



## Espécies sentinelas: Monitoramento Ambiental com base em biomarcadores de efeito cito- e genotóxico

MÔNICA L. ADAM<sup>1,2,5,6</sup>, RODRIGO A. TORRES<sup>1,2,5,6</sup>, HARRY BOOS<sup>3</sup> & MARCELO A. A. PINHEIRO<sup>4,6</sup>

<sup>1</sup> Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Londrina, Laboratório de Genômica Ambiental – LAGEA, Avenida João Miguel Caram, 3131, CEP - 86036-370, Londrina, PR, Brasil, mogabrod@gmail.com, rodrigoaugustorres2@gmail.com;

<sup>2</sup> Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, Campus Recife, PE, Brasil;

<sup>3</sup> Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade, Centro Nacional de Pesquisa e Conservação da Biodiversidade Marinha do Sudeste e Sul – ICMBio/CEPSUL, Avenida Carlos Ely Castro, 195, CEP - 88301-445, Centro, Itajaí, SC, Brasil, harry.boos-junior@icmbio.gov.br;

<sup>4</sup> Universidade Estadual Paulista – UNESP, Instituto de Biociências, Campus do Litoral Paulista – IB/CLP, Departamento de Ciências Biológicas e Ambientais – DCBA, Laboratório de Biologia da Conservação de Crustáceos e Ambientes Costeiros – LBC, Praça Infante Dom Henrique, s/n, Parque Bitaru, CEP - 11330-900, São Vicente, SP, Brasil, marcelo.pinheiro@unesp.br;

<sup>5</sup> A&Tcg Saúde Ambiental, Londrina, PR, Brasil, ATcgsaudeambiental@gmail.com;

<sup>6</sup> Grupo de Pesquisa em Biologia de Crustáceos – CRUSTA.

Submetido em: 08/10/2022; Aceito em: 09/03/2023; Publicado em: 12/04/2023

DOI 10.37002/revistacepsul.vol12.2333e2023002

**Resumo.** O crescimento demográfico humano tem promovido extrema elevação dos impactos antrópicos, acarretando declínio da biodiversidade mundial em vários ecossistemas, tornando imprescindível a aplicação de monitoramentos eficazes e ações efetivas de conservação. Atualmente, existe uma tendência de que os monitoramentos sejam de menor custo operacional e financeiro, bem como que possam ser desenvolvidos por longa duração. Os biomarcadores de efeito (p. ex., ensaios cometa, micronúcleo e vermelho neutro), têm sido empregados com sucesso em espécies emblemáticas, que têm se mostrado um ótimo reflexo da qualidade de um ambiente. Tais espécies, nomeadas “sentinelas ambientais”, evidenciam impactos antrópicos danosos ainda nos momentos iniciais, antecipando ações de gestão que evitem danos persistentes (às vezes irreversíveis) nas espécies, populações e comunidades locais, que somente seriam constatados futuramente. Espécies sentinelas precisam ser resistentes o suficiente, residentes do ambiente em avaliação, possuir reduzida vagilidade e mostrar interação com o maior número de componentes ambientais, sejam eles abióticos ou bióticos. Os trabalhos desenvolvidos com espécies de invertebrados (p. ex., bivalves e crustáceos) e vertebrados (p. ex., peixes e mamíferos) têm mostrado a excelência e eficácia dos biomarcadores, com avaliações no nível celular e molecular. O presente estudo visa apresen-

tar os procedimentos que devem ser adotados durante a avaliação da qualidade ambiental pelo uso de biomarcadores de efeito (genotoxicidade e citotoxicidade), desde a escolha das espécies sentinelas, os cuidados na condução dos protocolos e a eficácia dos métodos em casos reais.

**Palavras-chave:** biomarcador, conservação, monitoramento, qualidade ambiental, crustáceo, peixe.

**Abstract. Environmental species: Environmental monitoring based on geno- and cytotoxicity effect biomarkers.**

Human demographic growth has promoted extreme elevation of anthropic impacts and promoting a decline in biodiversity in several ecosystems on Earth. This makes it essential to apply effective monitoring and more effective conservation actions. In recent times, monitoring tends to have a lower operational and financial cost, so that it can be developed for a long time. Effect biomarkers (e.g., comet, micronucleus, and neutral red assays) have been successfully used in flagship species, which have been shown to be an excellent reflection of the quality of an environment. These species, named 'environmental sentinels', show harmful anthropic impacts even in the initial moments, anticipating management actions that avoid persistent (and sometimes irreversible) damage to species, populations and local communities, which would only be verified in the future. Sentinel species need to be resistant enough, resident in the environment under evaluation, have reduced vagility and show interaction with the greatest number of environmental components, whether abiotic or biotic. The works carried out about invertebrate species (e.g., bivalves and crustaceans) and vertebrates (e.g., fish and mammals) have shown the excellence and effectiveness of biomarkers, with evaluations at the cellular and/or molecular level. Present study aims to present the procedures that must be adopted during the assessment of environmental quality through the use of effect biomarkers (geno- and cytotoxicity), from the choice of sentinel species, care in conducting protocols and the effectiveness of these assays in real cases.

**Keywords:** biomarker, conservation, monitoring, environmental quality, crustacean, fish.

## Introdução

O aumento demográfico humano tem crescido cada vez mais impactos aos ambientes da Terra, sejam eles aquáticos ou terrestres (Khan *et al.*, 2021, Mishra *et al.*, 2021). Tal situação tem se agravado a cada ano, colocando a biodiversidade global em expressiva crise global, requerendo a necessidade premente por mudanças nas medidas de conservação. Infelizmente, se percebe que os monitoramentos ambientais, além de complexos e custosos, não têm permitido a esperada mudança de paradigmas e avanços efetivos nas respostas até o momento. Infelizmente isso é confirmado em vários programas de monitoramento ambiental, que além de deficientes quanto à eficácia têm contribuído para minorar o potencial conserva-

cionista, baseado em áreas de proteção ambiental, comprometendo, sua capacidade de conservar a biodiversidade e os ecossistemas (Lundquist & Granek, 2005, Nichols & Williams, 2006, Badalotti *et al.*, 2022). Neste contexto, o desenvolvimento de programas de monitoramento ambiental mais eficazes é essencial à gestão dessas áreas protegidas (Maxwell *et al.*, 2020), que têm sido o último reduto de proteção da biodiversidade dos ecossistemas (Vimal *et al.*, 2021, Zeng *et al.*, 2022), podendo ser conciliado a propostas de uso sustentável (Gatiso *et al.*, 2022). Desta forma, são esperadas soluções integradas e uma padronização dos sistemas de monitoramento, pois tal conexão pode trazer informações relevantes à conservação ambiental. Assim, o conhecimento do

status da biodiversidade e dos serviços ambientais podem favorecer a correta tomada de ações conservacionistas, minimizando os impactos estocásticos ou não, bem como de origem natural ou antropogênica (Magnusson, 2014, Leite *et al.*, 2020).

No Brasil, os programas de monitoramento têm sido idealizados com base em sua simplicidade e baixo custo operacional, favorecendo, assim, sua aplicação. Isso é importante, tendo em vista a grande extensão e número de unidades de conservação. Existem no Brasil 2.659 unidades de conservação municipais, estaduais e federais, com uma área total de mais de 256 milhões de hectares. Em relação ao total do território brasileiro, as unidades de conservação correspondem à 18,8% da área terrestre e 26,5% da área marinha (MMA, 2022). Portanto, adotar métodos baratos, mas eficazes em programas de monitoramento ambiental é fundamental para viabilizar sua execução. Neste sentido, desde 2017 o Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) tem elaborado ações para o desenvolvimento de protocolos simples e que gerem dados úteis, visando o monitoramento de unidades de conservação em diversos ecossistemas brasileiros. Estas ações estão aglutinadas no Programa Monitora, desenvolvido segundo três Subprogramas Temáticos: Terrestre, Marinho/Costeiro e Aquático Continental. A aplicação destes protocolos, centrados em espécies alvo de monitoramento, tem garantido o levantamento de informações necessárias à implementação de ações de conservação dos ecossistemas. A escolha das espécies alvo, bem como das estações, unidades e réplicas amostrais, deve ser adequada às peculiaridades locais, de acordo com a sazonalidade climática e demais situações a serem consideradas e/ou previstas, possibilitando, dessa forma, a melhor compreensão de padrões ecossistêmicos e o diagnóstico ecológico de alta qualidade (Leite *et al.*, 2020).

Os sistemas bióticos e/ou abióticos, em combinação com análises físicas, químicas e genômicas, podem ser avaliados em programas de monitoramento ambiental (Kienzl *et al.*, 2003, Cordier *et al.*, 2020, Cunningham *et al.*,

2022). Métodos baseados em efeitos são capazes de detectar, precocemente, a ação prejudicial de estressores ambientais em diversos organismos (Lionetto *et al.*, 2021). Assim, alterações moleculares, celulares, fisiológicas e genômicas podem ser detectadas e quantificadas em organismos submetidos a diferentes estressores ambientais, por meio de marcadores (biomarcadores) de exposição, que estão relacionados às diferentes respostas toxicológicas mensuráveis. Portanto, estas espécies animais são testemunho verdadeiro da qualidade ambiental, sendo também denominadas espécies sentinelas, que têm sido utilizadas como bioindicadoras da qualidade ambiental e uma importante ferramenta para uso em programas de monitoramento e avaliação ambiental (Areces *et al.*, 2015, Leite *et al.*, 2020). Os efeitos prejudiciais causados pelos estressores ambientais em tais espécies é detectado por estes biomarcadores, que podem determinar a extensão dos danos, extremamente relevante para a classificação dos impactos ambientais em uma área ambientalmente perturbada. Portanto, o monitoramento ambiental, com base em séries temporais e empregando biomarcadores de espécies sentinelas possibilita orientar os esforços de conservação ecossistêmica, contribuindo para a tomada de decisões quanto às condições de habitat, proteção das espécies, prestação de serviços ecossistêmicos e adoção de procedimentos de remediação (Hazen *et al.*, 2019, Lionetto *et al.*, 2021).

Este artigo objetiva disponibilizar os conhecimentos básicos da utilização de espécies sentinelas e biomarcadores de genotoxicidade e citotoxicidade, com a proposição de um protocolo de monitoramento ambiental suficientemente sensível, eficaz e de reduzido custo para as Unidades de Conservação, Áreas Prioritárias para a Conservação ou alvo em Processos de Licenciamento Ambiental.

Os métodos e estudos de caso apresentados a seguir têm como fonte primária a bibliografia especializada e as pesquisas desenvolvidas pelos autores, das quais os resultados já foram publicados anteriormente e estão citados no presente artigo.

## Espécies sentinelas

A dinâmica da qualidade ambiental do nosso planeta poderia ser melhor compreendida se monitorada por um sistema integrando sensores eletrônicos, numa tecnologia que já vem sendo utilizada (Ho *et al.*, 2005, Oliveira & Rodrigues, 2011, Ullo & Sinha, 2020). Embora esta tecnologia já seja empregada para o monitoramento da qualidade da água, seu custo ainda é elevado, em especial se for comparado aos marcadores disponibilizados por várias espécies e aplicados com sucesso, a custo muito mais baixo. Isso é possível pela sensível associação das condições ambientais e seus desvios (p. ex., efeito de poluentes etc.), nas respostas espécie-específicas de um organismo, pautadas na evolução e, portanto, amplamente testadas e inquestionavelmente válidas à avaliação da qualidade ambiental. Assim, monitoramentos ambientais que empreguem essas associações abiótico-bióticas, faz contraponto aos sofisticados sistemas de sensores eletrônicos remotos e aos sistemas de monitoramento mais tradicionais, sendo capazes de monitorar uma ampla variedade de condições físicas e propriedades ambientais (Constable *et al.*, 2016, Miloslavich *et al.*, 2018, Harcourt *et al.*, 2019). A avaliação de biomarcadores em espécies sentinelas, a partir de respostas individuais, podem caracterizar a qualidade e a saúde dos ecossistemas em tempo real, desempenhando papel fundamental à elucidação das respostas dos ecossistemas aos estressores ambientais (Jetz *et al.*, 2022).

**Espécies sentinelas** são definidas como organismos que respondem de forma oportuna e mensurável às variações (observáveis e/ou não observáveis) dos ecossistemas (Hazen *et al.*, 2019, Baroudi *et al.*, 2020). Pelo exposto, uma espécie pode ser uma boa sentinela ambiental se possuir requisitos específicos, possibilitando a avaliação dos processos ecológicos em várias escalas espaço-temporais, por apresentarem conspicuidade, sensibilidade aos processos ecossistêmicos, fácil acessibilidade/observação, prontidão nas respostas, ligação mecânica ao ecossistema e aplicação de vários indicadores em um mesmo indivíduo/população (Zacharias & Roff, 2001, Sergio *et al.*, 2008, Sydeman *et al.*, 2015, Fle-

ming *et al.*, 2016, Estes *et al.*, 2016, Hazen *et al.*, 2019). A eficácia de uma espécie sentinela também é determinada pela sua sensibilidade aos processos de interesse, com respostas a mudanças ambientais específicas de forma oportuna e detectável. Além disso, também deve ser considerada a capacidade e velocidade de resposta da sentinela às mudanças ambientais, em relação às outras que vivem no mesmo ambiente (Hazen *et al.*, 2019).

Dependendo da abordagem do monitoramento, as espécies sentinelas recebem denominações específicas. Uma **sentinela elucidativa** é capaz de indicar mudanças passadas ou em andamento nos componentes do ecossistema, fornecendo uma ligação observável entre aspectos de ordem físico-química e as respostas biológicas, possibilitando, assim, o monitoramento de processos muitas vezes pouco evidentes numa abordagem direta. Uma **sentinela líder**, por sua vez, pode prever possíveis mudanças futuras no meio ambiente, sendo esta capacidade decorrente de seu limiar mais baixo de resposta ao ambiente, em comparação a outras espécies, bem como à sua sensibilidade precoce às mudanças (Hazen *et al.*, 2019). Portanto, o uso de diferentes espécies sentinelas, em um programa de monitoramento, pode melhorar a capacidade de diagnose e previsão de alterações ambientais, além de identificar impactos decorrentes de múltiplos estressores ambientais, contribuindo às ações conservacionistas (Baroudi *et al.*, 2020).

