

UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA – UDESC

CENTRO DE CIÊNCIAS AGROVETERINÁRIAS - CAV

MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL

MARCUS VINICIUS MAXIMO

MÉTODOS DE COLETA DE GAMETAS E ESTOCAGEM DE ÓVULOS DE
OURIÇOS-DO-MAR USADOS EM ENSAIOS ECOTOXICOLÓGICOS

LAGES – SC

2012

MARCUS VINICIUS MAXIMO

MÉTODOS DE COLETA DE GAMETAS E ESTOCAGEM DE ÓVULOS DE
OURIÇOS-DO-MAR USADOS EM ENSAIOS ECOTOXICOLÓGICOS

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em
Ciência Animal, Área de Concentração em Produção
Animal, do Centro de Ciências Agroveterinárias da
Universidade do Estado de Santa Catarina (CAV-
UDESC), como requisito para obtenção de grau de
Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Alceu Mezzalira

Coorientador: Prof. Dr. CharriResgallaJunior

LAGES – SC

2012

MARCUS VINICIUS MAXIMO

MÉTODOS DE COLETA DE GAMETAS E ESTOCAGEM DE ÓVULOS DE
OURIÇOS-DO-MAR USADOS EM ENSAIOS ECOTOXICOLÓGICOS

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Ciência Animal, Área de Concentração em Produção Animal, do Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina (CAV-UDESC), como requisito para obtenção de grau de Mestre em Ciência Animal.

Banca Examinadora:

Professor Dr. Alceu Mezzalana
CAV/UDESC

Professor Dr. Marcos Luiz Pessatti
UNIVALI/SC

Professor Dr. Fabricio Desconzi Mozzaquatro
CAV/UDESC

Professor Dr. Thiago
CAV/UDESC

Lages, SC, Maio de 2012.

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária
Renata Weingärtner Rosa – CRB 228/14^a Região
(Biblioteca Setorial do CAV/UDESC)

Maximo, Marcus Vinicius
Métodos de coleta de gametas e estocagem de óvulos de ouriços-do-mar
usados em ensaios ecotoxicológicos / Marcus Vinicius Maximo ;
orientador: Alceu Mezzalana. – Lages, 2012.
37 f.

Inclui referências.
Dissertação (mestrado) – Centro de Ciências Agroveterinárias /
UDESC.

1. *Lytechinus variegatus* . 2. *Echinometra lucunter* . 3. *Arbacia lixula* .
4. Lidocaína. 5. Epinefrina. 6. Cloranfenicol. 7. Testes de toxicidade.
8. Estocagem. I. Título.

CDD – 636.08926

Dedico este trabalho a uma família cuja identidade jamais será conhecida, mas que no dia 09 de dezembro de 2011, em um momento de grande sofrimento, permitiu que os órgãos de seu ente querido fossem doados para dar nova vida a outras pessoas. Uma destas pessoas foi meu pai.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Alceu Mezzalira,

Por ter acreditado e aceitado o enorme desafio de orientar um trabalho tão diferente de sua área de atuação. Por ter estado a frente de todos os problemas burocráticos, em especial, por ter abraçado a causa e defende-la frente aqueles que outrora duvidaram que poderíamos fazer dar certo. Conseguimos!!!

São poucos os que tem a chance de receber a orientação de um pesquisador de renome como o prof. Alceu Mezzalira, eu fui um destes sortudos!!!

Meus mais sinceros e profundos agradecimentos. Muito Obrigado!

.....

Ao Dr. Charrid Resgalla Junior,

Pela primeira oportunidade e pelos mais de 10 anos seguintes de aprendizado e amizade. Por ter compartilhado todo seu conhecimento ao longo destes anos. Por ter sido fundamental na minha formação de carácter ético e profissional.

Daqui em diante me desprendo do Letox e trilho o meu próprio caminho, e o farei com a certeza de que coisa brilhantes virão pela frente. Muito Obrigado!

.....

Á minha esposa Juliana,

Por ter estar sempre ao meu lado e apoiar minhas escolhas. Por ser a mulher mais forte, determinada e incrível que eu conheço. Muito Obrigado!

.....

A todos os que contribuíram para que os objetivos deste trabalho fossem alcançados. Em especial a Joana Mezzalira, cujo as ótimas ideias resultaram no trabalho de indução com lidocaína. A Danielle Vieira e demais amigos do Letox, que deram todo o suporte para que os experimentos fossem realizados. Muito Obrigado!

.....

Por fim, aos meus pais, pilares fundamentais de minha existência. Muito Obrigado!

Muito Obrigado!

RESUMO

Embriões de ouriços-do-mar, de diversas espécies, têm sido amplamente utilizados em ensaios crônicos para estudos de impacto ambiental. No Brasil, apenas duas espécies são normatizadas para estes estudos, o que limita estes ensaios a poucos laboratórios, situados em regiões onde estas espécies ocorrem. Soma-se a isto à vulnerabilidade dos ouriços aos atuais métodos de obtenção de gametas, a sua sazonalidade, além do desperdício dos gametas obtidos. Isto gera dificuldades e limitações na utilização destes organismos em quaisquer áreas. Buscando solucionar ou pelo menos minimizar estes problemas, dois estudos foram conduzidos. No primeiro, buscou-se estabelecer um método eficaz e de baixa toxicidade para obtenção de gametas do ouriço-do-mar *Lytechinus variegatus*. Foi demonstrada a eficiência do emprego da lidocaína + epinefrina (CLE) na liberação de gametas, bem como a posterior sobrevivência dos ouriços. Comparou-se os métodos CLE e KCl para obtenção de gametas, avaliando-se ainda a sensibilidade dos embriões obtidos com esses gametas, aos testes de toxicidade com dicromato de potássio. Adicionalmente, foi avaliado o efeito da estação do ano (inverno e primavera) na obtenção dos gametas. Dos 125 ouriços injetados com CLE, 94 (73%) liberaram gametas viáveis e 98% sobreviveram ao processo. As taxas de liberação de gametas foram superiores a 80% com os dois métodos (CLE e KCl), no entanto maior taxa de sobrevivência ($P < 0,05$) foi observada com CLE (97,2%) em relação ao KCl (57,8%). Os embriões obtidos pelos dois métodos têm idêntica sensibilidade, frente aos testes de toxicidade. Observou-se melhor resposta dos ouriços na primavera (83,8%) em relação ao inverno (62,7%) ($P < 0,05$). O segundo estudo avaliou a adição de cloranfenicol para ampliar o tempo de viabilidade durante a estocagem dos óvulos das espécies *L. variegatus*, *E. lucunter* e *Arbacia lixula*, em água do mar natural ou artificial. Para isto, os óvulos destas espécies foram estocados em água do mar natural e em água do mar artificial, contendo 50 mg L^{-1} de cloranfenicol e incubados à 15°C , sem luz. A utilização de 50 mg L^{-1} de cloranfenicol em água do mar natural e artificial ampliou a viabilidade dos óvulos dos ouriços *L. variegatus*, *E. lucunter* e *A. lixula*, por até 12, 11 e 13 dias, respectivamente, possivelmente por evitar a proliferação bacteriana. Contudo o percentual diário de desovas viáveis diminuiu com o aumento do tempo de estocagem. Mesmo assim o percentual médio diário de larvas pluteu foi maior que 80% em todos os dias de estocagem para *L. variegatus* e *A. lixula*, e até o 6º dia para *E. lucunter*. Observou-se ainda, diariamente, baixos percentuais de ovos/óvulos e fragmentos, sendo que para *E. lucunter* e *A. lixula*, houve uma tendência ao aumento destas estruturas com o passar do tempo de estocagem. Em relação ao tipo de água empregado, a água do mar artificial foi mais efetiva na estocagem dos óvulos de *E. lucunter*, enquanto *A. lixula* e *L. variegatus* não sofreram influência da água do mar natural ou artificial. Embriões gerados a partir de óvulos estocados foram usados em ensaios de toxicidade com as substâncias de referência sulfato de zinco e dicromato de potássio, para comparar sua sensibilidade com a de embriões obtidos da natureza. Observou-se que os embriões obtidos a partir de óvulos estocados não alteram sua sensibilidade aos testes de toxicidade. Conclui-se que a indução artificial de gametas com CLE, bem como o uso de cloranfenicol durante a sua estocagem constituem importantes ferramentas para otimizar os gametas obtidos e desta forma manter e preservar estas espécies ouriços-do-mar.

Palavras Chave: *Lytechinus variegatus*; *Echinometra lucunter*; *Arbacia lixula*; lidocaína; epinefrina; cloranfenicol; testes de toxicidade; estocagem

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1 - Carta controle para o dicromato de potássio ($CE_{50} - mg.L^{-1}$) em testes de toxicidade embrio-larvais para embriões de *L. variegatus* obtidos com KCl (n=10 - 03/2010 a 03/2011) e CLE (n=6 - 05/2011 a 12/2011). Sendo: M = média e DP = desvio padrão14

CAPÍTULO 2

Figura 1 - Percentuais diários de desovas viáveis (A), percentuais médios diários de larvas pluteu (B), ovos/óvulos (C) e fragmentos (D) para óvulos do ouriço *L. variegatus* estocados em cloranfenicol a $50 mg L^{-1}$ dissolvido em água do mar natural.....25

Figura 2- Percentuais diários de desovas viáveis (A), percentuais médios diários de larvas pluteu (B), ovos/óvulos (C) e fragmentos (D) para óvulos do ouriço *E. lucunter* estocados em cloranfenicol a $50 mg L^{-1}$ dissolvido em água do mar natural (barras sólidas) e água do mar artificial (barras abertas).....26

Figura 3 -Percentuais diários de desovas viáveis (A), percentuais médios diários de larvas pluteu (B), ovos/óvulos (C) e fragmentos (D) para óvulos do ouriço *A. lixula* estocados em cloranfenicol a $50 mg L^{-1}$ dissolvido em água do mar natural (barras sólidas) e água do mar artificial (barras abertas).....27

Figura 4 - Carta controle para o dicromato de potássio (A) ($CE_{50} - mg.L^{-1}$) e sulfato de zinco (B) ($CE_{50} - mg.L^{-1}$) em testes de toxicidade embrio-larvais para embriões de *L. variegatus* não estocados (natureza) e embriões gerados a partir de óvulos estocados em cloranfenicol (desovas 1, 2 e 3). Sendo: M = média e DP = desvio padrão.....28

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Percentual de resposta, tempo inicial para liberação de gametas, relação de machos/fêmeas e sobrevivência de ouriços *Lytechinus variegatus* injetados com 2 mL de CLE (2,0 g em 100 mL de solução, contendo 2% de epinefrina).....**12**

Tabela 2: Tabela 2: Percentual de resposta e sobrevivência, tempo inicial de liberação de gametas e biometria (peso e diâmetro médio) de ouriços *L. variegatus* induzidos com 2 mL de CLE e 4 mL de KCl.....**13**

LISTA DE ABREVIATURAS

AA	Água do mar artificial
AN	Água do mar natural filtrada
CLE	Cloreto de lidocaína + Epinefrina
mg	Miligramas
°C	Graus celsius
KCl	Cloreto de potássio
M	Molar
min	Minutos
mL	Mililitro
mm	Milímetros
N ₂	Nitrogênio líquido
TSK	TrimmedSpermanKarber
µg	Micrograma
µL	Microlitro
χ^2	Qui-quadrado

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	2
2.1 CRONOLOGIA DO USO DO OURIÇO-DO-MAR COMO MODELO EXPERIMENTAL	2
2.2 OURIÇO-DO-MAR EM TESTES TOXICOLÓGICOS.....	2
2.3 OBTENÇÃO DOS GAMETAS DE OURIÇO-DO-MAR	3
2.4 PRESERVAÇÃO DE GAMETAS DE OURIÇO-DO-MAR	4
2.4.1 CONGELAMENTO	4
2.4.2 RESFRIAMENTO	6
3 CAPITULO 1	8
NOVA METODOLOGIA PARA OBTENÇÃO DE GAMETAS DO OURIÇO <i>LYTECHINUS</i>	
<i>VARIEGATUS</i> (ECHINODERMATA: ECHINOIDEA).....	8
RESUMO	8
3.1 INTRODUÇÃO.....	9
3.2. MATERIAIS E MÉTODOS	10
3.2.1 OBTENÇÃO E MANUTENÇÃO DOS OURIÇOS-DO-MAR.....	10
3.2.2 EXPERIMENTO 1 - INDUÇÃO DA LIBERAÇÃO DE GAMETAS COM LIDOCAÍNA	10
3.2.3 EXPERIMENTO 2 – COMPARAÇÃO ENTRE A INDUÇÃO COM CLE X KCL (ABNT, 2006).....	11
3.2.4 EXPERIMENTO 3 - TOXICIDADE DE CLE E TESTE DE SENSIBILIDADE COM SUBSTÂNCIA DE	
REFERÊNCIA	11
3.2.5 TRATAMENTO DOS DADOS	11
3.3 RESULTADOS	12
3.4 DISCUSSÃO	14
3.5 CONCLUSÕES.....	17
3.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁICAS.....	17
4 CAPÍTULO 2.....	19
ESTENDENDO A VIABILIDADE DE ÓVULOS DE OURIÇOS-DO-MAR COM ADIÇÃO DE	
CLORANFENICOL AO MEIO DE ESTOCAGEM.....	19
RESUMO	19
4.1 INTRODUÇÃO.....	20
4.2 MATERIAL E MÉTODOS	22
4.2.1 OBTENÇÃO DOS GAMETAS	22
4.2.2 PREPARO DO CLORANFENICOL	22
4.2.3 ESTOCAGEM EM ÁGUA DO MAR FILTRADA.....	22
4.2.4 ESTOCAGEM EM ÁGUA DO MAR ARTIFICIAL.....	23
4.2.5 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE	23
4.2.6 TESTES DE TOXICIDADE COM SUBSTÂNCIAS DE REFERENCIA	24

4.3 RESULTADOS	24
4.4 DISCUSSÃO	29
4.5 CONCLUSÕES	31
4.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	32
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS	33
6 BIBLIOGRAFIA TOTAL.....	35

1 INTRODUÇÃO

Ouriços-do-mar são historicamente empregados em estudos de biologia molecular, celular e na biologia do desenvolvimento (Bottger et al., 2004). As facilidades de coleta e manutenção em laboratório, associada ao sincronismo e transparência dos embriões, credenciam estes organismos como excelentes modelos biológicos. Atualmente, em todo o mundo embriões de ouriços-do-mar de diversas espécies tem sido amplamente utilizados em ensaios crônicos para estudos de impacto ambiental, devido principalmente a facilidades de execução, sensibilidade e reprodutibilidade.

