

FRANCISCO FILIPAK NETO

Avaliação da citotoxicidade de uma mistura complexa de pesticidas, MeHg e DDT em hepatócitos de *Hoplias malabaricus*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Departamento de Biologia Celular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná como requisito parcial à obtenção de título de Doutor em Biologia Celular e Molecular.

Orientador: Dr. Ciro A. de Oliveira Ribeiro
Co-orientador: Dr. Sílvio M. Zanata

CURITIBA
2007

FRANCISCO FILIPAK NETO

Avaliação da citotoxicidade de uma mistura complexa de pesticidas, MeHg e DDT em hepatócitos de *Hoplias malabaricus*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Departamento de Biologia Celular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná como requisito parcial à obtenção de título de Doutor em Biologia Celular e Molecular.

Orientador: Dr. Ciro A. de Oliveira Ribeiro
Co-orientador: Dr. Sílvio M. Zanata

CURITIBA
2007

PROGRAMA DE POS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Departamento de Biologia Celular e Departamento de Fisiologia
Setor de Ciências Biológicas
Universidade Federal do Paraná
Instituto de Biologia Molecular do Paraná

PARECER

A banca examinadora, instituída pelo colegiado do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, do Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná, composta por:



Dr. Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro

Orientador da Universidade Federal do Paraná - UFPR



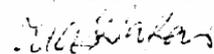
Dr. Olaf Malm

Universidade Estadual do Rio de Janeiro - UFRJ



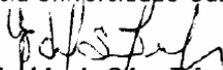
Dr. Marcos Pessatti

Universidade do Vale do Itajaí - UNIVALI



Dr. Lia Sumie Nakao

Pontifícia Universidade Católica do Paraná - PUCPR



Dr. Edvaldo da Silva Trindade

Universidade Federal do Paraná - UFPR

e tendo como suplentes,

Dr. Célia Regina Cavichiolo Franco

Universidade Federal do Paraná - UFPR

Dr. Helena Cristina Silva de Assis

Universidade Federal do Paraná - UFPR

após arguir o(a) doutorando(a) **Francisco Filipak Neto** em relação ao seu trabalho de tese intitulada: "**Avaliação citotóxica em hepatócitos de *Hoplias malabaricus* expostos a misturas complexas de pesticidas, MeHg e DDT**", é de parecer favorável à **APROVAÇÃO** do(a) acadêmico(a), habilitando-o(a) ao título de Doutor em Biologia Celular e Molecular, área de concentração em **Biologia Celular e Molecular**.

A obtenção do título de Doutor está condicionada à implementação das correções sugeridas pelos membros da banca examinadora e ao cumprimento integral das exigências estabelecidas nas Normas Internas deste curso de pós-graduação.