As Unidades de Conservação (UCs), como outras áreas protegidas (p. ex. Estações Ecológicas, Parques Nacionais etc.), são caracterizadas por sua expressiva biodiversidade e, portanto, possuem inúmeras espécies potenciais como sentinelas ambientais. A adoção de programas de monitoramento dessas áreas, com o uso de espécies sentinelas, poderá refletir seu real estado de conservação, revestindo-se, portanto, como poderosa ferramenta destinada à avaliação e quali-quantificação de seu estado de conservação.

## Biomarcadores

Os estressores ambientais interagem

diretamente com as macromoléculas biológicas, desencadeando uma cascata de eventos celulares/moleculares, produzindo efeitos toxicológicos agudos ou crônicos. Entre os efeitos destes estressores ambientais temos desde inibições enzimáticas, alterações nas propriedades de transporte e funcionamento de receptores de membrana/intracelulares, alterações das vias de sinalização intracelular, marcadores de estresse oxidativo e danos ao DNA (Lionetto *et al.*, 2021). Os efeitos primários dos estressores ambientais, tanto no nível celular quanto no molecular, não são isolados, mas resultam em efeitos de toxicidade integrados. Desta forma, a persistência e as consequências da exposição aos estressores ambientais podem comprometer o funcionamento de órgãos e sistemas. O comprometimento das funções orgânicas, de espécies expostas, pode resultar em efeitos adversos, tanto no nível de morbidade, quanto de mortalidade, fertilidade e reprodução, podendo comprometer a sobrevivência das espécies (Lionetto *et al.*, 2021). As alterações que ocorrem em nível celular, bioquímico, molecular ou fisiológico, podem ser quantificadas em células, fluidos corporais, tecidos ou órgãos de um organismo, indicando a exposição e/ou efeito a esses estressores ambientais, sendo denominados **Biomarcadores** (Lam, 2009).

Importante destacar que as respostas moleculares, bioquímicas e fisiológicas aos estressores ambientais, precedem aquelas que ocorrem em níveis mais altos de organização biológica (p. ex., populações, comunidades e/ou ecossistemas). Pelo exposto, os efeitos nocivos podem ser detectados precocemente em níveis basais (na escala de minutos a semanas), antes que sejam identificados em níveis de maior complexidade (escala de meses a anos). Portanto, a análise de biomarcadores, que trabalha com os níveis basais, fornece um sinal de alerta precoce dos efeitos biológicos significativos de grande importância ao biomonitoramento (Lam, 2009, Lionetto *et al.*, 2021).

Categorias diferentes de biomarcadores podem ser empregadas no biomonitoramento, a saber: 1) Biomarcadores de Exposição; 2) Biomarcadores de Suscetibilidade; e 3) Biomarcadores de Efeitos. As alterações celulares rever-

síveis caracterizam os **Biomarcadores de Exposição**, possibilitando detectar, precocemente, a exposição dos organismos aos estressores ambientais. Tais alterações se referem às respostas ativadas pelos organismos para a sua detoxificação. Assim, entre os biomarcadores de exposição podem ser citadas a concentração celular de proteínas, como as metalotioneínas, relacionadas à detoxificação de metais tóxicos (Moncaleano-Niño *et al.*, 2022, Buenfil-Rojas *et al.*, 2022) e a glutatona (GSH), que é um importante antioxidante envolvido no combate aos radicais livres, durante a degradação de poluentes (Gad, 2014, Castilhos-Ghisi *et al.*, 2022, Nagarani *et al.*, 2023). A bioacumulação de contaminantes em um organismo também pode ser considerada um biomarcador de exposição, mesmo considerando a degradação enzimática pelos xenobióticos (Rathore *et al.*, 2022, Leung *et al.*, 2022). Os **Biomarcadores de Suscetibilidade**, por outro lado, se referem à constituição genômica das espécies relativa à maior ou menor sensibilidade aos efeitos de estressores ambientais. O polimorfismo genético nos mecanismos de reparo do DNA ou no metabolismo de poluentes podem gerar diferentes respostas em diferentes indivíduos, podendo classificá-los quanto à suscetibilidade aos estressores ambientais (Schlenk, 1999, Lionetto *et al.*, 2021). Por outro lado, uma especial atenção deve ser dada aos **Biomarcadores de Efeitos**, por sua capacidade de resposta precoce, restritos aos níveis mais baixos de complexidade biológica (p. ex., moléculas, células e tecidos), antecedendo as alterações nos níveis de maior complexidade (p. ex., populacional e comunidades), apresentando notável aplicabilidade em procedimentos de avaliação da qualidade ambiental (De La Torre *et al.*, 2007). Vários biomarcadores de efeitos tem sido aplicados na avaliação da qualidade ambiental, tais como: *biomarcadores de estresse oxidativo* (indução da peroxidação da membrana lipídica – vide Parra *et al.*, 2021, Orozco-Hernández *et al.*, 2022); *biomarcadores enzimáticos* (inibição da acetilcolinesterase - conforme De Souza *et al.*, 2018, Dos Santos *et al.*, 2022); *biomarcadores citotóxicos* (alterações no sistema lisossomal e desestabilização da membrana lisossomal – segundo Da Silva *et*

*al.*, 2022, Gürkan, 2022, Souza *et al.*, 2022); e *biomarcadores genotóxicos* (danos na moléculas de DNA – vide Falcão *et al.*, 2020, De Lima e Silva *et al.*, 2022).

Esta proposta de protocolo para o monitoramento ambiental encontra-se descrita a seguir: **1) Ensaio de Citotoxicidade**, representado pelo Ensaio Vermelho Neutro, que trata do tempo de retenção do Vermelho Neutro; e **2) Ensaios de Genotoxicidade**, representado pelo Ensaio Cometa (microlesões no DNA), Ensaio Micronúcleo (macrolesões no DNA) e de Alterações Morfológicas Nucleares.

## Ensaio de Citotoxicidade

### *Ensaio Vermelho Neutro*

Os lisossomos são organelas celulares encontradas nas células eucariontes, que atuam na digestão celular, estando intimamente associados em resposta à efeitos tóxicos de contaminantes, já que participam ativamente no processo de sequestro e detoxificação de metais e contaminantes orgânicos pelas células (Svendsen *et al.*, 2004). Em alguns casos de toxidez extrema, que superam os limites de sua função fisiológica, os lisossomos podem se romper no interior das células (autólise), liberando suas enzimas e promovendo a morte celular por apoptose. Por este motivo, a análise de alterações patológicas nesta organela pode indicar impactos ambientais, como ocorre por alterações na estabilidade da membrana lisossomal, que pode ser comprometida em resposta à contaminantes ou de qualquer estresse inespecífico (p. ex., abiótico ou biótico) (Moore, 1985, Koagouw & Ciocan, 2018). A desestabilização da membrana lisossômica pode até mesmo afetar a competência imunológica celular, bem como sua capacidade fagocitária (Aguirre-Martínez *et al.*, 2013). Os mecanismos que resultam em perda da estabilidade da membrana lisossomal ainda não são totalmente conhecidos, mas pode ocorrer por reação patológica subcelular por aumento do sequestro autofágico de componentes celulares (Sforzini *et al.*, 2018), efeitos diretos de produtos químicos à membrana e aumento da frequência de lisossomos secundários, em células estressadas por

substâncias tóxicas (Mayer *et al.*, 1992).

Pelo exposto, a observação de danos à membrana lisossomal se junta ao grupo de ferramentas que podem ser empregadas em análises da qualidade ambiental. Neste contexto, o **Ensaio Vermelho Neutro**, que leva em consideração o tempo de retenção do corante vermelho neutro pelos lisossomos (do inglês “*Neutral Red Retention Time*” – *NRRT*, segundo Weeks & Svendsen, 1996), possibilita quantificar a capacidade dos processos fisiológicos celulares se ajustarem às condições de estresse celular provocadas por estressores ambientais (Lowe & Pipe, 1994). Neste ensaio as células vivas são submetidas a uma solução do vermelho neutro (corante vital) com um agente tóxico (p. ex., DMSO – Dimetilsulfóxido), visando desestabilizar a membrana lisossomal e, nos casos de maior comprometimento celular, seu rompimento e extravasamento ao citoplasma (Lowe & Pipe, 1994), com este tempo sendo registrado. Assim, células que possuem lisossomos com membranas intactas por mais tempo (> 90 min), são provenientes de exemplares capturados em áreas de reduzida toxidez (ambientes prístinos), enquanto os exemplares de áreas de maior toxidez (ambientes contaminados) apresentam um rápido extravasamento, pelo comprometimento anterior dessas membranas celulares (geralmente < 60 min). Tal efeito pode ser visualizado em concentrações de exposição a agentes tóxicos mais sutis do que aquelas que envolvem alterações no crescimento, reprodução e sobrevivência dos organismos expostos, refletindo, portanto, no efeito subletal de um poluente (Svendsen, 2000).

Antes do experimento, toda a vidraria, inclusive as lâminas, devem estar totalmente limpas, empregando duas soluções para lavagem/descontaminação, como segue: 1) solução de HNO<sub>3</sub> a 10%; 2) solução de Extran® Ácido a 10%; e 3) enxague final com água deionizada, até a completa remoção das soluções anteriores. Em seguida, o material deve ser seco (preferencialmente em estufa), com posterior cobertura daqueles com abertura (p. ex., beakers, etc.), com papel alumínio ou filme PVC.

As lâminas de microscopia anterior-

mente lavadas e secas deverão ser preparadas (24h antes do experimento), passando sobre a face de trabalho uma solução de Poly-L-lisina com água destilada (1:10), que facilita a adesão dos hemócitos ao vidro. Com uma micropipeta coloque 10µl dessa solução próxima a uma das laterais da lâmina, em sua face de trabalho, em seguida fazendo um esfregaço com o uso de outra lâmina. Deixe a lâmina secar e, posteriormente, coloque em um laminário até o momento do uso.

Para a execução do procedimento, devem ser preparadas duas soluções básicas, a saber: **1) Solução Fisiológica**, compreendendo 1L de água destilada, com adição de 4,77g HEPES + 25,48g NaCl + 4,36g MgSO<sub>4</sub> + 0,75g KCl + 1,92g CaCl. Ao final da dissolução e, sempre antes do uso, o pH deverá ser ajustado para 7,36, com uso de HCl 0,1 M para acidificar ou NaOH 0,1 M para alcalinizar; e **2) Solução Anticoagulante**, para uso com o caranguejo *Ucides cordatus*, compreendendo 2,05g Glicose (C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>) + 0,8g Citrato de Sódio (Na<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>) + 0,42g NaCl. O ajuste do pH para 7,36 deverá ser efetuado conforme mencionado para a solução anterior, ao seu término e sempre antes do uso.

O corante vermelho neutro é fotossensível e, portanto, deve ser manipulado com a menor quantidade possível de luz, desde o momento de sua pesagem ou confecção das soluções estoque e de trabalho, conforme informado a seguir. O Ensaio Vermelho Neutro aqui apresentado foi dimensionado para analisar no máximo 10 exemplares por vez (= número de réplicas por área de estudo), para que exista pouco mais do que 1 min para análise de cada lâmina. Após as lâminas terem sido confeccionadas, serão examinadas sistematicamente em intervalos de 15 min, para determinar em que momento temporal houve evidência de extravasamento do vermelho neutro dos lisossomos para o citosol. Os testes serão encerrados no último registro temporal para a perda de corante em pelo menos 50% dos hemócitos. O tempo médio de retenção (NRRT) deve ser calculado a partir dos dados de finalização obtidos para os 10 exemplares/ponto amostral.

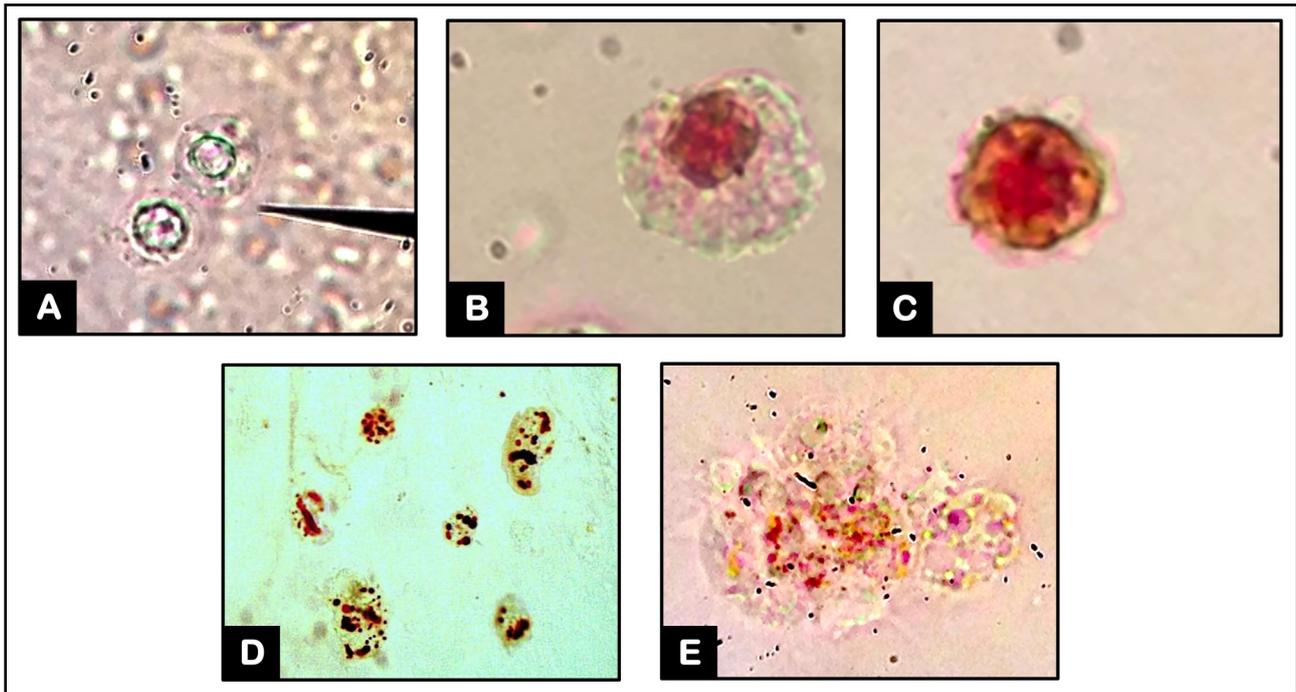
Importante destacar que o tempo basal para o Ensaio Vermelho Neutro (NRRT) possui variação interespecífica, sendo de 40 a 120 min para bivalves marinhos, como mexilhões e ostras (Hauton *et al.*, 1998, Dailianis *et al.*, 2003, Pereira *et al.*, 2007, Rank *et al.*, 2007, Martínez-Gómez *et al.*, 2008) e de 62 a 141 min para caranguejos (Wedderburn *et al.*, 1998, Astley *et al.*, 1999, Aguirre-Martínez *et al.*, 2013, Duarte *et al.*, 2016, Pinheiro *et al.*, 2017).

