

Análise das gônadas femininas de ouriços-do-mar antárticos *Sterechinus neumayeri* expostos à fração solúvel do petróleo (FSA)

**Vanessa Agüero Silva¹; José Roberto Machado Cunha da Silva²;
Andrews Krupinski Emerenciano²; João Carlos Shimada Borges^{1,3*}**

RESUMO - Em decorrência do crescimento da extração petrolífera, torna-se necessária a elaboração de novos mecanismos para o monitoramento de águas marinhas passíveis de contaminação. O ambiente antártico é ideal para a realização de testes relacionados aos bioindicadores, pois apresenta uma extensa área livre desse tipo de impacto ambiental. Assim, no verão de 2006, foram realizados experimentos com ouriços-do-mar antárticos (*Sterechinus neumayeri*) para a determinação de bioindicadores para a poluição petrolífera, objetivando-se determinar um bioindicador de baixo custo, de fácil obtenção e preciso para esse tipo de contaminação. Para isso as gônadas femininas de *S. neumayeri* expostos por 15 dias a diferentes concentrações da FSA (0,4; 0,8 e 1,2 ppm) foram analisadas por meio de técnicas histológicas específicas. No decorrer dos experimentos, observou-se que algumas fêmeas apresentavam suas gônadas escuras, mas nenhuma correlação à exposição com o petróleo foi estabelecida. Também não houve alterações histológicas decorrentes do efeito da FSA. Desse modo, conclui-se que as gônadas femininas de *S. neumayeri* não podem ser utilizadas como indicadoras da contaminação ocasionada pelo efeito agudo de exposição à FSA (15 dias). O presente estudo contribui para o monitoramento de contaminações petrolíferas.

Palavras-chave: Antártica, bioindicador, fagócitos nutritivos, ovócitos, poluição

Female gonads analysis of Antartic sea *Sterechinus neumayeri* exposed to soluble fraction of oil (FSA)

ABSTRACT - Due to the growth in oil extraction, products for the monitoring of marine waters where contamination may occur, become necessary. The Antarctic environment is ideal for the conduction of tests related to biomarkers, as it presents an extensive area free of this type of environmental impact. Experiments with Antarctic sea urchins (*Sterechinus neumayeri*) for the determination of biomarkers of oil pollution were conducted, aiming to determine a low cost, easy to obtain bioindicator for exactly this type of contamination. In order to do that, female gonads of *S. neumayeri* were exposed for 15 days to different concentrations of FSA (0.4, 0.8 and 1.2 ppm) and were analyzed by specific histological techniques. During the experiments, it was found that some females had dark gonads, but no correlation with exposure to oil was established. There were no histological alterations from the effect of the FSA. Thus, we concluded that female gonads of *S. neumayeri* cannot be used as indicators of contamination caused by the acute exposure to FSA (15 days). This project contributes to the monitoring of oil contamination.

Keywords: Antarctica, biomarker, nutritive phagocytes, oocytes, pollution.

¹Curso de Ciências Biológicas da Universidade Paulista - UNIP; ²Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento do ICB da Universidade de São Paulo - USP; ³Mestrado em Saúde Ambiental – Centro Universitário das Faculdades Metropolitanas Unidas, Rua Ministro Nelson Hungria, 541 Morumbi, CEP 05690-050, São Paulo/Brasil - jcborges@fmu.br - *Autor para correspondência

INTRODUÇÃO

Dado o exponencial aumento das ações antropogênicas impactantes ao ambiente marinho, a busca de ferramentas de baixo custo e eficazes para o seu monitoramento precisa ser contínua e na mesma proporção. Animais bentônicos, territorialistas e de baixa mobilidade podem ser ideais como bioindicadores ambientais, desde que possuam estruturas fáceis de serem identificadas e que possam indicar a intensidade do poluente. Os ouriços-do-mar são amplamente utilizados, devido a algumas vantagens, tais como: sua distribuição geográfica, abundância e fácil coleta, manuseio, manutenção em laboratório e obtenção de gametas (Bonfim 2005). Assim, são considerados excelentes bioindicadores de poluição marinha, como já demonstrado por diversos autores, tanto na fase de desenvolvimento embrionário, quanto na fase adulta (Davis et al. 1985, Chinchón et al. 2000, Hamdoun et al. 2002, Melo et al. 2003, Kobayashi; Okamura 2004). Geralmente são avaliados o índice de fecundação e eclosão dos ovos, o tempo de desenvolvimento larval, o diâmetro da larva e de seus apêndices, tal como bem descrito no artigo de Nunes e Jangoux (2007). Já nos ouriços adultos, pode-se avaliar o sistema imune, a maturidade das gônadas, as alterações comportamentais e a histologia de diferentes órgãos dessa classe. Borges e colaboradores (2010) evidenciaram o aumento quantitativo de uma estrutura intranuclear de células fagocíticas dessa espécie exposta a contaminantes petrolíferos.

