

OURIÇO-DO-MAR ANTÁRTICO (STERECHINUS NEUMAYERI) : UM BIOINDICADOR FRENTE À CONTAMINAÇÃO PETROLÍFERA

Paola Cristina Branco*
Leandro Nogueira Pressinotti**
José Roberto Machado Cunha da Silva***
Andréia Maria Martarello Gonçalves****
João Carlos Shimada Borges*****

RESUMO: As alterações ambientais causadas por poluentes diversos podem ser evidenciadas por estudos que utilizam a imunidade inata como indicador biológico, caracterizando o grau de impacto toxicológico sobre os organismos. Os ouriços-do-mar *Sterechinus neumayeri* são abundantes na Baía do Almirantado, Antártica e estão livres da ação da poluição, uma vez que a ação humana ainda é restrita nesta região. Os ouriços-do-mar adultos são bentônicos, ficam presos ao substrato marinho, ocupam um habitat restrito, pois possuem pequena capacidade de deslocamento e se aderem firmemente ao substrato. O presente trabalho teve como meta determinar um bioindicador para análises sensíveis a baixas concentrações de derivados do petróleo no meio marinho, através de protocolos de baixo custo que podem ser realizados em locais próximos ao de estudo, utilizando-se ouriços-do-mar expostos em diferentes concentrações de frações solúveis de petróleo em prazos determinados para analisar: a imunidade inata por meio de testes *in vitro* dos índices fagocíticos e a diferenciação celular sob microscopia óptica de luz. Concluindo-se que os núcleos celulares podem ser utilizados como bioindicadores de baixas concentrações para águas contaminadas por derivados do petróleo.

PALAVRAS-CHAVE: *Sterechinus neumayeri*. Bioindicadores. Cristalóide intranuclear. Petróleo.

* Aluna da Faculdade de Medicina Veterinária do Centro Universitário UniFMU.
Rua Gomes, 582 CEP 03275-010 São Paulo / SP. E-mail: paola_branco@yahoo.com.br

** Prof. MS. da Faculdade de Biologia da Universidade Estadual do Mato Grosso.

*** Prof. Dr. do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

**** Prof.^a Dr.^a da Faculdade de Medicina Veterinária do Centro Universitário UniFMU.

***** Prof. Dr. da Faculdade de Medicina Veterinária do Centro Universitário UniFMU.

Endereço: Faculdade de Medicina Veterinária. Centro Universitário UniFMU.

Av. Sto. Amaro, 1239. CEP: 04505-002 São Paulo / SP.

Recebido em: Setembro / 2007

Avaliado em: Novembro / 2007

ANTARCTIC SEA URCHIN (*STERECHINUS NEUMAYERI*): A BIOMARKER FOR OIL CONTAMINATION

ABSTRACT: The environmental changes caused by many pollutants can be evidenced through studies that use the innate immunity as a biological biomarker, characterizing the degree of toxicologic impact on the animals. Sea urchins *Sterechinus neumayeri* are abundant on the Admiralty Bay, Antarctica and they are free of pollution, once the human being's action is restricted at this region. Sea urchins are bentonic animals, they stay immovable on the marine substratum, they occupy a restrict habitat, because they own a small capacity of moving and they firmly adhere on the substratum. The present study aimed to determine a biomarker for analyzing small levels of oil derivatives on the marine environment, using cheap protocols that can be carried out next to the collect point, using for that, sea urchins exposed to different levels of soluble fraction of oil in determined periods of time in order to analyze: the innate immunity through *in vitro* tests of phagocytics rates and cell counting under light microscopic. Concluding that the cell's nucleus can be used as biomarkers of small levels for waters polluted by oil derivatives.

KEY WORDS: *Sterechinus neumayeri*. Biomarkers. Intranuclear crystalloid. Oil.

1 INTRODUÇÃO

O aumento da poluição ambiental decorrente das ações antrópicas exige o desenvolvimento de novas técnicas para prevenção e remediação dos danos gerados, bem como para a monitoração de determinado ambiente e previsão de futuros danos. Análises físicas, químicas e biológicas permitem a identificação e a mensuração de poluentes em um determinado ambiente. O interesse na adequação de metodologias envolvendo bioindicadores aquáticos apóia-se em vantagens de ordem prática e econômica. Livingstone (1993) considera como bioindicadores os fluídos corpóreos, as células ou os tecidos que indicam, em termos bioquímicos ou celulares, a presença de contaminantes. Também considera como bioindicadores as respostas fisiológicas, comportamentais ou energéticas dos organismos expostos. Existem assim biomarcadores moleculares, celulares ou sistêmicos, sendo alguns deles específicos para determinados poluentes.

São encontrados no líquido celomático de ouriços-do-mar, quatro tipos celulares: os amebócitos fagocíticos, tipo celular predominante que contém o cristalóide de ferro intranuclear; os esferulócitos incolores e vermelhos, células granulares; e as células vibráteis, que possuem flagelos (BOOLOOTIAN; GIESE, 1958; ENDEAN, 1966; BERTHEUSSEN; SELJELID, 1978; SMITH, 1981; CHIA; XING, 1996).

A presença do cristalóide de ferro intranuclear indica diferentes aspectos fisiológicos dos amebócitos fagocíticos. Esta estrutura é comum em todos equinóides regulares (HOBBAUS, 1978) e, acredita-se, está relacionada à retirada de metais pesados do organismo e à síntese de uréia (BACHMANN; GOLDSCHMID, 1978). Ocorrem variações morfológicas entre esses cristais de várias espécies (BORGES *et al*, 2001).

A análise desses cristalóides pelo método de Perls (MANGIATERRA; SILVA, 2001; BORGES *et al*, 2005) permite sua rápida quantificação e a mensuração, podendo-se, assim, evidenciar o impacto toxicológico sobre *S. neumayeri* e utilizar essa característica como um indicador biológico de alterações ambientais causadas por poluentes derivados de petróleo.