No caranguejo-uçá (*Ucides cordatus*), uma espécie endêmica do ecossistema manguezal, existem três tipos distintos de hemócitos na hemolinfa (Figura 1), a saber: **1) Hialinócitos** (Figura 1-A), com núcleo de fácil visualização e citoplasma sem granulação visível (hialino); **2) Semi-granulócitos** (Figura 1-B), com núcleo evidente e grânulos citoplasmáticos pequenos, não dificultando a visão do núcleo (Figura 1-B); e **3) Granulócitos** (Figura 1-C), com grânulos citoplasmáticos grandes, que por vezes pode dificultar a visão do núcleo. Os hemócitos hialinócitos são os mais indicados para a avaliação fisiológica, pois seu citoplasma hialino (sem granulação) facilita a visualização dos lisossomos (Figura 1-D) por aqueles menos experientes. A avaliação celular ocorre consecutivamente em períodos temporais similares, podendo, caso necessário, ser efetuada até o momento de **apoptose celular** (Figura 1-E), quando ocorre o extravasamento das enzimas dos lisossomos no citoplasma e degradação do hemócito.

No Quadro 1 encontram-se os procedimentos necessários à execução do Ensaio Vermelho Neutro (NRRT).

## Ensaio de Genotoxicidade

O efeito de danificar o DNA e/ou modificar componentes celulares responsáveis por regular o funcionamento do genoma é conhecido como genotoxicidade (Chellian *et al.*, 2017). A exposição a agentes genotóxicos (como os estressores ambientais) tem o potencial de mudar a estrutura do cromossomo através de quebras na molécula de DNA (clastogenicidade), da sequência de bases nitrogenadas (mutagenicidade) ou em interferir na dinâmica



**Figura 1.** Hemócitos do caranguejo-uçá (*Ucides cordatus*), com representação de seus três tipos (A, hialinócito; B, semi-granulócito; e C, granulócito), bem como de hemócitos hialinócitos com lisossomos bem evidentes (D), exercendo sua função de degradação do contaminante (DMSO, dimetilsulfóxido) diluído no vermelho neutro. Em áreas contaminadas, o processo de apoptose (E) pode ocorrer mais rapidamente, entre 15 a 45 minutos do início das avaliações. Fonte: Autores.

da migração dos cromossomos na anáfase (aneugenicidade) (Souto *et al.*, 2020). Esse desarranjo na estrutura do DNA pode comprometer a viabilidade do material genético (Srinivas *et al.*, 2019). Lesões no DNA, quando não reparadas, se acumulam no organismo, podendo resultar em problemas relativos à morbidade, mortalidade, fertilização e reprodução (Lee & Steinert, 2003). Estudos têm relacionado essas lesões no DNA a efeitos biológicos no nível celular e fisiológico, como a redução do crescimento, indução de anormalidades e redução no tempo de sobrevivência de embriões e adultos (Lee & Steinert, 2003, Imam, 2019).

Os danos causados no material genético por alterações ambientais, cujo efeito se reflete sobre os organismos que ali vivem, podem ser quantificados e, desta maneira, ser um eficiente indicativo de que o ambiente está tendo algum tipo de perturbação. Portanto, a contribuição de marcadores genéticos é significativa em estudos de diagnóstico e monitoramento ambiental, onde análises de características do núcleo celular podem quantificar efeitos de estressores ambientais (Gonzalez-Hunt *et al.*, 2018). Os

ensaios de genotoxicidade possuem uma grande sensibilidade devido a sua capacidade de detectar efeitos de concentrações muito pequenas (na ordem de nanogramas) de xenobióticos, refletindo interferências mínimas de um agente contaminante/perturbador (Sponchiado *et al.*, 2016). Além disso, esse tipo de abordagem genotóxica pode ser empregada em diversos organismos e em diferentes ambientes, sendo, portanto, uma ferramenta de alta eficiência (Bhat *et al.*, 2019). Entre os métodos de análise de danificação genômica o **Ensaio Cometa**, o **Ensaio Micronúcleo** e as **Alterações Morfológicas Nucleares** são ferramentas já consolidadas para a avaliação da qualidade ambiental (Vignardi *et al.*, 2015, Medeiros *et al.*, 2017, Stankevičiūtė *et al.*, 2019, Adam *et al.*, 2022, De Lima e Silva *et al.*, 2022).

### **Ensaio Micronúcleo**

A avaliação de células micronucleadas (Ensaio Micronúcleo) vem sendo aplicada há décadas para a detecção de macrolesões no genoma, causadas por fatores químicos, físicos ou

**Quadro 1.** Procedimentos para o Ensaio Vermelho Neutro (NRRT).

<b>Vermelho Neutro – Solução Estoque</b>	
Quantidades para 1 ml de Solução Estoque	
<b>Quantidade</b>	<b>Produto</b>
28,8 mg	Corante Vermelho Neutro (corante vital)
1 ml	Dimetilsulfóxido (DMSO)
Misturar até a completa diluição do corante (15 min), guardando em um frasco de vidro (10 ml), preferencialmente âmbar, com “batoque” e tampa, revestido externamente por papel alumínio em toda a sua extensão (inclusive o fundo). Conserve em refrigerador até o momento do uso, quando deve ser colocado em temperatura ambiente. A validade desta solução é de uma semana.	
<b>Vermelho Neutro – Solução de Trabalho</b>	
Quantidades para 5 ml de Solução de Trabalho	
10 µl	Vermelho Neutro (Solução Estoque)
5 ml	Solução Fisiológica (pH 7,36)
Coloque 5 ml de solução fisiológica (previamente ajustada para pH 7,36) em um frasco de vidro (10 ml), preferencialmente âmbar, com “batoque” e tampa, revestido externamente por papel alumínio em toda a sua extensão (inclusive o fundo). Homogeneizar a solução por 15 min, agitando levemente o frasco. A validade desta solução é de uma hora, com preparo imediatamente antes do uso).	
<b>Preparo das Seringas (1 ml)</b>	
0,2 ml	Solução Fisiológica (pH 7,36)
0,3 ml	Solução Anticoagulante (pH 7,36)
0,5 ml	Sangue, Hemolinfa ou Suspensão Celular
<b>Montagem e Leitura das Lâminas com Poly-L-Lisina</b>	
1. Para cada animal prepare uma seringa de 1 ml, munida de agulha 21 Gauge (40 x 0,8mm). Inicialmente preencha cada seringa com 0,2 ml de Solução Fisiológica + 0,3 ml de Solução Anticoagulante, coloque a tampa e reserve para uso.	
2. Use cada seringa para obter a solução biológica em análise (sangue, hemolinfa ou suspensão celular), fazendo a punção de 0,5 ml. A seringa ficará totalmente preenchida (1 ml). Retire a agulha e transfira este volume lentamente para um Eppendorf (2 ml), devidamente identificado, devendo ficar em descanso por 15 min. Faça este procedimento para cada um dos exemplares em análise.	
3. Coloque as lâminas tratadas previamente com Poly-L-Lisina dispostas em numa câmara escura úmida, com duas lâminas por exemplar (réplica de análise e reserva). Em seguida, pipete 40 µl junto ao fundo de cada Eppendorf, depositando-os no centro de cada lâmina de microscopia e deixando em descanso por 15 min.	
4. Após o tempo de descanso, pingue 40 µl do Vermelho Neutro (Solução de Trabalho) em cada lâmina, podendo misturar suavemente, mas sem ferir a camada de Poly-L-Lisina das lâminas. Preferencialmente faça este procedimento em sala em penumbra ou luz indireta, deixando em descanso por mais 15 min, quando as lâminas poderão ser cobertas por lamínula, com o excesso das bordas podendo ser absorvido com pequenos pedaços de papel filtro.	
5. Na primeira hora de análise as lâminas devem observadas sob microscopia a cada 15 min, passando a cada 30 min na segunda hora, o que pode ser continuado até a morte celular por apoptose (vide Tabela 1). Em cada momento será registrado o estado fisiológico celular: (+) quando < 50% dos hemócitos estão com o citosol claro, ausência de anormalidades / estresse (vide Tabela 2); (±) quando 50 a 75% dos hemócitos estiverem em estresse; e (-) quando > 75% dos hemócitos estiver em estresse. O tempo de retenção para cada animal se encerrará no último registro com (±). O resultado de citotoxicidade (ou NRRT) para uma espécie avaliada por 15 lâminas, em determinada área será representada pela média ± desvio padrão.	

**Tabela 1.** Critérios utilizados para a diferenciação de células saudáveis e estressadas, adaptados de King (2000).

<b>Critérios</b>	<b>Células Saudáveis</b>	<b>Células Estressadas</b>
<b>Formato da célula</b>	Irregular	Arredondado
<b>Tamanho da célula</b>	Aumentado	Diminuído
<b>Número de lisossomos</b>	Aumentado	Diminuído
<b>Tamanho dos lisossomos</b>	Menores	Aumentados
<b>Cor dos lisossomos</b>	Rosado	Vermelho
<b>Pseudópodos</b>	Não	Sim
<b>Corante extravasado no citosol</b>	Não	Sim

**Tabela 2.** Planilha de registro temporal da qualidade fisiológica dos hemócitos pelo Ensaio Vermelho Neutro (NRRT).

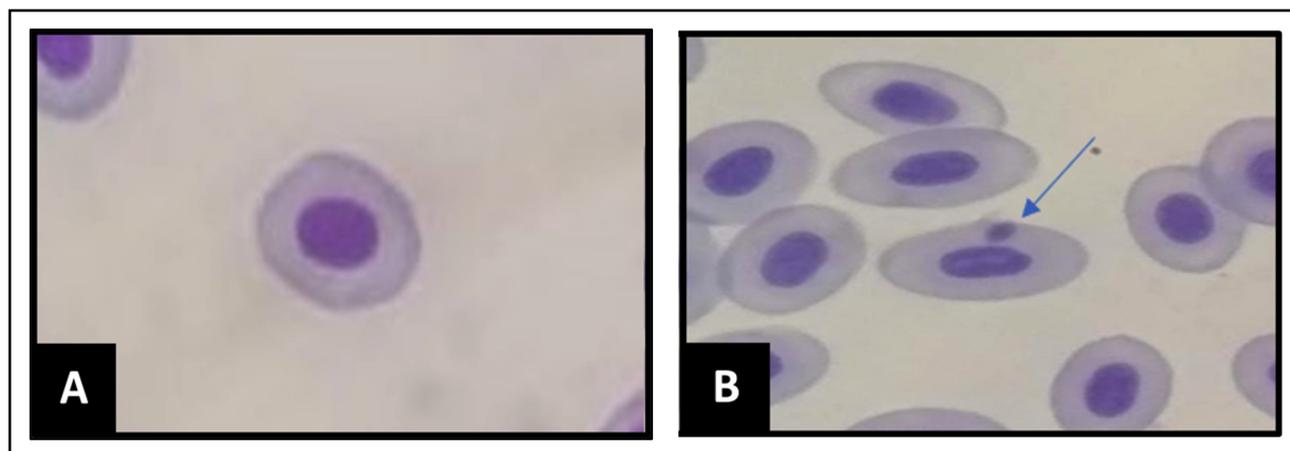
<b>Lâmina (Animal)</b>	<b>Tempo (minutos)</b>						<b>Efeito (Último +/-)</b>
	<b>15</b>	<b>30</b>	<b>45</b>	<b>60</b>	<b>90</b>	<b>120</b>	
<b>1</b>	+	+	+	±	-	-	60
<b>2</b>	+	+	+	±	±	-	90
<b>3</b>	+	±	±	±	-	-	60
<b>4</b>	+	+	±	±	±	-	90
<b>5</b>	+	+	±	±	-	-	60
<b>6</b>	+	+	±	-	-	-	45
<b>7</b>	+	+	±	±	-	-	60
<b>8</b>	+	+	±	±	-	-	60
<b>9</b>	+	+	±	-	-	-	45
<b>10</b>	±	±	-	-	-	-	30

\* Citotoxicidade por NRRT (Média Desvio Padrão) = 60,0 18,7 minutos.

biológicos, sendo um dos marcadores genéticos mais utilizados para avaliação do potencial de genotoxicidade, tanto em ensaios ou experimentações *ex situ*, como também em monitoramento *in situ* (Sommer *et al.*, 2020). O micronúcleo (Figura 2-B) consiste de uma pequena porção de cromatina de formato arredondado perceptível no citoplasma, resultante de algum dano ou instabilidade genômica (Fenech, 2000), diferindo facilmente de um eritrócito normal (Figura 2-A). A proposta para esta análise quantitativa de macrolesões no genoma se baseia na contabilização do número de células

micronucleadas, onde a quantidade de células apresentando micronúcleos em relação às células normais pode estimar o nível do impacto decorrente do agente perturbador (Fenech, 2000). Este método se destaca também, não só por sua alta sensibilidade de detecção de danos causados por estressores ambientais, mas por ser de baixo custo (Sommer *et al.*, 2020).

O método descrito no Quadro 2, demonstra a simplicidade da técnica de avaliação de células micronucleadas.



**Figura 2.** Eritrócito normal do peixe *Aspistor luniscutis* (A); e um Eritrócito micronucleado (B: seta) do mesmo animal. Fonte: Autores.

