INFLUÊNCIA DE ALTERAÇÕES REPRODUTIVAS (INTERSEX) SOBRE O GASTRÓPODE *Littorina flava* NO MUNICÍPIO DE PARANAGUÁ – PR, BRASIL.

Gabriel Fraga da Fonseca (PIBIC/UEPG), Augusto Luiz Ferreira-Jr (Co-orientador), Marcia Regina Paes de Oliveira (Colaboradora), Susete Wambier Christo (Orientador), e-mail: swchristo@hotmail.com

Universidade Estadual de Ponta Grossa/Departamento de Biologia Geral.

Área do conhecimento: Ciências biológicas; Subárea: Zoologia.

Palavras-chave: Caenogastropoda, Compostos Organoestânicos, Desregulador Endócrino, Marinas, Monitoramento Ambiental.

Resumo

Dentre os moluscos, a Classe Gastropoda é descrita como o grupo mais radiado, exibindo grande variedade morfológica externa, interna e de adaptações fisiológicas, que permitem que o grupo habite ambientes marinhos, dulcícolas e terrestres. Por essas e outras características, muitos gastrópodes são utilizados como bioindicadores em avaliações de monitoramentos ambientais. Assim este estudo teve como objetivo uma maior análise de alterações morfológicas e/ou reprodutivas de gastrópodes marinhos no litoral do Paraná, que possibilitam indicar a presença de poluentes em águas costeiras, principalmente, os compostos organoestânicos (COEs). Esses compostos estão presentes em tintas antiincrustantes de navios e embarcações, que visam diminuir a presença de animais como cracas em sua superfície para manter a hidrodinâmica apropriada. No Paraná, os resultados indicaram alterações em *Stromanita* cf. *brasiliana* e *Littorina flava* em determinadas praias. Para a espécimes de *Littorina flava* na região portuária de Paranaguá as análises indicaram alterações morfológicas e/ou reprodutivas. A integração de ferramentas histológicas propicia um maior entendimento do fenômeno na região.

Introdução

Dentre os moluscos, a Classe Gastropoda é descrita como o grupo mais radiado (AKTIPIS *e col.*, 2008), exibindo grande variedade morfológica externa, interna e de adaptações fisiológicas, permitindo que o grupo habite ambientes marinhos, dulcícolas e terrestres (HYMAN, 1967; AKTIPIS *e col.*, 2008).

Infelizmente, essa classe de moluscos sofre elevada influência de compostos contaminantes de águas marinhas, como compostos organoestânicos (COEs). Presentes em tintas antiincrustantes de praticamente todos os navios e embarcações, os COEs podem causar alterações reprodutivas e fisiológicas em caenogastropodas, como *Littorina flava*. As alterações podem levar à formação de um pênis não funcional em fêmeas do molusco, fenômeno denominado *intersex*, resultando na sua incapacidade reprodutiva e, consequentemente, em um declínio populacional da espécie (Bryan et al., 1986).

Devido à relação do composto com os fenômenos reprodutivos nos animais, trabalhos de monitoria ambiental que analisem *intersex* ou *imposex*, outro fenômeno de masculinização de gastrópodes, e o seu grau de alteração de órgão reprodutivo

em fêmeas, podem indicar a presença e o grau de contaminação de COEs nas áreas costeiras em que realizou-se o estudo, assim como Castro e colaboradores (2007), que indicaram a presença de imposex em *Stramonita brasiliensis* em locais portuários de Paranaguá, Pontal do Paraná e na Ilha do Mel, regiões pertencentes ao litoral Paranaense. Em costões rochosos da Ilha do Mel, Ferreira Jr. e colaboradores (2014) obtiveram como resultado da análise da espécie *Littorina flava,* a indicação de alterações reprodutivas (*intersex*), e estabeleceram uma possibilidade de esta espécie ser bioindicadora do fenômeno pela grande densidade populacional, quando comparada com *Stramonita brasiliensis* (CARVALHO *e col.*, 2016), permitindo a captura de indivíduos para os estudos sem amplo impacto na população do local.

Diversas ferramentas podem ser utilizadas para a análise do grau de *intersex*, como técnicas histológicas. O estudo, caracterizando a situação de espécies presentes no litoral paranaense, auxilia no monitoramento ambiental e os resultados obtidos nesse trabalho, serão de grande relevância para a indicação da qualidade da água, e consequentemente possíveis alterações reprodutivas.