A contaminação por petróleo no mar se dispersa na coluna d'água e pode persistir em concentrações elevadas por longo tempo; quando ocorre a contaminação do sedimento, esse tempo torna-se ainda maior (LEE; PAGE, 1997). Muitos trabalhos descrevem os efeitos da fração solúvel de petróleo sobre os peixes e invertebrados marinhos, principalmente com enfoque no desenvolvimento embrionário, na fisiologia e em alterações do comportamento. (GENOFRE *et al* 1991a, 1991b; VASHCHENKO *et al* 1988).

A vantagem de se utilizar ouriços-do-mar adultos seria o comportamento territorial dessa espécie que se estabelece em regiões determinadas, possibilitando assim, a análise específica de micro regiões. O ouriço-do-mar é um excelente bioindicador de poluição marinha como já foi demonstrado por Kobayashi e Okamura, (2004)

tanto pelo desenvolvimento embrionário como pelo fato de conseguir capturar e armazenar metais pesados no seu esqueleto calcário (CHINCHÓN, *et. al.*, 2000).

De acordo com Hamdoum, Griffin e Cher (2002), os ouriços-do-mar que vivem em águas contaminadas por hidrocarbonetos (produto da degradação microbiana do petróleo), apresentaram alterações no seu desenvolvimento embrionário, que variava de acordo com os níveis de poluição, podendo ter seu desenvolvimento embrionário retardado em concentrações de hidrocarboneto relativamente pequenas ou até mesmo tê-lo completamente interrompido em altas concentrações deste mesmo poluente. King e Riddle (2001) demonstraram, quanto ao desenvolvimento embrionário, que o ouriço antártico *Sterechinus neumayeri* é mais sensível a exposição em meio contendo cobre e cádmio que ouriços tropicais e temperados, ou seja, os ouriços antárticos são levados à morte em concentrações menores de metais pesados enquanto que os ouriços de climas mais quentes resistem a concentrações maiores.

1.1 Objetivos

Este projeto teve como meta determinar um bioindicador para análises sensíveis a baixas concentrações de metais pesados no meio marinho, através de protocolos de baixo custo que podem ser realizados em locais próximos ao de estudo. Para isso, foram cumpridos os seguintes objetivos: análise da quantidade dos celomócitos do *Sterechinus neumayeri*; análise *in vitro* dos índices fagocíticos e a capacidade germicida dos amebócitos fagocíticos; análise da quantidade dos cristalóides de ferro intranuclear em amebócitos fagocíticos e caracterização das alterações ultraestruturais dos celomócitos sob microscopia eletrônica de transmissão. Todos os experimentos foram realizados por diferentes períodos de tempo (2, 5, 10 e 15 dias) e em diferentes concentrações de fração solúvel de petróleo (0,4; 0,8 e 1,2 ppm).

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Colheita dos Animais

Foram utilizados ouriços-do-mar (n=64), machos e fêmeas, adultos, de volume aproximado de 30 ± 5 ml da espécie *Sterechinus neumayeri* (Meissner, 1900). Os ouriços foram coletados, com botes e rede de arrasto em local próximo da Estação Antártica

mandante Ferraz (EACF), e aclimatados em caixas do módulo de triagem da EACF. A água foi trocada duas vezes por dia e foi utilizado o fotoperíodo natural.

2.2 Parâmetros físicos químicos da água do mar do biotério marinho

Foram monitorados salinidade e nitrito semanalmente e temperatura diariamente. O nitrito foi mantido entre 0 e 0,1 mg/l, a salinidade foi mantida à 34 ± 1 ‰ e a temperatura à $0,0 \pm 2,0$ °C.

2.3 Alimentação

Cada animal foi alimentado semanalmente *ad libitum* com algas marinhas colhidas na região com a mesma rede de arrasto utilizada no habitat dos ouriços-do-mar.

2.4 Preparação da fração solúvel do petróleo (FSA)

Amostras de 20 litros de petróleo bruto (petróleo Albacora da p 31) foram requisitadas ao centro petroquímico da Petrobrás do município de São Sebastião -SP - TEBAR e a partir deste prepararam-se soluções de 100% FSA, seguindo o protocolo de Anderson *et al* (1974) e analisadas por espectros de fluorescência em aparelho: SPEX *Fluorolog*, em modo síncronizado ($\Delta\lambda=10\text{nm}$) de excitação e emissão em ângulo reto. Os extratos de FSA foram dissolvidos em clorofórmio (NICODEM *et al*, 2001).

Posteriormente as soluções de FSA foram aliqüotadas em soluções iniciais para serem adicionadas em caixas de 5 litros em 10, 20 e 30% resultando em diferentes concentrações de, respectivamente, 0,4; 0,8 e 1,2 ppm, calculadas pelo método gravimétrico (NICODEM *et al*, 2001). Essas doses foram feitas em água marinha esterilizada, condicionadas em frascos lacrados e resfriadas a $2 \pm 1^\circ\text{C}$, evitando-se assim a evaporação e a ação bacteriana.

2.5 Exposição dos ouriços-do-mar a diferentes concentrações de petróleo

Os ouriços foram expostos por períodos de 2, 5, 10 e 15 dias a diferentes concentrações de frações solúveis de petróleo em caixas plásticas de 5 litros. Para cada concentração em determinado período foram utilizados 4 animais, totalizando em 16 animais por período e em 64 no experimento todo.

2.6 Anestesia

Todo e qualquer animal manipulado experimentalmente foi previamente anestesiado em uma solução de cloreto de magnésio (10%), dissolvido em água do mar artificial 35s (Forty Fathoms®), na quantidade de 1,5 litros por animal, sendo que cada um foi, antes do sacrifício, imerso na mesma por 15 minutos, em temperatura ambiente (SILVA; MENDES; MARIANO, 1995; MANGIATERRA; SILVA, 2001).

2.7 Procedimentos Gerais para Retirada do Líquido Celomático

A retirada de líquido celomático foi realizada com seringa de 1 ml com agulha 13x3,3 (12,7mmx0,33mm) via membrana peristomial (PLYTYCS; SELJELID, 1993) e transversalmente oposta à lanterna de Aristóteles.