<b>Quadro 2.</b> Procedimentos do Ensaio Micronúcleo.	
<b>Solução de Coloração Micronúcleo – Solução de Trabalho</b>	
Quantidades para 42 ml	
<b>Quantidade</b>	<b>Produto</b>
2 ml	Giemsa
20 ml	Tampão $\text{KH}_2\text{PO}_4$ (Solução Estoque)
20 ml	Tampão $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ (Solução Estoque)
<b>Tampão <math>\text{KH}_2\text{PO}_4</math> 0,06M – Solução Estoque</b>	
Quantidades para 500 ml	
4,08 g	$\text{KH}_2\text{PO}_4$
500 ml	Água Destilada
<b>Tampão <math>\text{Na}_2\text{HPO}_4</math> 0,06M – Solução Estoque</b>	
Quantidades para 500 ml	
4,26 g	$\text{Na}_2\text{HPO}_4$
500 ml	Água Destilada
<b>Preparação da Lâmina com Material Biológico</b>	
Uma gota do material biológico (sangue/hemolinfa/suspensão celular) deve ser colocada sobre uma lâmina de microscopia e realizado um esfregaço. Depois que a lâmina com material celular estiver seca (temperatura ambiente), esta deverá ser imersa em metanol absoluto (5 min) para a fixação. Após este tempo, retirar a lâmina, lavá-la em água destilada e deixar secar à temperatura ambiente.	
<b>Coloração</b>	
A lâmina deverá ser colocada em uma cuba de coloração, contendo a solução corante, onde permanecerá por cerca de 10 min. Após este tempo, a lâmina deverá ser lavada em água destilada e deixada para secar à temperatura ambiente.	
<b>Análise das Lâminas</b>	
Deverão ser observadas em microscopia de imersão entre 1.000 e 3.000 células por espécime, sendo contabilizadas as células micronucleadas e as normais. Análises estatísticas apropriadas devem ser estabelecidas para a comparação dos resultados obtidos nos grupos exposto e o controle.	

### Alterações Morfológicas Nucleares

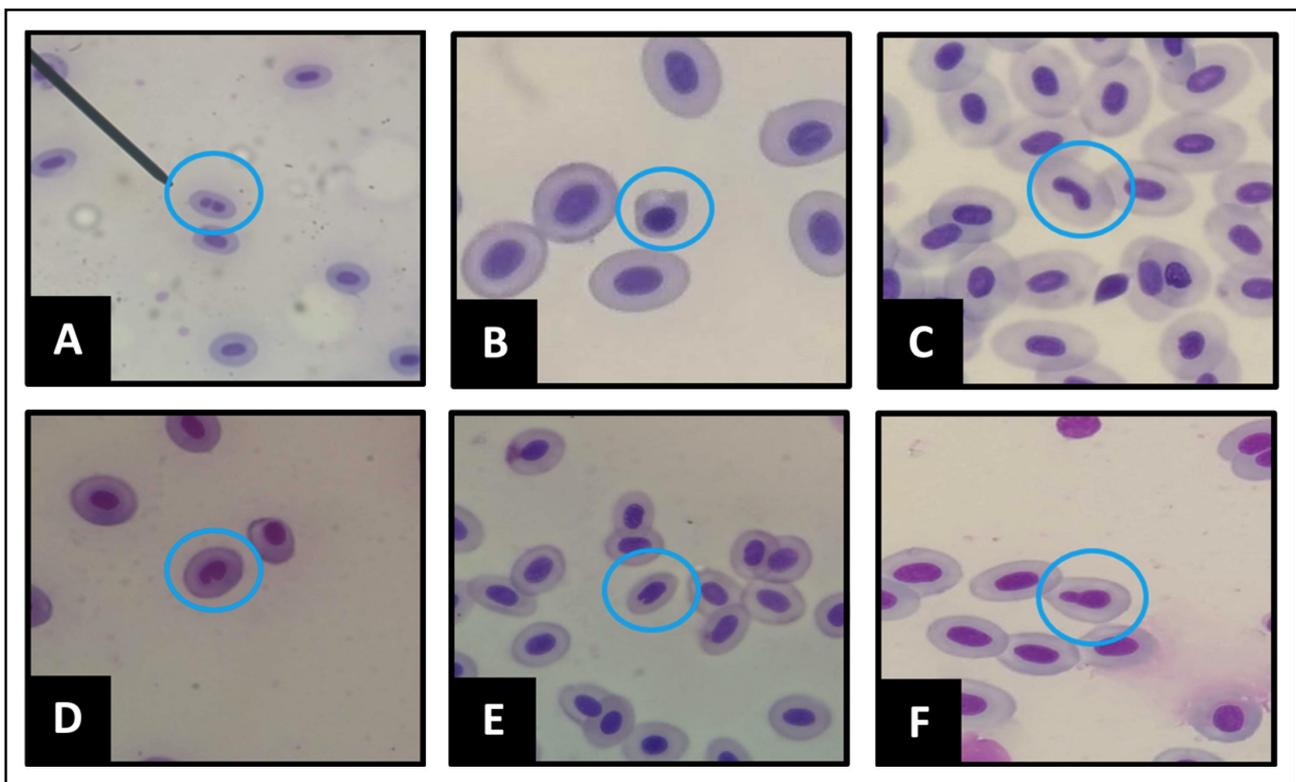
A localização dos genes não ocorre de forma aleatória dentro do núcleo e sua determinação visa priorizar a otimização da expressão gênica. Fatores de estresse podem gerar alterações na morfologia nuclear e comprometer o funcionamento do material genético (Stephens *et al.*, 2018). A identificação de alterações morfológicas nucleares (Figura 3), em resposta às alterações ambientais, constitui, também, uma classe de marcadores genéticos aplicáveis ao biomonitoramento (Silveira *et al.*, 2022).

O método empregado para a análise das alterações morfológicas nucleares segue o mesmo preparo já mencionado anteriormente para o Ensaio Micronúcleo (vide Quadro 2). Neste caso, no entanto, as diferentes classes de alterações nucleares podem ser identificadas e quantificadas nos esfregaços em lâmina, conforme apresentados por Carrasco *et al.* (1990). Apesar da diferente sensibilidade na detecção de efeitos de exposição aos agentes estressores do ambiente, as análises de alterações morfológicas nucleares podem ser complementares ao En-

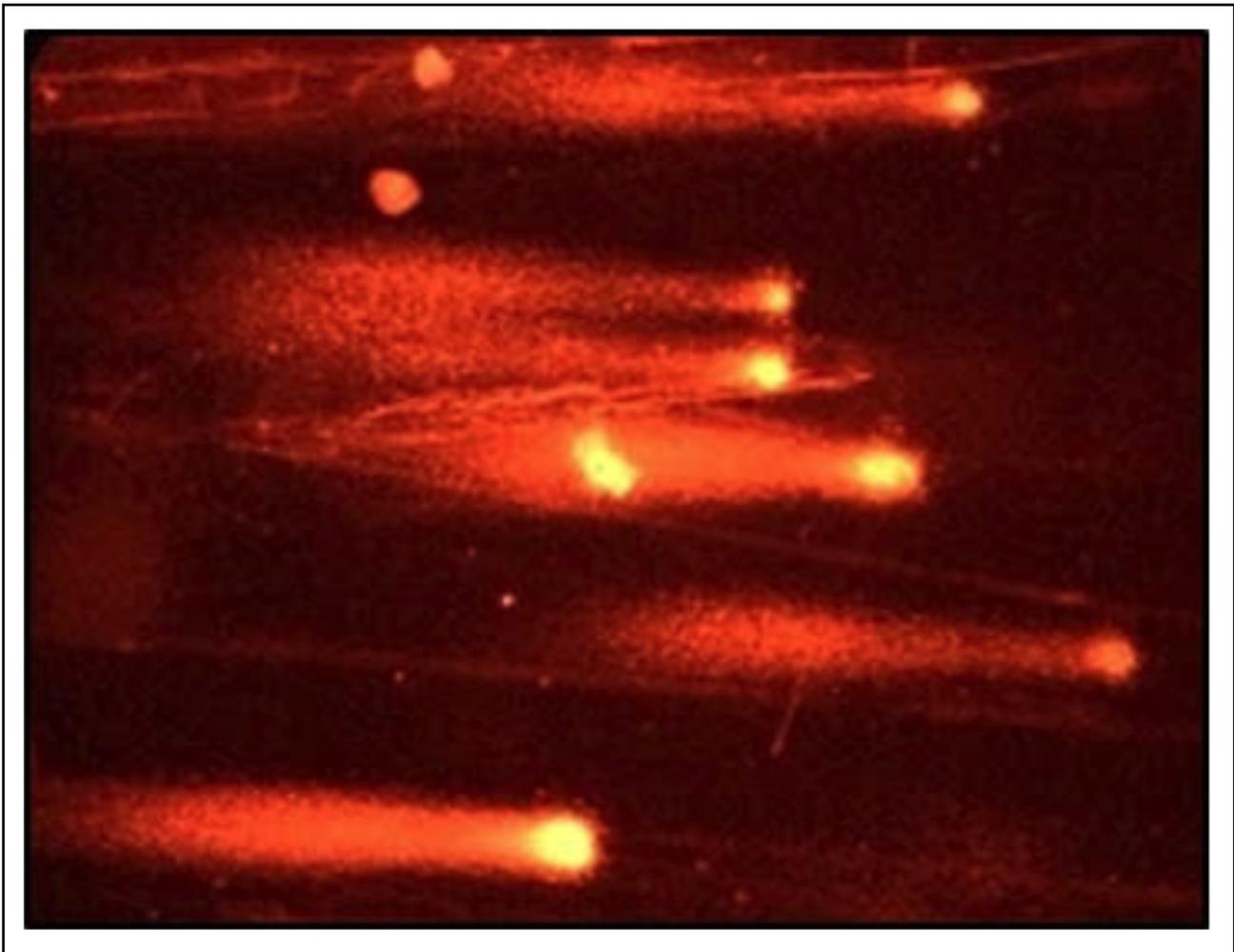
saio Micronúcleo. As alterações morfológicas nucleares e as células micronucleadas podem apresentar uma correlação positiva ou negativa, podendo revelar diferentes níveis de impacto ambiental, bem como inferir sobre a presença de diferentes agentes estressores ambientais (Rodrigues *et al.*, 2010).

### Ensaio Cometa

O Ensaio Cometa (eletroforese em gel de células individuais) é uma técnica capaz de detectar microlesões no DNA em células individualizadas (Speit & Hartmann, 1999), apresentando alta sensibilidade na detecção de lesões pré-mutagênicas (Scalon *et al.*, 2010) e ampla utilização estratégica no biomonitoramento de agentes genotóxicos (Adam *et al.*, 2010). Esta metodologia se baseia no fato de que o DNA danificado apresenta um padrão de migração em gel de eletroforese específico, conforme a intensidade do dano (Rojas *et al.*, 1999). Esta intensidade, se refere aos diferentes tamanhos dos fragmentos de DNA (Figura 4), resultantes



**Figura 3.** Alterações morfológicas nucleares em eritrócitos do peixe *Aspistor luniscutis*. A) Célula Binucleada; B) Micrócito; C) Núcleo Blebbed; D) Bud Nuclear; E) Núcleo Notched; e F) Núcleo com Brotamento. Fonte: Mônica Adam.



**Figura 4.** Hemócitos do caranguejo *Grapsus grapsus* submetidos ao Ensaio Cometa. Fonte: Autores.

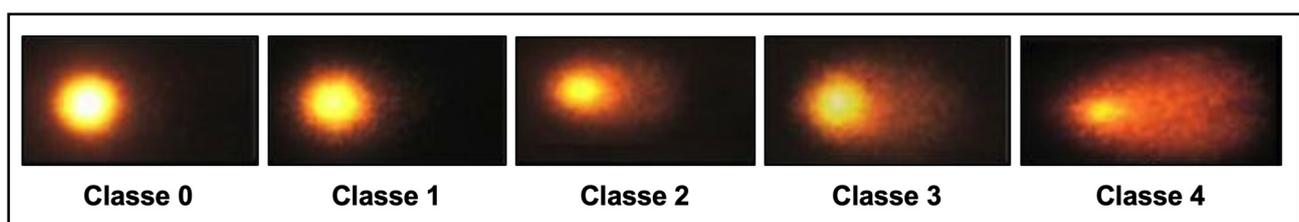
da exposição aos estressores ambientais, que migram diferencialmente no gel devido aos seus diferentes pesos moleculares, apresentando a figura típica de um cometa (Bolognesi & Cirillo, 2014).

A avaliação dos danos é feita pela relação entre o raio do núcleo e a extensão das “caudas” formadas pelo DNA em migração, conforme representado nas classes de danos (Figura 5), que variam da Classe 0 (ausência de

danos ao DNA), gradativamente até a Classe 4 (máximo dano ao DNA).

O Quadro 3 apresenta as soluções que devem ser preparadas para a execução do Ensaio Cometa, enquanto os procedimentos deste método são detalhados no Quadro 4.

O emprego dos métodos genômicas anteriormente descritos possibilitam a avaliação simultânea de danos no material genético, inclusive em vários tecidos de um mesmo indiví-



**Figura 5.** Classes de danos no DNA, atribuídos ao Ensaio Cometa. Fonte: modificado de Silva & Cruz (2012).

<b>Quadro 3.</b> Preparo das Soluções utilizadas no Ensaio Cometa.	
<b>Solução de Lise – Solução Estoque</b>	
Quantidades para 1.000 ml de Solução Estoque	
Quantidade	Produto
890 ml	H <sub>2</sub> O destilada
146,1 g	NaCl (Cloreto de Sódio) 2,5 M
37,2 g	EDTA (Ácido Etilenodiaminotetracético) 100 mM
1,2 g	TRIS 10 mM
8 g	NaOH (Hidróxido de Sódio) sólido
10 g	Lauril Sarcosinato de Sódio
Dissolver estes reagentes em 890 ml de água, com posterior ajuste para pH 10, usando NaOH	
<b>Solução de Lise – Solução de Trabalho</b>	
Quantidades para 100 ml de Solução de Trabalho	
3 ml	Triton X – 100
30 ml	DMSO
267 ml	Solução Estoque
Importante: Mantenha a solução sempre protegida da luz (escuro)	
<b>Tampão de Eletroforese</b>	
<b>Solução de NaOH (300 mM)</b>	
21,6 g	NaOH
54 ml	Água destilada
Observação: Estocar a solução em temperatura ambiente. Validade: 15 dias. <b>Solução</b>	
<b>Solução de EDTA (200 mM) – Solução Estoque</b>	
14,89 ml	EDTA
200 ml	Água destilada
Ajustar a solução para pH 10, utilizando NaOH.	
<b>Solução de EDTA – Solução de Trabalho</b>	
900 ml	H <sub>2</sub> O deionizada gelada (4°C)
4,5 ml	EDTA (Ácido Etilenodiaminotetracético) 200 mM
27 ml	NaOH (Hidróxido de Sódio)
Acertar a solução para pH > 13, utilizando NaOH.	