Materiais e Métodos

As duas amostragens foram realizadas em pontos distintos próximos ao cais de embarque da Igreja do Rocio município de Paranaguá, localizados no CEP. A primeira amostragem foi efetuada sobre a estrutura do trapiche de acesso de pequenas embarcações (barcos de suporte aos navios e barcos pesqueiros) e a segunda em vegetação natural (troncos mortos) na área adjacente (com distância de 50 metros) ao trapiche de embarque.

A amostragem foi efetuada com a captura manual de 30 espécimes de *Littorina flava* por ponto, sendo realizada distinção da espécie por análise morfológica empiricamente. Os espécimes de cada localidade foram armazenados em potes distintos, com demarcações específicas. Todos os animais foram narcotizados em solução de 1:1 de MgCl2 a 7% em água destilada e água do mar do local amostrado.

Após a narcotização, os espécimes foram pesados em balança de precisão (0,01g), e medidos com paquímetro digital a largura (diâmetro da última volta da concha) e comprimento da concha (do ápice ao final do canal sifonal). Posteriormente, os indivíduos foram dissecados, para exposição das vísceras e verificação do sexo pela visualização do pênis e do vaso deferente (em machos e em fêmeas com *intersex*) e da glândula de albúmen, da cápsula de ingestão de esrperma e da glândula de cápsulas ovígeras (em fêmeas). Avaliou-se a proporção sexual para os dois pontos amostrados. A avaliação do grau de *intersex* foi realizada pelo percentual e frequência de fêmeas *intersexadas* (GEBARA e *col.,*1999; SANTOS *e col.*, 2009).

Para descrever diferenças na biomassa (peso) e biometria da concha dos gastrópodes entre os dois pontos foi aplicado um teste U de Mann-Whitney U (α=0,05). Uma análise de correlação foi empregada para avaliar a associação entre largura, comprimento da concha com *intersex* (frequência de fêmeas *intersexadas*) em *L. flava.*

Ao final, retirou-se uma parte dos tecidos moles reprodutivos de animais com *intersex* para análise histológica, seguindo Ojeda e col. (2014), fixando o tecido em formaldeído 10% durante 12h. A seguir, utilizou-se etanol (70, 80, 90, 96 e 100%) para desidratação, com posterior imersão do tecido em xileno e em parafina, para

realização de cortes de 7µm de espessura. Os cortes foram corados em Hematoxilina e Eosina (HE), posteriormente foram analisadas em microscópio óptico.

Resultados e Discussão

Para este trabalho, duas amostragens foram realizadas, sendo a primeira no dia 10 de março de 2018 no trapiche, e apresentou salinidade no local de 23, e a segunda em um tronco, realizada em 18 de março de 2018, ocorreu, em maré vazante, com salinidade indicada de 35.

Os 60 animais amostrados passaram por avaliação de biomassa e biometria, sendo que os indivíduos do primeiro ponto (trapiche) apresentaram médias de 0,66 (±0,21) g para o peso, 10,93 (±1,17) mm para a largura da última volta e 13,11 (±1,58) mm para a altura da concha. Os indivíduos do segundo ponto (tronco) possuíram médias de 0,67 (±0,38) g para o peso, 11,56 (±1,72) mm para a largura da última volta e 13,90 (±2,27) mm para a altura da concha. Não foi observado diferenças no peso úmido (p=0,574), largura (p=0.099) e altura (0.097) da concha.

Como resultado da análise morfológica dos 60 indivíduos, evidenciou-se uma diferença na proporção sexual dos grupos das duas coletas. A primeira apresentou proporção aproximada de 2:1 de fêmeas para machos, com 19 fêmeas e 11 machos, valor que corrobora com dados encontrados em coletas de trabalhos anteriores. Todavia, no grupo amostrado no dia 18 de março, foi verificada a proporção sexual de aproximadamente 1:1, com 16 machos e 14 fêmeas, índice primeira vez visto em coletas realizadas pelo autor. De todos esses animais, foram confirmados em lupa 7 casos de alteração reprodutiva *intersex*, quatro no primeiro ponto (dois de nível 3, um de nível 1 e um de nível 2) e três do segundo ponto (todos de nível 3), dados encontrados na tabela 1. Com baixa correlação da altura ($R=0,23$; $R^2=0,05$) e largura da última volta ($R=0,19$; $R^2=0,04$) da concha com a frequência de *intersex*.