O ambiente antártico, por possuir grande área livre de impactos, permite a realização de testes de bioindicadores sem interferências que possam alterar resultados e interpretações. Os ouriços-do-mar *Sterechinus neumayeri*, que vivem na Baía do Almirantado, situada na Ilha do Rei George, que por sua vez está na península Antártica, encontram-se “aparentemente” livres da ação antropogênica. De acordo Weber e Montone (2006), a análise de todos os dados a partir de 1989 a 2002 permitem concluir que o ambiente marinho próximo à Estação Antártica Comandante Ferraz, em 2006, era considerado como levemente contaminado por hidrocarbonetos aromáticos de petróleo, permitindo-se inferir que o habitat em que os ouriços do presente trabalho foram coletados estavam livres desse tipo de contaminação.

Nesse sentido, o presente trabalho pretende determinar um bioindicador de fácil obtenção, análise e baixo custo, tendo por objetivo verificar se gônadas de *S. neumayeri* fêmeas podem ser usadas como bioindicadores de contaminação petrolífera em ambiente marinho. Para isso, foram realizadas análises morfológicas das gônadas de animais expostos a concentrações de 0,4; 0,8 e 1,2 ppm da fração solúvel do petróleo, no período de 15 dias.

MATERIAIS E MÉTODOS

a) Colheita e manutenção dos animais

Os animais foram coletados durante a Expedição Antártica em frente à estação Comandante Ferraz no ano de 2006. Foram utilizados ouriços-do-mar (n=16), *S. neumayeri* (Meissner 1900), fêmeas, adultas, de volume aproximado de 50 ± 10 mL. Os parâmetros físico-químicos da água foram monitorados e mantidos de acordo com o encontrado no ambiente

natural: salinidade de 35‰, nitrito entre 0 e 0,1mg/L e temperatura de $0,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$. Os animais foram alimentados semanalmente com algas colhidas na mesma região de coleta.

b) Exposição à fração solúvel do petróleo (FSA)

O petróleo bruto foi cedido pelo centro petroquímico da Petrobrás do município de São Sebastião – SP – Brasil. A partir deste foram preparadas soluções de 100% FSA, de acordo com protocolo descrito por Anderson et al. (1974). Posteriormente, as soluções de FSA foram alíquotadas e adicionadas em caixas de 5 litros numa concentração final de 0,4; 0,8 e 1,2 ppm. As diferentes concentrações foram feitas em água marinha esterilizada, acondicionadas em frascos lacrados e resfriadas a $2 \pm 1^{\circ}\text{C}$, evitando-se assim a evaporação.

Os ouriços foram expostos por um período de 15 dias a diferentes concentrações de FSA (0,4; 0,8 e 1,2 ppm). Para cada concentração foram utilizados quatro animais, totalizando 16 animais no experimento todo. A água foi trocada a cada dois dias e meio (60 horas), totalizando 210 litros de água que, após o uso, foi exposta à evaporação em local apropriado na estação. A água restante da evaporação, juntamente com o material e as carcaças dos animais utilizados, foi entregue à Petrobras para o correto descarte.

c) Procedimentos gerais: anestesia e retirada das gônadas.

Todo e qualquer animal manipulado experimentalmente, para a observação da anatomia interna, foi previamente anestesiado por 15 minutos em uma solução de cloreto de magnésio (10%), dissolvido em água do mar artificial 35s (Forty Fathoms[®]) (Mangiaterra; Silva 2001).