<b>Quadro 3.</b> Continuação.	
<b>Tampão de Neutralização</b>	
24,25 g	TRIS
475 ml	Água destilada
Ajustar o tampão para pH 7,5, com HCl. Estocar em temperatura ambiente. Importante: O volume total do tampão depende da capacidade da cuba de eletroforese.	
<b>Solução de Coloração* – Solução Estoque</b>	
10 mg	Brometo de Etídio
50 ml	Água destilada
<b>Solução de Coloração* – Solução de Trabalho</b>	
1 ml	Solução Estoque
9 ml	Água destilada
* Observação: Esta coloração por ser substituída pela utilização do corante GelRed.	
<b>PBS</b>	
Quantidades para 500 ml de Solução Estoque	
0,1 g	KCl – Cloreto de Potássio
0,1 g	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> – Fosfato de potássio monobásico
4 g	NaCl – Cloreto de Sódio
0,58 g	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> – Hidrogênio-fosfato disódico anidro
500 ml	Água destilada
Ajustar para pH 7,7 e estocar a 4°C.	
<b>Agarose Normal – 1,5 %</b>	
Quantidades para 100 ml de Solução Estoque	
1,5 g	Agarose Normal
100 ml	PBS
<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Dissolver bem e colocar para aquecer. Quando levantar fervura desligar. Agitar a solução.</li> <li>2. Deixar solidificar à temperatura ambiente. Cortar em pedaços e voltar a ferver, com cuidado para não derramar. Agitar a solução. Colocar em banho-maria a 80°C (o banho deve ficar no nível da agarose).</li> <li>3. Mergulhar as lâminas na agarose até alcançar o início da parte esmerilhada. Procurar formar uma camada bem fina de agarose. Retirar a lâmina, limpando com papel o lado oposto da parte esmerilhada. Secar a lâmina “overnight” em temperatura ambiente na horizontal. Estas lâminas podem ser estocadas por várias semanas.</li> </ol>	
<b>Agarose de Baixo Ponto de Fusão (LMP) – 0,5 %</b>	
Quantidades para 20 ml de Solução de uso	
0,1 g	Agarose de baixo ponto de fusão - LMP
20 ml	PBS
Dissolver bem e colocar para aquecer. Quando levantar fervura desligar. Agitar a solução. Deixar em banho-maria a 37°C.	

**Quadro 4.** Procedimentos empregados no Ensaio Cometa.

<b>Procedimentos</b>
1. Misturar 10 µl da amostra biológica (sangue/hemolinfa/suspensão celular) em 120 µl de agarose de baixo ponto de fusão (0,5%).
2. Espalhar esta suspensão em lâminas previamente revestidas com agarose padrão (1,5%).
3. Cobrir com lamínula e condicionar em refrigerador durante 10 a 20 min.
4. Após a adição das células na lâmina evitar exposição de luz direta.
5. Retirar as lamínulas gentilmente.
6. Colocar as lâminas em solução de lise e colocar em refrigerador (4°C), por 1h. As lâminas podem permanecer na solução de lise por até 4 semanas. Caso ocorra precipitação da solução de lise as lâminas podem ser lavadas gentilmente com PBS antes da eletroforese.
7. Colocar as lâminas na cuba horizontal de eletroforese, preenchendo o máximo possível de espaços. Caso seja necessário, completar com lâminas limpas.
8. Adicionar o tampão de eletroforese suavemente até cobrir as lâminas.
9. Deixar o DNA desnaturando no tampão alcalino por um tempo de 20 a 60 min (Normalmente 25 min é suficiente).
10. Realizar a eletroforese, mergulhando a cuba em gelo (4°C).
11. Iniciar a eletroforese (25 V, 300 mA). Correr por 10 a 40 min (tempo recomendado: 25 min).
12. Terminada a eletroforese, retira-se as lâminas cuidadosamente, gotejando a solução neutralizadora em cima das lâminas por 5 min.
13. Repete-se a neutralização por mais duas vezes.
14. Secar as lâminas na posição inclinada e fixar com etanol (gelado) por 5 min.
15. Estocar as lâminas, se necessário, em geladeira.
16. Para a coloração adicionar 20 µl de brometo de etídio e cobrir com lamínula. Descansar por 5 min, no escuro antes da análise. Analisar imediatamente.
17. Devem ser contabilizadas 100 células por espécimes, observando as classes diferenciais de danos.
18. Análises estatísticas apropriadas deverão ser empregadas para a conclusão dos resultados.

duo (espécie sentinela), gerando dados comparativos das respostas obtidas em condições idênticas de tratamento (Sargsyan *et al.*, 2019, Sharma *et al.*, 2021). Portanto, a combinação destes diferentes métodos pode ser empregada na triagem de efeitos de estressores ambientais, bem como acompanhar a recuperação ambiental através da investigação dos danos no DNA

das espécies sentinelas (Sharma *et al.*, 2021).

### **Espécies Sentinelas – Estudos de Caso**

#### ***Caranguejos***

Os caranguejos são animais bentônicos que totalizam cerca de 6.800 espécies (Ng *et al.*, 2007), vivendo em vários ambientes aquáti-

cos (água doce, salobra e marinha) e, até mesmo, no ambiente terrestre. Neste sentido, apresentam adaptações morfofisiológicas que os possibilita sobreviver aos diferentes ambientes, bem como distintos hábitos alimentares (herbívoros, carnívoros e onívoros).

O estabelecimento de uma espécie sentinela tem relação direta com o tipo de ecossistema a ser monitorado, dos compartimentos ambientais utilizados (p. ex., água, sedimento e/ou alimento), além de que ela seja, preferencialmente, endêmica, residente e de menor variabilidade naquele ambiente. Os exemplos que serão mencionados a seguir são de espécies endêmicas de manguezais/estuários brasileiros, conforme segue: **1) caranguejo-uçá (*Ucides cordatus*)**, uma espécie herbívora de folhas senescentes (Christofoletti *et al.*, 2013), escavadora de galerias no sedimento dos manguezais e caracterizada por crescimento lento e elevada longevidade (Pinheiro *et al.*, 2005); **2) caranguejo-arborícola (*Aratus pisonii*)**, uma espécie herbívora de algas e folhas verdes das árvores de manguezal (Beever *et al.*, 1979), que está associada com uma taxa de crescimento mais expressiva; **3) caranguejo maria-mulata (*Goniopsis cruentata*)**, uma espécie onívora, também endêmica de manguezais; e **4) caranguejo-guaimu (*Cardisoma guanhumi*)**, um caranguejo semi-terrestre, também caracterizada pela herbivoria, crescimento lento e elevada longevidade (Cardona *et al.*, 2019).

*Ucides cordatus* (Linnaeus, 1763) foi uma das espécies mais utilizadas para a avaliação da qualidade ambiental de áreas de manguezal, pelos ensaios Micronúcleo (MN, macrolesões) e Vermelho Neutro (NRRT, citotoxicidade). Numa primeira abordagem, Pinheiro *et al.* (2013) quantificaram o nível basal de macrolesões desse caranguejo (média  $\pm$  desvio padrão:  $2,0 \pm 1,0$  MN/1.000), para os manguezais prístinos da Estação Ecológica Juréia-Itatins, em Peruíbe (SP), correspondendo a menos da metade em relação aos manguezais de Cubatão (SP), que foram de  $5,2 \pm 1,8$  MN/1.000.

A partir daí, Pinheiro (2012) desenvolveu um projeto mais amplo, com apoio da FAPESP, realizando a dosagem de metais na água, folhas de *Rhizophora mangle*, sedimento e tecidos de *U. cordatus*, bem como análise citogenotóxica utilizando este crustáceo como espécie-sentinela durante o verão/2010, desta vez em seis áreas de manguezal do Estado de São Paulo (CAN, Cananéia; IGU, Iguape; JUR, Juréia; SAV, São Vicente; CUB, Cubatão; e BET, Bertioga). Tais resultados indicaram um gradiente de contaminação ambiental, bem como sua associação positiva com a quantificação de micronúcleos e negativa com o tempo de retenção do vermelho neutro, que foram publicados em parceria com Duarte *et al.* (2016). Assim, foi confirmado o sucesso dessa espécie como sentinela ambiental, utilizando os dois biomarcadores (MN e NRRT), que se mostraram suficientemente sensíveis e eficazes na classificação dos manguezais segundo seu estado de conservação (Duarte *et al.*, 2017), indicando como mais conservados os manguezais da Juréia (MN:  $0,7 \pm 0,1$  MN/1.000; e NRRT:  $260,0 \pm 42,7$  min) e de Cananéia (MN:  $0,4 \pm 0,6$  MN/1.000; e NRRT:  $141,0 \pm 51,8$  min), quando relacionado aos manguezais mais contaminados por metais e resíduos sólidos (“lixo”) em São Vicente (MN:  $7,4 \pm 2,6$  MN/1.000; e NRRT:  $61,5 \pm 10,7$  min). Estes dados foram compatíveis à densidade populacional de *U. cordatus*, que variou de  $0,8 \pm 0,8$  a  $1,3 \pm 0,9$  ind./m<sup>2</sup> em manguezais de maior impacto (BET, CUB e SAV: resíduos sólidos variando de  $18,9 \pm 32,1$  a  $34,4 \pm 32,6$  g/m<sup>2</sup>), em relação aos manguezais da Juréia ( $1,92 \pm 1,03$  ind./m<sup>2</sup>), este classificado como mais conservado (menor quantidade de metais e ausência de resíduos sólidos = “lixo”). Esta mesma matriz de dados, retrabalhada por Duarte *et al.* (2017), confirmou que o acúmulo de metais em *U. cordatus* esteve mais associado ao seu principal alimento (folhas senescentes de *R. mangle*), do que com a água ou sedimento dos manguezais, confirmando sua maior responsabilidade à exposição aos metais neste crustáceo. Outro aspecto importante foi que o impacto genotóxico (MN) deste caranguejo apresentou associação com o mercúrio (sedimento) e chumbo (água e folhas verdes), enquanto o impacto citotóxico (NRRT) esteve associado ao cobre (folhas verdes/senescentes) e chumbo

(sedimento). Portanto, percebe-se que os compartimentos ambientais (água e sedimento), associado ao alimento foram fontes de explicação dos efeitos citogenotóxicos nesta espécie, exigindo, portanto, o uso destas fontes de contaminação numa abordagem holística de danos subletais em *U. cordatus*.

As mesmas seis áreas previamente avaliadas por Pinheiro (2012) em 2010, foram reavaliadas novamente em 2015, também utilizando o caranguejo *Ucides cordatus* como espécie sentinela. Estes dados, publicados por Souza et al. (2022), desta vez foram executados em função das estações climáticas mais contrastantes (verão e inverno/2015), para verificar se havia alteração sazonal da resposta de citogenotoxicidade (MN e NRRT) para esta espécie. De modo geral, houve confirmação dos resultados obtidos anteriormente, onde os manguezais do Litoral Centro SP (SAV, CUB e BET:  $5,5 \pm 1,7$  MN‰) mostraram cerca do dobro do impacto em relação ao Litoral Sul SP (JUR, CAN e IGU:  $2,7 \pm 1,7$  MN‰), fato este confirmado pelo aumento da média de micronúcleos (cél./1.000) e menor tempo de integridade da membrana lisossômica (medido em minutos). O marcador de genotoxicidade (MN) foi cerca de cinco vezes maior em SAV ( $6,8 \pm 1,6$  MN‰) quando comparado à JUR ( $1,3 \pm 0,9$  MN‰), somente com diferença sazonal significativa verificada para CUB, onde a média no verão ( $5,9 \pm 1,4$  MN‰) foi superior à de inverno ( $5,0 \pm 1,2$  MN‰). Como já confirmado em 2010, os valores de citotoxicidade (NRRT) foram antagônicos aos de genotoxicidade (MN), com inversão das posições das áreas de manguezal mais prístinas (JUR:  $130,6 \pm 50,9$  min) em relação às mais impactadas (SAV:  $34 \pm 19,5$  min). Diferenças sazonais foram confirmadas estatisticamente para NRRT (verão > inverno), apenas para quatro áreas de manguezal (CAN, IGU, BET e SAV). Em suma, os manguezais mais preservados apresentaram valores de MN < 3 células/1.000 e NRRT > 100 min, maximizando a toxidez durante o verão, quando a lixiviação pelas chuvas maximiza o efeito negativo sob o NRRT, com redução no tempo de retenção do vermelho neutro em relação ao inverno (estiagem). Portanto, a utilização de *U. corda-*

*tus* foi garantida como espécie sentinela, sendo recomendado que os registros de MN e NRRT ocorram, preferencialmente, durante os meses de estiagem (Souza et al., 2022), quando os valores obtidos são mais homogêneos e sem efeito da lixiviação.

Pinheiro et al. (2021) avaliaram a frequência basal de células micronucleadas (MN‰) para três espécies de caranguejos, em um manguezal prístino, na Estação Ecológica Juréia-Itatins (JUR). Como já mencionado anteriormente, *A. pisonii*, *U. cordatus* e *G. cruentata* pertencem a diferentes grupos funcionais, seja quanto à dieta como estilo de vida. No geral, o MN ‰ basal de *G. cruentata* ( $1,7 \pm 1,2$  MN/1.000) foi superior ao de *A. pisonii* ( $0,9 \pm 1,1$  MN/1.000) e *U. cordatus* ( $1,3 \pm 0,9$  MN/1.000). Essas diferenças podem ser explicadas pela dieta (fv, folhas verdes; fs, folhas senescentes; an, itens animais; ou sua combinação), bem como pelo estilo de vida, que condiciona o grau de contato com os compartimentos abióticos (ag, água; se, sedimento). *Aratus pisonii*, como uma espécie arbórea e herbívora especialista, está associada a um menor número de compartimentos (ag + fv); *Ucides cordatus*, como um caranguejo escavador e herbívoro generalista, utiliza três compartimentos (ag + se + fs); enquanto que *Goniopsis cruentata* é um caranguejo cursorial, onívoro, que explora um maior número de compartimentos (ag + se + fs + a). Portanto, uma maior variedade de compartimentos e uma dieta mais diversificada estiveram correlacionados à maior genotoxicidade. Estes compartimentos foram associados aos metais na Juréia, que apresentaram reduzidas concentrações em relação à outras áreas (p. ex., Cubatão – SP), mas influenciaram os resultados basais de genotoxicidade nessas espécies de caranguejo. Assim, uma maior genotoxicidade foi registrada nas espécies de manguezal que interagem com mais compartimentos, em especial com o sedimento, que nos manguezais apresenta elevado teor de matéria orgânica e, por isso, mais metais associados (Paquin et al., 2002). Os dados obtidos confirmam o elevado potencial destas espécies endêmicas como sentinelas de manguezal, conforme sugerido por Pinheiro et al. (2017).