No Brasil, estes testes crônicos tiveram início nos anos 1990, no entanto, apenas recentemente a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT, 2006) protocolou duas espécies para a execução de testes crônicos em todo o Brasil, *Lytechinus variegatus* e *Echinometralucunter*. Apesar de importante, esta regulamentação determina que em todo o Brasil a execução destes testes seja restrita a apenas estas duas espécies.

Este fato determinou uma grande pressão sobre estas espécies, já que sua retirada do meio não é acompanhada por estudos de impacto sobre a população natural. Também, o fato de ouriços-do-mar não possuírem dimorfismo sexual aparente, exige que a cada ensaio um grande número deles sejam coletados e induzidos, de forma a garantir a obtenção de ambos os gametas. Ainda mais preocupante é que sequer a sobrevivência dos organismos após indução é garantida (Hinegardner, 1969; Luis et al., 2005; Gago & Luis, 2011).

Soma-se a estes problemas as exigências das normas técnicas para ensaios crônicos com ouriços (USEPA, 2002; ABNT, 2006), que recomendam que sejam coletados espermatozoides e óvulos de pelo menos três organismos, afim de assegurar a qualidade do embriões para os ensaios. Com isto, grande parte do material biológico obtido, não é aproveitada, sendo simplesmente descartada.

Diferentes estudos vem sendo orientados buscando garantir a preservação destas espécies e principalmente buscando preservar os gametas obtidos. O congelamento, que poderia representar uma solução importante e definitiva, pouco evoluiu desde os trabalhos iniciais de Azahina et al. (1978). No entanto, técnicas de resfriamento mostraram-se úteis na ampliação da viabilidade de espermatozoides (Spiegler, 1995) e a prevenção da contaminação bacteriana do meio, mediante uso de antibióticos, demonstrou ter um efeito positivo na manutenção de óvulos.¹ Finalmente, um fator que determina o consumo de grande quantidade destes animais, a cada teste realizado, é a elevada letalidade dos atuais métodos de obtenção

¹Current Protocol for maintaining/storing ovulated sea urchin eggs
In: (<<http://www.stanford.edu/group/Urchin/protocol.html>>)

de gametas. Assim, estudos que ampliem os conhecimentos destas áreas, são necessários e devem ser estimulados.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Cronologia do uso do ouriço-do-mar como modelo experimental

Ouriços-do-mar vem sendo utilizados como modelos biológicos pela comunidade científica desde o século XVIII. Os estudos iniciais foram focados na anatomia, desenvolvimento e paleontologia. Em 1876, Hertwig&Fol (*apud* Gilbert, 2003, p. 122), após adicionar espermatozoides a óvulos do ouriço-do-mar *Toxopneusteslividus*, observaram a penetração espermática, bem como a união dos pró-núcleos masculino e feminino, verificando, pela primeira vez, a fecundação como o resultado da união do espermatozoide e óvulo.

A partir disto, diversos mecanismos da interação óvulo/espermatozoide na fecundação passaram a ser estudados em ouriços-do-mar. Vacquier *et al.* (1977), demonstraram o mecanismo espécie-específico de reconhecimento entre gametas de ouriços-do-mar. Ward *et al.*, 1985 *apud* Gilbert, 2003, p. 129), demonstraram a atração dos espermatozoides pelos óvulos, uma espécie de quimiotaxia espécie-específica. Mecanismos de prevenção da polispermia (Just, 1919 *apud* Gilbert, 2003, p. 142; Carrol&Epel, 1975 *apud* Gilbert, 2003, p. 142) e mecanismos de ativação do óvulo através de cascatas de liberação de cálcio (Epel, 1977) são outras importantes contribuições da utilização de gametas de ouriço-do-mar. Estes gametas também foram especialmente úteis no entendimento destes mesmos mecanismos em gametas de mamíferos, principalmente em humanos.

2.2 Ouriço-do-mar em testes toxicológicos

Mais recentemente, devido a alta sensibilidade de espermatozoides e embriões à agentes químicos (Nipper *et al.*, 1993; Dinne *et al.*, 1987; Hose, 1985), diversas espécies tem sido adequadas a metodologias para realização de estudos de impacto ambiental para fins litigiosos e de regulamentação (Máximo *et al.*, 2008). A metodologia consiste na exposição por períodos de 1 a 24 horas, de gametas e embriões de diferentes espécies de ouriços-do-mar

à amostras líquidas. Estes ensaios são extremamente úteis para avaliações rápidas da toxicidade de efluentes e produtos despejados em ambientes costeiros.

No Hemisfério Norte a Environment Canadá (1992) e Standard Methods (Clesceriet al. 1998) permitem que testes de toxicidade sejam feitos com diversas espécies de equinodermos. Já a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA, 2002) apresenta uma única espécie de ouriço-do-mar protocolada, mas permite que estes testes sejam feitos também com espécies não listadas.

No Brasil, a execução de ensaios com ouriços-do-mar foram originalmente estabelecidos pelo protocolo da CETESB (1992), mas somente em 2006, a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) regulamentou os procedimentos para duas espécies de ouriços: *Lytechinus variegatus* e *Echinometralucunter*. Esta nova regulamentação, mesmo aumentando as espécies utilizadas nos ensaios, acabou restringindo o uso de outras espécies de ocorrência local.

Na costa brasileira existe uma grande diversidade de echinodermatas, cerca de 329 espécies que possibilitam seu uso em testes de toxicidade (Tommasi, 1999). Laitano et al. (2008) compararam a sensibilidade da bolacha-do-mar *Mellitaquinkiesperforata* com as demais espécies de ouriços e observaram uma sensibilidade muito similar entre elas, com o uso de substâncias de referência. Também, Maximo et al. (2008) determinaram a sensibilidade do ouriço *Arbacialixula*, concluindo que esta espécie pode ser adicionada à lista de espécies de ouriços de uso em testes de toxicidade embrio-larval no Brasil.

2.3 Obtenção dos gametas de ouriço-do-mar

Em todo o mundo, ouriços-do-mar podem ser facilmente coletados, transportados e mantidos em laboratório. Em países como o Japão e Estados Unidos algumas espécies podem ser compradas diretamente de cultivadores. No entanto, por muitos anos, métodos pouco eficazes para obtenção de gametas foram um fator limitante ao uso destes organismos.

Inicialmente, a coleta de gametas se dava pela extrusão das gônadas, o que acabava ocasionando a morte dos ouriços. Além disso, poucos gametas viáveis eram obtidos. Outros métodos ainda compreendiam choques térmicos e de salinidade, que, da mesma forma, são pouco eficientes e extremamente danosos aos reprodutores. Recentemente, Gago & Luís (2011), utilizaram estes mesmos métodos na indução de ouriços da espécie *Paracentrotuslividus*, porém, ambos não foram capazes de estimular os ouriços a desovarem.

Na natureza, a liberação dos gametas é realizada pela contração de bandas musculares que estão diretamente sob o efeito estimulante de hormônios do nervo radial (Cochran&Enoelmann, 1972^{apud}Subramonian, 1982, p. 181). Em laboratório, Tyler (1949) conseguiu reproduzir este estímulo artificialmente, injetando cloreto de potássio (0,5 M) através da membrana perioral do ouriço, obtendo assim um método eficaz que permitia coletar grandes quantidades de gametas. Nos anos seguintes foram desenvolvidos métodos como a aplicação de choques de baixa voltagem (Iwata, 1950) e injeção de acetilcolina (Ivavata&Fukasa, 1964). Estes métodos ainda são utilizados, porém sem a mesma eficiência da injeção de KCl.

O desenvolvimento destes métodos para estimular a liberação de gametas impulsionou o uso de ouriços-do-mar em todo o mundo nos últimos 50 anos. Dentre eles, o mais eficaz e amplamente utilizado para a maioria das espécies continua sendo o KCl (0,5 M), que quando injetado, espalha-se pela cavidade celomática promovendo a contração das gônadas com a consequente liberação dos gametas. Entretanto o KCl é altamente tóxico para os ouriços-do-mar.

Hinegardner (1969), reportou que adultos da espécie *Lytechinus pictus* são mais aptos a sobreviver à indução com acetilcolina (0,1-0,2 M) do que com injeção de KCl. Da mesma forma, Tyler (1966) relata que poucos ouriços da espécie *Lytechinus pictus* sobreviveram mais que uma semana após serem induzidos com KCl. Recentemente, Luis *et al.* (2005) avaliou a sobrevivência de ouriços da espécie *Paracentrotus lividus* à injeção de 1 mL de KCl (0,5 M), sendo observado que apenas 30% dos organismos induzidos sobreviveram e puderam ser utilizados para re-indução. Gago & Luis (2011) também relatam altas taxas de mortalidade para esta mesma espécie em induções por KCl.

2.4 Preservação de gametas de ouriço-do-mar

2.4.1 Congelamento

Azahina *et al.* (1977) foram os primeiros a conseguir resultados satisfatórios ao congelar espermatozoides e embriões em estágio avançado de ouriços-do-mar, obtendo mais de 90% de viabilidade para ambos. Gwo (2000) apresenta uma revisão contendo cerca de 20 trabalhos com congelamento de espermatozoides de invertebrados marinhos (ouriços-do-mar, ostras, mexilhões e crustáceos) com taxas de fertilização que variam de 6% a 96%. Já Adams

et al. (2005) descreve que espermatozoides mesmo congelados apenas com água do mar, sem crioprotetor, mantiveram cerca de 50% de capacidade de fertilização.

Contudo, o sucesso dos protocolos de criopreservação para um tipo celular e de uma espécie em particular, nem sempre pode ser utilizado com outras espécies dada a grande variação interespecífica. Adams *et al.* (2005) testaram a capacidade de fertilização de espermatozoides não congelados e congelados em DMSO (5%), coletados de cinco diferentes machos da espécie *Evechinus chloroticus*, e observaram variação significativa na fertilização tanto em espermatozoides congelados quanto os não congelados, sugerindo que estas diferenças se devem aos diferentes estágios de maturação de cada indivíduo.

Em relação ao congelamento de embriões de ouriços-do-mar, existem publicações com diversos estágios larvais, porém, bons resultados são observados apenas em estágios mais avançados como blástula, gástrula (Asahina *et al.* 1978), prisma e pluteu (Adams *et al.* 2006). No entanto, não há resultados satisfatórios a cerca do congelamento de óvulos e ovos de ouriço-do-mar.

Segundo Piironen (1993) as curvas de congelamento são os principais fatores que causam danos as células. Se o congelamento for muito lento a concentração de solutos no meio extracelular aumentará, podendo chegar a uma concentração tal que a membrana celular entrará em colapso. No congelamento rápido a formação de cristais de gelo no meio intracelular pode danificar o material genético. Estes danos são geralmente causados entre -15°C a -50°C. Após este intervalo a temperatura pode ser abaixada rapidamente até a temperatura de estoque (-196 °C).

Uma vez congelado em nitrogênio líquido, o material biológico pode permanecer viável por tempo indeterminado. Contudo, o percentual de sucesso alcançado nestes protocolos varia muito não só em relação a espécie, mas principalmente ao tipo celular e estágio embrionário no qual se pretende congelar. Além disso, no casos de ouriços, os protocolos já desenvolvidos para óvulos e ovos, de diferentes espécies, dificilmente alcançam 50% de viabilidade após o descongelamento. Este baixo percentual de viabilidade obtido com os métodos atuais de congelamento, também não permite que estes embriões sejam utilizados em ensaios toxicológicos, pois, testes de toxicidade são validados quando são obtidos mais de 80% de larvas pluteu plenamente formadas no controle.

Paredes & Bellas (2010) tentaram criopreservar ovos de *Paracentrotus lividus* com a finalidade de utilizá-los em testes de toxicidade e obtiveram até 68% de viabilidade ao resfriarem os ovos até -35°C. Bellas & Paredes (2011), também com a mesma finalidade, congelaram embriões de *P. lividus* em estágios iniciais e tardios, mas obtiveram resultados

significativos apenas no congelamento de estágios tardios (blástulas), estágio que pode limitar o tempo de exposição dos organismos ao tóxico em ensaios ecotoxicológicos.

Deve-se considerar também que alterações na sensibilidade frente a tóxicos de referência, atrasos no desenvolvimento e demais efeitos causados pelo congelamento, ainda não foram esclarecidos e podem inviabilizar a utilização de ovos de ouriços criopreservados em ensaios toxicológicos. Desta forma, estender a viabilidade de óvulos e espermatozoides apenas por resfriamento, poderia ser uma alternativa viável ao congelamento.

2.4.2 Resfriamento

Estocar espermatozoides resfriados é uma prática já comum e consta basicamente em coletá-los com menor quantidade de água possível para evitar sua ativação e mantê-los resfriados (4 a 5°C). Spiegler *et al.* (1995), conseguiu facilmente manter espermatozoides de *Lytechinus pictus* resfriados em geladeira comum por até 12 dias sem que perdessem a capacidade de fertilização. O mesmo resultado foi obtido no Laboratório de Ecotoxicologia da Univali com espermatozoides de *Lytechinus variegatus* (dados não publicados).

