142.
- MMA (2014) Ministério do Meio Ambiente. Lista Nacional Oficial de Espécies da Fauna Ameaçadas de Extinção - Peixes e Invertebrados Aquáticos. Portaria MMA nº 445 de 17 de Dezembro de 2014.
- Ohe T, Watanabe T and Wakabayashi K (2004) Mutagens in surface water: a review. *Mutat Res* 567:109–149.
- Oliveira-Neto JF, Boeger WA, Pie MR and Ostrensky A (2007). Genetic structure of populations of the mangrove crab *Ucides cordatus* (Decapoda: Ocypodidae) at local and regional scales. *Hydrobiologia* 583: 69-76.
- Oliveira-Neto JF, Pie MR, Chammas MA, Ostrensky A and Boerger WA (2008) Phylogeography of the blue land crab, *Cardisoma guanhumi* (Decapoda: Gecarcinidae) along the Brazilian coast. *J Mar Biol Assoc UK* 88:1417-1423.

- Pampoulie C, Ruzzante DE, Chosson V, Jörundsdóttir TD, Taylor L, Thorsteinsson V and Marteinsdóttir G (2006) The genetic structure of Atlantic cod (*Gadus morhua*) around Iceland: insight from microsatellites, the Pan I locus, and tagging experiments. *Can J Fish Aquat Sci* 63(12):2660-2674.
- Paris RJ, King RA and Stevens JR (2015) Human mining activity across the ages determines the genetic structure of modern brown trout (*Salmo trutta L.*) populations. *Evolutio Applic* 8(6):773-85.
- Pauls SU, Nowak C, Bálint M and Pfenninger M (2013) The impact of global climate change on genetic diversity within populations and species. *Mol Ecol* 22:925–946.
- Pfeiler E, Hurtado LA, Knowles LL, Torre-Cosío J, Bourillón-Moreno L, Márquez-Farías JF and Montemayor-López G (2005) Population genetics of the swimming crab *Callinectes bellicosus* (Brachyura: Portunidae) from the eastern Pacific Ocean. *Mar Biol* 146(3):559-569.
- Posada D (2008) jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. *Mol Biol Evol* 25(7):1253–1256.
- Rogers AR and Harpending HC (1992) Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Mol Biol Evol* 9:552-569.
- Silva IC, Mesquita N and Paula J (2010) Lack of population structure in the fiddler crab *Uca annulipes* along an East African latitudinal gradient: genetic and morphometric evidence. *Mar Biol* 157:1113–1126
- Stambuk A, Srut M, Satovic Z, Tkalec M and Klobucar GIV (2013) Gene flow vs. pollution pressure: Genetic diversity of *Mytilus galloprovincialis* in eastern Adriatic. *Aquat Toxicol* 136(137):22-31.
- Tajima F (1989) Evolutionary relationship of DNA sequences in finite populations. *Genetics* 105:437-460.
- Tamura K and Nei M (1993) Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol Biol Evol* 10(3):512–526.
- Vasemägi A, Nilsson J and Primmer CR (2005) Expressed sequence tag-linked microsatellites as a source of gene-associated polymorphisms for detecting signatures of divergent selection in Atlantic salmon (*Salmo salar L.*). *Mol Biol Evol* 22(4):1067-1076.
- Van Straalen NM and Timmermans JTN (2002) Genetic variation in toxicant-stressed populations: an evaluation of the genetic erosion hypothesis. *Hum Ecol Risk Assessment* 8(5):983-1002.
- Vega-Retter C, Rojas PM, Vila I, Copaja S and Véliz D (2014) Genetic effects of living in a highly polluted environment: the case of the silverside *Basilichthys microlepidotus* (Jenyns) (Teleostei: atherinopsidae) in the Maipo River basin, central Chile. *Popul Ecol* 56:569-579.
- Waters MD, Stack HF b and Jackson MA (1999) Genetic toxicology data in the evaluation of potential human environmental carcinogens. *Mut Res* 437:21-49.
- Wieman AC, Berendzen PB, Hampton KR, Jang J, Hopkins MJ, Jurgenson J, McNamara JC and Thurman CL (2014) A panmictic fiddler crab from the coast of Brazil? Impact of divergent ocean currents and larval dispersal potential on genetic and morphological variation in *Uca maracoani*. *Mar Biol* 161:173-185.
- Whitehead A, Anderson SL, Kuivila KM, Roach JL and May B (2003) Genetic variation among interconnected populations of *Catostomus accidentalis*: implications for distinguishing impacts of contaminants from biogeographical structuring. *Mol Ecol* 12:2817-2833.
- Wirgin I, Maceda L, Waldman J and Mayack DT (2015) Genetic variation and population structure of American mink *Neovison vison* from PCB-contaminated and non-contaminated locales in eastern North America. *Ecotox* 24(9):1961-75.
- Wright S (1951) The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics* 15:323-354.
- Yednock BK and Neigel JE (2014) An investigation of genetic population structure in blue crabs, *Callinectes sapidus*, using nuclear gene sequences. *Mar Biol* 161(4):871-886.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) pelo suporte financeiro para o desenvolvimento deste trabalho. C.B.R. Falcão é especialmente grato à FACEPE pelo suporte financeiro do doutorado. R.A. Torres e M.A.A. Pinheiro são especialmente gratos ao CNPq pela parceria de pesquisa provida (Número dos processos 306099/2011-0, 301208/2012-3, e 302813/2010-1, respectivamente). Este estudo é uma contribuição do INCT AmbTropic – Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Ambientes Marinhos Tropicais CNPq/FAPESB. Processos: 565054/2010-4 e 8936/2011.