Outra espécie que vive em ambientes adjacentes aos de manguezal, como parte de sistemas estuarinos, é o caranguejo guaiamum (*Cardisoma guanhumi*). Falcão *et al.* (2020) avaliaram a genotoxicidade desta espécie pelo Ensaio Cometa (CO) e Ensaio Micronúcleo (MN), que tratam das microlesões e macrolesões de DNA, respectivamente. Neste estudo foram avaliados exemplares de *C. guanhumi* provenientes de cinco áreas estuarinas do Estado de Pernambuco (GOI, Goiana; JAG, Jaguaribe; CAP, Capibaribe; SIR, Sirinhaém; e FOR, Formoso), em comparação a uma área prístina, o estuário da estação ecológica no Estado de São Paulo (JUR, Juréia-Itatins). O estudo foi realizado ao longo de dois anos consecutivos, com amostragens sazonais, no inverno e verão, correspondentes a época das chuvas e seca nas Regiões Norte-Nordeste do Brasil, respectivamente. Diferentemente dos verões e inverno/2013, no inverno/2012 houve um aumento significativo na frequência de MN/1.000 e no índice de dano genômico. A ocorrência de danos genômicos coincidiu com o rigoroso inverno/2012, que devido ao maior aporte de água dos rios costeiros, afetou significativamente o DNA deste crustáceo.

### Peixes

Inquestionavelmente, o destino da maioria dos poluentes é o meio aquático. Rios, lagos, aquíferos ou mar estão constantemente recebendo uma mistura complexa de contaminantes, expondo os organismos aquáticos a uma variedade de efeitos deletérios (Sedeño-Díaz & López-López, 2012). A interação dos organismos com o seu meio reflete o equilíbrio ecossistêmico, portanto, a saúde do ecossistema pode ser mensurada pela saúde dos organismos que ali vivem. Neste contexto, os animais aquáticos, devido a sua interação com a coluna d'água e sedimento, são sensíveis aos estressores ambientais em concentrações subletais, sendo considerados sentinelas dos ecossistemas aquáticos (Amadi *et al.*, 2022). Assim, as variações ambientais do meio aquático podem ser rastreadas em diferentes escalas temporais, desde semanas a anos. A escolha da

sentinela para a avaliação dessas variações temporais deve levar em consideração os diferentes bioindicadores de vida das espécies, onde os invertebrados são excelentes sentinelas para variações temporais mais curtas enquanto os peixes são para a análise de perturbações ambientais em longos períodos (Colin *et al.*, 2016). Comparativamente, os peixes são considerados mais vulneráveis que os invertebrados quanto à exposição aos estressores ambientais, sendo bioindicadores adequados para as análises dos efeitos subletais de substâncias que se encontram em concentrações muito baixas no ambiente (Amadi *et al.*, 2022).

Há uma vasta literatura abordando a utilização dos peixes como sentinelas da qualidade ambiental. Tais abordagens indubitavelmente demonstram a sensibilidade dos peixes em resposta aos diversos estressores ambientais. Muitos estressores podem ser disponibilizados de forma contínua no ambiente. Outros, porém, podem ser acidentalmente disponibilizados e, de forma mais aguda, alterar o equilíbrio ecossistêmico, como o relatado por Da Silva (2021). Em 2018, um acidente com o derramamento de vinhoto em um rio nordestino (rio Goiana) causou uma grande mortalidade de peixes e outros animais. Este rio localiza-se dentro de uma reserva extrativista (Reserva Extrativista Acaú-Goiana), sendo a grande fonte de subsistência de vários ribeirinhos através da pesca artesanal. Com a alta mortalidade de peixes afetando a atividade pesqueira, uma preocupação surgiu quanto ao efeito prolongado deste acidente no rio. Para a verificação deste efeito foram realizados o diagnóstico e o monitoramento do rio, posterior ao acidente. Da Silva (2021) realizou coletas mensais do bagre-amarelo (*Aspistor luniscutis*), durante dois anos consecutivos e analisou o impacto ambiental por parâmetros de danificação genômica. As metodologias do Ensaio Micronúcleo e de Alterações Morfológicas Nucleares foram empregadas para a quantificação de danos no DNA de eritrócitos dos animais coletados naquele rio. Os resultados demonstraram uma alta genotoxicidade (altas frequências de células micronucleadas e com alterações morfológicas nucleares) nos seis primeiros meses de co-

leta, sendo também demonstrada uma depuração gradual do ambiente (queda gradual na expressão de danos genômicos), a qual chegou nos níveis de normalidade de expressão de danos genômicos após um ano da ocorrência do acidente.

A mesma abordagem foi realizada por Lima *et al.* (2019) para o diagnóstico ambiental de cinco estuários do Nordeste do Brasil, os mesmos estudados por Falcão *et al.* (2020), citados acima. Os pesquisadores, porém, avaliaram a expressão de macrolesões (Ensaio Micronúcleo) e microlesões (Ensaio Cometa) no DNA de eritrócitos de tainha (*Mugil curema*). Os resultados revelaram que os diferentes perfis ambientais nos quais os estuários estão inseridos respondem de forma específica e quantitativa aos impactos sofridos, onde os estuários localizados próximos a locais com uma maior densidade demográfica e desenvolvimento industrial apresentaram os maiores níveis de dano genômico.

A magnitude da interferência humana nos ambientes pode ser evidenciada em De Lima e Silva *et al.* (2022) que demonstraram, pela análise de danos genômicos em eritrócitos de espécimes de sargentinho (*Abudefduf saxatilis*) coletados em Porto de Galinhas (PE, Brasil), o alto nível dos impactos das perturbações ambientais causadas pelo intenso turismo. A restrição à mobilidade humana devido à pandemia do COVID-19 permitiu avaliar dois cenários divergentes quanto à atividade turística nesta praia. Coletas mensais foram realizadas durante um ano e durante o trimestre de restrição de mobilidade humana. Todas as avaliações genotóxicas estabelecidas (Micronúcleos, Alterações Morfológicas Nucleares e Ensaio Cometa) demonstraram uma alta frequência de danos no DNA dos animais nos períodos de intensa atividade turística, contrastando com a menor frequência de danos genômicos no período de ausência de movimentação humana. Esta pesquisa corrobora a premissa de que o ambiente é capaz de se recuperar quando o agente perturbador deixa de existir.

A quantificação de impacto ambiental não se restringe ao ambiente marinho, mas

também pode ser realizada em ambientes dulcícolas. Arantes *et al.* (2016) através da análise de impacto genotóxico (micronúcleos) em espécimes de jundiá (*Rhamdia quelen*), diagnosticou a qualidade ambiental do rio Iguazu (PR, Brasil). As diferenças encontradas quanto à frequência de células micronucleadas nos animais coletados em diferentes localidades do rio, possibilitaram estabelecer um perfil de conservação *versus* impacto deste rio, principalmente com relação às características locais de cada ponto de amostragem e em relação à influência de uma megacidade (neste caso, Curitiba/PR).

Similarmente, Adam *et al.* (2010) havia demonstrado a influência antrópica de uma megacidade na qualidade de um rio. Exemplares de cuaru (*Poecilia vivipara*) foram amostrados em um lago artificial (pelo represamento do rio Belém) dentro de um parque urbano na cidade de Curitiba/PR. Este rio percorre na sua extensão vários parques industriais até ser represado no interior do parque. As altas frequências de células micronucleadas nos eritrócitos dos animais avaliados demonstraram um alto nível de impacto genotóxico nesta localidade, sendo bastante preocupante quanto a tomada de ações de gestão do parque, principalmente pela alta visitação e o provável contato com esta água, além da conservação deste ecossistema.

### **Mamíferos**

Entre os mamíferos, os morcegos constituem uma classe de sentinelas que permite avaliar ambientes terrestres. Estes animais estão expostos a uma maior exposição a estressores ambientais em razão de sua longevidade e alta ingestão de alimentos (Amadi *et al.*, 2022). Adam *et al.* (2022) utilizando a metodologia de avaliação de células micronucleadas em células sanguíneas de diferentes espécies de morcegos, avaliaram a qualidade ambiental de três áreas protegidas da caatinga (Estação Ecológica Seridó, Parque Nacional do Catimbau, Estação Ecológica Raso da Catarina - Nordeste brasileiro). Foram detectadas frequências alarmantes de células micronucleadas nos animais coleta-

dos nas duas estações ecológicas, refletindo um alto impacto ambiental. Tal impacto se deve a um efeito persistente da exposição no ambiente de pesticidas, que outrora eram utilizados na cultura algodoeira da região, mesmo esta atividade já tendo sido extinta no local há décadas. Este resultado coloca em alerta a gestão dessas estações ecológicas, principalmente por se tratarem de áreas de proteção integral, com o objetivo de conservação da biodiversidade.

### Considerações finais

A padronização dos métodos de diagnose e monitoramento ambiental para áreas protegidas, como aqui sugerida, poderá suprir a necessidade de uma avaliação mais abrangente e comparativa sobre seu estado de conservação. O emprego de espécies sentinelas, pautado numa análise integrativa dos métodos citotóxicos e de danificação genômica, poderá demonstrar, em tempo real, o impacto de estressores ambientais, contribuindo para a gestão das unidades de conservação brasileiras. Contudo, a escolha da espécie sentinela para avaliar o impacto ambiental deve ser testada previamente, observando as que possuam interação com o maior número de compartimentos ambientais. Além disso, é desejável o uso de espécies de menor vagilidade, que possuam ciclo de vida mais longo e que, preferencialmente, sejam espécies-chave no ecossistema em avaliação.

### Referências

- ADAM, M. L., DE ASSIS ROCHA PESSOA, L., DE LIMA, A. R. B. & BERNARD, E. 2022. DNA damage as indicator of the environmental vulnerability of bats in Brazil's Caatinga drylands. *Environ. Monit. Assess.*, 194(4): 1-17.
- ADAM, M. L., TORRES, R. A., SPONCHIADO, G., MOTTA, T. S., OLIVEIRA, C. M. R., CARVALHO-FILHO, M. A. & CORREIA, M. T. S. 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: 61-68.
- AMADI, C. N., FRAZZOLI, C. & ORISAKWE, O. E. 2022. Sentinel species for biomonitoring and biosurveillance of environmental heavy metals in Nigeria. *J. Environ. Sci. Health, Part C*, 38(1): 21-60.
- AGUIRRE-MARTNEZ, G. V., BURRATI, S., FABRI, E., DEL VALLS, T. A. & MARTIN-DIAZ, M. L. 2013. Stability of lysosomal membrane in *Carcinus maenas* acts as biomarker of exposure to pharmaceuticals. *Environ. Monit. Assess.*, 185(5): 3783-3793.
- ARANTES, A. C. R., ADAM, M. L., SOUZA, J. R. B., BASTOS, L. P., JACOBINA, U. P. & TORRES, R. A. 2016. Frequency of fish micronuclei to diagnose aquatic environmental conditions from Brazilian megacities: a case study of Iguaçu river, Southern Brazil. *Rev. Bras. Biociências*, 14(2).
- ARECES, A. J., COCENTINO, A. L. M., REIS, T. N. V., VASCONCELOS, E. R. T. P. P., GUIMARÃES-BARROS, N. C., FUJII, M. T. 2015. Las Macroalgas como Bioindicadoras da Calidad Ambiental y Cambios Climaticos. *Guia pratica. Braz. J. Ecol.*, 1-64: 1516-5868.
- ASTLEY, K. N., MEIGH, H. C., GLEGG, G. A., BRAVEN, J. & DEPLEDGE, M. H. 1999. Multivariate analysis of biomarker responses in *Mytilus edulis* and *Carcinus maenas* from the Tees Estuary (UK). *Mar. Pollut. Bull.*, 39(1-2): 145-154.
- BADALOTTI, A., VAN GALEN. L., VIÉ, J. C. & STEPHENSON, P. J. 2022. Improving the monitoring of conservation programs: lessons from a grant-making initiative for threatened species. *Oryx*, 56: 288-294.
- BAROUDI, F., AL ALAM, J., FAJLOUN, Z. & MILLET, M. 2020. Snail as sentinel organism for monitoring the environmental pollution; a review. *Ecol. Indic.*, 113: 106240.
- BEEVER, J. W., SIMBERLOFF-III, D. & KING, L. L. 1979. Herbivory and predation by the mangrove tree crab *Aratus pisonii*. *Oecol.*, 43: 317-328.
- BHAT, S. A., CUI, G., LI, F. & VIG, A. P. 2019. Biomonitoring of genotoxicity of industrial wastes using plant bioassays. *Biores. Tech. Rep.*, 6: 207-216.
- BOLOGNESI, C. & CIRILLO, S. 2014. Genotoksi-