Já óvulos, deterioram rapidamente logo após a desova em função da proliferação bacteriana proveniente de fontes variadas². A temperatura também é outro fator determinante na deterioração de óvulos. Spiegler *et al.* (1995) estocou óvulos de *L. pictus* entre 0 e 5°C e observou que poucos óvulos mantiveram-se viáveis por até 4 dias, mesmo assim com inúmeras anormalidades. Portanto, a combinação entre temperatura ótima de estocagem (± 15 °C) e uso de antibióticos no meio para suprimir o crescimento bacteriano, poderia estender o tempo de viabilidade dos óvulos. Em aquicultura, a utilização de antibióticos para controle de infecções bacterianas é comum em sistemas de larvicultura (Moriarty, 1998).

O uso de antibióticos como penicilina ou estreptomicina também é comum em culturas de embriões de ouriço-do-mar (Foltz *et al.*, 2004). Para óvulos, Epel² utilizando uma mistura entre dois antibióticos (sulfametoxazol e trimetropina), conseguiu estocar óvulos de *S. purpuratus* e *L. pictus*, por períodos de uma e três semanas, respectivamente, e observou, posteriormente, que a fecundação, clivagem e desenvolvimento embrionário até estágios avançados não diferiram do controle. Embora limitada a poucas semanas, a estocagem por resfriamento torna-se mais vantajosa que o congelamento por diversas razões: baixo custo; procedimentos simples e rápidos; possibilidade de maior quantidade de gametas estocados de

²Current Protocol for maintaining/storing ovulated sea urchin eggs
In: (<<http://www.stanford.edu/group/Urchin/protocol.html>>)

uma só vez; não altera o tempo de desenvolvimento embrio-larval e seu transporte é facilitado e mais seguro.

Desta forma, fica claro que existe a necessidade de se buscar formas de minimizar os problemas relacionados ao uso de ouriços-do-mar em ecotoxicologia. Com este enfoque, no presente estudo foram desenvolvidos dois trabalhos, com objetivos distintos. O primeiro trabalho teve como objetivo desenvolver um método eficaz e com baixa toxicidade para a indução artificial da liberação de gametas do ouriço-do-mar *Lytechinus variegatus*. O segundo trabalho teve como objetivo testar o emprego do antibiótico cloranfenicol, como agente capaz de impedir a proliferação bacteriana e com isto desenvolver uma técnica simples e eficaz para ampliar a viabilidade de óvulos dos ouriços *Lytechinus variegatus*, *Echinometralucunter* e *Arbacialixula*.

3 CAPITULO 1

Artigo a ser submetido a periódico internacional

Nova metodologia para obtenção de gametas do ouriço *Lytechinus variegatus* (Echinodermata: Echinoidea)

Marcus Vinicius Máximo, Joana Claudia Mezzalira, Lain Uriel Ohlweiler, CharridResgalla Jr., Alceu Mezzalira

RESUMO

A injeção de KCl (0,5 M) simula o efeito excitante do nervo radial, estimulando a liberação de gametas em ouriços-do-mar. Este método é amplamente utilizado em diversas espécies, porém possui uma alta toxicidade. Este estudo objetivou estabelecer um método eficaz e de baixa toxicidade para a liberação de gametas do ouriço-do-mar *Lytechinus variegatus*. Foi avaliada a eficiência da injeção de 2 mL de lidocaína + epinefrina (CLE) na liberação de gametas e sobrevivência dos indivíduos (experimento 1); a comparação entre a indução com CLE e KCl (experimento 2) e a sensibilidade dos embriões obtidos pelo método de CLE frente ao dicromato de potássio (experimento 3). Dos 125 ouriços injetados com CLE, 94 (73 %) liberaram gametas viáveis e 98% sobreviveram ao processo. Nos experimentos em que os dois protocolos (CLE ou KCl) foram comparados, ambos produziram taxas de liberação de gametas superiores a 80%. No entanto, maior taxa de sobrevivência foi observada com CLE (97,2%) em relação ao KCl (57,8%). No experimento 3, os valores de CE₅₀ para testes executados com embriões coletados com CLE indicam que a sensibilidade não foi alterada pelo método de indução. Observou-se ainda influencia das estações do ano nas respostas dos ouriços à indução com CLE, com menor taxa de indução (57,4 e 42,9%) durante o inverno, fora do período reprodutivo, em relação às realizadas na primavera (87,5 e 94,4%). Os dados permitem concluir que a injeção intraperistomal de 2 mL de lidocaína + epinefrina é eficiente na liberação de gametas do ouriço *Lytechinus variegatus*, não alterando a sensibilidade dos embriões gerados e proporciona maiores taxas de sobrevivência dos animais tratados, em relação ao método tradicional com KCl.

Palavras Chave: Ouriço-do-mar, indução, Cloridrato de lidocaína, KCl, *Lytechinus variegatus*

3.1 INTRODUÇÃO

Ovos e embriões de ouriços-do-mar historicamente são empregados em estudos de biologia molecular, celular e na biologia do desenvolvimento (Bottger et al., 2004). A facilidade de coleta e de manutenção em laboratório, associada ao sincronismo e transparência dos embriões, credenciam estes organismos como excelentes modelos biológicos.

Adicionalmente, a alta sensibilidade dos espermatozoides e dos embriões à ação de agentes químicos (Hose, 1985; Dinnel et al., 1987; Nipper et al., 1993), determinaram seu emprego em ensaios ecotoxicológicos em vários países, principalmente em estudos de impacto ambiental exigidos por órgãos ambientais (Máximo et al., 2008). O amplo emprego de ouriços-do-mar se deu pelas facilidades proporcionadas pelo emprego de métodos artificiais de obtenção de seus gametas.

Naturalmente, a liberação dos gametas ocorre pela contração de bandas musculares sob efeito estimulatório do nervo radial (Cochran & Enoelmann, 1972 *apud* Subramoniam, 1982). Já artificialmente, os métodos de obtenção de gametas compreendem a remoção das gônadas, a injeção de KCl através da membrana perioral (Tyler, 1949), o emprego de choques de temperatura e salinidade, o estímulo elétrico (Iwata, 1950) e injeções de acetilcolina (Ivata & Fukasa, 1964). A maioria destes métodos apresenta baixa eficiência e, geralmente, culminam com a morte de número significativo de indivíduos. Destes métodos o mais eficaz e amplamente utilizado para a maioria das espécies continua sendo o KCl (0,5 M), que quando injetado, espalha-se pela cavidade celomática, promovendo a contração das gônadas com a conseqüente liberação dos gametas

Entretanto, o KCl apresenta como inconveniente uma alta toxicidade para os ouriços-do-mar. Hinegardner (1969) reportou maior sobrevivência de ouriços da espécie *Lytechinus pictus* induzidos com acetilcolina (0,1-0,2 M) em comparação com a indução com KCl. Mais recentemente, baixa sobrevivência de ouriços da espécie *Paracentrotus lividus* induzidos com KCl foram reportadas por Luis *et al.* (2005) e Gago & Luis (2011).

Mesmo com as severas restrições atribuídas aos atuais métodos de obtenção de gametas em ouriços-do-mar, não existem trabalhos avaliando novas alternativas para obtenção de gametas, que permitam maior sobrevivência dos ouriços estimulados. Nosso grupo avaliou a ação de diferentes fármacos, como ocitocina, epinefrina, lidocaína e a associação de

lidocaína + epinefrina na indução da liberação de gametas do ouriço-do-mar (dados não publicados). Os dados preliminares sugeriram uma boa eficiência da associação de lidocaína + epinefrina, na liberação de gametas do ouriço *Lytechinus variegatus*, originando este estudo que teve como objetivo estabelecer um método eficaz e com baixa toxicidade para a indução artificial da liberação de gametas do ouriço-do-mar *L.variegatus*. Com este propósito, três experimentos foram conduzidos: 1) Avaliação da eficiência do anestésico cloridrato de lidocaína com 2% de epinefrina (CLE), na indução à liberação de gametas no ouriço-do-mar *Lytechinus variegatus*; 2) Comparação entre o método de CLE com o método tradicional de indução com KCl (0,5M) (ABNT, 2006); 3) Avaliação da sensibilidade de embriões obtidos a partir da indução com CLE, em testes de toxicidade com substância de referência dicromato de potássio. Adicionalmente, avaliou-se também a influência das estações do ano na resposta dos ouriços à indução com CLE.

3.2. MATERIAIS E MÉTODOS

3.2.1 Obtenção e manutenção dos ouriços-do-mar

Indivíduos adultos do ouriço-do-mar *Lytechinus variegatus* foram coletados, através de mergulho autônomo, nos meses de junho, julho e agosto (inverno) e outubro, novembro e dezembro (primavera) de 2011, no litoral norte do estado de Santa Catarina, no município de Bombinhas (latitude: 27°07'54" S; longitude: 48°31'40" W). Os ouriços foram transportados ao laboratório de Ecotoxicologia (CTTMar/Univali) e mantidos a 22°C em aquários de 20 litros com água do mar natural, salinidade de 32, aeração constante e fotoperíodo 12:12. A densidade foi de um organismo por litro de água do mar e a alimentação consistiu no oferecimento de macroalgas marinhas (*Sargassum sp.* e *Ulva fasciata*). O tempo máximo de manutenção antes das induções foi de uma semana. Após a indução a manutenção dos organismos constou na aspiração dos detritos a cada 48h e a renovação total da água do mar dos aquários uma vez por semana e por um período máximo de 30 dias, sendo os organismos sobreviventes devolvidos ao local de origem.

3.2.2 Experimento 1 - Indução da liberação de gametas com cloridrato de lidocaína + epinefrina 2% (CLE)

Este experimento foi conduzido tendo como base metodológica o protocolo tradicional com KCl (Tyler, 1949), porém utilizando-se 2 mL de uma solução de cloridrato de lidocaína contendo 2% de epinefrina (CLE). Esta dose foi determinada em pré experimentos (dados não

publicados) onde foram avaliadas doses de 1 a 6 mL, observando-se um aumento da mortalidade a partir do emprego de 2,0 mL. Foram realizadas 6 rotinas durante os meses de junho a dezembro de 2011 (inverno / primavera). A injeção dos 2 mL de lidocaína (CLE) foi realizada na membrana perioral, com auxílio de uma agulha de insulina 13 gauge, seguido de agitação suave do ouriço, para permitir a dispersão do CLE por toda a cavidade celomática. Os animais foram então transferidos para bandejas, sendo avaliada a resposta e o tempo até o início da liberação dos gametas. Concluído o procedimento, os ouriços foram mantidos em aquários por períodos entre 14 e 30 dias para avaliação da sua sobrevivência.

3.2.3 Experimento 2 – Comparação entre a indução com CLE x KCl (ABNT, 2006)

O experimento foi conduzido nos meses de novembro e dezembro de 2011 (primavera), com ouriços (n=68) coletados e mantidos nas condições previamente descritas. Os ouriços foram pesados, separados por classes de peso e de forma equitativa alocados em um dos dois grupos experimentais (KCl e CLE). Os volumes injetados foram de 4 mL/ouriço de KCl (0,5 M) segundo ABNT (2006) e 2 mL/ouriço de CLE. Após a indução, os ouriços foram mantidos em aquários por períodos entre 7 e 30 dias para avaliação da sua sobrevivência.

3.2.4 Experimento 3 - Toxicidade de CLE e teste de sensibilidade com substância de referência

Este experimento avaliou a sensibilidade dos embriões produzidos com gametas obtidos por indução com CLE, frente a diferentes concentrações (10; 5; 2,5; 1,25; 0,62 e 0,31 mg/L) do tóxico de referência dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$). Os testes foram executados segundo norma da ABNT (2006). Cada diluição, mais o controle, foram preparados em frascos de 15 mL, com 10 mL de solução teste, adicionados de \pm 400 ovos de *L. variegatus*, incubados à temperatura de 25°C, em 4 réplicas. O tempo de teste foi de 24 horas com fotoperíodo de 12:12. O teste foi finalizado com adição de formol a 4% e a validação se deu pela observação de mais de 80% de larvas pluteu plenamente formadas em uma sub-amostra do controle. A avaliação do teste consistiu da quantificação de 100 larvas de cada réplica em câmara de Sedwick-Rafter, com dois critérios: larva pluteu atrasada e normal.

3.2.5 Tratamento dos dados

No experimento 1 foram realizados apenas dados descritivos da indução com CLE, sem comparações estatísticas. No experimento 2, os dados foram submetidos ao teste Qui quadrado, com nível de significância de 5%, onde foram comparados os percentuais de

desova e sobrevivência obtidos pelos métodos CLE e KCl. No experimento 3, os valores de CE_{50} (Concentração Efetiva Mediana) foram estimados pelo método Trimmed-Spearman-Karber, utilizando-se o programa TSK versão 1.5 (EPA, Cincinnati, Ohio). A comparação entre a sensibilidade de embriões obtidos por ambos os métodos de indução (CLE e KCl) foi realizada mediante elaboração de uma carta controle de sensibilidade para o dicromato de potássio (ABNT, 2006). Para a elaboração desta, foram utilizados dez valores de CE_{50} , obtidos a partir de testes de toxicidade com embriões obtidos pela indução com KCl (03/2010 a 03/2011) e seis valores de CE_{50} para embriões obtidos com CLE (05/2011 a 12/2011).

3.3 RESULTADOS

No primeiro experimento, dos 125 ouriços *Lytechinus variegatus* injetados com 2 mL de CLE na membrana perioral, 94 (75 % \pm 19,38) responderam rapidamente (média de 2:13 \pm 1:15 minutos) ao estímulo, liberando gametas viáveis (Tabela 1). A estação do ano influencia as respostas à indução com CLE, sendo observados menores percentuais médios de resposta (62,7%) no inverno, fora da época reprodutiva de *L. variegatus*, em relação aos obtidos na primavera (83,8% $P < 0,05$). Os maiores percentuais de resposta, 87,5 e 94,4 %, foram observados na primavera, época mais favorável à reprodução desta espécie (Tabela 1). Dos ouriços injetados, 98% sobreviveram ao processo, não sendo observadas diferenças em relação a estação do ano (inverno ou primavera).