2.8 Classificação dos Celomócitos

Após a retirada das amostras de líquido celomático de cada ouriço, uma fração de 0,1ml foi colocada sobre lâmina e coberta com lamínula para observação sob fotomicroscópio de contraste de fase (Carl Zeiss^â - Fotomicroscópio II). Com o auxílio da literatura existente para ouriços-do-mar (BERTHEUSSEN; SELJELID, 1978; SMITH, 1981; CHIA; XING, 1996), os celomócitos foram classificados em quatro tipos: amebócitos fagocíticos, esferulócitos vermelhos e incolores e células vibráteis.

2.9 Quantificação, pelo método de Perls, da Presença de Cristalóides de Ferro Intranucleares de Amebócitos Fagocíticos em contato com o fator quimiotático.

Utilizou-se o método de Perls, já usado em experimentos com celomócitos de equinodermes (BERTHEUSSEN; SELJELID, 1978; CANICATTI; D'ANCONA, 1989; MANGIATERRA; SILVA, 2001; BORGES *et al*, 2005), e classicamente para demonstrar a presença de ferro (BANCROFT e STEVENS, 1982). Por meio dessa técnica, o ferro adquire uma coloração azulada e as demais estruturas rosada, já que o contraste é feito com Safranina-O a 0,2%.

O método de Perls foi realizado em lâminas contendo os celomócitos já fixados em solução de McDowell a 4° C e modificada (glutaraldeído 4% e paraformaldeído 8% diluída em água do mar 34s).

2.10 Mensuração dos Cristalóides de Ferro Intranucleares

A mensuração dos cristalóides de ferro intranucleares foi realizada com auxílio dos programas Carl Zeiss KS 400.3 e Image J^Ò em no mínimo 100 cristalóides por prazo e por concentração de FSA (controle, 0,4; 0,8 e 1,2 ppm de FSA e expostos

a FSA por 2, 5, 10 e 15 dias). Nesta mensuração foram obtidos os valores de área.

2.11 Caracterização da Capacidade Fagocítica (CF), Índice Fagocítico (IF) e Capacidade Germicida (CG) dos Amebócitos Fagocíticos Frente a Leveduras (*Saccaromyces cerevisiae*) in vitro

Foi utilizado o protocolo de Silva *et al*, 2001 e Borges *et al*, 2002 para invertebrados antárticos. Dos mesmos animais que foram utilizados para a contagem de cristalóides, amostras (0,5ml) serão retiradas e depositadas sobre lâminas de vidro e em seguida foi adicionado o mesmo volume de suspensão de leveduras sobre as lâminas.

As lâminas contendo o líquido celomático com a suspensão de leveduras foram mantidas em câmara úmida por 60 minutos, sendo examinada logo em seguida ao término do prazo para cálculo dos seguintes índices:

Capacidade Fagocítica (CF), porcentagem das células fagocitando por tipo celular.

$$CF = \frac{\text{nº de celomócitos (por tipo) com levedura no interior}}{\text{nº de celomócitos (por tipo)}}$$

Índice Fagocítico (IF), número médio de leveduras no interior dos amebócitos fagocíticos

$$IF = \frac{\text{nº total de leveduras no interior dos amebócitos fagocíticos}}{\text{número de celomócitos fagocíticos}}$$

Capacidade Germicida (CG), porcentagem de leveduras mortas coradas com Brometo de Etídio (vermelho) no interior dos amebócitos fagocíticos em 25 leveduras contadas.

$$CG = \frac{\text{Quantidade de leveduras mortas} \times 100}{25 \text{ leveduras}}$$

2.12 Fixação e Processamento para Microscopia Eletrônica de Transmissão

Para o estudo ultra-estrutural dos celomócitos, a fixação foi feita em solução gelada de glutaraldeído a 2,5% em tampão fosfato 0.1M de pH 7,2 a 0°C (HAYAT, 1981), com fragmentos de cerca de 1 a 2 mm de espessura. A pós-fixação foi reali

zada com tetróxido de ósmio a 1% em tampão fosfato com sacarose por 2 horas a 4 °C. Em seguida, colocaremos os fragmentos por 24 horas em solução de acetato de uranila a 0.5% em água destilada com sacarose a 10,56 g por 100ml, a 4 °C. Depois da desidratação em soluções alcoólicas crescentes de 70% a 100%, seguem-se duas passagens pelo óxido de propileno puro durante 15 minutos cada, infiltração com óxido de propileno mais resina básica (Araldite) em partes iguais, durando 12 horas, com agitação em temperatura ambiente. Na seqüência, as peças serão incluídas em resina pura a 37 °C, depositadas em moldes e levadas à estufa a 70 °C, durante 3 dias. Para a microtomia de corte semi-fino, da ordem de 0,5 mm de espessura, empregamos o ultramicrótomo LKB Porter Blum MT-1; para cortes ultrafinos de aproximadamente 70 nm, utilizamos o ultramicrótomo LKB Porter Blum MT 2, cujos cortes foram coletados em telas de cobre, corados com acetato de uranila a 2% em água destilada durante 1 hora e lavados em água destilada durante 30 minutos. Para as análises das telas e obtenção de micrografias eletrônicas, utilizaremos os microscópios eletrônicos do Departamento de Histologia e Embriologia de instituição colaboradora (JEOL-100 CX-II).

2.13 Estatística

O modelo estatístico utilizado sobre os valores obtidos nas análises das quantificações de cristalóide de ferro intranuclear foi o teste t de student, duas amostras em par para médias com confiabilidade de 95% (Excel) e nas análises dos índices fagocíticos utilizou-se a análise de variância (BERQUÓ, 1981) através do programa computacional “GraphPad InStat” - Tukey-Kramer Multiple Comparisons Test (One-way Analysis of Variance (ANOVA)).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Preparação da fração solúvel do petróleo (FSA)

As análises foram feitas por fluorescência em modo síncrono. Pelo comprimento de luz pode-se afirmar que a FSA apresenta principalmente mono e diaromáticos (como benzeno, naftaleno e derivados), que são as moléculas menores (extremamente tóxicas) e mais solúveis em água. (FIG 1)

Segundo Martins et al, (2004) a análise de todos os dados a partir de 1989 a 2002, permitem concluir que o ambiente marinho próximo a Ferraz pode ser considerado apenas levemente contaminado por hidrocarbonetos aromáticos de petróleo (PAHs), permitindo inferir que os ambientes onde foram coletados os animais estavam livres de contaminação antropogênica

3.2 Classificação dos celomócitos

Na classificação dos celomócitos do ouriço-do-mar, observou-se a maior proporção de amebócitos fagocíticos, seguido por células vibráteis e esferulócitos vermelhos e incolores. Não foi observada diferença significativa entre as populações de células em nenhum período e nenhuma concentração estudada. A proporção de cada tipo de celomócitos do ouriço-do-mar Antártico concorda com os resultados obtidos por Bertheussen (1981) e Borges et al. (2002)

3.3 Quantificação, pelo método de Perls, da Presença de Cristalóides de Ferro Intranucleares de Amebócitos Fagocíticos em contato com o fator quimiotático.