Curitiba, 23 de agosto de 2007



Ricardo Fernandez Perez
Coordenador do Curso

SUMÁRIO

LISTA DAS PRINCIPAIS ABREVIações	i
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	ii
RESUMO	iii
ABSTRACT	iv
INTRODUÇÃO GERAL	1
CAPÍTULO I: Cultivo primário de hepatócitos de <i>Hoplias malabaricus</i> como modelo para ensaios <i>in vitro</i> com xenobióticos.....	4
RESUMO	4
1. INTRODUÇÃO.....	5
2. OBJETIVOS	9
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	10
3.1 Obtenção e cuidados com os peixes	10
3.2 Isolamento das células	10
3.3 Rendimento do isolamento	11
3.4 Determinação da viabilidade celular	11
3.5 Pré-tratamentos para melhorar a adesão celular (fase de padronização)	11
3.6 Condições escolhidas para o cultivo celular	11
3.7 Monitoramento da cultura	12
3.8 Ultraestrutura Celular.....	12
3.8.1 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).....	12
3.8.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	12
4. RESULTADOS	14
4.1 Variação de pH no meio de cultura, viabilidade celular e rendimento do isolamento	14
4.2 Adesão dos hepatócitos após tratamento de garrafas de cultura	14
4.3 Mudanças na cultura ao longo do tempo	14
4.4 Morfologia dos hepatócitos em cultura	15
5. DISCUSSÃO.....	20
6. CONCLUSÕES.....	26
CAPÍTULO II: Caracterização da toxicidade de uma mistura complexa de pesticidas organoclorados em hepatócitos de <i>Hoplias malabaricus</i>.....	27
RESUMO	27
1. INTRODUÇÃO.....	28
2. OBJETIVOS	32
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	33
3.3 Condições para o cultivo celular	33
3.4 Teste com mistura de pesticidas organoclorados.....	33
3.4.1 Preparo da mistura e escolha das concentrações testadas.....	33
3.4.2 Desenho experimental adotado	36
3.6 Ensaio Cometa	36
3.7 Ensaio <i>TUNEL</i>	37
3.8 Ensaio bioquímicos	38
3.8.1 Peroxidação lipídica (LPO)	39
3.8.2 Concentração de Glutathione Reduzida (GSH)	40
3.8.3 Atividade das Catalases (CAT)	41
3.8.4 Atividade Global das Isoformas de GST	42
3.8.5 Quantificação de proteínas totais.....	43
3.9 Tratamento estatístico dos dados	44
4. RESULTADOS	45
4.1 Viabilidade Celular e Apoptose	45
4.2 Ensaio Cometa	46
4.3 Ensaio Bioquímicos.....	47
5. DISCUSSÃO.....	50
6. CONCLUSÕES.....	60
CAPÍTULO III: Caracterização da toxicidade do DDT, metilmercúrio (MeHg) e mistura DDT+MeHg em hepatócitos de <i>Hoplias malabaricus</i>.....	61
RESUMO	61
1. INTRODUÇÃO.....	62
2. OBJETIVOS	66
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	67
3.2 Isolamento das células	67
3.3 Condições para o cultivo celular	67
3.4 Desenho experimental	67
3.5 Viabilidade Celular.....	69
3.7 Ensaio bioquímicos	69

3.7.5 Atividade da Glutathione dissulfeto redutase (GR)	69
3.7.6 Atividade das Superóxido dismutases (SOD)	70
3.7.7 Atividade da Glucose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH)	71
3.7.10 Conteúdo de glicogênio	74
3.8 Detecção de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs)	75
3.9 Tratamento estatístico dos dados	76
4. RESULTADOS	78
4.1 Viabilidade celular e apoptose	78
4.2 Atividades enzimáticas das CAT, GST, GR, SOD, G6PDH e δ -ALAd	79
4.3 Conteúdo celular de GSH e glicogênio	83
4.4 Peroxidação lipídica e carbonilação de proteínas.....	84
4.5 Detecção de espécies reativas de oxigênio.....	85
5. DISCUSSÃO.....	87
6. CONCLUSÕES.....	102
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	103
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	106

LISTA DAS PRINCIPAIS ABREVIações¹

CAT – catalase(s)
DDT - diclorodifeniltricloroetano
DMSO – dimetilsulfóxido
EDTA – Ácido etileno diamino tetracético (do inglês *Ethylenediaminetetraacetic Acid*)
ERO(s) – espécie(s) reativa(s) de oxigênio
FOX - do inglês **Ferrous Oxidation / Xylenol Orange Method**
G6PDH – glucose-6-fosfato desidrogenase
GPx – glutatona peroxidase
GR – glutatona redutase
GSH – glutatona reduzida
GSSG – glutatona dissulfeto (glutatona oxidada)
GST – glutatona S-transferase(s)
H₂O₂ – peróxido de hidrogênio
HCH – hexaclorocicloexano
HEPES – do inglês *N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-Ethanesulfonic Acid*
Hg - mercúrio
HO• - radical hidroxila
LPO – peroxidação lipídica (do inglês *lipid peroxidation*)
MeHg – monometilmercúrio
MET – microscopia eletrônica de transmissão
MEV – microscopia eletrônica de varredura
O₂^{•-} - (radical) ânion superóxido
PBS - tampão fosfato salino (do inglês *phosphate buffer saline*)
PCBs – bifenilas policloradas (do inglês *polychlorinated biphenyls*)
PCO – carbonilação de proteínas (do inglês *protein carbonyl content or protein carbonylation*)
pCO₂ – pressão parcial de CO₂
PKC – proteína(s) quinase(s) c
POC(s) – pesticida(s) organoclorado(s)
POPs – poluentes organopersistentes
ROOH – hidroperóxido(s) orgânico(s)
SOD – superóxido dismutase(s)
TUNEL - do inglês **Terminal deoxynucleotidyltransferase dUTP Nick End Labeling**
δ-ALAd – delta-aminolevulinato desidratase

