

AVALIAÇÃO DO IMPACTO GENOTÓXICO EM *Ucides cordatus* (LINNAEUS, 1763) (CRUSTACEA, BRACHYURA, OCYPODIDAE) EM SISTEMAS DE MANGUEZAIS DO SUDESTE DO BRASIL

Toledo^{1,3}, T.R.; Torres^{2,3}, R.A.; Pinheiro^{1,3}, M.A.A.

¹ UNESP, Campus Experimental do Litoral Paulista (CLP) – Pç. Infante Dom Henrique, s/n. – 11330-900 – São Vicente (SP). ² Departamento de Zoologia, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) – Av. Prof. Moraes Rego, s/n – Cidade Universitária, Recife (PE) - 50670-420 – Recife (PE). ³ Grupo de Pesquisa em Biologia de Crustáceos (CRUSTA). tomas.rt@csv.unesp.br; rodriqortorres@ufpe.br; pinheiro@csv.unesp.br

RESUMO

O presente estudo visa diagnosticar o impacto genotóxico sobre o caranguejo *Ucides cordatus* (Linnaeus, 1763), em duas áreas de manguezal da Região Sudeste do Brasil, baseando-se na frequência de células micronucleadas. Foram capturados 10 exemplares da espécie em cada uma das regiões de manguezal (maior impacto = Cubatão; menor impacto = Estação Ecológica Juréia Itatins). Para cada exemplar foram preparadas três lâminas da hemolinfa, que depois de coradas foram examinadas sob sistema de análises de imagens por computador. Foram avaliadas 3.000 células por animal (aumento de 1.000X), e determinada a frequência de células micronucleadas. Os animais coletados em Cubatão apresentaram média de 5 células micronucleadas/1.000 analisadas (2,3 a 8,7 células micronucleadas/1.000), sendo 2,5 vezes superior a média obtida para a Juréia, que foi de 2 células micronucleadas/1.000 analisadas (0,3 a 3,7 micronúcleos/1.000 células). Os dados obtidos corroboram outros estudos “*in situ*”, que relatam como variação normal até quatro células micronucleadas/1.000 em espécies animais.

Palavras-chave: Genotoxicidade, Impacto Ambiental, Micronúcleos.

INTRODUÇÃO

Os micronúcleos são pequenas massas nucleares delimitadas por membrana e separadas do núcleo principal das células, sendo resultantes de fragmentos cromossômicos não incluídos no núcleo principal. Estas estruturas podem ocorrer nas células por danos causados ao DNA (p.ex., exposição a poluentes), sendo indicadores de deficiências citogenéticas e mutagênese. O uso desta técnica foi iniciado por Evans em 1959 (BURGEOT *et al.*, 1995), já tendo sido utilizado em análises de mutagênese de animais invertebrados (BRUNETTI *et al.*, 1988; SCARPATO *et al.*, 1990; WRISBERG *et al.*, 1992), peixes (CARRASCO *et al.*, 1990; WILLIAMS *et al.*, 1992), anfíbios (JAYLET *et al.*, 1986) e mamíferos (SHIMADA *et al.*, 1992).

Os ensaios de micronúcleo têm demonstrado grande sensibilidade como indicadores de danos cromossômicos e, devido a sua simplicidade, têm sido indicados para organismos marinhos (BURGEOT *et al.*, 1995). Essa técnica é recomendada para ensaios de genotoxicidade de rotina em locais aparentemente contaminados (STOPPER *et al.*, 1997), pois, segundo LIMA (2000), os poluentes podem provocar estímulos a estes organismos, exprimindo o efeito de fatores ambientais, sejam eles naturais ou de natureza antrópica.

Os macroinvertebrados bentônicos são organismos potenciais para uso como bio-indicadores, podendo refletir o estado de conservação ou degradação de um ecossistema (ESTEVES, 1988). Neste sentido, estudos realizados com camarões (*Palaemonetes* spp.) possibilitaram uma interessante abordagem da genotoxicidade em estuários nos Estados Unidos (KEY *et al.*, 2006).