Os resultados, obtidos referentes a quantificação de cristalóides de ferro de amebócitos fagocíticos dos ouriços-do-mar expostos a diferentes concentrações de fração solúvel do petróleo no período de exposição de 15 dias demonstram que houve um aumento numérico significativo dos cristais nos animais submetidos nas maiores concentrações ($p < 0,05$), no entanto, também observou-se uma diferença significativa na média geral de todos (TAB 1 e FIG 2 e 5).

Hobaus (1978), demonstrou a presença de 93,0%, 91,6% e 94,4% de cristalóides em amebócitos fagocíticos de *Arbacia lixula*, *Sphaeruchinus granularis* e *Paracentrotus lividus* respectivamente; o presente projeto obteve como resultado a presença de $71,51 \pm 1,34\%$ de cristalóides intranucleares em amebócitos fagocíticos de ouriços-do-mar não expostos à FSA e $80,16 \pm 4.35\%$ em animais expostos a 1,2 ppm de FSA. Estes resultados demonstram a importância do local de amostragem. Os números elevados obtidos por Hobaus (1978) podem ser decorrentes da contaminação ambiental comum ao Atlântico Norte, tal como Geyer, Freitag e Korte, (1984) que observaram que os PCBs possuem baixa solubilidade em água e assim depositam-se em organismos marinhos.

3.4 Mensuração dos Cristalóides de Ferro Intranucleares

Os cristalóides de ouriços-do-mar expostos a 1,2 ppm de FSA por 10 dias, apresentaram um aumento significativo ($p < 0,05$) quando comparados com animais expostos à mesma concentração de FSA por 2 dias. (TAB 2). Bachmann, Pohla, e Goldschimid, (1980) sugere que os cristalóides aumentam de tamanho após atividade fagocítica, como não houve diferença significativa nos índices fagocíticos no presente trabalho não se pode concluir uma relação direta entre atividade

fagocítica e variação na área dos cristais. O que se pode supor é que a qualidade e não a quantidade de elementos fagocitados influi no tamanho dos cristalóides. Assim sendo, pode-se afirmar que a presença de monoaromáticos e diaromáticos, tais como benzenos e naftalenos da FSA influem no metabolismo de íons ferro de ouriços-do-mar.

O fato dos cristalóides aumentarem em tamanho apenas no prazo de 15 dias sugere que esse fato ocorra em contaminações crônicas por petróleo, sendo, portanto, dependente do tempo que os ouriços-do-mar são expostos aos poluentes.

3.5 Caracterização da Capacidade Fagocítica (CF), Índice Fagocítico (IF) e Capacidade Germicida (CG) dos Amebócitos Fagocíticos Frente a Leveduras (*Saccaromyces cerevisiae*) *in vitro*.

Quanto aos índices fagocíticos houve uma redução nos valores, porém não significativa (TAB 3, 4 e 5 e FIG 3, 4 e 6), sendo assim pode-se afirmar que o estresse gerado pelo confinamento em áreas pequenas estimulou os índices fagocíticos, mas tal fato não prejudica os resultados obtidos neste projeto, pois as comparações realizadas entre caixas com e sem FSA mostraram repetibilidade, permitindo inferências sobre o efeito desses poluentes na fisiologia de *Sterechinus neumayeri*.

3.6 Microscopia Eletrônica de Transmissão

Quanto à microscopia eletrônica de transmissão, os resultados comprovam as análises de microscopia óptica com a coloração pelo método de Perls. O aumento do número de cristalóides é decorrente da fragmentação destes e posterior exocitose (FIG 7). Os resultados também estão de acordo com os obtidos por Delmas (1990) que descreve a presença desses cristais no citoplasma de amebócitos fagocíticos encontrados nas gônadas e não no interior do núcleo como é observado normalmente no líquido celomático perivisceral, em condições isenta de poluição.

Notou-se a presença de cristalóides no citoplasma em amebócitos fagocíticos de ouriços-do-mar expostos à FSA em concentrações de 0,8 e 1,2 ppm por 15 dias. Tais concentrações no prazo de 15 dias são as em que melhor se evidenciam as alterações nucleares. Estes dados indicam que as alterações celulares estão correlacionadas com a dose e o tempo de exposição ao petróleo tal como Radford *et al* (2000) observaram em hemócitos de tunicatos, em que a presença de vacúolos celulares são dose e tempo dependentes, confirmando, portanto, sua correlação com a exposição aos metais pesados.

4 CONCLUSÃO

Este trabalho demonstra pela primeira vez, que por meio de protocolos de baixo custo, os cristalóides de ferro de amebócitos fagocíticos do líquido celomático perivisceral de ouriços-do-mar podem ser utilizados como bioindicadores celulares para ambientes marinhos contaminados por derivados do petróleo em baixíssimas concentrações.