6. Discussão geral

Ao longo dos anos de 2012 a 2014 ficou sugerido o aporte de compostos químicos nos sistemas estuarinos do litoral pernambucano. O forte dano genômico no inverno do ano de 2012 alertou para este cenário de degradação ambiental. No entanto, a diminuição dos índices de danificação trouxe, também, as primeiras evidências para algumas perguntas antigas: qual estação do ano estaria mais relacionada com possíveis índices de danificação genômica? O maior volume de chuvas que atingem o nordeste do Brasil nos meses de inverno estaria maximizando efeitos de poluição com carreamento de compostos químicos ou atuariam amenizando tais efeitos ao diluírem estes compostos? Embora os trabalhos de Werner *et al.* (2002), Whitehead *et al.* (2004) e Pollard *et al.* (2011) evidenciassem um aumento de danificação genômica nos organismos após um evento de grande pluviosidade, era necessário testar esta hipótese para a região do nordeste brasileiro.

A relação do aumento da danificação genômica com a estação do inverno ficou evidenciada considerando que os eventos de grande pluviosidade, com provável carreamento de compostos químicos para os estuários, devem ocorrer prioritariamente no período com maior incidência de chuvas, tendo sua ocorrência nos meses de verão muito diminuída em função características naturais das regiões de clima tropical e pelos dados históricos de pluviosidade (http://www.mma.gov.br/estruturas/sqa_sigercom/_publicacao/78_publicacao12122008091035.pdf).

O monitoramento da estrutura genética ao longo de dois ciclos climáticos completos com a ocorrência de um evento de danificação genômica entre as duas análises também nos permitiu refutar, ao menos para espécie *C. guanhumi* no intervalo

de tempo abordado, a hipótese de erosão genética mediada por agentes genotóxicos proposta por Van Straalen and Timmermans (2002). Os indivíduos de *C. guanhumi* mostraram-se capazes de responder positivamente aos possíveis eventos de danificação genômica mediada por grande disponibilização de poluentes devido à pluviosidade, mantendo elevados os índices de variabilidade genética das populações amostradas. O estudo permitiu, também, apontar esta espécie como bom indicador de saúde ambiental, considerando a sensibilidade com que respondeu aos prováveis diferentes índices de poluição dos estuários em função do carreamento pluviométrico de compostos químicos. O monitoramento da estrutura genética das populações de guaiamum dos estuários pernambucanos ainda permitiu reforçar a hipótese de panmixia da espécie, corroborando a atual ideia do grande fluxo gênico entre populações de espécies que apresentam um ciclo larval planctônico de longa duração (Francisco and Robalo, 2015).

Por fim, o monitoramento da danificação genômica em *C. guanhumi* em decorrência de um evento atípico de intensas chuvas permite a extrapolação dos dados e utilização do estudo como modelo preditivo para o carreamento de compostos químicos tóxicos, com possível ação genotóxica, para os sistemas estuarinos com ação danificadora nas espécies locais, principalmente em espécies que apresentam hábitos exclusivamente aquáticos e estão, naturalmente, mais expostas aos contaminantes carregados pelas chuvas. Mediante tal informação, é possível juntamente com os dados de meteorologia e monitoramento dos índices de pluviometria para a região, planejar medidas preventivas que visem minimizar os danos decorrentes dessas trombas d'água que acometem o estado.

7. Conclusões

- 1 Os sistemas estuarinos do estado de Pernambuco estão sujeitos ao aporte de compostos químicos de ação genotóxica, maximizado nos períodos de chuvas.
- 2 As populações de *C. guanhumi* do estado de Pernambuco apresentam grande resiliência à presença de compostos químicos diluídos no ambiente, sendo capazes de reestabelecer níveis seguros de integridade genômica após eventos de danificação.
- 3 As populações de *C. guanhumi* do estado de Pernambuco apresentam altos índices de diversidade genética com ausência de indícios de erosão genética em curto espaço temporal mesmo em decorrência de eventos de danificação genômica pontuais.
- 4 A espécie *C. guanhumi* apresentou panmixia para as populações do estado de Pernambuco permitindo a realocação de espécimes entre os estuários sem comprometimento da estrutura genética da espécie.
- 5 Devido ao seu poder de resiliência, *C. guanhumi* pode ser utilizado como espécie bioindicadora em estudos que visem avaliar alterações da homeostase ambiental em sistemas estuarinos.
- 6 A previsão ou amostragem de eventos de grande pluviosidade que atinjam os estuários do estado de Pernambuco devem estimular a ação de medidas mitigadoras dos efeitos decorrentes de tais cenários.