¹ Abreviações citadas apenas uma vez ou em seqüência próxima no texto não estão listadas. Também não estão listados os símbolos de elementos químicos ou de íons/moléculas mais comuns (p.ex. OH⁻, O₂). Abreviações, em inglês, muito usadas em laboratório foram mantidas no idioma original (p.ex. PBS (ao invés de TFS)).

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1. Espécimes de <i>Hoplias malabaricus</i> - traíra. -----	1
FIGURA 2. Hepatócitos de <i>H. malabaricus</i> sob microscopia de luz (óptica).-----	17
FIGURA 3. Culturas de hepatócitos de <i>H. malabaricus</i> sob MEV. -----	18
FIGURA 4. Culturas de hepatócitos de <i>H. malabaricus</i> sob MET. -----	19
FIGURA 5. Viabilidade celular estimada através do ensaio de exclusão do azul de tripan. -----	45
FIGURA 6. Apoptose estimada pelo ensaio TUNEL. -----	46
FIGURA 7. Nucleóides de hepatócitos de <i>H. malabaricus</i> visualizados no ensaio Cometa. -----	46
FIGURA 8. Atividade específica das CAT. -----	47
FIGURA 9. Atividade específica das GST. -----	48
FIGURA 10. Concentração de glutathiona reduzida (GSH).-----	48
FIGURA 11. Peroxidação lipídica – concentração de hidroperóxidos lipídicos -----	49
FIGURA 12. Efeitos causados pelo DMSO e alguns mecanismos hipotéticos.-----	58
FIGURA 13. Efeitos causados pela mistura de POCs e alguns mecanismos hipotéticos.-----	59
FIGURA 14. Viabilidade celular estimada através de ensaio com iodeto de propídio. -----	78
FIGURA 15. Apoptose estimada pelo ensaio TUNEL. -----	79
FIGURA 16. Atividade específica das CAT. -----	79
FIGURA 17. Atividade específica das GST.-----	80
FIGURA 18. Atividade específica das SOD. -----	80
FIGURA 19. Atividade específica da GR. -----	81
FIGURA 20. Atividade específica da δ -ALAd.-----	82
FIGURA 21. Atividade específica da G6PDH. -----	82
FIGURA 22. Concentração de glutathiona reduzida (GSH).-----	83
FIGURA 23. Conteúdo de glicogênio celular. -----	84
FIGURA 24. Peroxidação lipídica – concentração de hidroperóxidos lipídicos. -----	84
FIGURA 25. Carbonilação de proteínas.-----	85
FIGURA 26. Produção de espécies reativas de oxigênio. -----	86
FIGURA 27. Efeitos causados pelo DDT e MeHg e alguns mecanismos hipotéticos. -----	100
TABELA 1. Relação e concentração dos POCs identificados presentes na mistura empregada para expor os hepatócitos e suplementos do meio de cultura. -----	35
TABELA 2. Percentagem de incidência das classes de dano ao DNA (0, 1, 2 e 3) e escores. -----	47
TABELA 3. Concentrações de DDT e Hg detectadas em músculo e fígado de peixes.-----	65