5 FIGURAS E TABELAS

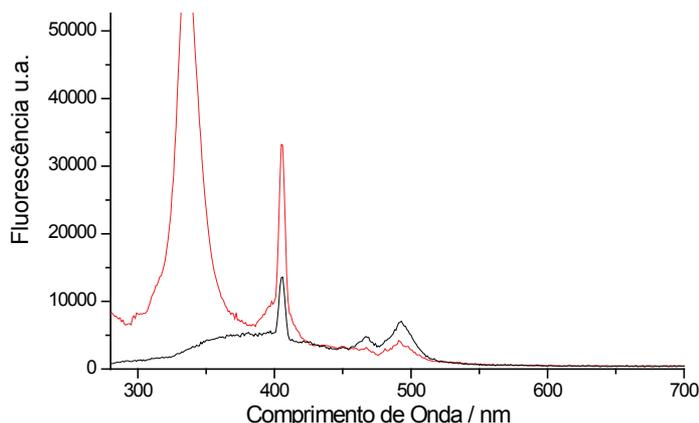


FIG 1: Espectros de fluorescência em modo síncrono* da água do mar contaminada com fração solúvel de petróleo (FSA) e água do mar não contaminada. (*Intervalo entre excitação e emissão $\Delta=10\text{nm}$)

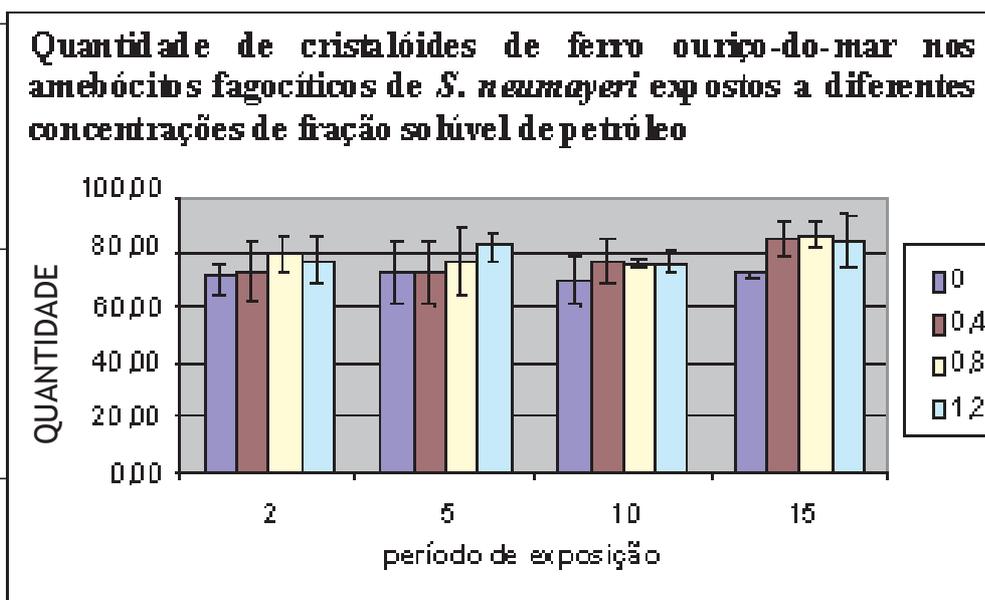
TAB 1. Quantidade de cristalóides de Amebócitos do Líquido Celomático de Ouriços-do-mar *Sterechinus neumayeri* expostos a diferentes concentrações de Fração Solúvel do Petróleo (FSA)

	0 ppm (0%)	0,4 ppm (10%)	0,8 ppm (20%)	1,2 ppm (30%)
02 dias (n=16)	70,93	73,25	78,98	77,00
Desv. Pad	5,51	10,34	6,61	8,72

05 dias (n=16)	73,10	71,85	77,00	81,88
Desv. Pad	10,56	11,00	11,71	4,48
10 dias (n=16)	70,00	77,25	76,00	76,25
Desv. Pad	8,16	8,14	1,41	4,35
15 dias (n=16)	72,00	84,33*	86,00**	85,50*
Desv. Pad	1,63	5,77	4,32	6,61
Média geral	71,51	76,67**	79,50***	80,16***
Desv. Pad.	1,34	5,59	4,51	4,35

15 dias: *0 vs 0,4 = P<0.05 / **0 vs 0,8 = P<0.01 / * 0 vs 1,2 = P<0.05

Média geral: **0 vs 0,4 = P<0.01 / *** 0 vs 0,8 = P<0.001 / *** 0 vs 1,2 = P<0.001



(0%) (10%) (20%) (30%)

02 dias (n=16)	0,978	0,967	1,041	0,905 *
Desv. Pad	0,759	0,443	0,748	0,701

FIG 2: Quantidade de cristalóides de Amebócitos Fagocíticos do Líquido Celomático de Ouriços-do-mar *Sterechinus neumayeri* expostos a diferentes concentrações de Fração Solúvel do Petróleo (FSA) em diferentes prazos (4 animais por concentração e 16 por período de exposição).

TAB 2. Área (μ^2) de cristalóides de Amebócitos Fagocíticos do Líquido Celomático de Ouriços-do-mar *Sterechinus neumayeri* expostos a diferentes concentrações de Fração Solúvel do Petróleo (FSA) em diferentes prazos

	0 ppm	0,4 ppm	0,8 ppm	1,2 ppm
05 dias (n=16)	1,138	1,149	1,208	1,287
Desv. Pad	0,861	0,976	0,861	0,898
10 dias (n=16)	1,106	1,247	1,258	1,350 *
Desv. Pad	0,891	1,009	0,932	0,923
15 dias (n=16)	1,143	0,987	0,904	1,160
Desv. Pad	1,022	0,811	0,680	0,872
Média geral	1,091	1,087	1,103	1,160
Desv. Pad.	0,077	0,809	0,161	0,872

* 1,2 ppm: 2 dias vs 10 dias = P<0,05

TAB 3. Capacidade Fagocítica (CF) de Amebócitos do Líquido Celomático de Ouriços-do-mar *Sterechinus neumayeri* expostos a diferentes concentrações de Fração Solúvel do Petróleo (FSA)

	0 ppm (0%)	0,4 ppm (10%)	0,8 ppm (20%)	1,2 ppm (30%)
02 dias (n=16)	33,50	31,75	30,73	32,93
05 dias (n=16)	31,25	40,21	45,15	42,37
10 dias (n=16)	29,94	45,24	30,07	20,98
15 dias (n=16)	23,67	29,32	26,54	24,14

Média	29,59	36,63	33,12	30,11
Desv. Pad.	4,21	7,39	8,23	9,61

TAB 4. Índice Fagocítico (IF) de Amebócitos do Líquido Celomático de Ouriços-do-mar *Sterechinus neumayeri* expostos a diferentes concentrações de Fração Solúvel do Petróleo (FSA)