Tabela 1: Percentual de resposta, tempo inicial para liberação de gametas, relação de machos/fêmeas e sobrevivência de ouriços *Lytechinus variegatus* injetados com 2 mL de CLE 2%.

Período	Rotina n°	Total	Liberação dos gametas		Início da liberação dos gametas (min)	♂/♀	Sobrevivência (%)
			N	%			
Inverno	1	14	8	57,4	3:28	6/2	100
	2	23	18	78,3	1:55	13/5	100
	3	14	6	42,9	1:48	4/2	100
Primavera	4	16	14	87,5	1:48	9/5	100
	5	40	31	77,5	3:01	14/17	97
	6	18	17	94,4	1:09	7/10	94
Total / Média		125	94	75 \pm 19,38	2:13 \pm 1:15	53/41	98

O experimento 2, foi conduzido em duas rotinas, com um total de 68 ouriços induzidos com 2 mL de CLE ou 4 mL de KCl (ABNT, 2006). Os dois protocolos mostraram-se eficientes na liberação de gametas, com taxas superiores a 80% nas duas rotinas (Tabela 2). No entanto, a indução com CLE proporcionou maior taxa de sobrevivência (97,2%) em relação a indução com KCl (57,8%) (Tabela 2). Quanto ao tempo de resposta, os Ouriços induzidos com KCl responderam mais rapidamente do que os induzidos com CLE (Tabela 2).

Tabela 2: Percentual de resposta e sobrevivência, tempo inicial de liberação de gametas e biometria (peso e diâmetro médio) de ouriços *L. variegatus* coletados na primavera e induzidos com 2 mL de CLE (2%) e 4 mL de KCl (0,5M), no período da primavera.

Método de indução	CLE - 2,0 mL	KCl - 4,0 mL
Número de ouriços injetados	34	34
Liberação de gametas	30 (88,2%) ^a	32 (94,1%) ^a
Sobrevivência	97,2 ^a	57,8 ^b
Início da liberação de gametas (minutos) ± D.P	2,06 ± 1:02	1:05 ± 0:87
Peso médio (g) ± D.P	197,40 ± 42,07	198,04 ± 39,23
Diâmetro médio (cm) ± D.P.	8,02 ± 0,69	7,98 ± 0,65

^{ab}Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística pelo Qui quadrado ($P < 0,05$; DP= desvio padrão.)

Os resultados para os testes de toxicidade com embriões obtidos pelos métodos de KCl e CLE (experimento 3) estão representados na figura 1. Observou-se que assim como para o KCl (Figura 1, linhas pontilhadas), os valores de CE_{50} para testes executados com embriões coletados com CLE (Figura 1, linhas tracejadas), encontram-se dentro dos limites de controle (Média ± 2 desvios padrão) determinados pela ABTN (2006), indicando que a sensibilidade não é alterada pelo método de indução. Isto indica que embriões obtidos a partir de gametas coletados pelo método de CLE podem ser utilizados em testes de toxicidade em estudos de impacto ambiental.

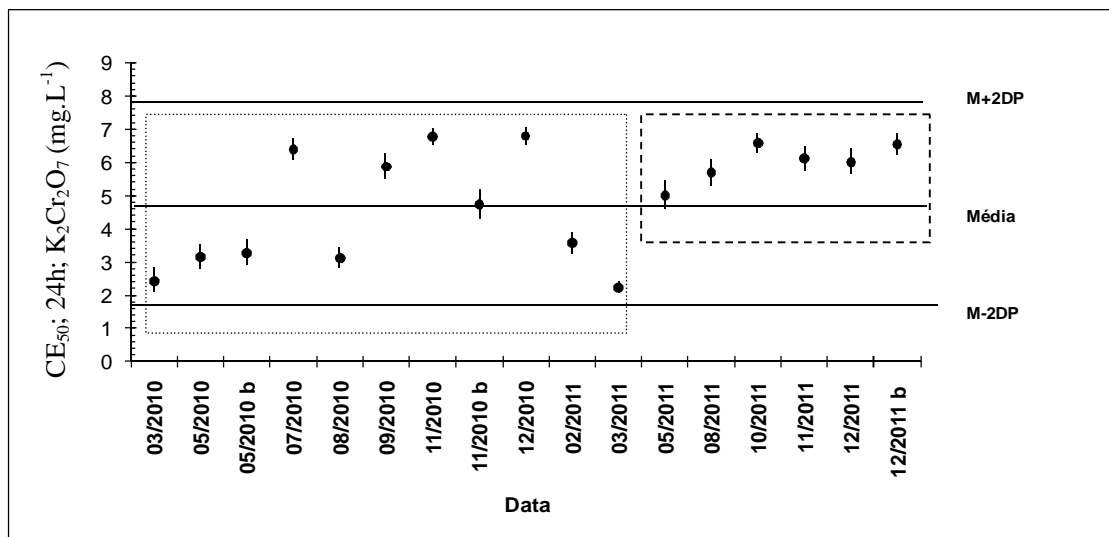


Figura 1 - Carta controle para o dicromato de potássio (CE_{50} – mg.L⁻¹) em testes de toxicidade embrionários para embriões de *L. variegatus* obtidos por indução com KCl (n=10 - 03/2010 a 03/2011) e CLE (n=6 - 05/2011 a 12/2011). Sendo: M = média e DP = desvio padrão.

3.4 DISCUSSÃO

Os principais avanços obtidos neste estudo foram: 1) A injeção intraperitoneal de 2 mL de cloridrato de lidocaína + epinefrina, 2% (CLE) induz a liberação de gametas no ouriço *L. variegatus*; 2) O emprego de CLE possibilita taxas de liberação de gametas semelhantes às obtidas com o emprego de KCl; 3) Ouriços *L. variegatus* apresentam maior taxa de sobrevivência após indução com CLE, do que após a indução com o KCl; 4) A indução com CLE não altera a sensibilidade de embriões em testes de toxicidade com o tóxico de referência dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$) e 5) A resposta na indução da liberação de gametas de ouriços-do-mar sofre influência da época do ano.

Descreve-se pela primeira vez a possibilidade de liberação induzida de gametas de ouriços-do-mar com o emprego de lidocaína associada à epinefrina. De forma semelhante ao observado com o emprego do KCl, ouriços induzidos com CLE reagem rapidamente após a injeção, com movimentação intensa dos espinhos, seguida da liberação dos gametas em

poucos minutos (tempo médio de $2:13 \pm 1:15$ minutos). Esta reação sugere que ao ser injetado e espalhar-se rapidamente pela cavidade celomática, o CLE altere o potencial elétrico da membrana plasmática das gônadas, disparando potenciais de ação e como consequência, promove contração das bandas musculares, culminando na liberação de gametas.

Com o emprego de KCl observou-se uma liberação ininterrupta de gametas enquanto perdura o seu efeito, fato também relatado por Subramonian (1982). Em função deste efeito prolongado, o protocolo de teste crônico ABNT (2006) recomenda que os óvulos devam ser coletados por um período máximo de 15 minutos, prevenindo assim uma possível mistura entre óvulos maturados com aqueles imaturos liberados após estímulo excessivo. Em contrapartida, com o emprego do CLE, foi observada uma marcante diferença. Embora o CLE também tenha gerado um efeito prolongado, por até 30 minutos, a liberação dos gametas ocorre de forma intermitente. A liberação é interrompida poucos segundos após o estímulo, sendo reativada após nova agitação dos ouriços. Esta liberação gradual de gametas, característica do CLE, permite controlar a quantidade e qualidade dos gametas obtidos, diminuindo os riscos da total depleção das gônadas e do aparecimento de formas imaturas. Este fato, somado a baixa toxicidade observada neste estudo, possibilita que os ouriços estejam mais aptos a uma possível re-indução num curto espaço de tempo. Desta forma, demonstra-se que a liberação induzida com o emprego de CLE permite um melhor aproveitamento dos gametas, reduzindo a quantidade de animais necessários para a realização de um mesmo ensaio. Sugere-se que o método caracteriza-se como uma importante ferramenta para a manutenção do bem estar e da própria preservação da espécie.

Já na posterior avaliação da viabilidade dos ouriços ao processo de liberação induzida de gametas, observou-se uma alta sobrevivência com o emprego de CLE (97,2%) (Tabela 1) e uma menor sobrevivência com o emprego de KCL (57,8%) (Tabela 2). Os efeitos deletérios do KCl surgiram já nas primeiras 48 horas, com queda de espinhos, seguida de morte do organismo, sendo a maior taxa de mortalidade observada nos primeiros 10 dias após a indução. Este efeito também foi observado por Tyler (1966), que obteve uma baixa taxa de sobrevivência de ouriços por um período de duas semanas após indução com KCl. Contudo, o KCl pode não ser o único responsável por estes efeitos adversos. Procedimentos simples como o uso de agulhas estéreis e de tamanho adequado, somado ao ângulo correto de injeção e agitação apropriada do ouriço para espalhamento do KCl, podem evitar desde um foco de infecção na membrana perioral até o rompimento de estruturas internas. Neste estudo, estes cuidados foram observados nos dois protocolos, o que justifica as taxas mais elevadas de sobrevivência obtidas, em relação às descritas na literatura. Em geral estes cuidados, que

visam o bem estar animal e que poderiam reduzir os efeitos causados pelos métodos de indução, não constam nos protocolos onde o KCl é indicado para obtenção de gametas (Environment Canadá, 1992; USEPA, 2002 e ABNT, 2006).

Outras diferenças foram ainda observadas no comportamento dos ouriços após indução com CLE ou KCl. Os ouriços induzidos com CLE pareciam estar sob efeito anestésico, permanecendo por algumas horas no fundo do aquário antes de subirem às paredes, após a indução. Ainda, observou-se um longo período para a retomada da alimentação, em torno de 24 a 48 horas, o que não foi observado naqueles induzidos com KCl. No entanto, após este período, houve uma total recuperação.

Durante o estudo, foi observado um efeito sazonal na liberação de gametas, o que pode ser atribuído a característica reprodutiva desta espécie de ouriço. De acordo com Watts (2001) o ciclo reprodutivo de *L. variegatus* varia amplamente, dependendo do local e das condições ambientais. Foltz et al. (2004) descreve que ouriços *L. variegatus* estão tipicamente grávidos durante os meses do verão. De forma geral, a desova ocorre quando as temperaturas estão subindo ou perto de seu pico anual. Beddingfield e McClintock (2000) apud Watts, (2001), p. 383) descreve picos de desova na primavera e verão, em várias populações no norte do Golfo do México, que correspondem geralmente aos picos nos índices gonadais. Indivíduos encontrados no sul da Flórida desovam principalmente no verão, mas são capazes de ovular o ano inteiro, com base na presença de indivíduos maduros nas amostras (Watts, 2001).

As rotinas de indução com CLE foram realizadas durante o inverno e primavera, que supostamente não são as épocas mais favoráveis para a reprodução desta espécie. Observou-se taxas de indução mais elevadas na primavera, com picos de resposta de 87,5 e 94,4%, fato que poderia ser explicado pelo aumento gradual da temperatura em função da proximidade do verão, período mais favorável à reprodução. No inverno foram observados os menores percentuais de resposta (52,7 e 42,4%). Mesmo assim, foi possível a obtenção de gametas viáveis, evidenciando que ao menos para os indivíduos coletados no litoral norte catarinense, a sazonalidade não é um fator limitante. Apesar de não existirem trabalhos específicos acerca da reprodução de *L. variegatus* no Brasil, os resultados deste estudo sugerem que o comportamento reprodutivo destes organismos é similar aos das mesma espécie, encontrados no hemisfério norte e indicam que a indução artificial da liberação de gametas de *L. variegatus* com CLE, realizada na estação reprodutiva (verão), proporcione melhores resultados.

3.5 CONCLUSÕES

- Os dados obtidos neste estudo permite concluir que a injeção intraperistomal de 2 mL de Lidocaina + epinefrina é eficiente para induzir a liberação de gametas no ouriço *L. variegatus*, possibilitando taxas de liberação de gametas semelhantes às obtidas com a indução com o emprego de KCl (0,5 M).
- A indução com lidocaína + epinefrina possibilita a obtenção de taxas mais elevadas de sobrevivência de *L. variegatus*.
- Embriões produzidos com gametas obtidos após indução com lidocaína não apresentam alterações morfológicas, atrasos no desenvolvimento embrio-larval, tampouco na sensibilidade em testes de toxicidade com dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$), podendo ser aplicados em estudos de impacto ambiental.
- A resposta a liberação induzida de gametas do ouriço *L. variegatus* sofre influência sazonal, porém mesmo com a diminuição da resposta ao estímulo, é possível se obter gametas viáveis durante o inverno e primavera.

3.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABNT. 2006. ABNT/NBR15350 – Ecotoxicologia aquática – **Toxicidade crônica de curta duração -Método de ensaio com ouriço-do-mar (Echinodermata: Echinoidea)**, 17 p.

Bottger, S.A., Walker, C.W., Unuma T. 2004. **Care and maintenance of adult echinoderms**. *Methods in Cell Biology*. 74:17-38.

Subramoniam, T. 1982. **Manual of research Methods for marine invertebrate reproduction**. *Cmfri*.9:181-183.

Dinnel, P.A., Link, J.M., Stober, Q.J. 1987. **Improved methodology for a sea urchin sperm cell bioassay for marine waters**. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 16(1):23-32.

ENVIRONMENT CANADA. 1992. **Biological test method: fertilization assay using echinoids (sea urchins and sand dollars)**. *Env. Prot. Series. EPS 1/RM/27*. 99 p.

Foltz, K.R., Adams, N.L., Runft, L.L. **Echinoderm Eggs and Embryos: Procurement and Culture**. IN: Ettensohn, C.A. *Methods in cell biology*. Vol. 74. Califórnia: 2004. ed. Elsevier. pp.39-74.