RESUMO

Um procedimento de fácil reprodução para o isolamento de hepatócitos de *Hoplias malabaricus* e condições de cultivo foram padronizadas no capítulo I para posterior emprego em ensaios com xenobióticos (capítulos II e III). Os hepatócitos puderam ser cultivados durante 1-3 semanas, sendo que o período de uma semana foi escolhido como tempo limite para os ensaios. No capítulo II, avaliou-se o efeito de uma mistura de pesticidas organoclorados extraídos da gordura hepática de enguias expostas naturalmente e coletadas na Reseva de Camarguè – França, depois de 48 horas de exposição. O desenho experimental incluía dois controles (grupo controle e solvente) e duas concentrações da mistura (10 e 50 ng.ml⁻¹), sendo que foram analisados sete biomarcadores (atividade das enzimas catalase e glutathione S-transferase, concentração de glutathione reduzida, peroxidação de lipídios, incidência de apoptose, viabilidade celular e quebras do DNA), os quais responderam conforme o grupo experimental. No capítulo III, foi investigado o efeito do DDT e do monometilmercúrio (MeHg) após 96 horas de exposição. O desenho experimental incluía um grupo controle e quatro expostos (DDT a 50 nM, MeHg a 0,25 µM e a 2,5 µM, e uma mistura de DDT a 50 nM mais MeHg a 0,25 µM). Aos biomarcadores avaliados no capítulo II (com exceção do ensaio de quebras do DNA), acrescentaram-se oito novos para o capítulo III (atividade das enzimas superóxido dismutase, glutathione dissulfeto redutase, delta-aminolevulinato desidratase e glucose-6-fosfato desidrogenase, carbonilação de proteínas, concentração de glicogênio celular, produção de peróxido de hidrogênio e de ânion superóxido). Esses marcadores também responderam conforme o grupo experimental. A soma dos capítulos II e III configura-se no primeiro registro empírico de ensaios *in vitro* empregando hepatócitos da espécie *Hoplias malabaricus* como modelo para avaliar o efeito de xenobióticos.