8. Referências Bibliográficas

- Abrunhosa FA, Mendes LN, Brito LT, Oliveira YS, Ogawa CY and Ogawa M (2000) Cultivo do Caranguejo Terrestre *Cardisoma guanhumi* (Latreille, 1825) do Ovo ao Estágio Juvenil. *Revista Científica de Produção Animal*, 2(2):190-197.
- Adam ML, Torres RA, Sponchiado G, Motta TS Oliveira CMR, Carvalho-Filho MA and Correia MTS (2010) Environmental degradation at a public park in southern Brazil as revealed through a genotoxicity test (MN) on peripheral blood cells from *Poecilia vivipara* (Teleostei). *Water Air Soil Pollut* 211(1):61-68.
- Adam ML, Torres RA, Kiska AM, Oliveira FF, Lacerda O, Sponchiado G, Ribas CMO and Correia MT (2013) Assessment of genome damage in bird and mammal species as a tool for improvements in ex-situ conservation at zoos. *Natureza & Conservação* 11:59-64.
- Amaral ACZ and Jablonski S (2005) Conservação da biodiversidade marinha e costeira no Brasil. *Megadiversidade*, 1(1):43-51.
- Araújo MCB, Souza ST, Chagas ACO, Barbosa SCT and Costa MF (2007) Análise da Ocupação Urbana das Praias de Pernambuco, Brasil. *JICZM* 7(2):97-104.
- Araújo MC and Oliveira MBM (2013) Monitoring of water quality of a stream at the Federal University of Pernambuco, Brazil *Rev Ambient Água* 8(3):247-257.
- Arcaute CR, Pérez-Iglesias JM, Nikoloff N, Natale GS, Soloneski S and Larramendy ML (2014) Genotoxicity evaluation of the insecticide imidacloprid on circulating blood cells of Montevideo tree frog *Hypsiboas pulchellus* tadpoles (Anura, Hylidae) by comet and micronucleus bioassays. *Ecol Indic* 45:632–639.
- Aubrecht J and Caba E (2005) Gene expression profile analysis: An emerging approach to investigation mechanisms of genotoxicity. *Pharmacogenomics*, 6(4):419-428.
- Atienzar FA and Jha AN (2006) The random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay and related techniques applied to genotoxicity and carcinogenesis studies: A critical review. *Mut Res* 613:76-102
- Barbier EB, Hacker SD, Kennedy C, Koch EW, Stier AC and Silliman BR (2011) The value of estuarine and coastal ecosystem services. *Ecol Monogr* 81(2):169–193.
- Barletta M and Costa MF (2009). Living and Non-living resources exploitation in a tropical semi-arid estuary. *J Coastal Res* 56:371-375
- Beheregaray LB and Sunnucks P (2001) Fine-scale genetic structure, estuarine colonization and incipient speciation in the marine silverside fish *Odontesthes argentinensis*. *Mol Ecol* 10:2849–2866.
- Belfiore NM and Anderson SL (2001). Effects of contaminants on genetic patterns in aquatic organisms: a review. *Mut Res* 489:97-122
- Bickham JW, Sandhu S, Herbert PDN, Chikhi L and Athwal R (2000) Effects of chemical contaminants on genetic diversity in natural populations: implications for biomonitoring and ecotoxicology. *Mut Res* 463:33-51.
- Birimi TS (2007). Disponível em: http://www.taek.gov.tr/sanaem/html/tip_birimi.html
Acesso em: 04 de junho de 2010.
- Bonfim NR, Aragão IR, Abadia BC, Almeida EC (2012) La instalación de Porto-Sul em la región de Ponta da Tulha – BA, Brasil: Una propuesta de turismo de base comunitária para desarrollar la comunidade local. *Estud Perspect Tur* 21(5).
- Botelho ERO, Santos MF and Souza JRB (2001) Aspectos populacionais do guaiamum, *Cardisoma guanhumi* Latreille, 1825, do estuário do Rio Una (Pernambuco Brasil). *Boletim Técnico Científico, CEPENE* 9(1):123-146.

- Branco JO (1991) Aspectos ecológicos dos brachyura (crustacea:decapoda) no manguezal do Itacorubi, SC – Brasil. Rev Bras Zoo 7(1-2):165-179.
- Brendler-Schwaab S, Hartmann A, Pfuhrer S and Speit G (2005) The in vivo comet assay: use and status in genotoxicity testing. Mutagenesis 20(4):245-254.
- Bright DB and Hogue CL (1972) A synopsis of the burrowing land crabs of the world and list of their arthropod symbionts and burrow associates. Contributions in science 220.
- Brusick DJ (1978). Alterations of germ cells leading to mutagenesis and their detection. Environ Health Perspect 24:105-112.
- Carvalho MB, Ramirez A, Gattás GJF (2002). Relationship between the outcome and the frequency of micronuclei in cells of patients with oral and oropharyngeal carcinoma. Rev Assoc Med Bras 48(4):317-322.
- Catalán J, Autio K, Wessman M, Lindholm C, Knuutila S, Sorsa M and Norppa H (1995) Age-associated micronuclei containing centromeres and the X chromosome in lymphocytes of women. Cytogenet Cell Genet 68:11–16.
- Chapman JR, Nakagawa S, Coltman DW, Slates J and Sheldon BC (2009) A quantitative review of heterozygosity-fitness correlations in animal populations. Mol Ecol 18:2746–2765.
- Comforth MN and Goodwin EH (1991) Transmition of radiation-induced acentric chromosomal fragments to micronuclei in normal human fibroblasts. Radiat Res 126:210-217.
- Costa S, Pardal MA and Azeiteiro UM (2013). The use of an Estuarine System (Mondego estuary, Portugal) as Didactic Tool to incorporate Education for Sustainable Development into School Curricula. JICZM 13(2):243-251
- Costlow Jr JD and Bookhout CG (1968a) The complete larval development of the land-crab, *Cardisoma guanhumi* Latreille in the laboratory (Brachyura, Gecarcinidae). Crustaceana. Supplement, 259-270.
- Costlow Jr JD and Bookhout CG (1968b) The Effect of Environmental Factors on Development of the Land-Grab, *Cardisoma guanhumi* Latreille. Amer Zool 8(3):399-410.
- CPRH/PE (2010) Proteção das Áreas Estuarinas- FIDEM – 1996. Disponível em http://www.cprh.pe.gov.br/perfis_ambientais/areas_estuarinas.
- Dachs J and Méjanelle L (2010). Organic Pollutants in Coastal Waters, Sediments, and Biota: A relevant Driver for Ecosystems during the Anthropocene? Estuar Coas, 33(1):1-14.
- Davanso MB, Moreira LB, Pimentel MF, Costa-Lotufo LV and Abessa DMS (2013) Biomarkers in mangrove root crab *Goniopsis cruentata* for evaluating quality of tropical estuaries. Mar Environ Res 91:80-88.
- Di Paolo C (2008) Aplicação do ensaio cometa ao estudo de danos ao DNA de robalos, *Centropomus parallelus* (Poey, 1860), exposto à β -naftoflavona. São Paulo-SP, 103p. Dissertação de mestrado em Ciências, área de Oceanografia Biológica, Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo.
- Dixon DR, Pruski AM, Dixon LRJ and Jha AN (2002) Marine invertebrate ecogenotoxicology: a methodological overview. Mutagenesis 17(6):495-507.
- Excoffier L, Laval G and Schneider S (2005) Arlequin (version 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis. Evolutionary Bioinformatics 1:47-40.
- Falck GC, Catalán J and Norppa H (2002) Nature of anaphase laggards and micronuclei in female cytokinesis-blocked lymphocytes. Mutagenesis 17:111–117.
- Ford JH and Corell AT (1992) Chromosome errors at mitotic anaphase. Genome 35:702–705.