	0 ppm (0%)	0,4 ppm (10%)	0,8 ppm (20%)	1,2 ppm (30%)
02 dias (n=16)	1,69	1,87	1,63	1,89
05 dias (n=16)	1,87	1,99	1,77	1,84
10 dias (n=16)	1,69	1,76	1,61	1,36
15 dias (n=16)	1,79	1,65	1,60	1,72
Média	1,76	1,82	1,65	1,70
Desv. Pad.	0,17	0,44	0,33	0,43

TAB 5. Capacidade Germicida (CG) de Amebócitos do Líquido Celomático de Ouriços-do-mar *Sterechinus neumayeri* expostos a diferentes concentrações de Fração Solúvel do Petróleo (FSA)

	0 ppm (0%)	0,4 ppm (10%)	0,8 ppm (20%)	1,2 ppm (30%)
02 dias (n=16)	48,97	37,40	46,53	28,11
05 dias (n=16)	27,65	23,13	29,39	30,79
10 dias (n=16)	32,00	32,45	35,34	26,48
15 dias (n=16)	34,18	25,59	17,50	33,63

Média	35,70	29,64	32,19	29,75
Desv. Pad.	9,25	6,50	12,10	3,14

Capacidade Fagocítica (CF) e Capacidade Germicida (CG) de Amebócitos provenientes de ouriços-do-mar *S. neumayeri* expostos a diferentes concentrações de fração solúvel de petróleo (FSA)

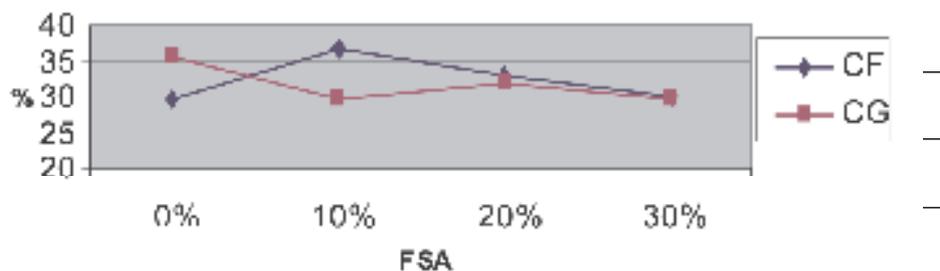


FIG 3: Capacidade Fagocítica (CF) e Capacidade Germicida (CG) de Amebócitos Fagocíticos do Líquido Celomático de Ouriços-do-mar *Sterechinus neumayeri* expostos a diferentes concentrações de Fração Solúvel do Petróleo (FSA)

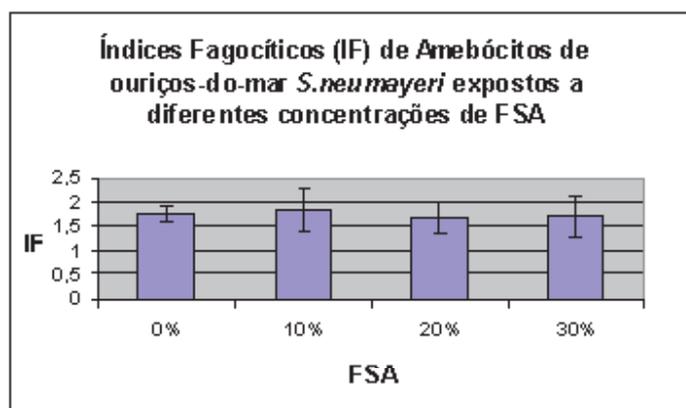


FIG 4: Índices Fagocíticos de Amebócitos Fagocíticos do Líquido Celomático de Ouriços-do-mar *Sterechinus neumayeri* expostos a diferentes concentrações de Fração Solúvel do Petróleo (FSA)

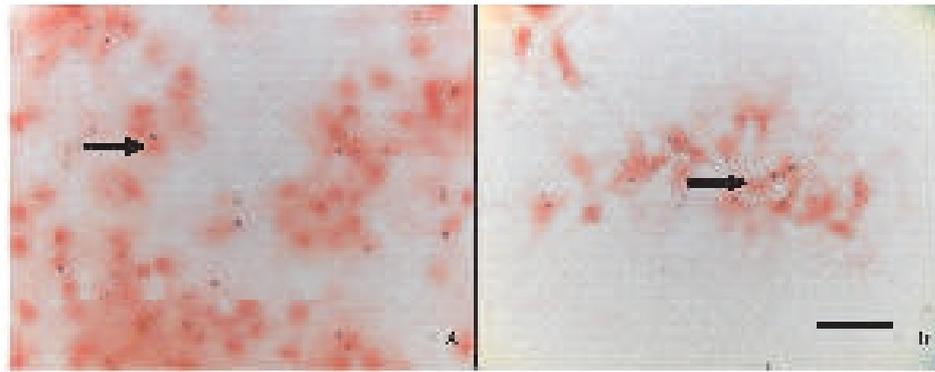


FIG 5: Fotomicrografia de amebócitos fagocíticos (AF) espalhados sobre lâmina de vidro. **A** Controle, 0 ppm FSA ocorre, em média, apenas um cristalóide (seta) por AF **B** 0,4 ppm FSA, os amebócitos fagocíticos apresentam mais de um cristalóide por AF (barra de escala = 40 μ m, coloração de Perls).

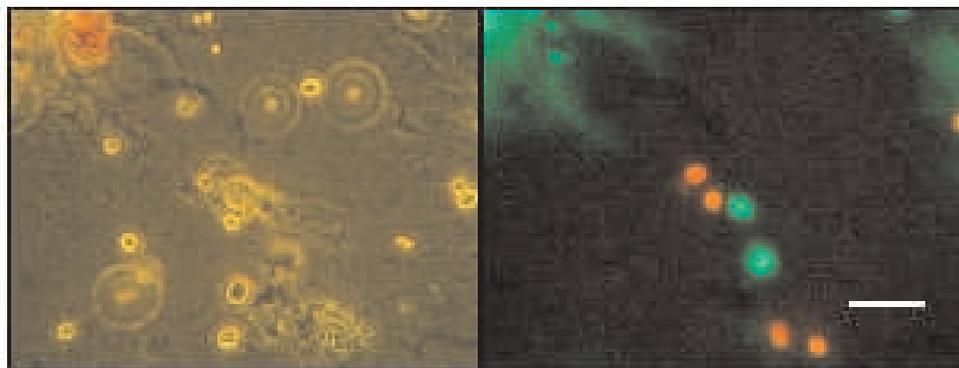


FIG 6: Fotomicrografia em microscopia de fase de amebócitos fagocíticos espalhados sobre a lâmina com leveduras internalizadas (barra de escala = 40 μ m). A cor verde indica leveduras vivas e a cor vermelha leveduras mortas .