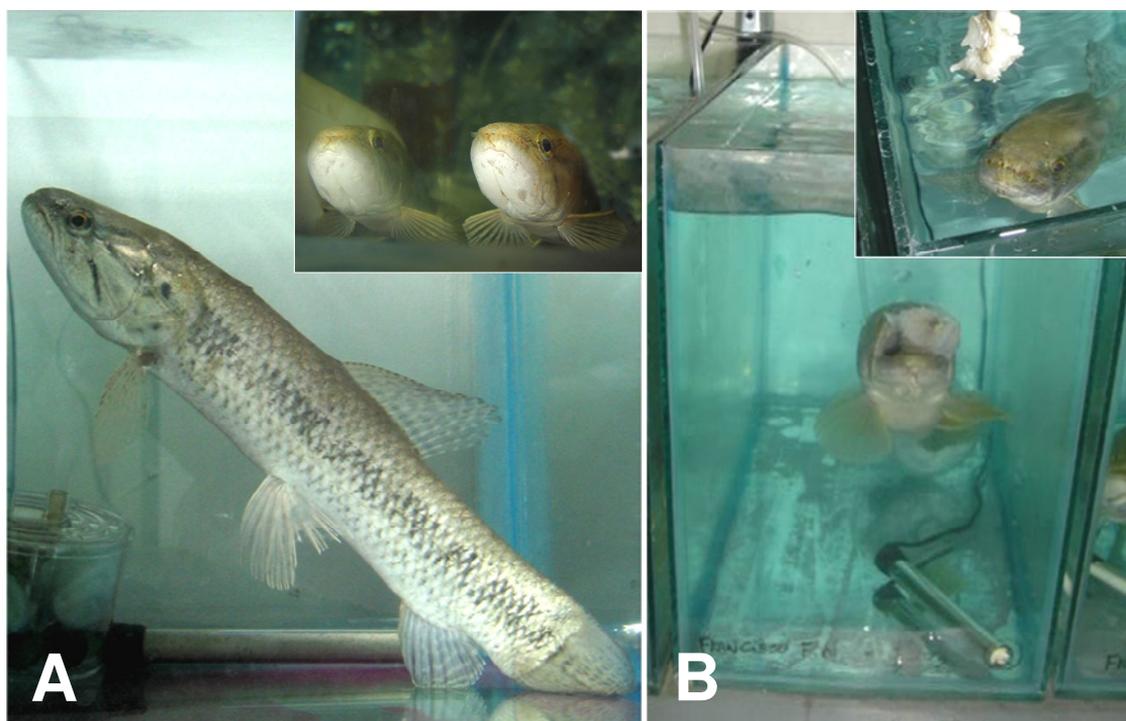
ABSTRACT

A simple and easily reproducible procedure to isolate *Hoplias malabaricus* hepatocytes and the required culture conditions to maintain these cells were standardized in the chapter I. Then, two independent studies were conducted to evaluate the effects of xenobiotics (chapter II and III) on those cells. Hepatocytes were successfully cultured during 1-3 weeks, and the period of one week was selected as the limit of time for any assay. In the chapter II, the effects of one chlorinated pesticides mixture extracted from the eel hepatic lipids were determined after two days of cell exposure. The experimental design included two controls (control and solvent groups) and two different concentrations of the mixture (10 and 50 ng.ml⁻¹). Seven biomarkers were analyzed (enzymatic activities of catalase and glutathione S-transferase, concentration of reduced glutathione, lipid peroxidation, incidence of apoptosis, cell viability and DNA fragmentation). They responded according to each experimental group. In the chapter III, the effects of concentrations of DDT and monomethyl mercury (MeHg) reported in the tissues of fishes naturally raised were investigated after four days of cell exposure. The experimental design included one control and four tested groups (DDT at 50 nM, MeHg at 0,25 µM and at 2.5 µM, and the mixture of DDT at 50 nM plus MeHg at 0,25 µM). To the aforementioned biomarkers analyzed in chapter II, eight new biomarkers were added (activity of superoxide dismutase, glutathione reductase, delta-aminolevulinic acid dehydratase and glucose-6-phosphate dehydrogenase, protein carbonyl content, glycogen content and production of hydrogen peroxide and superoxide anion), which varied according to each experimental group. The sum of chapters II and III is the first empirical register of *in vitro* assays using *Hoplias malabaricus* hepatocytes as a research model to evaluate the effects of xenobiotics.

INTRODUÇÃO GERAL

A espécie *Hoplias malabaricus* (BLOCK, 1794) - traíra (Figura 1) - pertence à ordem Characiformes e à família Erythrinidae. É uma espécie de teleósteo predador de água doce com ampla distribuição geográfica que abrange todas as bacias hidrográficas da América do Sul, com exceção da área transandina e dos rios da Patagônia. Habita preferencialmente ambientes lânticos, embora possa ser encontrada em rios (FOWLER, 1950).

FIGURA 1. Espécimes de *Hoplias malabaricus* - traíra.



Peixes mantidos no Laboratório de Bioensaios (aquários de 30 litros), Departamento de Biologia Celular, Setor de Ciências Biológicas, UFPR. (A, B) Peixes de 100-200 g aguardando serem alimentados.

Diversos estudos *in vivo* em laboratório já realizados (SUNDIN *et al.*, 1999; REID *et al.*, 2000; RABITTO *et al.*, 2005; RIOS *et al.*, 2005; OLIVEIRA RIBEIRO *et al.*, 2006; ALVES COSTA *et al.*, 2007; MELA *et al.*, 2007) são indicativos da eficiência da espécie *Hoplias malabaricus* como modelo de peixe tropical nos estudos de toxicologia experimental. Do ponto de vista da toxicologia, espécie em questão é particularmente valiosa pelo fato de ser abundante nos ambientes naturais brasileiros, ter tamanho satisfatório para a obtenção de quantidade de amostra biológica suficiente para a realização de

diferentes tipos de ensaios, acomodar-se² facilmente às condições de laboratório e ingerir sua presa inteira e rapidamente³.

Além de ensaios em laboratório, estudos *in situ* têm empregado a espécie *Hoplias malabaricus* (MOL *et al.*, 2001; PORTO *et al.*, 2005; SOUZA LIMA *et al.*, 2005; DOREA *et al.*, 2006; OLIVERO-VERBEL *et al.*, 2006; MIRANDA, 2006; SEBRENSKI SILVA, 2007). Contudo, não há relatos da utilização da espécie em estudos *in vitro*, o que poderia complementar ou até explicar alguns dos dados empíricos obtidos para a espécie sob um novo enfoque, o celular, sobretudo em células consideradas alvo de muitos xenobióticos, como as células hepáticas.