Gago, J., Luis, O. 2011. **Comparison of spawning induction techniques on *Paracentrotus lividus* (Echinodermata: Echinoidea) broodstock.** Aquacult. Int. 19:181–191.

Hinegardner, R.T. 1969. **Growth and development of the laboratory cultured sea urchin.** Biol. Bull. 137:465-475.

Hose, J.E. 1985. **Potential use of sea urchin embryos for identifying toxic chemicals: Description of a bioassay incorporating cytologic, cytogenic and embryologic endpoints.** J. Appl. Toxicol. 5:245-254.

Iwata, K.S. 1950. **A method of determining the sex of sea urchins and of obtaining eggs by electric stimulation.** Annot. Zool. Jap. 23:39-42.

Iwata, K. S., Fukase, H. 1964. **Artificial spawning in sea urchins by acetylcholine.** Biol. J. Okayama Univ., 10:51-56.

Luis, O., Delgado, F. Gago, J. 2005. **Year-round captive spawning performance of the sea urchin *Paracentrotus lividus*: Relevance for the use of its larvae as live feed.** Aquat. Living Resour. 18:45–54.

Máximo, M.V., Mottola, L.S.M., Resgalla Jr, C. 2008. **Sensibilidade do ouriço *Arbacia lixula* (Echinodermata: Echinoidea) em testes de toxicidade.** J. Braz. Soc. Ecotoxicol. 3(1):47-52.

Nipper, M. G., Prósperi, V. A., Zamboni, A. J. 1993. **Coastal species of southeastern Brazil echinoderm sperm and embryos.** Environ. Contam. Toxicol. 50:646-652.

Tyler, A. 1949. **A simple, non-injurious method for inducing repeated spawning of sea urchins and sand dollars.** Collect. Net. 19:19-20.

Tyler, A., Tyler, B. 1966. **The gametes: some procedures and properties.** IN: R. A. Boolootian (ed.) Physiology of Echinodermata. 639-682.

USEPA. 2002. **Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to marine and estuarine organisms.** Third Edition – EPA-821-R-02-014.

Watts, S.A, McClintock, J.B., Lawrence, J.M. **The ecology of *Lytechinus variegatus*.** Edible Sea Urchins: Biology and Ecology. Ed. Elsevier: 2001. 375-393.

4 CAPÍTULO 2

Estendendo a viabilidade de óvulos de ouriços-do-mar com adição de cloranfenicol ao meio de estocagem

Marcus Vinicius Máximo, Charrid Resgalla Junior, Alceu Mezzalira

RESUMO

No Brasil os ensaios toxicológicos com ouriços-do-mar restringem-se a apenas duas espécies, *Lytechinus variegatus* e *Echinometra lucunter*. Este fato limita estes ensaios a poucos laboratórios aonde estas espécies ocorrem, além de limitar a aplicação destes testes para espécies de ocorrência local. Neste trabalho, cloranfenicol foi avaliado como aditivo antibiótico para evitar a proliferação bacteriana durante a estocagem dos óvulos das espécies *L. variegatus*, *E. lucunter* e *Arbacia lixula*, constituindo-se assim um método alternativo para estender a viabilidade destes gametas e assim suprir a demanda por este material biológico. Os óvulos foram estocados em água do mar natural e em água do mar artificial, contendo 50 mg L⁻¹ de cloranfenicol, e incubados à 15°C, sem luz. Para espermatozoides foi utilizado o método já tradicional, no qual consiste na coleta com a menor quantidade de água possível e resfriamento entre 4 a 5°C. No experimento 2, embriões gerados a partir de óvulos de *L. variegatus* estocados, foram usados em ensaios de toxicidade com as substâncias de referência sulfato de zinco e dicromato de potássio, a fim de comparar sua sensibilidade com a de embriões obtidos da natureza. A utilização de 50 mg L⁻¹ do antibiótico cloranfenicol em água do mar natural e artificial, inibiu o crescimento bacteriano, ampliando desta forma a viabilidade dos óvulos dos ouriços *L. variegatus*, *E. lucunter* e *A. lixula*, por até 12, 11 e 13 dias, respectivamente. Contudo o percentual diário de desovas viáveis diminuiu com o aumento do tempo de estocagem, sendo este fato atribuído a variações intrínsecas de cada indivíduo que não podem ser controladas. Mesmo assim o percentual médio diário de larvas pluteu foi maior que 80% em todos os dias de estocagem para *L. variegatus* e *A. lixula* até o 6º dia para *E. lucunter*. Óvulos/ovos e fragmentos celulares também foram observados diariamente, mas em baixo percentual para as três espécies, mesmo assim observou-se uma tendência ao aumento do percentual destas estruturas com o tempo de estocagem para as espécies *E. lucunter* e *A. lixula*. Já os testes de toxicidade mostraram que a sensibilidade dos embriões para o sulfato de zinco tende a aumentar com o tempo de estocagem, mas, tanto para o sulfato de zinco quanto para o dicromato de potássio, com exceção de uma desova, os

resultados de CE_{50} encontram-se dentro dos limites de sensibilidade aceitáveis quando comparados a testes com embriões frescos. Conclui-se portanto que a utilização de 50 mg L^{-1} do antibiótico cloranfenicol em água do mar associado a estocagem a 15°C , constitui um método simples e eficaz que permite ampliar a viabilidade dos óvulos dos ouriços *L. variegatus*, *E. lucunter* e *A. lixula*, além de credenciar os embriões obtidos com estes óvulos estocados a serem utilizados em testes de toxicidade sob exigência de órgãos ambientais e outras finalidades.

Palavras-chave: Ouriços-do-mar; *Lytechinus variegatus*; *Echinometralucunter*; *Arbacialixula*; óvulos; Estocagem; Teste de toxicidade

4.1 INTRODUÇÃO

As facilidades de coleta e manutenção em laboratório, associada ao sincronismo e transparência dos embriões, determinaram que historicamente os Ouriços-do-mar sejam empregados em estudos de biologia celular e na biologia do desenvolvimento (Bottger et al., 2004).

Adicionalmente, a alta sensibilidade dos gametas desta espécie à ação de agentes químicos (Nipper et al., 1993; Dinnel et al., 1987; Hose, 1985) os credenciaram como modelos ideais para emprego em ensaios ecotoxicológicos em estudos de impacto ambiental em vários países (Máximo et al., 2008).

No Brasil, duas espécies foram recentemente normatizadas pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT, 2006): *Lytechinus variegatus* e *Echinometralucunter*. Apesar da importância e necessidade da regulamentação dos procedimentos de execução dos ensaios, estabelecidos pelo protocolo da CETESB (1992), essa norma não permite a aplicação dos testes em outras espécies de ocorrência local. Máximo et al. (2008), comparou a sensibilidade do ouriço *Arbacialixula* com as espécies já normatizadas, concluindo que estas espécies possuem semelhante sensibilidade, não existindo razão para não serem incluídas na lista de espécies normatizadas.

Esta restrição no número de espécies utilizadas como organismos teste resulta em grande pressão sobre elas, já que sua retirada do meio não vem sendo acompanhada por um estudo de impacto sobre a população natural. As restrições sazonais e a falta de um dimorfismo sexual que exigem a transferência de um grande número (cerca de 30 ouriços)

destes organismos em laboratório, associado ao fato de que a maior parte dos gametas obtidos não é aproveitada, estão determinando um risco para a espécie.

Uma abordagem alternativa seria o congelamento e a estocagem de gametas em nitrogênio líquido. Espermatozoides e estágios avançados (blástula e pluteu) de embriões de ouriços-do-mar tem sido criopreservados com sucesso (Asahina & Takahashi, 1978; Gwo, 2000, Odintsova, 2001). No entanto para, óvulos ou ovos os percentuais de sucesso no congelamento não ultrapassam 20% (Asahina, 1977).

Uma outra opção de otimizar o emprego destas estruturas, seria estender a viabilidade de espermatozoides e óvulos, por resfriamento e tratamento com antibióticos. Estocar espermatozoides é uma prática comum, que consiste basicamente na coleta com a menor quantidade de água possível, para evitar sua ativação, e a sua manutenção entre 4 a 5°C (Spiegler, 1995). Já os óvulos deterioram rapidamente após a desova, parecendo existir uma relação direta entre crescimento bacteriano e deterioração de óvulos (Epel³). Segundo o protocolo da universidade de Stanford, descrito pelo Dr. Epel, o emprego de antibióticos que suprimam o crescimento bacteriano, retardam esta deterioração.

Em aquicultura, a utilização de antibióticos para controle de infecções bacterianas é prática comum em sistemas de larvicultura (Moriarty, 1998). O uso de antibióticos como penicilina ou estreptomicina também é comum em culturas de embriões de ouriço-do-mar (Foltz et al., 2004). Epel³, utilizando uma mistura dos antibióticos sulfametoxazol e trimetropina, conseguiu estocar óvulos de *S. purpuratus* e *L. pictus* por um período de até três semanas. Observou, ainda que a fecundação, clivagem e desenvolvimento embrionário até estágios avançados não diferiu do controle.

Neste estudo, experimentos prévios realizados testaram o potencial dos antibióticos sulfametoxazol com trimetropina, penicilina, estreptomicina e cloranfenicol, quanto a solubilidade em água do mar e alteração de parâmetros físico-químicos (pH e salinidade), bem como na capacidade de manutenção da viabilidade de óvulos de *L. variegatus*. Os resultados preliminares indicaram o antibiótico cloranfenicol na concentração de 50 mg/L como um potencial candidato para emprego na estocagem de gametas.

Com base nestes ensaios, este estudo avaliou o emprego do cloranfenicol como aditivo antibiótico para prevenir a proliferação bacteriana na água do mar, permitindo desta forma estender a viabilidade de óvulos dos ouriços *Lytechinus variegatus*, *Echinometralucunter* e *Arbacialixula*, bem como verificar a sensibilidade dos embriões produzidos com estes óvulos

³Current Protocol for maintaining/storing ovulated sea urchin eggs.
Disponível em: (<<http://www.stanford.edu/group/Urchin/protocol.html>>)

aos testes de toxicidade com substâncias de referência.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Obtenção dos gametas

Os gametas foram obtidos de indivíduos adultos dos ouriços-do-mar *Lytechinus variegatus*, *Arbacialixula* e *Echinometralucunter*, coletados no município de Bombinhas, litoral norte do estado de Santa Catarina, (latitude: 27°07'54" S; longitude: 48°31'40" W). Em laboratório, foram mantidos em aquários de 20 litros, com água do mar natural, salinidade de 32, aeração constante, fotoperíodo 12:12 e temperatura de 22 °C, sendo alimentados com macroalgas marinhas (*Sargassum sp.* e *Ulva fasciata*).

A liberação artificial dos gametas foi realizada mediante injeção de 2,0 mL de Cloridrato de lidocaína 2,0 g 100.L⁻¹ com epinefrina a 2% (CLE) (Anestésico L – Pearson, Eurofarma). Os espermatozoides, distintos por sua viscosidade e cor branca, foram coletados diretamente dos poros genitais com auxílio de pipeta de pasteur, transferidos para tubos plásticos do tipo eppendorf e armazenados em refrigerador à 5,0 ± 1,0 °C, sem luz. Os óvulos foram liberados diretamente em um frasco becker contendo água do mar filtrada. Nos ensaios de estocagem foi utilizada água do mar filtrada e água do mar artificial.

4.2.2 Preparo do cloranfenicol

A solução estoque de antibiótico era preparada com a dissolução de 50 mg de cloranfenicol em 1 litro de água do mar natural filtrada (AN), ou água do mar artificial (AA), seguida de 30 minutos de agitação para completa dissolução do antibiótico. Tanto pH quanto a salinidade da água do mar, não sofreram alteração por esta concentração de cloranfenicol.

4.2.3 Estocagem em água do mar filtrada

Foram utilizadas 09 desovas de *L. variegatus*, 06 de *E. lucunter* e 07 de *A. lixula*, obtidas em diferentes datas de indução. Logo após a ovulação, os óvulos foram filtrados em malha de 220µm para a remoção de fragmentos e lavadas duas vezes por decantação. Após a precipitação dos óvulos, a água do mar foi substituída por água do mar natural com cloranfenicol. Em seguida, alíquotas de 2,0 mL desta solução de óvulos com antibiótico foram transferidas para frascos de cultura de tecidos, contendo 40 mL de solução de cloranfenicol em água do mar. As demais alíquotas de óvulos foram estocados apenas em água do mar, sem

adição de antibiótico, servindo como controle. Para o armazenamento, os frascos foram mantidos deitados em incubadora à 15°C, sem luz. Este mesmo procedimento foi repetido para a estocagem de óvulos das três espécies de ouriços. Não foram misturados óvulos de diferentes fêmeas ou espécies e a densidade média final nos frascos de cultura foi de 450 óvulos mL⁻¹.

4.2.4 Estocagem em água do mar artificial

Foram utilizadas 04 desovas de *E. lucunter* e 04 de *A. Lixula*. Para o preparo da água do mar artificial, utilizou-se a seguinte fórmula: 1 litro de água destilada onde foi dissolvido: 25,5 g NaCl; 0,67 g KCl; 4,7 g MgCl₂ 6H₂O; 6,3 g MgSO₄ 7H₂O; 1,35 g CaCl₂ 2H₂O e 0,18 g NaHCO₃, (Foltz et al. 2004). Os demais procedimentos de preparo e estocagem seguiram as etapas descritas anteriormente.