Para extração das gônadas, os animais foram sacrificados e, logo em seguida, tiveram suas carapaças cuidadosamente serradas e abertas. As gônadas foram retiradas com o auxílio de pinças esterilizadas, acondicionadas em frascos com fixador (formol 4% salino) e armazenadas à 10°C para posterior processamento para histologia.

d) Processamento para microscopia óptica (MO)

Para análises histológicas, os fragmentos de gônadas fixados em formol 4% salino foram desidratados em concentrações crescentes de álcool etílico, seguido de diafanização em xilol e inclusão em resina. Com o material incluído, fez-se a microtomia obtendo-se cortes com espessura de 3 μm , que foram corados com: toluidina e fucsina, Perls para a quantificação de ferro, Sudan Black para quantificação de lipídios e coloração de PAS para quantificação de glicogênio. Após montadas, as lâminas foram analisadas e fotografadas em um fotomicroscópio Leica[®] (DM-1000).

Como controle positivo da coloração de Perls utilizou-se celomócitos de *Lytechinus variegatus* aderidos em lâmina de vidro, onde o cristalóide intranuclear pode ser observado após coloração.

e) Análise estatística

Para determinar diferenças quantitativas entre gônadas claras e escuras e entre gônadas proliferativas e maduras utilizou-se o teste T de Student não pareado.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com a análise sob microscopia de luz na objetiva de 10x visualizou-se os ovócitos em diferentes estágios, variando entre maturação e proliferação. A fase predominante foi de proliferação e uma pequena quantidade em fase de maturação (Figura 1).



Figura 1. Fotomicrografia do estágio do ciclo gametogênico em fêmeas de *S. neumayeri* em maturação (coloração de toluidina-fucsina)

A maioria dos estudos que avaliam a razão sexual dentro de *Echinoidea* observou que não existe diferença significativa na proporção sexual. Porém, Coppard e Campbell (2005) citam proporções diferentes (10:1 e 20:1) para animais coletados em Fiji e argumentam que o efeito de substâncias tóxicas no local de coleta deve ser a principal razão para os seus resultados. Nas coletas do presente estudo, observou-se a razão de 1:1, desse modo, sugerindo um ambiente livre de contaminantes.

Borges et al. (2010) demonstraram que ocorre aumento significativo da quantidade de cristais de ferro intranucleares nos celomócitos de *S. neumayeri* submetidos às mesmas concentrações de FSA do presente trabalho e também observaram a presença de gônadas escuras e claras nos animais experimentais; assim esperava-se que a cor estava relacionada à quantidade de cristaloides, corroborando com Delmas (1990), que descreve em *Paracentrotus lividus* a presença desses cristais no citoplasma dos fagócitos nutritivos (FN) e não no interior do núcleo como é observado normalmente no líquido celomático perivisceral. No entanto, não houve correlação com as águas contaminadas por FSA. Tanto os animais controle e expostos a FSA apresentaram gônadas claras e escuras, sem diferenças significativas. A quantidade total de

gônadas em proliferação foi maior significativamente em relação às maduras, mas demonstra ser apenas casualidade, uma vez que no controle também ocorre essa diferença. E, finalmente, não foram detectados os referidos cristaloides nas gônadas de fêmeas de *S. neumayeri* (Tabela 1 e Figuras 2, 3 e 4).

Tabela 1. Características morfológicas das gônadas de fêmeas de *S. neumayeri* mantidas por 15 dias em águas contaminadas por concentrações de 0; 0,4; 0,8 e 1,2 ppm de fração solúvel do petróleo (FSA) em água do mar

Características/concentração	0 ppm	0,4 ppm	0,8 ppm	1,2 ppm
Quantidade de gônadas claras	3	1	2	3
Quantidade de gônadas escuras	1	3	2	1
Quantidade de cristaloides de ferro	0	0	0	0
Quantidade de gônadas em proliferação	3	2	3	3
Quantidade de gônadas em maturação	1	2	1	1