- Forsee RA and Albrecht M (2012) Population estimation and site fidelity of the land crab *Cardisoma guanhum* (Decapoda: Brachyura: Gecarcinidae) on Vieques Island, Puerto Rico. *J Crustacean Biol* 32(3):435-442.
- Francisco SM and Robalo JI (2015) Genetic Structure and Effective Population Size through Time: A Tale on Two Coastal Marine Species with Contrasting Life-History Patterns. *J Phylogen Evolution Biol* 3:3.
- Frankham R (2005) Stress and adaptation in conservation genetics. *J Evol Biol* 18:750–755.
- Frenzilli G, Nigro M and Lyons BP (2009) The Comet assay for the evaluation of genotoxic impact in aquatic environments. *Mut Res* 681:80-92.
- Galli OB, Fujimoto RY and Abrunhosa FA (2012) Acute toxicity of sodium metabisulphite in larvae and post-Larvae of the land crab, *Cardisoma guanhum*. *B Environ Contam Tox* 89(2):274-280.
- Ghizalini AM, Mendonça-Hagler LCS and Macrae A (2012) Microbial diversity in Brazilian mangrove sediments: a mini review. *Braz J Microbiol.* 43(4):1242-1254.
- Gifford CA (1962) Some observations on the general biology of the land crab, *Cardisoma guanhum* (Latreille), in south Florida. *Biol Bull* 123(1):207-223.
- Giska I, Babik W, Van Gestel CAM, Van Straalen NM and Laskowski R (2015) Genome-wide genetic diversity of rove beetle populations along a metal pollution gradient. *Ecotox Environ Safe* 119:98-105
- Green PT, O'Dowd DJ and Lake PS (2008) Recruitment dynamics in a rainforest seedling community: context-independent impact of a keystone consumer. *Oecologia*, 156(2):373-385.
- Hall TA (1999) BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41:95-98.
- Hartmann A, Agurell E, Beevers C, Brendler-Shawaab S, Burlinson B, Clay P, Collins A, Smith A, Speit G, Thybaud V and Tice RR (2003) Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay. 4th International Comet Assay Workshop. *Mutagen* 18(1):45-51.
- Heilveil JS, LaPilusa TL and Turner LM (2014) Characterization of microsatellite markers from the commodity species *Cardisoma guanhum* Latreille and the Christmas Island blue crab (*Discoplax celeste*). *Conservation Genet Resour* 6:99–101.
- Heddle JA (1973) A rapid in vivo test for chromosomal damage. *Mut Res* 18:187-190.
- Hostetler ME, Mazzotti FJ and Taylor AT (1991) Blue Land Crab (*Cardisoma guanhum*). *Wec* 30 of University of Florida, 2 p.
- Hughes AR, Inouye BD, Johnson MTJ, Underwood N and Vellend M (2008) Ecological consequences of genetic diversity. *Ecol Lett* 11:609–623.
- Kaselowski T and Adams JB (2013) Not so pristine - characterising the physico-chemical conditions of an undescribed temporarily open/closed estuary. *Water SA* 39(5).
- Kehdy FSG (2003) Projeto Micronúcleos. Departamento Biologia Geral ICB-UFMG. Disponível em: <www.icb.ufmg.br/~prodap/2003/micronucleos/projeto.htm>. Acesso em 15 de nov. 2008.
- Klobucar GIV, Malev O, Srut M, Stambuk A, Lorenzon S, Cvetkovic Z, Ferrero EA and Maguire I (2012) Genotoxicity monitoring of freshwater environments using caged crayfish (*Astacus leptodactylus*). *Chemosphere* 87:62–67.
- Lacaze E, Devaux A, Mons R, Bony S, Garric J, Geffard A and Geffard O (2011) DNA damage in caged *Gammarus fossarum* amphipods: A tool for freshwater genotoxicity assessment. *Environ Pollut* 159(6):1682:1691.
- Librado P and Rozas J (2009) DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25:1451-1452.