4.2.5 Avaliação da viabilidade

Diariamente, os óvulos de cada frasco estocado eram cuidadosamente re-suspensos e alíquotas de 5 mL foram transferidas para frascos plásticos de 15 mL, mantidos em temperatura ambiente (\pm 22°C) por 10 minutos para aclimação e precipitação. Para a fertilização, uma alíquota de 0,05 mL de espermatozoides de cada macho, estocado em refrigerador, era diluída em 10 mL de água do mar filtrada para ativação e submetidas a avaliação sob microscópio óptico. Sendo empregadas as alíquotas cujos espermatozoides estivessem com melhor motilidade. A fertilização consistiu na adição de uma alíquota de 0,05 mL desta solução espermática aos óvulos. O controle da fertilização era realizado pela observação em microscópio óptico (100x) da formação da membrana de fertilização. Uma vez confirmada a fecundação, os ovos eram novamente lavados para remoção do excesso de espermatozoides e distribuídos em triplicatas de 10 mL, contendo água do mar natural a 30 de salinidade e levados a incubadora a 25°C, fotoperíodo de 12:12, por 24 h, para desenvolvimento embrio-larval.

Os experimentos eram encerrados com a adição de 1 mL de formol a 4%, quando nos frascos eram observadas larvas pluteu plenamente formadas. Para cada réplica foram analisadas 100 larvas, utilizando os critérios recomendados pela ABNT (2006), ou seja: larva em desenvolvimento (anormal) e larva pluteu (normal). Também foram determinadas e quantificadas a presença de ovos/óvulos e fragmentos. As análises estatísticas para o experimento 1 foram executadas no programa estatístico Toxstat 3.5 (West & Gulley, 1996). As comparações entre os tratamentos (larvas pluteu geradas a partir de óvulos estocados em cloranfenicol 50 mg L⁻¹) e controle (larvas pluteu geradas com óvulos não estocados) foram

realizados por aplicação de teste de normalidade, ANOVA, seguida, quando indicado, do teste de Tukey com um nível de significância de 5%.

4.2.6 Testes de toxicidade com substâncias de referência

Para avaliar a sensibilidade de embriões gerados a partir de óvulos estocados, foram realizados testes de toxicidade com os embriões obtidos de óvulos de *L. variegatus*, no 2º, 4º, 6º e 8º dia de estocagem. Os testes foram executados segundo norma da ABNT (2006), utilizando duas substâncias de referência: sulfato de zinco ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) nas concentrações: 1; 0,5; 0,25; 0,125; 0,062 e 0,031 mg L^{-1} e dicromato de potássio ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) nas concentrações: 10; 5; 2,5; 1,25; 0,62 e 0,31 mg L^{-1} . Cada diluição, mais o controle, foram preparados em frascos de 15 mL, em 4 réplicas, com 10 mL de solução teste e adicionados aproximadamente 400 ovos de *L. variegatus*. O teste consistiu na incubação à temperatura de 25°C e fotoperíodo de 12:12, por 24 horas. O teste era finalizado com adição de 1 mL formol a 4% e a validação se dava pela observação de mais de 80% de larvas pluteu plenamente formadas em uma sub-amostra do controle. Para cada réplica foram analisadas 100 larvas, utilizando os critérios recomendados pela ABNT (2006), ou seja: larva em desenvolvimento (efeito) e larva pluteu (normal). A partir desta avaliação, foram estimados os valores de CE_{50} (Concentração Efetiva Mediana) pelo programa TSK versão 1.5 (EPA, Cincinnati, Ohio). Para determinar se a sensibilidade destes embriões encontrava-se dentro do esperado foi utilizado a carta controle do Laboratório de Ecotoxicologia da UNIVALI para comparação.

4.3 RESULTADOS

Os resultados para a estocagem de óvulos das espécies *L. variegatus*, *E. lucuntere* A. *lixula*, em cloranfenicol (50 mg L^{-1}) dissolvido em água do mar natural ou artificial, estão representados nas figuras 1, 2 e 3. Para *L. variegatus*, todas as desovas estocadas ($n=9$) mantiveram-se 100% viáveis até o 4º dia de estocagem. Após este período, este percentual diminuiu gradativamente, chegando a 40% no 10º dia e 10% no último dia de estocagem (Fig. 1A). O tempo máximo de estocagem foi de 12 dias e o percentual médio diário de larvas pluteu não diferiu do controle (dia 0), permanecendo acima de 80% até o último dia de estocagem, mesmo com apenas 10% das desovas viáveis.

Juntamente com as larvas pluteu, foram também quantificados o número de ovos/óvulos e fragmentos celulares. Não foi observado um padrão no aparecimento de ovos/óvulos, e em média, foram observados pouco mais de 4% entre 3^o e 6^o dias, e um pico máximo de 6% no 9^o e 12^o dias (Fig. 1C). Já os fragmentos celulares foram observados em quase todos os dias de estocagem, e em maior percentual que ovos/óvulos, tendo sido também observados inclusive no controle (4%) (Fig. 1D). No entanto, o surgimento diário tanto de ovos/óvulos quanto de fragmentos parece aleatório, não estando relacionado com o aumento do tempo de estocagem (Fig. 1C e D).

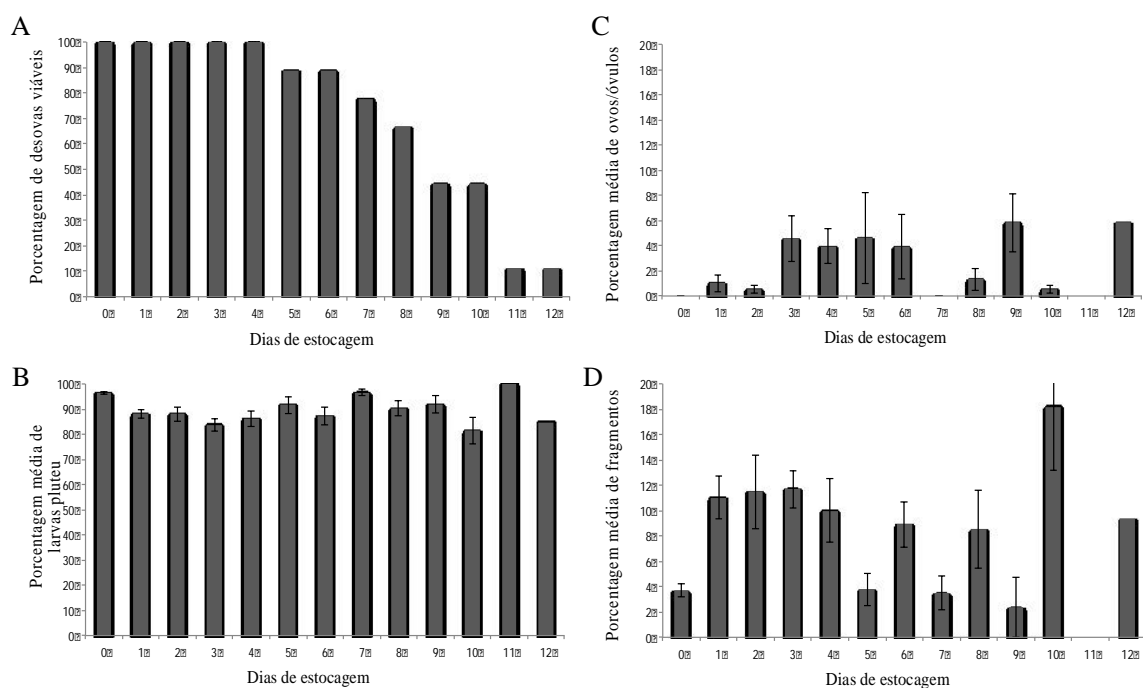


Figura 1-Percentuais diários de desovas viáveis (A), percentuais médios diários de larvas pluteu (B), ovos/óvulos (C) e fragmentos (D) para óvulos do ouriço *L. variegatus* estocados em cloranfenicol a 50 mg L⁻¹ dissolvido em água do mar natural. Dia 0 = controle (óvulos não estocados).

Para *E. lucunter* a água do mar artificial (AA) foi mais efetiva na estocagem dos óvulos. Em AA as desovas mantiveram-se viáveis por maior tempo (11 dias) do que as estocadas em AN (9 dias). Além disso, todas as desovas mantiveram-se 100% viáveis até o oitavo dia, enquanto que em AN este percentual de viabilidade caiu a 80% já no 4^o dia e 50% no 8^o dia (Fig. 2A). Para o desenvolvimento embrio-larval (Fig. 2B), indiferente do meio (AN ou AA), os percentuais médios de larvas pluteu foram iguais até o 6^o dia (+ de 90%). Do 7^o ao

11º dia, em AA, o percentual médio de pluteu manteve-se acima 90%, enquanto que em AN, estes percentuais diminuíram para cerca de 80 e 70%, até o último dia de viabilidade (9º dia).

Em relação a presença de ovos/óvulos (Fig. 2C), observou-se maiores percentuais no meio AN, com picos de até 6%. Já para o meio AA, o percentual máximo diário de ovos/óvulos foi de 2%. Para fragmentos, foi observada uma tendência para ambos os meios, na qual o percentual médio de fragmentos aumentou gradativamente com o aumento dos dias de estocagem.

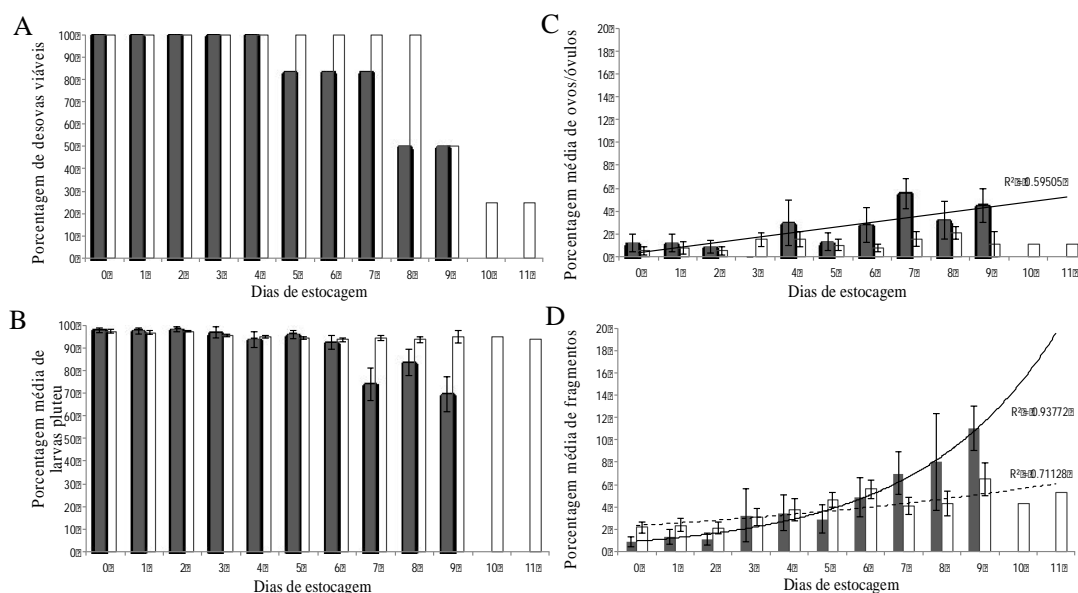


Figura 2 -Percentuais diários de desovas viáveis (A), percentuais médios diários de larvas pluteu (B), ovos/óvulos (C) e fragmentos (D) para óvulos do ouriço *E. lucunter* estocados em cloranfenicol a 50 mg L⁻¹ dissolvido em água do mar natural (barras sólidas) e água do mar artificial (barras abertas). Dia 0 = controle (óvulos não estocados).

Para a espécie *A. lixula*, a AA não proporcionou maior tempo de estocagem (Fig. 3A-D). O período máximo alcançado foi de 11 dias para AA e 13 dias para AN. Os percentuais de viabilidade das desovas foi semelhante até o 11º dia de estocagem, sendo que até o 7º dia, 100% das desovas apresentaram-se viáveis, sendo observada uma redução para pouco mais de 50% no 8º dia e 10% no 12º e 13º dias para AN. O percentual médio diário de larvas pluteu também foi igual nos dois meios, com médias de mais de 90% em todos os dias em que os óvulos estiveram viáveis. Foram ainda observados poucos ovos/óvulos durante os dias de estocagem, com percentuais máximos de 3% para AN e 1,5% para AA. Foram ainda

observados fragmentos em todos os dias de estocagem, e da mesma forma como observado para *E. lucunter*, observou-se em ambos os meios uma tendência ao aumento do percentual de fragmentos em relação ao aumento do tempo de estocagem.

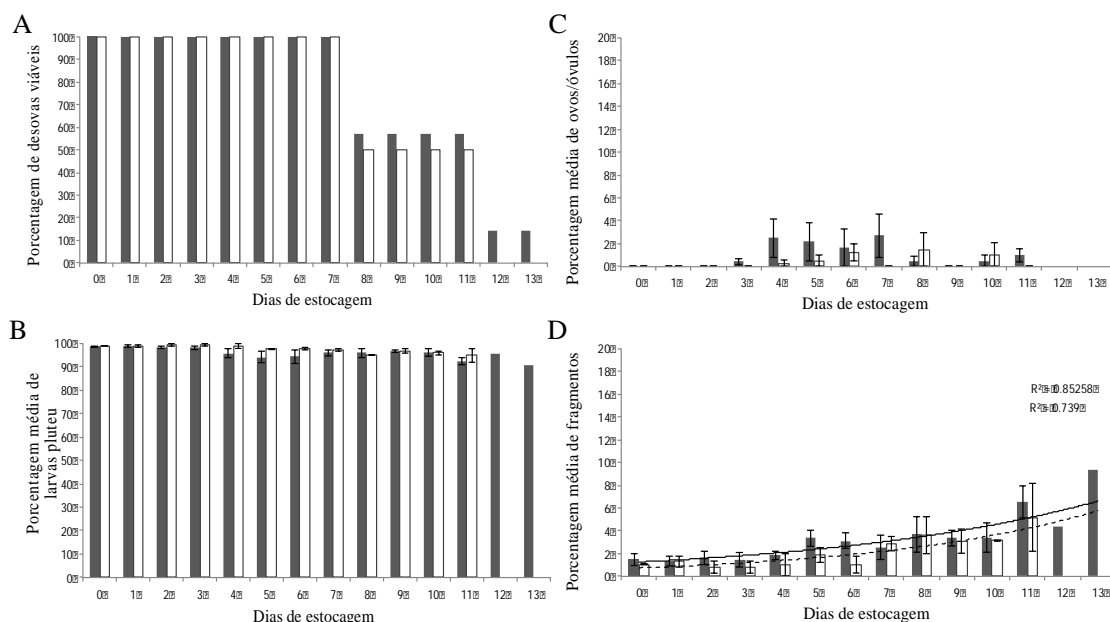


Figura 3 - Percentuais diários de desovas viáveis (A), percentuais médios diários de larvas pluteu (B), ovos/óvulos (C) e fragmentos (D) para óvulos do ouriço *A. lixula* estocados em cloranfenicol a 50 mg L⁻¹ dissolvido em água do mar natural (barras sólidas) e água do mar artificial (barras abertas). Dia 0 = controle (óvulos não estocados).