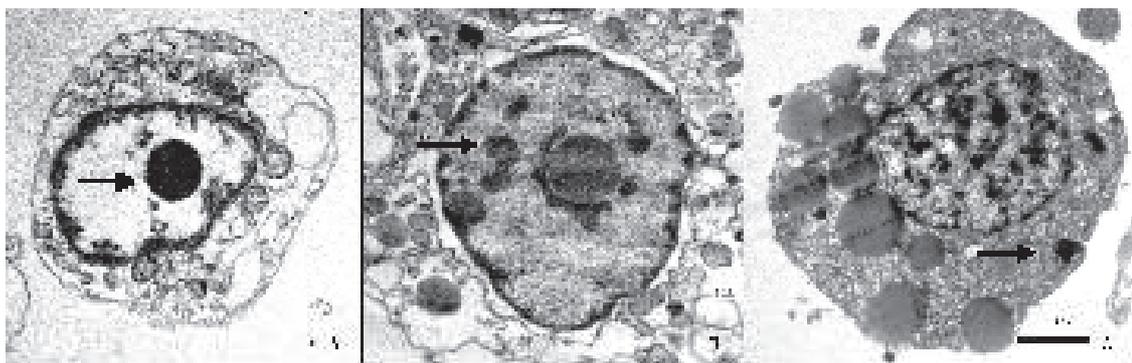


FIG 7: Elétron micrografia de amebócitos fagocíticos do líquido celomático perivisceral do ouriço-do-mar *Sterechinus neumayeri*. A cristalóide ferro em posição intranuclear (seta) em amebócito proveniente do grupo controle (0 ppm) B Cristalóide em posição citoplasmática, interiorizados em vacúolos em amebócito proveniente do grupo 0,8 ppm de FSA C cristalóides em posição citoplasmática em um amebócito proveniente do grupo experimental (1,2 ppm FSA) (aumento da eletromicrografia 10Ke barra de escala 10 µm)

AGRADECIMENTOS

Os autores gostariam de expressar seus agradecimentos ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq) pelo apoio financeiro, à Marinha do Brasil e Secretaria dos Recursos Interministeriais para os Recursos do Mar (SECIRM) e ao Programa Antártico Brasileiro (PROANTAR) pelo apoio logístico, à Petrobrás (TEBAR) pelo fornecimento do petróleo bruto e ao Centro de Biologia Marinha da Universidade de São Paulo (CEBIMAR - USP) pelo apoio aos experimentos pilotos.

REFERÊNCIAS

- ANDERSON, J.W.; NEFF, J.M.; COX, B.A.; TATEM, H.E.; HIGHTOWER, G.M. 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.
- BACHMANN, S.; GOLDSCHMID, A. Fine structure of the axial complex of *Sphaerechinus granularis* (Lam.) (Echinodermata: Echinoidea). **Cell Tissue Research**, New York, USA, v. 193, p. 107-123, 1978.
- BACHMANN, S.; POHLA, H.; GOLDSCHMID, A. Phagocytes in the axial complex of the sea urchin *Sphaerechinus granularis* (Lam.) - Fine structure and X-ray microanalysis. **Cell Tissue Research**, New York, USA, v. 31, p. 109-20, 1980.
- BANCROFT, J. D.; STEVENS, A. **Theory and practice of histological techniques**. 2 ed. London: Churchill, 1982. 662 p.
- BERQUÓ, E. S.; SOUZA, J. M. P.; GOTLIEB, S. L. D. **Bioestatística**. São Paulo: EPU, 1981. 350 p.
- BERTHEUSSEN, K.; SELJELID, R. Echinoid phagocytes *in vitro*. **Exp. Cell. Research**, Orlando, USA, v. 111, p. 401-12, 1978.
- BERTHEUSSEN, K. Endocytosis by echinoid phagocytes in vitro - Recognition of foreign matter. **Developmental and Comparative Immunology**, USA, v. 5, p. 241 - 250, 1981.
- BOOLOOTIAN, R. A.; GIESE, A. C. Coelomic corpuscles of echinoderms. **Biological Bulletin**, Woods Hole, MA, USA, v. 115, p. 53-63, 1958.