- Lindholm C, Norppa H, Hayashi M and Sorsa M (1991). Induction of micronuclei and anaphase aberrations by cytochalasin B in human lymphocyte cultures. *Mut Res* 260:369–375.
- Lindquist ES, Kraus KW, Green PT, O'Dow DJ, Sherman PM and Smith TJ (2009) Land crabs as key drivers in tropical coastal forest recruitment. *Biological Reviews* 84(2):203-223.
- Lohmann THO (1995) Análise da radiosensibilidade de linfócitos periféricos de pacientes com câncer de pele e de indivíduos sadios por meio do Método do Micronúcleo. São Paulo – SP, 83p. Dissertação de mestrado em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo.
- Martinho F, Cabral HN, Azeiteiro UM and Pardal MA (2012) Estuarine nurseries for marine fish: Connecting recruitment variability with sustainable fisheries management. *Manag Environ Qual Int J* 23(4):414-433.
- Matson CW, Lambert MM, McDonald TJ, Autenrieth RL, Donnelly KC, Islamzadeh A, Politov DI and Bickham JW (2006). Evolutionary Toxicology: Population-Level Effects of Chronic Contaminant Exposure on the Marsh Frogs (*Rana ridibunda*) of Azerbaijan. *Environ Health Perspect* 114:547–552.
- McGregor D (2000) Carcinogenicity and genotoxic carcinogens, In: Ballantyne B, Mars T and Syversen T (eds). *General and Applied Toxicology*. 2nd edition. London p. 1099-1117.
- Mendez M, Rosenbaum HC, Subramaniam A, Yackulic C and Bordino P (2010) Isolation by environmental distance in mobile marine species: molecular ecology of franciscana dolphins at their southern range. *Mol Ecol* 19:2212–2228.
- Miller SA, Dykes DD, Polesky HF (1998) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 16(3):12-15.
- MMA (2004) Ministério do Meio Ambiente. Lista Nacional das Espécies Sobreexplotadas ou Ameaçadas de Sobreexploração. In: Lista Nacional de Espécies de Invertebrados Aquáticos e Peixes Ameaçados de Extinção. Instrução Normativa nº 5, de 21 de maio de 2004. Ministério do Meio Ambiente. Brasília. Diário Oficial da União nº 102, de 28 de maio de 2003, Seção 1, páginas 136-142.
- MMA (2014) Ministério do Meio Ambiente. Lista Nacional Oficial de Espécies da Fauna Ameaçadas de Extinção - Peixes e Invertebrados Aquáticos. Portaria MMA nº 445 de 17 de Dezembro de 2014.
- Muller P (2006) The alkaline comet assay: towards validation in biomonitoring of DNA damaging exposures. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 98:336- 345.
- Newton RK, Aardema M and Aubrecht J (2004). The utility of DNA microarrays for characterizing genotoxicity. *Environ Health Perspect* 112:420–422.
- Norppa H and Falck M (2003). What do human nuclei contain? *Mutagenesis* 18(3):221-233.
- Nowak C, Vogt C, Pfenninger M, Schwenk K, Oehlmann J, Streit B and Oetken M (2009) Rapid genetic erosion in pollutant-exposed experimental chironomid populations *Environ Pol* 157:881–886
- Nudi AH, Wagener ALR, Francioni E, Sette CB, Sartori AV and Scofield AL (2010) Biomarkers of PAH exposure in crabs *Ucides cordatus*: Laboratory assay and field study. *Environ Res* 110:137-145.
- Ohe T, Watanabe T and Wakabayashi K (2004) Mutagens in surface water: a review. *Mutat Res* 567:109–149.

- Olive PL, Banath JP and Durand RE (1990) Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the "comet" assay. *Radiat Res*, 122(1): 86-94.
- Park SY and Choi J (2007). Cytotoxicity, genotoxicity and ecotoxicity assay using human cell and environmental species for the screening of risk from pollutant exposure. *Environ Inter* 33:817-822.
- Passos AC, Contente RF, Abbatepaulo FV, Spach AL, Vilar CC, Joyeux JC, Cartagena BFC and Fávaro LF (2013) Analysis of fish assemblages in sectors along salinity gradient based on species, families and functional groups. *Braz J Ocenogr* 61(4):251-264.
- Pauls SU, Nowak C, Bálint M and Pfenninger M (2013) The impact of global climate change on genetic diversity within populations and species. *Mol Ecol* 22:925–946.
- Picado A, Bebianno MJ, Costa MH, Ferreira A and Vale C (2007) Biomarkers: a strategic tool in the assessment of environmental quality of coastal Waters. *Hydrobiology* 587:79-87.
- Pinheiro, MAA, Duarte LFA, Toledo TR, Adam ML and Torres RA (2013) Habitat monitoring and genotoxicity in *Ucides cordatus* (Crustacea: Ucididae), as tools to manage a mangrove reserve in southeastern Brazil. *Environ Monit Assess* 185(10):8273-8285.
- Polard T, Jean S, Gauthier L, Laplanche C, Merlina G, Sánchez-Pérez JM and Pinelli E. (2011) Mutagenic impact on fish of runoff events in agricultural areas in south-west France. *Aquat Toxicol* 101:126-134.
- Rocha AJS, Botelho MT, Hasue FM, Passos MJACR, Vignardi CP, Ngan PV and Gomes V (2015) Genotoxicity of shallow waters near the Brazilian Antarctic station "Comandante Ferraz" (EACF), Admiralty Bay, King George Island, Antarctica. *Braz J Oceanogr* 63(1).
- Rojas E, Lopez MC and Valverde M (1999) Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, 722(1-2):225-54.
- Saunders WS, Shuster M, Huang X, Gharaibeh B, Enyenihi AH, Petersen I and Gollin SM (2000) Chromosomal instability and cytoskeletal defects in oral cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:303–308
- Scherer M. (2013) Gestão de Praias no Brasil: Subsídios para uma Reflexão. *RGCI* 13(1).
- Schmid W (1975) The micronucleus test. *Mut Res* 31:9-15.
- Seriani R, Abessa DMS, Pereira CDS, Kirschbaum AA, Assunção A and. Ranzani-Paiva MJT (2013). Influence of seasonality and pollution on the hematological parameters of the estuarine fish *Centropomus parallelus*. *Braz J Oceanogr* 61(2):105-111.
- Sheaves M (2006) Scale-dependent variation in composition of fish fauna among sandy tropical estuarine embayments. *Mar Ecol Prog Ser* 310: 173–184.
- Shimasaki L, Kitagawa K, Hernandez M and Blumstein DT (2012) Are blue land crabs (*Cardisoma guanhumi*) attracted to falling fruit?. *Acta Ethologica*, 15(1):159-164.
- Silva J, Erdtmann B and Henriques JAP (2003) *Gene. Toxicol.* Porto Alegre: Alcance 1:424.
- Singh NP, McCoy MT, Tice RR and Schneider EL (1988) A simple technique for the quantification of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 175:184-191.
- Siu WHL, Jia C, Luca-Abboty SB, Richardson BJ and LAM PKS (2004) Micronucleus induction in gill cells of green-lipped mussels (*Perna viridis*) exposed to mixtures of polycyclic aromatic hydrocarbons and chlorinated pesticides. *Environ Toxicol Chem* 232:1317-1325.