No experimento 2 os embriões gerados a partir de óvulos de *L. variegatus* estocados em cloranfenicol, foram utilizados em testes de toxicidade com dicromato de potássio e sulfato de zinco. Os ensaios foram executados no 2^o, 4^o, 6^o e 8^o dias de estocagem, com óvulos de três diferentes fêmeas, os resultados estão representados na figura 4. Para o dicromato de potássio (Figura 4A), observou-se que com exceção da fêmea 1, todos os demais valores de CE₅₀ encontram-se dentro dos limites observados para ensaios realizados com desovas sem estocagem e independente dos dias de estocagem. Já para o sulfato de zinco (Fig. 4B), apenas um valor de CE₅₀ (desova 2 do 4^o dia) não encontrou-se dentro dos limites de sensibilidade. Observou-se também que os valores de CE₅₀ para o sulfato de zinco diminuem com o aumento da estocagem (Seta, fêmeas 1 e 3), demonstrando uma tendência de que quanto maior o tempo de estocagem maior a sensibilidade dos embriões a esta substância.

Também não foram observados atrasos no desenvolvimento embrio-larval, nem alterações morfológicas na larva pluteu.

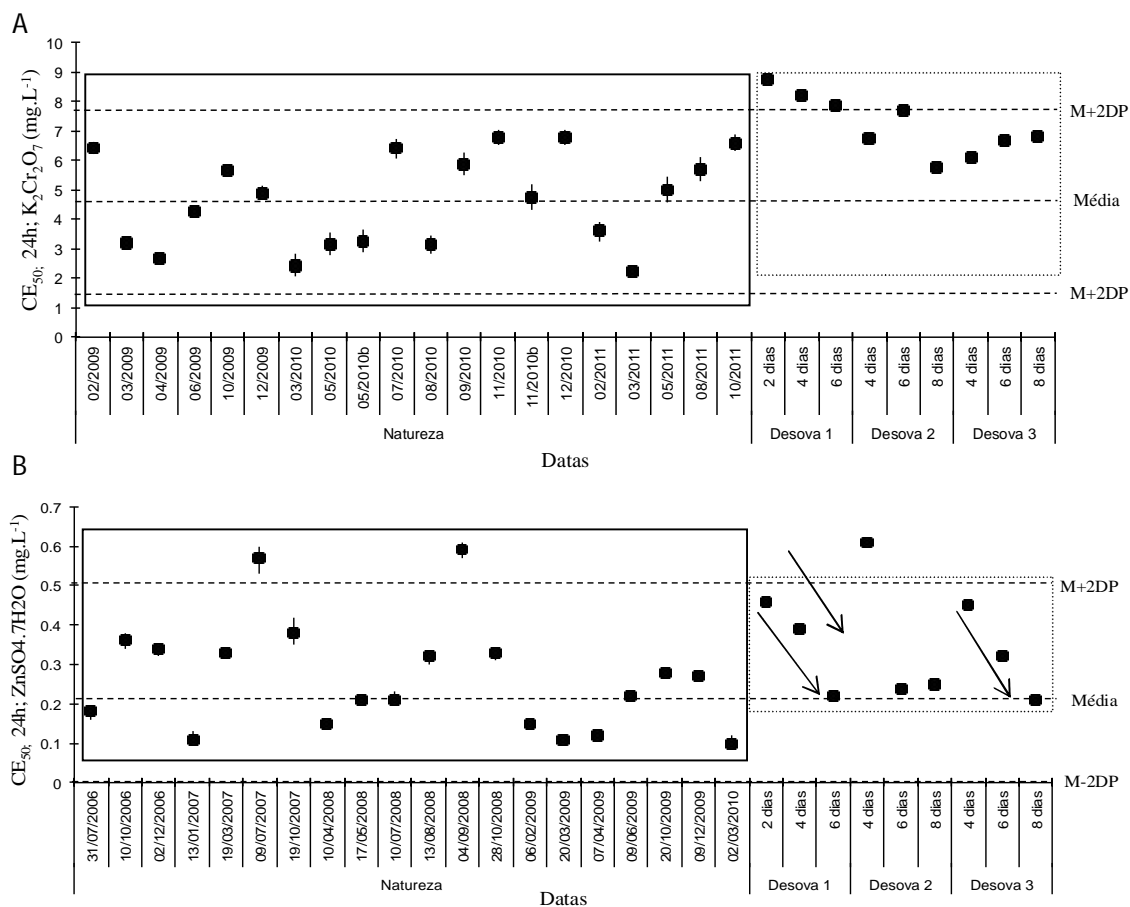


Figura 4 - Carta controle para o dicromato de potássio (A) (CE_{50} – $mg.L^{-1}$) e sulfato de zinco (B) (CE_{50} – $mg.L^{-1}$) em testes de toxicidade embrio-larvais para embriões de *L. variegatus* não estocados (natureza) e embriões gerados a partir de óvulos estocados em cloranfenicol (desovas 1, 2 e 3). Sendo: M = média e DP = desvio padrão.

4.4 DISCUSSÃO

De acordo com Epel⁴, óvulos deterioram rapidamente após a ovulação em função da ação de bactérias contaminantes. A evidência para isto é que uma variedade de antibióticos que inibem o crescimento bacteriano podem retardar esta deterioração, além disto, existe uma correlação direta entre a presença bactérias com a deterioração dos óvulos, uma vez que a lise destes fornece substrato ao desenvolvimento bacteriano.

O presente trabalho mostrou que a utilização de 50 mg L⁻¹ do antibiótico cloranfenicol em água do mar foi altamente eficiente em inibir o crescimento bacteriano, permitindo que óvulos dos ouriços *L. variegatus*, *E. lucuntere* e *A. lixula*, continuassem viáveis após 12, 11 e 13 dias estocados, respectivamente. Cloranfenicol é um antibiótico de amplo espectro, eficaz contra bactérias gram-negativas e gram-positivas. Contudo, é altamente tóxico para seres humanos, tendo sido proibido em muitos países para o tratamento de animais produtores de alimentos. Mas, ainda é um dos principais fármacos mais utilizados na profilaxia de infecções na aquicultura (Costa et al. 2008) e está presente na grande maioria dos bactericidas utilizados na aquariofilia (Alcon, 2004) *apud* Andrade et al., (2005).

De forma geral todos os antibióticos tem algum potencial tóxico, dependendo da dose e tempo de exposição utilizado. Reid & Siegmund (1989) *apud* Andrade, (2005) utilizaram cloranfenicol no tratamento dos peixes *Cyprinus carpio* e *Salmo gairdneri*, observando diferentes efeitos na atividade natatória e um aumento significativo nos batimentos cardíacos, quando comparados ao tratamento controle. Epel⁵ observou alterações morfológicas no intestino posterior de larvas do ouriço *Lytechinus pictus* geradas a partir de óvulos estocados por mais de duas semanas, com os antibióticos sulfametoxazol e trimetropina.

No presente trabalho, possíveis efeitos do cloranfenicol sobre a embriogênese dos ovos não foi avaliada, uma vez que o foco da avaliação foi no desenvolvimento até larva pluteu. Neste contexto, não foram observadas quaisquer alterações na morfologia destas larvas em relação ao controle e nem no tempo de desenvolvimento, que variou entre 24-28 horas.

Contudo, a fertilização foi inicialmente tida como critério de avaliação, observando-se em alguns óvulos recém fecundados de *L. variegatus* (4^o e 5^o dias de estocagem), um atraso na formação da membrana de fecundação. Além de ser um indicador de fertilização, a expansão da membrana ocorre em função da entrada do espermatozóide, como uma resposta

⁴Current Protocol for maintaining/storing ovulated sea urchin eggs. Disponível em: (<<http://www.stanford.edu/group/Urchin/protocol.html>>)

⁵Current Protocol for maintaining/storing ovulated sea urchin eggs. Disponível em: (<<http://www.stanford.edu/group/Urchin/protocol.html>>)

lenta de prevenção da polispermia e envolve inúmeras cascatas bioquímicas, as quais culminam na criação de um gradiente osmótico, permitindo a entrada de água entre a membrana do óvulo e o envoltório vitelínico (Carroll & Epel, 1975) apud Gilbert, (2003). Possíveis alterações bioquímicas ou diminuição do metabolismo dos óvulos, em razão da estocagem, seja por um efeito do antibiótico no meio, ou mesmo a temperatura de estocagem (15°C), podem retardar esta resposta. Mesmo assim, nestes ovos, 1 hora após a fertilização observou-se a primeira clivagem e após 24h, desenvolveram normalmente até larva pluteu.

Outro aspecto importante da estocagem é que o número de desovas disponíveis tende a diminuir com o aumento do tempo de estocagem, entretanto, isto afeta apenas a quantidade de material gâmico disponível, pois as desovas que resistem à estocagem mantêm alta taxa de viabilidade. Estas diferenças podem ser atribuídas às variações intrínsecas na qualidade das desovas, comumente observada entre diferentes fêmeas. De acordo com Epel⁶, após ovulação, a maioria das desovas são de ótima qualidade, contudo somente cerca de 50% destas podem ser estocadas por longos períodos. Um fator determinante nesta variação entre os organismos, possivelmente seria a sazonalidade, pois ao fim do período reprodutivo a qualidade dos óvulos tende a diminuir e a maioria das fêmeas libera óvulos frágeis que podem não resistir a estocagem.

Para *E. lucunter*, o tipo de água foi determinante em aumentar a viabilidade das desovas, pois as que foram estocadas em água do mar artificial mantiveram-se 100% viáveis até o 8º dia, quatro dias a mais que as estocadas em água do mar natural. Já para *A. lixula*, esta diferença não foi observada e nos dois meios as desovas apresentaram o mesmo comportamento ao longo da estocagem.

Segundo Epel⁵, as bactérias podem vir de diversas fontes, muitas delas estão associadas a resíduos, fezes, superfície dos ouriços e estão naturalmente presentes na água do mar. Neste sentido, por ser estéril, a água do mar artificial além de ser usada para a estocagem, pode também ser usada na lavagem da superfície do ouriço, coleta e lavagem dos óvulos, diminuindo assim as chances de contaminação, junto com os óvulos estocados.

A qualidade dos óvulos foi avaliada diariamente mediante fertilização e desenvolvimento embrio-larval. A diminuição da viabilidade das desovas com o aumento do tempo de estocagem não diminuiu o percentual médio diário de larvas pluteu, que foi maior que 80% em todo o período de estocagem para *L. variegatus* (12 dias) e *A. lixula* (13 dias) e até o 6º dia para *E. lucunter*.

⁶Current Protocol for maintaining/storing ovulated sea urchin eggs.
Disponível em: (<<http://www.stanford.edu/group/Urchin/protocol.html>>)

Ovos e/ou óvulos também foram observados em quase todos os dias de estocagem, para todas as espécies. Porém, os percentuais médios diários foram inferiores a 6%, não havendo indícios de que o aumento do tempo de estocagem aumentaria a quantidade destas estruturas. A presença de ovos e/ou óvulos em baixos índices não é um evento anormal, sendo comuns até mesmo em desovas frescas. Normalmente são atribuídas principalmente a presença de óvulos imaturos, que até podem ser fertilizados, mas não se desenvolvem.

Fragmentos celulares também foram observados diariamente, inclusive nos controles (dia 0). Para *E. lucunter* e *A. lixula*, o percentual médio diário destes fragmentos aumentou com o andamento dos dias de estocagem. A presença destes fragmentos é atribuída a duas causas. Primeiro, a degeneração natural dos óvulos imaturos ou velhos, que aumenta com a progressão do tempo de estocagem. Segundo, a um excesso de manipulação, que tem início antes da estocagem, com filtração e lavagens e segue com a re-suspensão diária para a retirada de alíquotas para fertilização. Estes procedimentos geram atritos entre os óvulos, o que pode levar ao seu rompimento.

Por fim, os embriões gerados com óvulos estocados de *L. variegatus*, principal espécie de ouriço usada em ensaios de toxicidade no Brasil, foram usados sob efeito de duas substâncias de referencia, afim de comparar sua sensibilidade com a sensibilidade de embriões frescos. Apenas a desova 1, nos testes com dicromato de potássio ficaram fora dos limites de sensibilidade determinados na carta controle. Os demais resultados de CE_{50} encontraram-se dentro dos limites de sensibilidade aceitáveis quando comparados a testes com embriões frescos, credenciando desta forma estes óvulos estocados a serem utilizados em testes de toxicidade sob exigência de órgãos ambientais e outras finalidades.

4.5 CONCLUSÕES

- A utilização de 50 mg L^{-1} do antibiótico cloranfenicol em água do mar associado a estocagem em 15°C é eficiente em inibir o crescimento bacteriano, permitindo desta forma aumentar o tempo de viabilidade dos óvulos dos ouriços *L. variegatus*, *E. lucunter* e *A. lixula*.