Os fenômenos de *intersex* encontrados foram analisados em lupa e enquadrados de acordo com o grau de desenvolvimento da alteração. Os dados obtidos acerca das alterações reprodutivas serão confirmados com a análise das lâminas histológicas em desenvolvimento dos 60 indivíduos.

A indicação de ocorrência de *intersex* em indivíduos da região comprova a contaminação das águas costeiras do CEP com materiais organoestânicos, sinalizando a utilização de tintas antiincrustantes proibidas ou a permanência em longo prazo desse composto em ambientes do litoral paranaense, dado alarmante para a preservação de qualquer espécie que possa ser afetada pelo resíduo.

Conclusões

A primeira coleta já demonstra a ocorrência de resíduos do TBT nas águas do litoral paranaense pelo aparecimento de espécimes com alteração reprodutiva. A utilização da histologia para confirmação do *intersex* pode ser uma importante ferramenta no trabalho, suprimindo as possibilidades do erro de análise dos animais dissecados. Esse estudo poderá oferecer base para a comparação entre trabalhos anteriores e futuros, auxiliando em uma análise mais completa da influência do tributil estanho nos gastrópodes e em outros organismos presentes nas áreas contaminadas.

Agradecimentos

Agradeço ao CNPq pela bolsa concedida durante o período de trabalho do projeto, assim como à minha orientadora Profa. Drª Susete W. Christo, pela oportunidade de exercer a pesquisa e ao Msc Augusto Ferreira-Jr pelas orientações em todos os momentos.

Referências

Aktipis, S. W., Giribet, G., Lindberg, D. R., & Ponder, W. F. 2008. Gastropoda: An overview and analysis. *In:* Ponder, W. F., & Lindberg, D. R. (2008). Phylogeny and Evolution of the Mollusca. Univ. of California Press. 201-237.

Bryan, G. W., Gibbs, P. E., Hummerstone, L. G., & Burt, G. R. (1986). The decline of the gastropod Nucella lapillus around south-west England; evidence for the effect of tributyltin from antifouling paints. Journal of the Marine Biological Association of the U.K, 66, 611–640.

Castro, I.B., Bemvenutti, C.E., Filmann, G. 2007. Preliminary Appraisal of Imposex in Areas Under the Influence of Southern Brazilian Harbors. *ECOTOX – Journal of the Braz. Soc.of Ecotox*., 2(1):73-79.

Carvalho, I.F.P., Ferreira-jr, A.L., Christo, S.W. and Absher, T.M., Distribution of gastropods in a rocky shore of Ilha do Mel, Paraná–Brazil. *Tropical Oceanography*,*44*(2).

Ferreira-Jr, A. L., Carvalho, I. F., Absher, T. M., Christo, S. W. 2014. Reprodução e potenciais impactos sobre *Littorina flava* (Neogastropoda: Littorinidae) na Ilha do Mel, Paraná. ***BJAST*****,** *18*(2), 53-57.

Gebara, L., Teles, G., Bispo, L., Wagener, A.R., Fernandez, M.A. 1999. Distribuição do imposex no gastrópode *Thais haemastoma* (Neogastropoda, Thaididae) na Baía de Guanabara, Rio de Janeiro, Brasil. *Resumo da XII Semana Nacional de Oceanografia*, 1999, Rio de Janeiro. p.381-3.

Hyman, L. H. 1967. Capítulo VII: Class Gastropoda: Introduction. Hyman, L. H. (ed) In: The Invertebrates: Mollusca I. Volume VI. Aplacophora, Polyplacophora, Monoplacophora, Gastropoda – The coelomate Bilateria. MacGraw-Hill Book Company. 152-169pp.

Santos, M. M., Eenes, P., Reis-Henriques, M. A., Kuballa, J., Castro, L. F. C., Vieira M. N. 2009. Organotin levels in seafood from Portuguese markets and the risk for consumers. *Chemosphere,* 75(5), 661–666.

Ojeda, D. D. et al. 2014. Exposure to tributyltin chloride induces penis and vas deferens development and increases RXR expression in females of the purple snail (Plicopurpura pansa). ISJ 11: 204-212.

Vermeij, G. J. Distribution, history, and taxonomy of the thaisclade (gastropoda: muricidae) in the neogene of tropical america. Journal of Paleontology, v.75, p. 697-705. 2001.

Yebra, D.M., Kiil, S., Dam-Johansen, K., 2004. Antifouling technology - Past, present and future steps towards efficient and environmentally friendly antifouling coatings. Prog. Org. Coatings 50, 75-104.