- Tajima F (1983) Evolutionary relationship of DNA sequences in finite populations. *Genetics* 105:437-460.
- Thompson JD, Higgins DG and Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22:4673- 4680.
- Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Myiamae Y, Rojas F, Ryu JC and Sasaki YF (2000) The single cell/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen* 35:206-221.
- Van Straalen NM and Timmermans JTN (2002) Genetic variation in toxicant-stressed populations: an evaluation of the genetic erosion hypothesis. *Hum Ecol Risk Assessment*, 8(5):983-1002.
- Waters MD, Stack HF and Jackson MA (1999) Genetic toxicology data in the evaluation of potential human environmental carcinogens. *Mut Res* 437:21-49.
- Werner I, Deanovic LA, Hinton DE, Henderson JD, de Oliveira GH, Wilson BW, Krueger W, Wallender WW, Oliver MN and Zalom FG (2002) Toxicity of Stormwater Runoff After Dormant Spray Application of Diazinon and Esfenvalerate (Asana®) in a French Prune Orchard, Glenn County, California, USA. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 68:29–36.
- White PA and Rasmussen JB (1998) The genotoxic hazards of domestic wastes in surface waters. *Mut Res*, 410(3):223-36
- Whitehead A, Anderson SL, Kuivila KM, Roach JL and May B (2003) Genetic variation among interconnected populations of *Catostomus accidentalis*: implications for distinguishing impacts of contaminants from biogeographical structuring. *Mol Ecol* 12:2817-2833.
- Whitehead A, Kuivila MK, Orlando JL, Kotelevtsev S and Anderson SL (2004) Genotoxicity in native fish associated with agricultural runoff events. *Environ Toxicol Chem* 23(12):2868-2877.

9. Anexos

Ecological Indicators – Journal – Elsevier

<https://www.elsevier.com/journals/ecological-indicators/1470-160X/guide-for-authors>

GUIDE FOR AUTHORS

Your Paper Your Way We now differentiate between the requirements for new and revised submissions. You may choose to submit your manuscript as a single Word or PDF file to be used in the refereeing process. Only when your paper is at the revision stage, will you be requested to put your paper in to a 'correct format' for acceptance and provide the items required for the publication of your article. To find out more, please visit the Preparation section below.

NEW SUBMISSIONS

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts your files to a single PDF file, which is used in the peer-review process. As part of the Your Paper Your Way service, you may choose to submit your manuscript as a single file to be used in the refereeing process. This can be a PDF file or a Word document, in any format or layout that can be used by referees to evaluate your manuscript. It should contain high enough quality figures for refereeing. If you prefer to do so, you may still provide all or some of the source files at the initial submission. Please note that individual figure files larger than 10 MB must be uploaded separately.

References

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct.

Formatting requirements

There are no strict formatting requirements but all manuscripts must contain the essential elements needed to convey your manuscript, for example Abstract, Keywords, Introduction, Materials and Methods, Results, Conclusions, Artwork and Tables with Captions. If your article includes any Videos and/or other Supplementary material, this should be included in your initial submission for peer review purposes. Divide the article into clearly defined sections. Figures and tables embedded in text Please ensure the figures and the tables included in the single file are placed next to the relevant text in the manuscript, rather than at the bottom or the top of the file.

Article structure

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the

text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Theory/calculation

A Theory section should extend, not repeat, the background to the article already dealt with in the Introduction and lay the foundation for further work. In contrast, a Calculation section represents a practical development from a theoretical basis.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

Essential title page information

- Title. Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- Author names and affiliations. Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lowercase superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- Corresponding author. Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.
- Present/permanent address. If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author

actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should be not longer than 400 words. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, nonstandard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Keywords Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Reference formatting

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct. If you do wish to format the references yourself they should be arranged according to the following examples:

Reference style

Text: All citations in the text should refer to:

1. Single author: the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
2. Two authors: both authors' names and the year of publication;
3. Three or more authors: first author's name followed by 'et al.' and the year of publication. Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically.