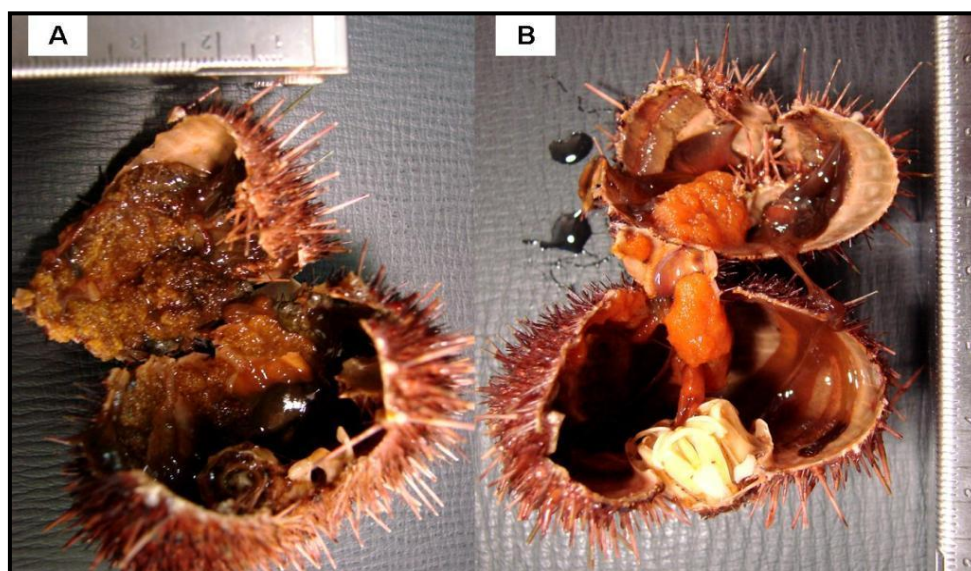


Figura 2. Diferentes colorações encontradas nas gônadas femininas de *S. neumayeri*, apresentando-se escuras (amarronzadas A) e claras (laranjas B)

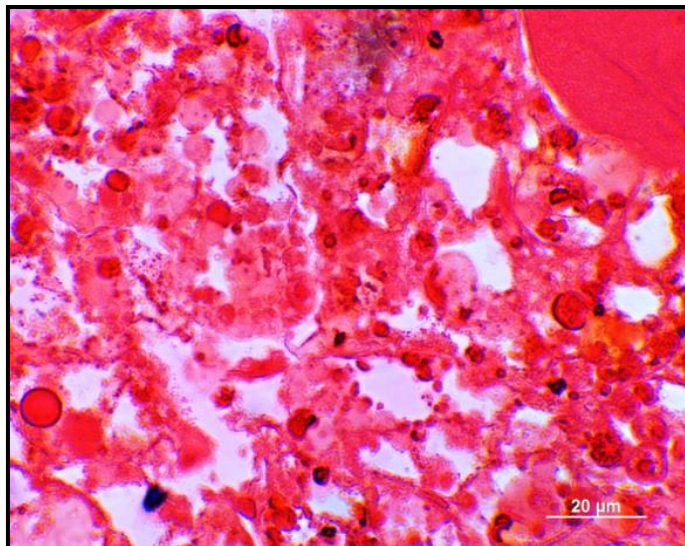


Figura 3. Fotomicrografia da gônada feminina do ouriço do mar *S. neumayeri* demonstrando que não há a presença de cristaloide de ferro (Historresina, coloração de Perls)

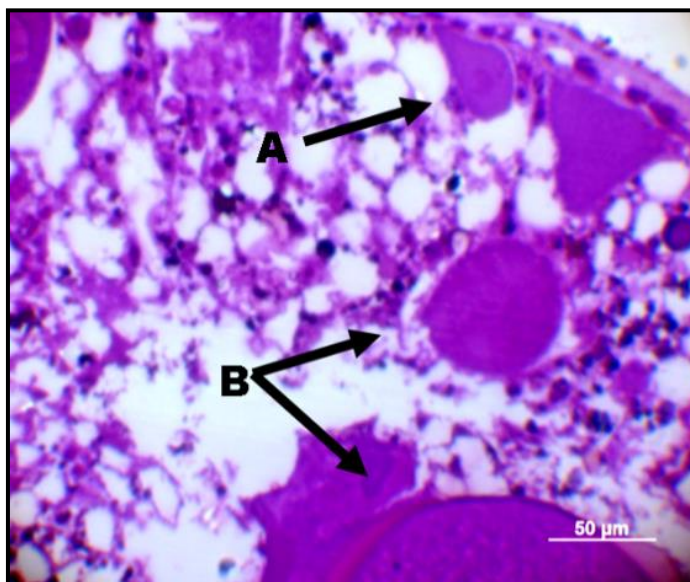


Figura 4. Fotomicrografia do estágio de maturação do ciclo gametogênico em fêmeas de *S. neumayeri*. A letra A indica um fagócito nutritivo (FN) aderido a um ovócito em estágio inicial de maturação e a letra B ovócitos em diferentes fases de maturação (coloração de Toluídina/Fuccina)