- city biomarkers in aquatic bioindicators. *Curr. Zool.*, 60(2): 273-284.
- BUENFIL-ROJAS, A. M., ALVAREZ-LEGORRETA, T., GONZÁLEZ-JÁUREGUI, M., RENDÓN-VON OSTEN, J. & CEDEÑO-VAZQUEZ, J. R. 2022. Effectiveness of Morelet's crocodile as a bioindicator of metal pollution and metallothionein response to spatial variations of metal exposure. *Environ. Adv.*, 100251.
- CARDONA, L., CAMPOS, N. H. & ROLONG, E. H. 2019. Parámetros de crecimiento de *Cardisoma guanhumi* en el departamento del Magdalena, Colombia. *Bull. Mar. Coast. Res.*, 48(1): 27-41.
- CARRASCO, K. R., TILBURY, K. L. & MYERS, M. S. 1990. Assessment of the piscine micronucleus test as an in situ biological indicator of chemical contaminant effects. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 47(11): 2123-2136.
- CASTILHOS-GHISI, N., LARENTIS, C., OLIVEIRA, E. C., NEVES, M. P., ZAVASKI, A. G., ALMEIDA-ROQUE, A., WACHTEL, C. C., SILVA, A. P., LIMA, E. B. S., COSTA, G. O. N., AMORIM, J. P. A., RIBEIRO, C. A. O., DELARIVA, R. L. 2022. Environmental assessment of Neotropical streams using fish as bioindicators: a multibiomarker and integrated approach. *Hydrobiologia*, 849: 4587-4604.
- CHELLIAN, R., PANDY, V. & MOHAMED, Z. 2017. Pharmacology and toxicology of  $\alpha$ - and  $\beta$ -Asarone: A review of preclinical evidence. *Phytomed.*, 32: 41-58.
- CHRISTOFOLETTI, R. A., HATTORI, G. Y. & PINHEIRO, M. A. A. 2013. Food selection by a mangrove crab: temporal changes in fasted animals. *Hydrobiol.*, 702: 63-72.
- COLIN, N., PORTE, C., FERNANDES, D., BARATA, C., PADRÓS, F., CARRASSÓN, M., ... & MACEDA-VEIGA, A. 2016. Ecological relevance of biomarkers in monitoring studies of macro-invertebrates and fish in Mediterranean rivers. *Sci. Total Environ.*, 540: 307-323.
- CONSTABLE, A. J., COSTA, D. P., SCHOFIELD, O., NEWMAN, L., URBAN JR, E. R., FULTON, E. A., ... & WILLIS, Z. 2016. Developing priority variables ("ecosystem Essential Ocean Variables"—eEOVs) for observing dynamics and change in Southern Ocean ecosystems. *J. Mar. Syst.*, 161: 26-41.
- CORDIER, T., ALONSO-SAEZ, L., APOTHELOZ-PERRET-GENTIL, L., AYLAGAS, E., BOHAN, D. A., BOUCHEZ, A., CHARITON, A., CREER, S., FRÜHE, L., KECK, F., KEELEY, N., LAROCHE, O., LEESE, F., POCHON, X., STOECK, T., PAWLOWSKI, J. & LANZEN, A. 2020. Ecosystems monitoring powered by environmental genomics: A review of current strategies with an implementation roadmap. *Mol. Ecol.*, 46: 235-248.
- CUNNINGHAM, M. M., TRAN, L., MCKEE, C. G., POLO, R. O., NEWMAN, T., LANSING, L., ... & GUARNA, M. M. 2022. Honey bees as bio-monitors of environmental contaminants, pathogens, and climate change. *Ecol. Indic.*, 134: 108457.
- DA SILVA, D. M. 2021. Diagnóstico e monitoramento do rio Goiana (PE-Brasil), por parâmetros de danificação genômica, após acidente ambiental. Recife. 97p. (Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal. Universidade Federal de Pernambuco).
- DA SILVA, L. F., NOBRE, C. R., MORENO, B. B., PEREIRA, C. D. S., DE SOUZA ABESSA, D. M., CHOUERI, R. B., ... & CESAR, A. 2022. Non-destructive biomarkers can reveal effects of the association of microplastics and pharmaceuticals or personal care products. *Mar. Pollut. Bull.*, 177: 113469.
- DAILIANIS, S., DOMOUHTSIDOU, G. P., RAFTOPOULOU, E., KALOYIANNI, M. & DIMITRIADIS, V. K. 2003. Evaluation of neutral red retention assay, micronucleus test, acetylcholinesterase activity and a signal transduction molecule (cAMP) in tissues of *Mytilus galloprovincialis* (L.), in pollution monitoring. *Mar. Environ. Res.*, 56: 443-470.
- DE LA TORRE, F. R., SALIBIÁN, A. & FERRARI, L. 2007. Assessment of the pollution impact on biomarkers of effect of a freshwater fish. *Chemosphere*, 68(8): 1582-1590.
- DE LIMA E SILVA, J. R., DE LIMA, A. R. B., DA SILVA, D. L., ROSA FILHO, J. S. & ADAM, M. L. 2022. Contrasting tourism regimes due to the COVID-19 lockdown reveal varied genomic toxicity in a tropical beach in the

- Southern Atlantic. Environ. Monit. Assess., 194(7): 1-19.
- DE SOUZA, P. R., DE SOUZA, K. S., DE ASSIS, C. R. D., DE ARAÚJO, M. C., SILVA, K. C. C., DA SILVA, J. D. F. X., ... & DE SOUZA BEZERRA, R. 2018. Acetylcholinesterase of mangrove oyster *Crassostrea rhizophorae*: A highly thermostable enzyme with promising features for estuarine biomonitoring. Aquat. Toxicol., 197: 109-121.
- DOS SANTOS, G. P. C., DE ASSIS, C. R. D., OLIVEIRA, V. M., CAHU, T. B., SILVA, V. L., SANTOS, J. F., ... & BEZERRA, R. S. 2022. Acetylcholinesterase from the charru mussel *Mytella charruana*: kinetic characterization, physicochemical properties and potential as in vitro biomarker in environmental monitoring of mollusk extraction areas. Comp. Biochem. Physiol. Part C: Toxicol. Pharmacol., 252: 109225.
- DUARTE, L. F. A., SOUZA, C. A., NOBRE, C. R., PEREIRA, C. D. S. & PINHEIRO, M. A. A. 2016. Multi-level biological responses in *Ucides cordatus* (Linnaeus, 1763) (Brachyura, Ucididae), as indicators of conservation status in mangrove areas from the Western Atlantic. Ecotoxicol. Environ. Saf., 133: 176-187.
- DUARTE, L. F. A., SOUZA, C. A., PEREIRA, C. D. S. & PINHEIRO, M. A. A. 2017. Metal toxicity assessment by sentinel species of mangroves: In situ case study integrating chemical and biomarkers analyses. Ecotoxicol. Environ. Saf., 145: 367-376.
- ESTES, J. A., HEITHAUS, M., MCCAULEY, D. J., RASHER, D. B. & WORM, B. 2016. Megafaunal impacts on structure and function of ocean ecosystems. Ann. Rev. Environ. Res., 41 (1): 83-116.
- FALCÃO, C. B. R., PINHEIRO, M. A. A., TORRES, R. A. & ADAM, M. L. 2020. Spatial-temporal genome damaging in the blue crab *Cardisoma guanhumi* as ecological indicators for monitoring tropical estuaries. Mar. Pollut. Bull., 156: 111232.
- FENECH, M. 2000. The in vitro micronucleus technique. Mut. Res./Fund. Mol. Mech. Mutagen., 455(1-2): 81-95.
- FLEMING, A. H., CLARK, C. T., CALAMBOKI-DIS, J. & BARLOW, J. 2016. Humpback whale diets respond to variance in ocean climate and ecosystem conditions in the California Current. Glob. Change Biol., 22: 1214-24.
- GAD, S.C. 2014. Glutathione. In: Encyclopedia of Toxicology. Elsevier, p. 751.
- GATISO, T. T., KULIK, L., BACHMANN, M., BONN, A., BÖSCH, L., FREYTAG, A., HEURICH, M., WESCHE, K., WINTER, M., ORDAZ-NÉMETH, I., SOP. T. & KÜHL, H. S. 2022. Sustainable protected areas: Synergies between biodiversity conservation and socio-economic development. People and Nature, (4): 893-903.
- GONZALEZ-HUNT, C. P., WADHWA, M. & SANDERS, L. H. 2018. DNA damage by oxidative stress: Measurement strategies for two genomes. Curr. Opinion Toxicol., 7: 87-94.
- GÜRKAN, S. E. 2022. Impact of Nickel Oxide Nanoparticles (NiO) on Oxidative Stress Biomarkers and Hemocyte Counts of *Mytilus galloprovincialis*. Biol. Trace Element Res., 1-13.
- HARCOURT, R., SEQUEIRA, A. M., ZHANG, X., ROQUET, F., KOMATSU, K., HEUPEL, M., ... & FEDAK, M. A. 2019. Animal-borne telemetry: an integral component of the ocean observing toolkit. Front. Marine Sci. 6: 326.
- HAUTON, C., HAWKINS, L. E. & HUTCHINSON, S. 1998. The use of neutral red retention assay to examine the effects of temperature and salinity on haemocytes of the European flat oyster *Ostrea edulis* (L). Comp. Biochem. Physiol. B, 119: 619-623.
- HAZEN, E. L., ABRAHMS, B., BRODIE, S., CARROLL, G., JACOX, M. G., SAVOCA, M. S., ... & BOGRAD, S. J. 2019. Marine top predators as climate and ecosystem sentinels. Front. Ecol. Environ., 17(10): 565-574.
- HO, C., ROBINSON, A., MILLER, D. & DAVIS, M. 2005. Overview of Sensors and Needs for Environmental Monitoring. Sensors, 5: 4-37.
- IMAM, R. S. 2019. Genotoxicity of monosodium glutamate: A review on its causes, consequences and prevention. Indian J. Pharmaceut. Educ. Resear., 53(4s): S510-517.
- JETZ, W., TERTITSKI, G., KAYS, R., MUELLER, U., WIKELSKI, M., AKESSON, S., ... &

- RAKHIMBERDIEV, E. 2022. Biological Earth observation with animal sensors. *Trends Ecol. Evol.*, 37(4): 293-298.
- KHAN, A., SICEN, L., KHAN, B. & SALMAN, N. 2021. On the influence of demographic structure and industrial growth on environmental quality. *J. Environ. Manag.*, 288: 112453.
- KIENZL, K., RISS, A., VOGEL, W., HACKL, J. & GOTZ, B. 2003. Bioindicators and biomonitoring for policy, legislation and administration, In: MARKERT, B. A., BREURE, A. M. & ZECHMEISTER, H. G. (eds.). *Trace Metals and other Contaminants in the Environment*. Elsevier, Chap 3: 85-122.
- KING, M. A. 2000. Detection of dead cells and measurement of cell killing by flow cytometry. *J. Immunol. Meth.*, 243: 155-166.
- KOAGOUW, W. & CIOCAN, C. 2018. Impact of metformin and increased temperature on blue mussels *Mytilus edulis*-evidence for synergism. *J. Shellfish Res.*, 37(3): 467-474.
- LAM, P. K. 2009. Use of biomarkers in environmental monitoring. *Ocean Coast. Manag.*, 52(7): 348-354.
- LEE, R.F. & STEINERT, S. 2003. Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. *Mut. Res./Rev. Mut. Res.*, 544(1): 43-64.
- LEITE, D. S. L., RIUL, P., DE FREITAS, N. D. A. & DE MIRANDA, G. E. C. 2020. Evaluation of the conservation status and monitoring proposal for the coastal reefs of Paraíba, Brazil: Bioindication as an environmental management tool. *Ocean Coast. Manag.*, 194: 105208.
- LEUNG, H. M., SUNG, K. C., YUE, P. Y. K., PENG, X. L., CHEUNG, K. C., AU, C. K., ... & LI, W. C. 2022. Characterization of Maize Cytochrome P450 Monooxygenases Induced in Response to 2,3,7,8 Tetrachlorodibenzodioxin: The Role of Indigenous Biomarkers in Environmental Monitoring of Contaminated Sites. PREPRINT (Version1) available at Research Square, 1-10. <<https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-1164167/v1>>.
- LIMA, A. R., TORRES, R. A., JACOBINA, U. P., PINHEIRO, M. A. A. & ADAM, M. L. 2019. Genomic damage in Mugil curema (Actinopterygii: Mugilidae) reveals the effects of intense urbanization on estuaries in northeastern Brazil. *Mar. Pollut. Bull.*, 138: 63-69.
- LIONETTO, M. G., CARICATO, R. & GIORDANO, M. E. 2021. Pollution biomarkers in the framework of marine biodiversity conservation: State of art and perspectives. *Water*, 13(13): 1847.
- LOWE, D. M. & PIPE, R. K. 1994. Contaminant induced lysosomal membrane damage in marine mussel digestive cells: an in vitro study. *Aquat. Toxicol.*, 30: 357-365.
- LUNDQUIST, C. J. & GRANER, E. F. 2005. Strategies for Successful Marine Conservation: Integrating Socioeconomic, Political, and Scientific Factors. *Conserv. Biol.*, 19: 1771-1778.
- MAGNUSSON, W. E. 2014. Uncertainty and the design of in-situ biodiversity-monitoring programs. *Nat. Conserv.*, 8: 77-94.
- MARTÍNEZ-GÓMEZ, C., BENEDICTO, J., CAMPILLOA, J. A. & MOORE, M. 2008. Application and evaluation of the neutral red retention (NRR) assay for lysosomal stability in mussel populations along the Iberian Mediterranean coast. *J. Environ. Monit.*, 10: 490-499.
- MAXWELL, S. L., CAZALIS, V., DUDLEY, N., HOFFMANN, M., RODRIGUES, A. S. L., STOLTON, S., VISCONTI, P., WOODLEY, S., KINGSTON, N., LEWIS, E., MARON, M., STRASSBURG, B. B. N., WENGER, A., JONAS, H. D., VENTER, O. & WATSON, J. E. M. 2020. Area-based conservation in the twenty-first century. *Nature*, 586: 217-227.
- MAYER, F. L., VERSTEEG, D. J., MCKEE, M. J., FOLMAR, L. C., GRANER, R. L., MCCUMBE, D. C. & RATTNER, B. A. 1992. Physiological and nonspecific biomarkers. In: HUGGETT, R. J., KIMERLE, R. A., MEHRLE, J. R. P. M. & BERGMAN, H. L. (eds.). *Biomarkers: Biochemical, Physiological, and Histological Markers of Anthropogenic Stress*. Lewis, Boca Raton, FL, USA, 125-153.
- MEDEIROS, L. C. C., DELUNARDO, F. A. C., SIMÕES, L. N., PAULINO, M. G., VARGAS, T. S., FERNANDES, M. N., ... & CHIPPARIGOMES, A. R. 2017. Water-soluble fraction of