Examples: 'as demonstrated (Allan, 2000a, 2000b, 1999; Allan and Jones, 1999). Kramer et al. (2010) have recently shown'

List: References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

Examples: Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2010. The art of writing a scientific article. *J. Sci. Commun.* 163, 51–59.

Reference to a book: Strunk Jr., W., White, E.B., 2000. *The Elements of Style*, fourth ed. Longman, New York. Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G.R., Adams, L.B., 2009. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp. 281–304.

10. Curriculum vitae (Lattes)

Caio Bruno Ribeiro Falcão
Curriculum Vitae

Dezembro/2015

Caio Bruno Ribeiro Falcão

Curriculum Vitae

Dados pessoais

Nome Caio Bruno Ribeiro Falcão
Filiação Almir Borges Falcão e Ruthmir Ribeiro Falcão
Nascimento 15/01/1988 - Recife/PE - Brasil
Carteira de Identidade 6261581 SDS - PE - 25/01/2007
CPF 071.755.064-81

Formação acadêmica/titulação

- 2012** Doutorado em Genética.
 Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil
 Título: Genética e conservação do caranguejo azul *Cardisoma guanhumi* (Brachyura: Gecarcinidae) e dos seus habitats em Pernambuco.
 Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Augusto Torres
 Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco
- 2010 - 2012** Mestrado em Saúde Humana e Meio Ambiente.
 Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil
 Título: Os Cervídeos Brasileiros e a Doença da Debilidade Crônica: Verificação de Polimorfismos Genéticos Associados à Susceptibilidade., Ano de obtenção: 2012
 Orientador: Prof. Dr. José Eduardo Garcia
 Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco
- 2009** Especialização em Gestão Ambiental.
 Faculdade de Ciências Humanas Esuda, ESUDA, Recife, Brasil
 Título: --
- 2005 - 2009** Graduação em Bacharelado em Ciências Biológicas.
 Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil
 Título: Efeitos Da Acidificação Da Água Do Mar Sobre A Taxa De Sobrevivência Das Larvas Do Caranguejo Arborícola *Aratus pisonii* (Milne Edwards, 1837) (Brachyura: Grapsidae) Nas Primeiras 72h De Vida
 Orientador: Prof. Dr. Ralf Schwamborn

Formação complementar

- 2008 - 2008** Curso de curta duração em Ecopedagogia. (Carga horária: 20h).
 Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil

Atuação profissional

1. Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Vínculo institucional

2013 - 2013 Vínculo: Monitor , Enquadramento funcional: Monitor, Regime:

2012 - Atual	Parcial Vínculo: Estudante , Enquadramento funcional: Doutorando , Carga horária: 40, Regime: Dedicação exclusiva
2010 - 2012	Vínculo: Estudante , Enquadramento funcional: Mestrando, Regime: Dedicação exclusiva

Áreas de atuação

1. Genética Animal
2. Ecologia
3. Genética Molecular
4. Mutagenese

Idiomas

Inglês Compreende Bem , Fala Bem , Escreve Bem , Lê Bem

Prêmios e títulos

- | | |
|-------------|---|
| 2014 | Menção Honrosa - Apresentação oral nível doutorado, XX Encontro de Genética do Nordeste |
| 2011 | Menção Honrosa - Prêmio Pós-Graduação-Oral, 57º Congresso Brasileiro de Genética |
| 2002 | Prêmio Personalidade Destaque 2002 - Categoria Meio Ambiente, Jornal Grande Recife |
| 2001 | Prêmio Vasconcelos Sobrinho - Menção Honrosa, CPRH |
| 2001 | XII Prêmio Volvo de Segurança no Trânsito, Volvo do Brasil Veículos Ltda. |

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

1. **FALCÃO, C.B.R.**, GARCIA, J.E.
Chronic Wasting Disease: The Prion Disease of Cervids. ARS Veterinária (Online). , v.28, p.13 - 21, 2012.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. LIRA, S.M.A., **FALCÃO, C.B.R.**, TEIXEIRA, I. A., SCHWAMBORN, R., TORRES, R.A.
Diversidade e estruturação genética de populações do caranguejo insular *Jonhgarthia lagostoma* em ilhas do Atlântico Sul In: VIII Congresso Brasileiro sobre Crustáceos, 2014, Bonito.
VIII Congresso Brasileiro sobre Crustáceos. , 2014.
2. **FALCÃO, C.B.R.**, PINHEIRO, M. A. A., TORRES, R.A., ADAM, M.L.
Genotoxicidade espaço-temporal em guaiamum (*cardisoma guanhumi*) como ferramenta de monitoramento de manguezais tropicais do nordeste do Brasil In: XX ENGENE - Encontro de Genética do Nordeste, 2014, Campina Grande.
XX ENGENE - Encontro de Genética do Nordeste. , 2014.

3. **FALCÃO, C.B.R.**, CUNHA, J.E.G., DUARTE, J.M.B., OLIVEIRA, J.R.M., TORRES, R.A., GARCIA, J.E.

Genetic similarities as possible trends on evolution and susceptibility to prion diseases in the Neotropical deer (Cervidae) In: I International Symposium on Evolutionary Biology, 2012, João Pessoa.

I International Symposium on Evolutionary Biology. , 2012.