Brooks e Wessel (2002) descrevem a *MYP* (*major yolk protein*) como uma proteína da família das transferrinas, que transporta o ferro do intestino para as gônadas, sendo que tal transporte é realizado através dos celomócitos que contém o ferro no interior do seu núcleo sob a forma de cristaloide. Desse modo, com a coloração de Perls (ferrocianeto de potássio), esperava-se que grande quantidade de ferro seria identificada na forma associada a proteínas ou na forma de cristaloide. Esse corante reage com o ferro apresentando uma coloração azul escura e indica

que as quantidades de ferro estão presentes no cristal ou associadas a proteínas (Karasaki 1965, Mangiaterra; Silva 2001, Borges et al. 2005).

A morfologia dos cristaloides de ferro intranucleares é variável, existem espécies que possuem cristais esféricos, tal como *S. neumayeri*, e outras com cristais poliédricos como o *L. variegatus* (Borges et al. 2001). A forma esférica pode ser confundida com o núcleo celular ou com o nucléolo, indicando um falso positivo para a presença do ferro; porém o uso de um controle positivo, utilizando-se esfregaços de líquido celomático de *L. variegatus*, determinou a eficiência do corante e a certeza de que não havia ferro nas gônadas femininas de *S. neumayeri*.

A ausência do cristalóide esférico intracitoplasmático nos FN da gônada feminina leva a acreditar que o período de 15 dias seja insuficiente para as fêmeas alterarem o metabolismo desse íon, desregulando quantidades expressivas de ferro, diferentemente do encontrado para *Paracentrotus lividus* que era uma contaminação crônica, com altas concentração de ferro presente no esgoto (Delmas 1990).

De acordo Machado (2007), a proliferação é um estágio caracterizado pelo crescimento em tamanho e números dos ovócitos pré-vitelogênicos. As gônadas em proliferação contêm ovócitos vitelogênicos que estão em contato com a parede do ácino e estão cercados por FN que preenchem o lúmen. A maturação é um estágio em que a vitelogênese está em fase avançada, com o aumento dos ovócitos em número e tamanho. Com isso, há uma redução na presença dos FN que passam a ocupar uma posição periférica no ácino, enquanto os ovócitos migram para o centro do ácino. Alguns ovócitos pré-vitelogênicos são encontrados aderidos à parede do tecido gonadal, o que pressupõe que as mudanças na quantidade de FN dificultam o possível reconhecimento dos cristaloides esféricos intracitoplasmáticos do *S. neumayeri*.

CONCLUSÃO

Com base nos dados encontrados pode-se concluir que o tempo e/ou a concentração de FSA não foram suficientes para promover alterações macroscópicas e microscópicas nas gônadas de *S. neumayeri* fêmeas, e que esta espécie não apresentou quantidade significativa de cristaloides de intranuclear de ferro nas gônadas.

AGRADECIMENTOS

Os autores expressam seus agradecimentos ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq) pelo o apoio financeiro (Bolsa PIBIC e Auxílio à Pesquisa); à Marinha do Brasil e à Secretaria dos Recursos Interministeriais para os Recursos do Mar (SECIRM), pelo apoio logístico; à Petrobrás (TEBAR) pelo fornecendo o óleo; e ao Centro de Biologia Marinha da Universidade de São Paulo (CEBIMar-USP) pelo apoio nos experimentos pilotos.