- petroleum induces genotoxicity and morphological effects in fat snook (*Centropomus parallelus*). *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 144: 275-282.
- MILOSLAVICH, P., BAX, N. J., SIMMONS, S. E., KLEIN, E., APPELTANS, W., ABURTO-OROPEZA, O., ANDERSEN-GARCIA, M., BATTEN, S. D., BENEDETTI-CECCHI, L., CHECKLEY, D. M., CHIBA, S., DUFFY, J. E., DUNN, D. C., FISCHER, A., GUNN, J., KUDELA, R., MARSAC, F., MULLER-KARGER, F. E., OBURA, D. & SHIN, Y. 2018. Essential ocean variables for global sustained observations of biodiversity and ecosystem changes. *Global Change Biol.*, 24: 2416-2433.
- MISHRA, B., KUMAR, P., SARASWAT, C., CHAKRABORTY, S. & GAUTAM, A. 2021. Water Security in a Changing Environment: Concept, Challenges and Solutions. *Water*, 13, 490.
- MMA. 2022. Cadastro Nacional de Unidades de Conservação (CNUC). Disponível em: <<https://cnucc.mma.gov.br>>. Acesso em: 28 set. de 2022.
- MONCALEANO-NIÑO, A. M., GÓMEZ-CUBILLOS, M. C., LUNA-ACOSTA, A., VILLAMIL, L., CASSERES-RUIZ, S. & AHRENS, M. J. 2022. Monitoring metallothionein-like protein concentrations and cholinesterase activity in tropical cup oysters as biomarkers of exposure to metals and pesticides in the southern Caribbean, Colombia. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 29(17): 25157-25183.
- MOORE, M. N. 1985. Cellular response to pollutants. *Mar. Pollut. Bull.*, 16: 134-139.
- NAGARANI, N., KRISHNAVENI, G., DHARSHINI, V. D., MANOHARI, K. G., JEYAPANDI, M. A., MARIAPPAN, P. V., SANGEETHA, R. 2023. Biomarkers as ecological indices in monitoring the status of market fish. *The Journal of Basic and Applied Zoology*, 84: 2-6.
- NG, P. K. L., GUINOT, D. & DAVIE, P. J. 2008. *Systema Brachyurorum: Part I. An annotated checklist of extant brachyuran crabs of the world*. *The Raffles Bull. Zool.*, 17: 1-286.
- NICHOLS, J. & WILLIAMS, B. 2006. Monitoring for conservation. *Trends Ecol. Evol.*, 21: 668-673.
- OLIVEIRA, L. M. & RODRIGUES, J. J. 2011. Wireless Sensor Networks: a Survey on Environmental Monitoring. *JCM*, 6: 143-151.
- OROZCO-HERNÁNDEZ, J. M., GÓMEZ-OLIVÁN, L. M., ELIZALDE-VELÁZQUEZ, G. A., HEREDIA-GARCÍA, G., CARDOSO-VERA, J. D., DUBLÁN-GARCÍA, O., ISLAS-FLORES, H., SANJUAN-REYES, N. & GALAR-MARTÍNEZ, M. 2022. Effects of oxidative stress induced by environmental relevant concentrations of fluoxetine on the embryonic development on *Danio rerio*. *Sci. Total Environ.*, 807: 151048.
- PAQUIN, P. R., GORSUCH, J. W., APTE, S., BATTLE, G. E., BOWLES, K. C., CAMPBELL, P. G. C., DELOS, C. G., DI TORO, D. M., DWYER, R. L., GALVEZ, F., GENSEMER, R. W., GOSS, G. G., HOGSTRAND, C., JANSSEN, C. R., MCGEER, J. C., NADDY, R. B., PLAYLE, R. C., SANTORE, R. C., SCHNEIDER, U., STUBBLEFIELD, W. A., WOOD, C. M. & WU, K. B. 2002. The biotic ligand model: a historical overview. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 133: 3-35.
- PARRA, S., VARANDAS, S., SANTOS, D., FÉLIX, L., FERNANDES, L., CABECINHA, E., GAGO, J. & MONTEIRO, S. M. 2021. Multi-biomarker responses of Asian clam *Corbicula fluminea* (Bivalvia, Corbiculidea) to cadmium and microplastics pollutants. *Water*, 13: 394.
- PEREIRA, C. D. S., ABESSA, D. M. S., BAINY, A. C., ZARONI, L. P., GASPARRO, M. R., BÍCEGO, M. C., TANIGUCHI, S., FURLEY, T. H. & MOREIRA DE SOUSA, E. C. P. 2007. Integrated assessment of multilevel biomarker responses and chemical analysis in mussels from São Sebastião, São Paulo, Brazil. *Environ. Toxicol. Chem.*, 26(3): 462-469.
- PINHEIRO, M. A. A. 2012. Projeto Uçá III – Impacto genotóxico em populações de caranguejo-uçá, *Ucides cordatus* (Linnaeus, 1763) (Crustacea, Brachyura, Ucididae): Avaliação e correlação com a concentração de metais pesados em seis manguezais do Estado de São Paulo. São Vicente: UNESP / Campus Experimental do Litoral Paulista (CLP) – Relatório Científico Final FAPESP (Proc. nº 2009/14725-1), 153p.
- PINHEIRO, M. A. A., DUARTE, L. F. A., TOLE-

- DO, T. R., ADAM, M. L. & TORRES, R. A. 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.
- PINHEIRO, M. A. A., FISCARELLI, A. G. & HATTORI, G. Y. 2005. Growth of the mangrove crab *Ucides cordatus* (Brachyura, Ocypodidae). *J. Crust. Biol.*, 25(2): 293-301.
- PINHEIRO, M. A. A., KRIEGLER, N., SOUZA, C. A. & DUARTE, L. F. A. 2021. Feeding habit and lifestyle influence the baseline micronuclei frequency of crab species in pristine mangroves. *Wetlands*, 41: 30. <<https://doi.org/10.1007/s13157-021-01427-4>>.
- PINHEIRO, M. A. A., SOUZA, C. A., ZANOTTO, F. P., TORRES, R. A. & PEREIRA, C. D. S. 2017. The crab *Ucides cordatus* (Malacostraca, Decapoda, Brachyura) and other related taxa as environmental sentinels for assessment and monitoring of tropical mangroves from South America. In: LARRAMENDI, M. L. (ed.). *Ecotoxicology and Genotoxicology Non-traditional Aquatic Models. Issues in Toxicology n° 33*. London, Royal Society of Chemistry (RSC), chap. 10: 212-241.
- RANK, J., LEHTONEN, K. K., STRAND, J., LAURSEN, M. 2007. DNA damage, acetylcholinesterase activity and lysosomal stability in native and transplanted mussels (*Mytilus edulis*) in areas close to coastal chemical dumping sites in Denmark. *Aquat. Toxicol.*, 84: 50-61.
- RATHORE, S., VARSHNEY, A., MOHAN, S. & DAHIYA, P. 2022. An innovative approach of bioremediation in enzymatic degradation of xenobiotics. *Biotech. Gen. Eng. Rev.*, 38(1): 1-32.
- RODRIGUES, A. P. D. C., MACIEL, P. O., DA SILVA, L. P., ALBUQUERQUE, C., INÁCIO, A. F., FREIRE, M., LINDE, A. R., ALMOSNY, N. R. P., ANDREATA, J. V., BIDONE, E. D. & CASTILHOS, Z. C. 2010. Biomarkers for mercury exposure in tropical estuarine fish. *J. Braz. Soc. Ecotoxicol.*, 5(1): 9-18.
- ROJAS, E., LOPEZ, M. C. & VALVERDE, M. 1999. Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications. *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, 722 (1-2): 225-254.
- SARGSYAN, A., SIMONYAN, A., HOVHANISYAN, G., ARAKELYAN, M. & AROUTIOUNIAN, R. 2019. Application of the comet assay, micronucleus test and global DNA methylation analysis in *Darevskia* lizards as a sentinel organism for genotoxic monitoring of soil pollution. *Mut. Res./Gen. Toxicol. Environ. Mutagen.*, 842: 117-124.
- SCALON, M. C. S., RECHENMACHER, C., SIEBEL, A. M., KAYSER, M. L., RODRIGUES, M. T., MALUF, S. W., ... & SILVA, L. B. D. 2010. Evaluation of Sinos River water genotoxicity using the comet assay in fish. *Braz. J. Biol.*, 70: 1217-1222.
- SCHLENK, D. 1999. Necessity of defining biomarkers for use in ecological risk assessments. *Mar. Pollut. Bull.*, 39: 48-53.
- SEDEÑO-DÍAZ, J. E. & LÓPEZ-LÓPEZ, E. 2012. Fresh water fish as sentinel organism: from the molecular to the population level, a Review. In TURKER, H. (ed.). *New advances and contributions to fish biology*. InTech. Chap.: 4. <Doi: [10.5772/54825](https://doi.org/10.5772/54825)>.
- SERGIO, F., CARO, T., BROWN, D., CLUCAS, B., HUNTER, J., KETCHUM, J., MCHUGH, K. & HIRALDO, F. 2008. Top predators as conservation tools: ecological rationale, assumptions, and efficacy. *Ann. Rev. Ecol. Evol. System.*, 39: 1-19.
- SFORZINI, S., MOORE, M. N., OLIVERI, C., VOLTA, A., JHA, A., BANNI, M. & VIARENGO, A. 2018. Role of mTOR in autophagic and lysosomal reactions to environmental stressors in molluscs. *Aquat. Toxicol.*, 195:114-128.
- SHARMA, M., CHADHA, P. & SHARMA, P. C. R. 2021. Environmental biomonitoring using different biomarkers and their contribution in aquatic environmental research. *Inter. J. Fish. Aquat. Studies*, 9(5): 205-214.
- SILVA, C. C. & CRUZ, A. D. 2012. Genotoxicidade da triancinolona e do nitrato de prata em linfócitos utilizando o teste cometa. *Estudos*, 39 (2): 155-163.
- SILVEIRA, E. D. R., BENVINDO-SOUZA, M.,

- ASSIS, R. A., SANTOS, C. G. A., LIMA-AMORIM, N. P., BORGES, R. E., MELO, C. & SOUZA-SANTOS, L. R. 2022. Micronucleus and different nuclear abnormalities in wild birds in the Cerrado, Brazil. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 29: 14279-14287.
- SOMMER, S., BURACZEWSKA, I. & KRUSZEWSKI, M. 2020. Micronucleus assay: the state of art, and future directions. *Inter. J. Mol. Sci.*, 21(4): 1534.
- SOUTO, E. B., CAMPOS, J. R., DA ANA, R., MARTINS-GOMES, C., SILVA, A. M., SOUTO, S. B., LUCARINI, M., DURAZZO, A. & SANTINI, A. 2020. Ocular cell lines and genotoxicity assessment. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 17(6): 2046.
- SOUZA, C. A., DUARTE, L. F. A., ZANOTTO, F. P., ORTEGA, P., MOREIRA, R. G. & PINHEIRO, M. A. A. 2022. Seasonal effect on biomarker responses in sentinel species: innovation in mangrove conservation status assessment. *Environ. Monit. Assess.*, 194: 425.
- SPEIT, G. & HARTMANN, A. 1999. The Comet Assay (Single-Cell Gel Test), 203-2012. In: HENDERSON, D. S. (ed.). *DNA Repair Protocols. Methods in Molecular Biology*. New Jersey: Humana Press, 113: 642p.
- SPONCHIADO, G., ADAM, M. L., SILVA, C. D., SOLEY, B. S., DE MELLO-SAMPAYO, C., CABRINI, D. A., CORRER, C. J. & OTUKI, M. F. 2016. Quantitative genotoxicity assays for analysis of medicinal plants: A systematic review. *J. Ethnopharmacol.*, 178: 289-296.
- SRINIVAS, U. S., TAN, B. W., VELLAYAPPAN, B. A. & JEYASEKHARAN, A. D. 2019. ROS and the DNA damage response in cancer. *Redox Biol.*, 25: 101084.
- STANKEVIČIŪTĖ, M., JAKUBOWSKA, M., PAŽUSIENĖ, J., MAKARAS, T., OTREMBA, Z., URBAN-MALINGA, B., FEY, D. P., GRESZKIEWICZ, M., SAULIUTĖ, G., BARŠIENĖ, J. & ANDRULEWICZ, E. 2019. Genotoxic and cytotoxic effects of 50 Hz 1 mT electromagnetic field on larval rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), Baltic clam (*Limecola balthica*) and common ragworm (*Hediste diversicolor*). *Aquat. Toxicol.*, 208: 109-117.
- STEPHENS, A. D., LIU, P. Z., BANIGAN, E. J., ALMASSALHA, L. M., BACKMAN, V., ADAM, S. A., GOLDMAN, R. D. & MARKO, J. F. 2018. Chromatin histone modifications and rigidity affect nuclear morphology independent of lamins. *Mol. Biol. Cell*, 29(2): 220-233.
- SVENDSEN, C. 2000. Earthworm biomarkers in terrestrial ecosystems. Reading, UK. (Ph.D. Thesis, University of Reading).
- SVENDSEN, C., SPURGEON, D. J., HANKARD, P. K. & WEEKS, J. M. 2004. A review of lysosomal membrane stability measured by neutral red retention: is it a workable earthworm biomarker? *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 57(1): 20-29.
- SYDEMAN, W. J., POLOCZANSKA, E., REED, T. E. & THOMPSON, S. A. 2015. Climate change and marine vertebrates. *Sci.*, 350: 772-777.
- ULLO, S. L. & SINHA, G. R. 2020. Advances in Smart Environment Monitoring Systems Using IoT and Sensors. *Sensors*, 20: 3113.
- VIGNARDI, C. P., HASUE, F. M., SARTÓRIO, P. V., CARDOSO, C. M., MACHADO, A. S., PASSOS, M. J. A. C. R., SANTOS, T. C. A., NUCCI, J. M., HEWER, T. L. R., WATANABE, I. S., GOMES, V. & PHAN, N. V. 2015. Genotoxicity, potential cytotoxicity and cell uptake of titanium dioxide nanoparticles in the marine fish *Trachinotus carolinus* (Linnaeus, 1766). *Aquat. Toxicol.*, 158: 218-229.
- VIMAL, R., NAVARRO, L. M., JONES, Y., WOLF, F., LE-MOGUÉDEC, G. & RÉJOU-MÉCHAIN, M. 2021. The global distribution of protected areas management strategies and their complementarity for biodiversity conservation. *Biol. Conserv.*, 256: 109014.
- WEDDERBURN, J., CHEUNG, V., BAMBER, S., BLOXHAM, M. & DEPLEDGE, M. H. 1998. Biomarkers of biochemical and cellular stress in *Carcinus maenas*: an *in situ* field study. *Mar. Environ. Res.*, 46(1-5): 321-324.
- WEEKS, J. M. & SVENDSEN, C. 1996. Neutral red retention by lysosomes from earthworm (*Lumbricus rubellus*) coelomocytes: a simple biomarker of exposure to soil copper. *Environ. Toxicol. Chem.*, 15: 1801-1805.
- ZACHARIAS, M. A. & ROFF, J. C. 2001. Use of focal species in marine conservation and ma-

nagement: a review and critique. *Aquat. Conserv. Mar. Freshw. Ecosyst.*, 11(1): 59-76.

ZENG, Y, KOH, L. P. & WILCOVE, D. S. 2022. Gains in biodiversity conservation and ecosystem services from the expansion of the planet's protected areas. *Sci. Adv.*, 8: ea-  
bl9885.