Apresentação de trabalho e palestra

1. **FALCÃO, C.B.R.**, PINHEIRO, M. A. A., TORRES, R.A., ADAM, M.L.

Análise espaço-temporal da estrutura genético-populacional e danificação genômica de populações de guaiamum (Cardisoma guanhumí) como ferramenta de monitoramento de manguezais tropicais do Nordeste do Brasil., 2015. (Simpósio,Apresentação de Trabalho)

2. **FALCÃO, C.B.R.**, PINHEIRO, M. A. A., ADAM, M.L., TORRES, R.A.

Variação, conectividade e estruturação genética das populações do guaiamum (Cardisoma guanhumí) em manguezais tropicais do estado de Pernambuco., 2015. (Simpósio,Apresentação de Trabalho)

3. **FALCÃO, C.B.R.**, PINHEIRO, M. A. A., TORRES, R.A., ADAM, M.L.

Genotoxicidade espaço-temporal em guaiamum (cardisoma guanhumí) como ferramenta de monitoramento de manguezais tropicais do nordeste do Brasil, 2014. (Outra,Apresentação de Trabalho)

4. **FALCÃO, C.B.R.**, CUNHA, J.E.G., DUARTE, J.M.B., OLIVEIRA, J.R.M., TORRES, R.A., GARCIA, J.E.

Genetic similarities as possible trends on evolution and susceptibility to prion diseases in the Neotropical deer (Cervidae), 2012. (Simpósio,Apresentação de Trabalho)

5. **FALCÃO, C.B.R.**

Genotoxicidade e Genética de Estrutura de populações no Guaiamum (Cardisoma guanhumí) como ferramentas de monitoramento e manejo de ambientes estuarinos no estuarinos no estado de Pernambuco., 2012. (Outra,Apresentação de Trabalho)

Demais produções bibliográficas

1. **FALCÃO, C.B.R.**, PINHEIRO, M. A. A., TORRES, R.A., ADAM, M.L.

Análise espaço-temporal da estrutura genético-populacional e danificação genômica de populações de guaiamum (Cardisoma guanhumí) como ferramenta de monitoramento de manguezais tropicais do Nordeste do Brasil. Resumos em Congresso. , 2015. (Outra produção bibliográfica)

2. **FALCÃO, C.B.R.**, PINHEIRO, M. A. A., ADAM, M.L., TORRES, R.A.

Variação, conectividade e estruturação genética das populações do guaiamum (Cardisoma guanhumí) em manguezais tropicais do estado de Pernambuco. Resumos em Congresso. , 2015. (Outra produção bibliográfica)

Produção técnica

Entrevistas, mesas redondas, programas e comentários na mídia

1. LIMA, A. R. B., **FALCÃO, C.B.R.**, ADAM, M.L.

Degradação ameaça até o cardápio, 2015

2. ADAM, M.L., **FALCÃO, C.B.R.**

Poluição altera o DNA de guaiamum, 2013

Eventos

Participação em eventos

1. Apresentação de Poster / Paineis no(a) **1º Simpósio brasileiro da fauna sobre-explotada e ameaçada de extinção.**, 2015. (Simpósio)
Análise espaço-temporal da estrutura genético-populacional e danificação genômica de populações de guaiamum (*Cardisoma guanhumi*) como ferramenta de monitoramento de manguezais tropicais do Nordeste do Brasil..
2. Apresentação de Poster / Paineis no(a) **1º Simpósio brasileiro da fauna sobre-explotada e ameaçada de extinção.**, 2015. (Simpósio)
Variação, conectividade e estruturação genética das populações do guaiamum (*Cardisoma guanhumi*) em manguezais tropicais do estado de Pernambuco..
3. Apresentação Oral no(a) **XX Encontro de Genética do Nordeste**, 2014. (Encontro)
Genotoxicidade espaço-temporal em guaiamum (*cardisoma guanhumi*) como ferramenta de monitoramento de manguezais tropicais do nordeste do Brasil.
4. Apresentação de Poster / Paineis no(a) **XX Encontro de Genética do Nordeste**, 2014. (Encontro)
Genotoxicidade espaço-temporal em guaiamum (*cardisoma guanhumi*) como ferramenta de monitoramento de manguezais tropicais do nordeste do Brasil.
5. Apresentação de Poster / Paineis no(a) **I International Symposium On Evolutionary Biology**, 2012. (Simpósio)
Genetic similarities as possible trends on evolution and susceptibility to prion diseases in the Neotropical deer (*Cervidae*).
6. Apresentação de Poster / Paineis no(a) **II Jornada de Pós-graduação em Genética**, 2012. (Outra)
Genotoxicidade e genética de estrutura de populações no Guaiamum (*Cardisoma guanhumi*) como ferramentas de monitoramento e manejo de ambientes estuarinos no estado de Pernambuco..

Bancas

Participação em banca de trabalhos de conclusão

Graduação

1. TORRES, R.A., JACOBINA, U. P., **FALCÃO, C.B.R.**
Participação em banca de Flávia Roberta Santos Andrade. **Análise da Conectividade Genética da Tainha Branca (*Mugil curema Valenciennes, 1836*) no Nordeste Oriental do Brasil**, 2014 (Ciências Biológicas) Universidade Federal de Pernambuco

Outras Informações

Aprovado no Concurso Público Docente UPE 2015.2 (Campus Petrolina) Portaria Conjunta SAD/UPE nº54, de 15 de Junho de 2015 para o cargo de Professor Universitário, categoria Adjunto.