REFERÊNCIAS

- Anderson JW, Neff JM, Cox BA, Tatem HE, Hightower GM. Characteristics of dispersions and water-soluble extracts of crude and refined oils their toxicity to estuarine crustaceans and Fish. Marine Biology, New York, USA, v. 27, p. 75-88, 1974.
- Bonfim CLL. Efeitos do fenol e 4-clorofenol sobre o desenvolvimento embrionário de *Echinometra lucunter* (LINNAEUS, 1758): Avaliação dessas substâncias como referência [dissertação]. Salvador: Universidade Federal Da Bahia; 2005.
- Borges JCS, Branco PC, Pressinotti LN, Silva JRMC. Intranuclear crystalloids of sea urchins as a biomarker for oil contamination, Polar Biol. 2010; 33:843-849.
- Borges JCS, Mangiaterra MBBCD, Silva JRMCS. Intranuclear iron bodies in tropical sea urchins (*Lytechinus variegatus* and *Equinometria lucunter*) and antarctic sea urchin (*sterechinus neumayeri*) phagocytic amoebocytes (PA). Acta Microscopica. 2001; 03(Suppl C): 263-264.
- Borges JCS, Jensch-Junior BE, Mangiaterra MBBCD, Garrido P, Silva JRMCS. Phagocytic amoebocyte sub populations in the perivisceral coelom of the sea urchin *Lytechinus variegatus* (Lamarck, 1816). J Exp Zool. 2005; 303(A): 241-248.
- Brooks JM, Wessel GM. The Major Yolk Protein in Sea Urchins Is a Transferrin-like, Iron Binding Protein. Developmental Biology. 2002; 245: 1–12.
- Chinchón S, Auernheimer C, Alastuey A, Gal S. Accumulation of Pb and Zn in sea Urchin Plates and Spines Related to their Different Crystalline Structure. Mar Pollut Bull. 2000; 40(7): 647-649.
- Coppard, SE, Campbell AC. Lunar periodicities of diadematid echinoids breeding-in-Fiji.-Coral Reefs. 2005; 24: 324-332.
- Davis PJ, Bragg J, Keough KM. Respiration of mitochondria from gonads of sea urchin, *Strongylocentrotus droebachiensis*: the effects of petroleum fractions on oxygen consumption. Comp Biochem Physiol C. 1985; 80(1):155-160.
- Delmas P. Bioaccumulation of iron-containing crystals in the gonads of the sea-urchin *Paracentrotus lividus* (Lam.): Ultrastructural study. C R Acad Sci Paris. Ser III.1990; 311(2): 69-74.
- Hamdoun, A. M.; Griffin F. J.; Cherr, G. N. Tolerance to biodegraded crude oil in marine invertebrate embryos and larvae is associated with expression of a multixenobiotic resistance transporter, Aquatic Toxicology, 61: 127–140, 2002.
- Karasaki S. Intranuclear crystal within the phagocytes of the ovary of *Arbacia punctulata*. J Cell Biol. 1965; 25(1): 654-660.
- Kobayashi N, Okamura H. Effects of heavy metals on sea urchin embryo development. 1. Tracing the cause by the effects. Chemosphere. 2004; 55: 1403–1412.
- Mangiaterra MBBCD, Silva JRMC. Induced inflammatory process in the sea urchin (*Lytechinus variegatus*). J Inv Biol. 2001; 120(2): 178-184.
- Machado AA. Descrição do ciclo gametogênico do ouriço-branco, *Tripneustes ventricus* (Lamarck, 1816), no Arquipélago de Fernando de Noronha PE [dissertação]. Natal: Universidade Federal do Rio Grande do Norte – UFRN; 2007.
- Melo LS, Ferreira GFA, Pimentel VM, Silva SL, Ferreira AQ, Fernandes MLB, Chaves AC. Avaliação molecular em ouriço do mar (*Equinometra lucunter*) como indicador da qualidade ambiental das praias do litoral Pernambucano. In: Anais da X Congresso Latinoamericano de

Ciencias del Mar - Las Ciencias Del Mar a Favor del Desarrollo de las Comunidades, 2003 sep 22-26; San José, Costa Rica. Costa Rica: X Congreso Latinoamericano de Ciencias del Mar; 2003.

Nunes CAP, Jangoux M. Larval growth and perimetamorphosis in the echinoid *Echinocardium cordatum* (Echinodermata): the spatangoid way to become a sea urchin. *Zoomorphology*. 2007; 126: 103 – 119.

WEBER, R. R.; MONTONE, R. C. (Coords.). Rede-2: Gerenciamento ambiental na Baía do Almirantado, Ilha Rei George, Antártica. Relatório Final da Rede-2. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, CNPq-PROANTAR, SECIRM, 2006; 261 p.