A Baixada Santista é representada por nove municípios, sendo palco de expressiva intervenção humana, como é o caso do importante Pólo Industrial estabelecido em Cubatão. GUTBERLET (1996) menciona que a pesca no Rio Cubatão e nos manguezais dessa região era evitada pela população local, tendo em vista o estado contaminado dos peixes, que em sua maioria apresentava manchas na pele, cegueira e sabor desagradável. Por outro lado, existem áreas caracterizadas por preservação ambiental, como é o caso de algumas Unidades de Conservação (Estação Ecológica Juréia-Itatins), que tem sua flora e fauna protegida por legislação específica.

O presente estudo visa diagnosticar o impacto genotóxico sobre o caranguejo *Ucides cordatus* (Linnaeus, 1763), em duas áreas de manguezal da Região Sudeste do Brasil, baseando-se na frequência de células micronucleadas. Desta forma, pretende-se contribuir ao manejo “*in situ*” das

populações desta espécie, tendo em vista sua importância ecológica e uso como alimento humano em áreas costeiras, orientando condutas para sua conservação.

MATERIAIS E MÉTODOS

Local de Coleta – As coletas foram realizadas em duas áreas de manguezal, sendo uma delas pertencente ao Município de Cubatão (próxima ao Canal da COSIPA - 23°53' S e 46°22' W), e outra na Juréia (próxima ao Rio Verde - 24°25' S e 47°15' W). A escolha das mesmas teve o intuito de comparar uma área submetida à influência antrópica do tipo industrial (Cubatão), com outra detentora de preservação ambiental, por se tratar de uma Unidade de Conservação (Juréia).

Coleta dos Exemplos – Em cada área de manguezal foram coletados 10 exemplares de *Ucides cordatus* durante a maré baixa, utilizando o método direto (“braceamento”), dos quais foram obtidas amostras da hemolinfa para a verificação da incidência de células micronucleadas.

Amostras de hemolinfa e preparação das lâminas – A hemolinfa de cada exemplar foi coletada com seringas de 1mL, munidas de agulhas 21 gauge (0,8x40mm), sendo transferida para um tubo siliconizado e, em seguida, submetida à centrifugação. Aproximadamente 50•L de hemolinfa foram dispostos sobre lâminas de microscopia para a preparação dos esfregaços e, posteriormente, mantidas a temperatura ambiente (20-30 min) e imersas em metanol absoluto (6-8 min) para a fixação celular. A partir do material fixado, as lâminas foram coradas com solução Giemsa a 10%, em tampão fosfato pH 8,0 (Na₂HPO₄ + KH₂PO₄), por cerca de 20 minutos. Após este procedimento, as lâminas foram lavadas (água deionizada) e secas (temperatura ambiente). As lâminas foram examinadas sob sistema de análise de imagens acoplado a um microscópio óptico comum, sob aumento de 1.000X. A contagem das células micronucleadas foi efetuada com o programa KS-300® da Carl Zeiss®. Foram analisadas 3.000 células/animal, com o cálculo da frequência de células micronucleadas, totalizando 30.000 células para cada grupo amostral.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os animais coletados em Cubatão apresentaram média de 5 células micronucleadas/1.000 analisadas (2,3 a 8,7 células micronucleadas/1.000), sendo 2,5 vezes superior a média obtida para a Juréia, que foi de 2 células micronucleadas/1.000 analisadas (0,3 a 3,7 micronúcleos/1.000 células) (t=4,9; p<0,01). Os dados obtidos corroboram os de SCARPATO *et al.* (1990) e FOSSI *et al.* (2000), os quais definem valores iguais ou superiores a 4 micronúcleos/1.000 células analisadas como positivos para genotoxicidade, além de indicar a existência de impacto antrópico e comprometimento genético na população de *U. cordatus* dos manguezais de Cubatão. No entanto, NUDI (2005) não encontrou resultados significativos quando realizou este mesmo teste em exemplares de *U. cordatus* coletados nos manguezais da Baía de Guanabara (RJ), onde a impactação por hidrocarbonetos poliaromáticos foi evidente.