- BORGES, J.C.S.; MANGIATERRA, M.B.B.C.D; SILVA, J.R.M.C. Intranuclear iron bodies in tropical sea urchins (*Lytechinus variegatus* and *Equinometria lucunter*) and antartic sea urchin (*Sterechinus neumayeri*) phagocytic amoebocytes (PA). *Acta Microscópica*, Rio de Janeiro, v. 3, p. 263-264, 2001. Suplemento C.
- BORGES, J.C.S.; MANGIATERRA, M.B.B.C.D; PORTO-NETO, L. R; JENSCH JR, B.E.; SILVA, J.R.M.C. Phagocytosis *in vitro* and *in vivo* in the Antarctic Sea Urchin *Sterechinus neumayeri* (Meissner, 1900) at 0°C. *Polar Biology*, New York, USA, v. 25, p. 891-897, 2002.
- BORGES J.C.S.; JENSCH-JUNIOR B.E.; MANGIATERRA M.B.B.C.D.; GARRIDO P.; SILVA J.R.M.C.S. Phagocytic amoebocyte sub populations in the perivisceral coelom of the sea urchin *Lytechinus variegatus* (Lamarck, 1816). *Journal of Experimental Zoology*, Hoboken, NJ, USA, v. 303A, p. 241-248, 2005.
- CANICATTI, C.; D'ANCONA, G. Cellular aspects of *Holothuria polii* immune response. *Journal of Invertebrate Pathology*, Orlando, FL, USA, v. 53, p. 152-8, 1989.
- CHIA, F.; XING, J. Echinoderm Coelomocytes. *Zool Studies*, Taipei, Taiwan, v. 35, n. 4, p. 231-54, 1996.
- 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, *Marine Pollution Bulletin*, Orlando, FL, USA, v.40, n. 7, p. 647-649, 2000.
- 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*, Paris, France, 311, n. 2, p. 69-74, 1990.
- ENDEAN, R. The coelomocytes and coelomic fluids. In: *Physiology of Echinodermata*, New York: Interscience, 1966.
- GENOFRE, G. C.; MILALENO, E.; SENO, G.; SADOKOFF, L.; MAGEROWSKI, M. A.; Efeito do Petróleo no Mecanismo de Abertura e Fechamento da Cloaca de *Holothuria grisea* (echinodermata, holothuroidea) em diferentes salinidades, In: XVIII CONGRESSO BRASILEIRO DE ZOOLOGIA, *Resumos...* São Paulo, 1991a.
- GENOFRE, G. C.; COSTA, A C.; OLIVEIRA, F. C.; GABRIEL, J. B.; JUVENALE, M.; SERRANO, M.G.; Efeito do petróleo no reflexo de virar, da estrela-do-mar *echinaster brasiliensis* (echinodermata, stellerioidea, asteroidea), In: XVIII CONGRESSO BRASILEIRO DE ZOOLOGIA, *Resumos...* São Paulo, 1991b.
- GEYER H. ; FREITAG D.; KORTE F.; Polychlorinated biphenyls (PCBs) in the marine environment, particularly in the Mediterranean. *Ecotoxicol Environ Saf.*, Orlando, FL, USA, v. 8, n.2, p. 129-51, 1984.
- HAYAT, M. T. *Fixation for electron microscopy*. London: Academic Press, 1981, 437 p.
- HAMDOUM, A.M.; GRIFFIN, F.J.; CHER, G.N. Tolerance to biodegraded crude oil in marine invertebrate embryos and larvae is associated with expression of a multixenobiotic resistance transporter. *Aquat. Toxicol*, Orlando, FL, USA, v. 6, n.1-2, p. 127-140, 2002.
- HOBAUS, E. Studies on phagocytes of regular sea urchins (Echinoidea, Echinodermata) I- The occurrence of iron containing bodies within the nuclei of phagocytes. *Zool. Anz.*, Leipzig, Deutsch, v. 200, p. 31-40, 1978.

- KING C. K.; RIDDLE, M. J. Effects of metal contaminants on the development of the common Antarctic sea urchin *Sterechinus neumayeri* and comparisons of sensitivity with tropical and temperate echinoids. **Mar Ecol Prog Ser**, Oldendorf/Luhe, Germany, v. 215, p. 143-154, 2001.
- KOBAYASHI N.; OKAMURA, H. Effects of heavy metals on sea urchin embryo development. 1. Tracing the cause by the effects. **Chemosphere**, Orlando, FL, USA, v. 55, p. 1403-1412, 2004.
- LEE, R.F.; PAGE, D.S.; Petroleum hydrocarbons and their effects in subtidal regions after major oil spills. **Marine Pollution Bulletin**, Orlando, FL, USA, nov 1997.
- LIVINGSTONE, D. R. Biotechnology and pollution monitoring: use of molecular biomarker in the aquatic environment. **J. Chem. Tech. Biotechnol**, Hoboken, NJ, USA, v. 57, p.195-211, 1993.
- MANGIATERRA, M.B.B.C.D. e SILVA, J.R.M.C. Induced inflammatory process in the sea urchin (*Lytechinus variegatus*). **Journal of Invertebrate Biology**, Malden, USA, v. 120 n.2, p. 178-184, 2001.
- MARTINS, C. C.; BÍCEGO, M. C.; TANIGUCHI, S.; MONTONE, R. C. Aliphatic (Ahs) And Aromatic Hydrocarbons (Pahs) in surface sediments in admiralty bay, king George Island, Antarctica: a regional survey of organic contaminants resulting from human activity. **Antarctic Science**, Cambridge, UK, v. 16, n. 2, p. 117-122, 2004.
- NICODEM, D. E.; GUEDES, C. L. B.; FERNANDES, M. C. Z.; SEVERINO, D. ; CORREA, R. J.; COUTINHO, M. C.; SILVA, J. Photochemistry of petroleum. **Progress in Reaction Kinetics and Mechanism**, Oxford, UK, v. 26 n.2/3, p. 219-238, 2001.
- PLYTYCS, B.; SELJELID, R. Bacterial clearance by the sea urchin *Strongylocentrotus droebachiensis*. **Dev. Comp. Immunol**. Orlando, FL, USA, v. 17, p. 283-9, 1993.
- RADFORD, J.L.; HUTCHINSON, A.E.; BURANDT ,M.; RAFTOS, D.A. Effects of metal based environmental pollutants on tunicate hemocytes. **Journal of Invertebrate Pathology**, Orlando, FL, USA, v. 76, p. 242 - 248, 2000.
- SILVA, J.R.M.C.; MENDES, E. G.; MARIANO, M. Wound repair and graft rejection in the amphioxus (*Branchiostoma platyae*). **Journal of Invertebrate Pathology**, Orlando, FL, USA, v. 65, p. 147-51,1995.
- SILVA, J.R.M.C.; HERNADEZ-BLAZQUEZ, F.J.; PORTO-NETO, L. R; BORGES, J. C. S. Comparative study of in vivo and in vitro phagocytosis including germicidal capacity in *Odontaster validus* (Koehler) at 0oC - **Journal of Invertebrate Pathology**, Orlando, FL, USA, v. 77, p. 180-185, 2001.
- SMITH, V. J. Invertebrate blood cells In: RATCLIFF, N. A **The echinoderms**, London, UK, London: Academic Press, 1981, p. 513-62.
- VASHCHENKO, M.A.; DURKINA V. B.; GNEZDILOVA, S.M.; Effect of diesel fuel hydrocarbons and cadmium on the development of sea urchin progeny. **Ontogenez**, Wrentham, MA, USA, v. 19, n.1, p. 82-8, 1988.