- Devido a variações intrínsecas, o número de desovas viáveis diminui com o aumento do tempo de estocagem. No entanto, as que se mantêm viáveis geram embriões que desenvolvem normalmente até larva pluteu.

- A estocagem em água do mar artificial foi mais efetiva na estocagem de óvulos de *E. lucunter* e igual a água natural para óvulos de *A. lixula*, portanto, constitui-se como uma

excelente alternativa para a lavagem dos ouriços, desovas e estocagem de óvulos outras espécies de ouriços.

- Embriões gerados a partir de óvulos estocados, encontraram-se dentro dos limites de sensibilidade aceitáveis quando comparados a testes com embriões frescos, desta forma podem ser utilizados em testes de toxicidade em estudos de impacto ambiental.

4.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Andrade, R.L.B., Andrade, L.S., Boscolo, W.R., Soares, C.M. 2005. **Comportamento, sobrevivência e desenvolvimento de lebistes, *Poeciliareticulata*, submetidos a agentes utilizados na profilaxia de doenças.** ActaSci. Anim. Sci. Maringá. 27(4): 523-528.

Bottger, S.A., Walker, C.W., Unuma T. 2004. **Care and Maintenance of Adult Echinoderms.** Methods in Cell Biology.74: 17-38.

Costa, M.M., Peixoto, R.M., Bojjink, C.L., Castagna L., Meurer, F., Vargas, A.C., 2008. **Sensibilidade antimicrobiana de bactérias isoladas de Jundiá (*Rhamdia quelen*).** Pesq. Vet. Bras. 28(10).

ABNT. 2006. ABNT/NBR15350 – Ecotoxicologia aquática – **Toxicidade crônica de curta duração -Método de ensaio com ouriço-do-mar (Echinodermata: Echinoidea)**, 17.

Asahina, E., Takahashi, T. 1977. **Survival of sea urchin spermatozoa and embryos at very low temperatures.** Abstracts, 15th Annual Meeting. p.703.

Asahina, E., Takahashi, T. 1978. **Freezing tolerance in embryos and spermatozoa of the sea urchin.** Cryobiology. 15:122-127.

CETESB, 1992, **Teste de toxicidade crônica de curta duração com *Lytechinus variegatus*, Lamarck, 1816.** Norma Técnica CETESB, L5.250.

Dinnel, P.A., Link, J.M., Stober, Q.J. 1987. **Improved methodology for a sea urchin sperm cell bioassay for marine waters.** Arch. Environ. Contam. Toxicol. 16(1): 23-32.

Epel, **Current protocol for maintaining / storing ovulated sea urchin eggs.** Disponível em: <<http://www.stanford.edu/group/Urchin/protocol.html>>. Último acesso: 30 de abril de 2012.

Foltz, K.R., Adams, N.L., Runft, L.L. **Echinoderm Eggs and Embryos: Procurement and Culture.** IN: Ettensohn, C.A. Methods in cell biology. Vol. 74. Califórnia: 2004. ed. Elsevier. pp.39-74.

Gilbert, S.F. 2003. **Biologia do Desenvolvimento.** Editora Funpec. 5 ed. 912 p.

Spiegler, M.A., Oppenheimer, S.B. 1995. **Extending the viability of sea urchin gametes.** *Cryobiology*. 32:168-174.

Gwo, J.C. 2000. **Cryopreservation of aquatic invertebrate semen: a review.** *Aquaculture Research*. 31: 259-271.

Hose, J.E. 1985. **Potential use of sea urchin embryos for identifying toxic chemicals: Description of a bioassay incorporating cytologic, cytogenic and embryologic endpoints.** *J. Appl. Toxicol.* 5: 245-254.

Máximo, M.V., Mottola, L.S.M., Resgalla Jr, C. 2008. **Sensibilidade do ouriço *Arbacialixula* (Echinodermata: Echinoidea) em testes de toxicidade.** *J. Braz. Soc. Ecotoxicol.* 3(1):47-52.

Moriarty, D.J.W. 1998. **Control of luminous *Vibrio* species in penaeid aquaculture ponds.** *Aquaculture*. 164:351–358.

Nipper, M.G., Prósperi, V. A., Zamboni, A. J. 1993. **Coastal species of south eastern Brazil. Echinoderm Sperm and Embryos.** *Environ. Contam. Toxicol.* 50: 646-652.

Odintsova, N., Kiselev, K., Sanina, N., Kostetsky, E. 2001. **Cryopreservation of primary cell cultures of marine invertebrates.** *CryoLetters*. 22: 299-310.

West, Inc. & Gulley, D., 1996, **Toxstat Version 3.5** – University of Wyoming.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

Os dados obtidos neste estudo permitiram um significativo avanço do conhecimento científico relacionado ao ouriço-do-mar, bem como na manutenção de seus gametas para emprego em testes de toxicidade. No primeiro trabalho foi demonstrado a possibilidade de se induzir de forma artificial a liberação de gametas do *L. variegatus*, com a injeção intraperistomal de 2 mL de lidocaína + epinefrina. Este protocolo demonstrou ser tão eficiente quanto o método que tradicionalmente emprega KCl. Em contraste, a utilização deste protocolo resulta numa significativa redução da mortalidade após a indução, constituindo-se assim numa importante ferramenta para a preservação dos ouriços-do-mar, bem como adequando o processo as condições de bem estar animal, preconizadas pelos Comitês de Ética em Experimentos com Animais.

Neste experimento, também foi demonstrado que os embriões produzidos a partir de gametas artificialmente liberados com lidocaína apresentam uma constituição normal,

respondendo de forma adequada aos testes de toxicidade rotineiramente realizados com estas estruturas. Finalmente, o primeiro estudo ainda demonstrou que a resposta na liberação artificial de gametas de ouriços-do-mar é influenciada pela época do ano.

Além do significativo avanço no conhecimento científico, o primeiro estudo abre um leque de novas perspectivas que poderão ser avaliadas cientificamente a partir dos conhecimentos gerados. Existe a possibilidade de se buscar uma melhor relação dose/efeito com a lidocaína, bem como avaliar a real necessidade ou não da associação com a epinefrina. Em relação aos ouriços, novos ensaios devem ser conduzidos para avaliar a efetividade do método aqui proposto para outras espécies, além do *L. variegatus*. Ainda, novos estudos devem ser conduzidos para se avaliar a real situação da população nativa de ouriços-do-mar, bem como formas de melhor entender sua sazonalidade e variação comportamental devidas ao ambiente. Finalmente seria oportuno verificar a possibilidade de manter animais em condições de laboratório, permitindo avaliar a possibilidade de sucessivas coletas de gametas, o que permitiria reduzir a demanda por esses animais, já que após a primeira coleta, seria possível a determinação do sexo.

No segundo estudo, foi demonstrado uma nova estratégia de estocagem de óvulos dos ouriços *L. variegatus*, *E. lucunter* e *A. lixula*, com o emprego de cloranfenicol, como inibidor de crescimento bacteriano. Foi demonstrado que o número de desovas viáveis diminui com o tempo de estocagem, porém as que se mantêm viáveis geram embriões normais. Além disso, observou-se que a água do mar artificial foi mais efetiva do que a água natural filtrada na estocagem de óvulos de *E. lucunter*, porém não para a *A. Lixula*. Estas observações criam a perspectiva de novos estudos que avaliem a variação intrínseca em cada espécie, buscando o entendimento destas variações. Fica ainda evidenciado que a excessiva manipulação que resulte em lise de óvulos podem constituir um meio adequado à proliferação bacteriana, havendo a necessidade de se estabelecer protocolos adequados de manuseio destas estruturas,

Por fim, foi demonstrado que embriões gerados a partir de óvulos estocados, apresentam condições de resposta normais aos testes de toxicidade, podendo então serem utilizados, otimizando o processo e reduzindo a demanda por ouriços.

6 BIBLIOGRAFIA TOTAL

ABNT. 2006. ABNT/NBR15350 – Ecotoxicologia aquática – **Toxicidade crônica de curta duração -Método de ensaio com ouriço-do-mar (Echinodermata: Echinoidea)**, 17.

Adams, S.L., Hessian, P.A., Mladenov, P.V. 2004.**Cryopreservation of the sea urchin (*Evechinus chloroticus*) sperm**.Cryo Letters.4:287-99.

Adams, S.L, Hessian, P.A, Mladenov, P.V. 2006.**The potential for cryopreserving larvae of the sea urchin, *Evechinus chloroticus***.Cryobiology. 52:139-145.

Asahina, E., Takahashi, T. 1977.**Survival of sea urchin spermatozoa and embryos at very low temperatures**. Abstracts, 15th Annual Meeting. p.703.

Asahina, E., Takahashi, T. 1978.**Freezing tolerance in embryos and spermatozoa of the sea urchin**. Cryobiology. 15:122-127.

Bellas, J., Paredes, E. 2011. **Urchin embryos: Potential application in marine water quality assessment**.Cryobiology62(3):174-180.

Bottger, S.A., Walker, C.W., Unuma, T. 2004.**Care and maintenance of adult echinoderms**.Methods in Cell Biology.74: 17-38.

CETESB, 1992, **Teste de toxicidade crônica de curta duração com *Lytechinus variegatus*, Lamarck, 1816**. Norma Técnica CETESB, L5.250.

Clesceri, L.S., Greenberg, A.E., Eaton, A.D. 1998. **Standard methods for the examination of water and wastewater**.20th Edition, pp. 8-1, 8-140.

Dinnel, P.A., Link, J.M., Stober, Q.J. 1987. **Improved methodology for a sea urchin sperm cell bioassay for marine waters**. Arch. Environ. Contam. Toxicol., 16(1): 23-32.

ENVIRONMENT CANADA. 1992. **Biological test method: fertilization assay using echinoids (sea urchins and sand dollars)**. Env. Prot. Series. EPS 1/RM/27. 99p.

Epel, D. 1977.**The program of fertilization**. Sci. Am. 237(5):128-138.

Epel, D.**Current protocol for maintaining / storing ovulated sea urchin eggs**. Disponível em: <<http://www.stanford.edu/group/Urchin/protocol.html>>. Último acesso: 30 de abril de 2012.

Foltz, K.R., Adams, N.L., Runft, L.L. **Echinoderm Eggs and Embryos: Procurement and Culture**. IN: Ettensohn, C.A. Methods in cell biology. Vol. 74. Califórnia: 2004. ed. Elsevier. pp.39-74.

Gago, J., Luis, O. 2011. **Comparison of spawning induction techniques on *Paracentrotus lividus* (Echinodermata: Echinoidea) broodstock**.Aquacult. Int. 19:181–191.

- Gwo, J.C. 2000. **Cryopreservation of aquatic invertebrate semen: a review.** Aquaculture Research. 31:259-271.
- Gilbert, S.F. 2003. **Biologia do Desenvolvimento.** Editora Funpec. 5 ed. 912 p.
- Hinegardner, R.T. 1969. **Growth and development of the laboratory cultured sea urchin.** Biol. Bull. 137:465-475.
- Hose, J.E. 1985. **Potential use of sea urchin embryos for identifying toxic chemicals: Description of a bioassay incorporating cytologic, cytogenic and embryologic endpoints.** J. Appl. Toxicol. 5:245-254.
- Iwata, K.S. 1950. **A method of determining the sex of sea urchins and of obtaining eggs by electric stimulation.** Annot. Zoo/. Jap. 23:39-42.
- Iwata, K. S., Fukase, H. 1964. **Artificial spawning in sea urchins by acetylcholine.** Biol. J. Okayama Univ. 10:51-56.
- Laitano, K.S., Gonçalves, C. & Resgalla Jr., C., (no prelo). 2008. **Estudos sobre a sensibilidade da bolacha-do-mar (*Mellita quinquesperforata*) como organismo teste.** J. Braz. Soc. Ecotoxicol.
- Luis, O., Delgado, F. Gago, J. 2005. **Year-round captive spawning performance of the sea urchin *Paracentrotus lividus*: Relevance for the use of its larvae as live feed.** Aquat. Living Resour. 18:45-54.
- Máximo, M.V., Mottola, L.S.M., Resgalla Jr, C. 2008. **Sensibilidade do ouriço *Arbacia lixula* (Echinodermata: Echinoidea) em testes de toxicidade.** J. Braz. Soc. Ecotoxicol., 3(1): 47-52.
- Moriarty, D.J.W. 1998. **Control of luminous *Vibrio* species in penaeid aquaculture ponds.** Aquaculture, 164:351-358.
- Nipper, M. G., Prósperi, V. A., Zamboni, A. J. 1993. **Coastal species of southeastern Brazil. Echinoderm Sperm and Embryos.** Environ. Contam. Toxicol., 50: 646-652.
- Paredes E., Bellas, J. 2010. **Development of a cryopreservation protocol for sea urchin (*Paracentrotus lividus*) embryos.** Abstracts. Cryobiology. 61:362-408.
- Pironen, J. 1993. **Cryopreservation of sperm from brown trout (*Salmo trutta*) and Arctic char (*Salvelinus alpinus* L).** Aquaculture. 116:275-285.
- Spiegler, M.A., Oppenheimer, S.B. 1995. **Extending the viability of sea urchin gametes.** Cryobiology. 32:168-174.
- Subramoniam, T. 1982 **Manual of research Methods for marine invertebrate reproduction.** Cmfri. 9:181-183.
- Tommasi, L.R. 1999. **Echinodermatas recentes e fósseis do Brasil.** Base de Dados Tropical. Campinas. Disponível em: www.bdt.org.br/zoologia.

Tyler, A. 1949. **A simple, non-injurious method for inducing repeated spawning of sea urchins and sand dollars.** Collect. Net.19: 19-20.

Tyler, A., Tyler, B. 1966. **The gametes; some procedures and properties.** In R. A. Boolootian (ed.) Physiology of Echinodermata. 639-682.

USEPA. 2002. **Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to marine and estuarine organisms.** Third Edition – EPA-821-R-02-014.