CONCLUSÕES

O presente estudo revela que o caranguejo *Ucides cordatus* pode ser utilizado com eficiência como bio-indicador de genotoxicidade em áreas de manguezal e os dados obtidos serem utilizados para fins de conservação e biomonitoramento ambiental. O uso do teste de micronúcleo é de fácil execução e apresentou ótimo resultado aplicado, indicando áreas sob o efeito de impacto antrópico industrial. Entretanto, testes complementares de natureza molecular devem ser utilizados em consorciação com este aqui apresentado, uma vez que pode existir uma associação positiva entre maior impacto genotóxico e uma significativa perda de variabilidade genética na espécie. Tal evidência se torna premente, pois reforçaria o quão ameaçadas se encontram as regiões de manguezais da costa brasileira, além de orientar e priorizar medidas de manejo e conservação destes ambientes.

REFERÊNCIAS

BRUNETTI, R.; MAJONE, F.; GOLA, I. & BELTRAME, C. 1998. The micronucleus test: Examples of application to marine ecology. **Marine Ecology and Progress Series**, 44: 65-68.
BURGEOT, T.; HIS, E. & GALGANI, F. 1995. The micronucleus assay in *Crassostrea gigas* for the detection of seawater genotoxicity. **Mutation Research**, 342: 125-140;

- 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. **Canadian Journal of Fishery and Aquatic Science**, 47: 2123-2136;
- ESTEVES, F.A. 1988. Fundamentos de Limnologia. **Rio de Janeiro: Interciência/FINEP**, 575p;
- FOSSI, M.C.; et al. 2000. Biomarker responses at different levels of biological organization in crabs (*Carcinus aestuarii*) experimentally exposed to benzo[a]pyrene. **Chemosphere**, 40: 861-874;
- GUTBERLET, J. 1996. Cubatão: Desenvolvimento, Exclusão Social e Degradação Ambiental. **Editora da Universidade de São Paulo, FAPESP**, 244p;
- JAYLET, A.; DEPARIS, P.; FERRIER, V.; GRINFELD, S. & SIBOULET, R. 1986. A new micronucleus test using peripheral blood erythrocytes of the newt 15 *Pleurodeles waltl* to detect mutagens in fresh water pollution. **Mutation Research**, 164: 245-257;
- KEY, P. B.; WIRTH, E. F.; FULTON, M. H. 2006. A Review of Grass Shrimp, *Palaemonetes* spp., as a Bioindicator of Anthropogenic Impacts. **Environmental Bioindicators**, 1 (2): 115-128;
- LIMA, J. S. 2000. Bioindicação e Biomonitoramento: Aspectos Bioquímicos e Morfológicos. **Tecnologia Hoje**. Instituto de Educação Tecnológica - IETEC, Belo Horizonte / MG, 11p;
- NUDI, A., H. 2005. Avaliação da contaminação de manguezais da Baía de Guanabara utilizando caranguejo *Ucides cordatus* como bioindicador de poluentes de petróleo e desenvolvimento de metodologia de análises. **Tese de Doutorado/ Puc-Rio**. 233p;
- SCARPATO, R.; MIGLIORE, L.; ALFINITO-COGNETTI, G. & BARALE, R. 1990. Induction of micronucleus in gill tissue of *Mytilus galloprovincialis* exposed to polluted marine waters. **Marine Pollution Bulletin**, 21(2): 74-80;
- SHIMADA, H.; SUZUKI, H.; ITOH, S.; HATTORI, C.; MATSURA, Y.; TADA, S. & WATANABE, C. 1992. The micronucleus test of benzo[a]pyrene with mouse and rat peripheral blood reticulocytes. **Mutation Research**, 278: 165-168;
- STOPPER, H.; MÜLLER, S., O.. 1997. Micronuclei as a Biological Endpoint for Genotoxicity: A Minireview. **Toxicology in Vitro**, 11: 661-667;
- WILLIAMS, R.C. & METCALFE, C.D. 1992. Developement of an in vivo hepatic micronucleus assay with rainbow trout. **Aquatic Toxicology**, 23: 193-202;
- WRISBERG, M.N.; BILBO, C.M. & SPLIID, H. 1992. Induction of micronuclei in hemocytes of *Mytilus edulis* and statistical analysis. **Ecotoxicology Environmental Safety**, 23: 191-205;