Há décadas sabe-se que o fígado é o principal⁴ órgão responsável pelo metabolismo de drogas e xenobióticos em vertebrados. Isso porque as células do parênquima hepático, os hepatócitos, tornaram-se especializadas, ao longo da evolução, na remoção de substâncias tóxicas recém absorvidas, na sua biotransformação⁵ e no lançamento dos produtos de biotransformação na circulação (KLASSEN *et al.*, 1996; RODRIGUES, 2003) para posterior excreção.

Na toxicologia aquática, culturas primárias e linhagens estabelecidas de hepatócitos de peixes têm sido amplamente empregadas em diversos estudos de toxicidade e de biomecanismos. Contudo, peixes exóticos são utilizados

² Conceitos importantes:

- Adaptação – caractere(s) hereditário(s) que permite(m) o ajuste de uma espécie ao seu ambiente de vida (FONTAINE, 1993). Processo coletivo que permite um ajuste a condições ambientais novas ou alteradas (escala de tempo evolutiva), envolvendo mudanças no *pool* gênico de uma população ou espécie em consequência da ação da seleção natural.

- Acomodação, adequação ou ajuste fisiológico: processo decorrente de um desafio fisiológico do meio de vida de um organismo, com mudanças morfofuncionais (FONTAINE, 1993) e/ou comportamentais não hereditárias em um organismo (escala de tempo = período de vida do organismo), conferindo-lhe tolerância. Processo individual que utiliza o patrimônio genético de um ser vivo para “afinar” seu funcionamento.

Outros termos importantes: aclimação (acomodação, geralmente à temperatura), que pode ser uma aclimatação (processo que ocorre em laboratório) ou uma aclimatização (processo que ocorre no ambiente natural) (BEGON *et al.*, 2006).

³ Isso permite um bom controle da dose ingerida de xenobiótico em experimentos de exposição trófica.

⁴ Apesar de o fígado ser o principal sítio de metabolismo de muitos xenobióticos, o metabolismo extra-hepático contribui notavelmente para a biotransformação e eliminação de muitos xenobióticos.

⁵ A modificação química, ou modificações, que um xenobiótico sofre num sistema biológico (biotransformação) pode caracterizar uma destoxificação ou uma bioativação. O primeiro advém da remoção de propriedades tóxicas, total ou parcialmente, enquanto que o segundo incide quando há um aumento de toxicidade em relação ao xenobiótico de origem.

como modelos biológicos na maioria desses estudos, o que limita a extrapolação de dados para as espécies brasileiras.

Em luz dos fatos acima discorridos, uma metodologia para o isolamento e cultivo primário de hepatócitos de *Hoplias malabaricus* foi padronizada (capítulo I). A partir dessa padronização, aplicou-se o modelo em dois estudos independentes. O primeiro estudo conduzido verificou os efeitos de uma mistura de pesticidas organoclorados (capítulo II) em hepatócitos cultivados, enquanto que o segundo verificou os efeitos do DDT e monometilmercúrio (capítulo III) no mesmo tipo celular.

CAPÍTULO I

CAPÍTULO I: Cultivo primário de hepatócitos de *Hoplias malabaricus* como modelo para ensaios *in vitro* com xenobióticos

RESUMO

Visando a complementação de dados obtidos a partir de ensaios *in vivo* realizados com a espécie *Hoplias malabaricus*, um método para o isolamento e cultivo primário de hepatócitos da espécie citada foi padronizado, a partir de outros protocolos. Esse método configura-se numa ferramenta fundamental para ensaios de caracterização de resposta e efeitos celulares e de investigação de mecanismos moleculares e bioquímicos envolvidos na expressão de um determinado “fenótipo” pós-exposição a agentes xenobióticos. A metodologia padronizada envolve a perfusão não enzimática (com quelante de metais divalentes como Cálcio e Magnésio) do fígado previamente removido do corpo do peixe a uma placa de *Petri*, durante 30 a 70 min. O fígado é então cortado e as células são forçadas a passar através de uma tela metálica para melhor dissociação. Depois de seguidas lavagens em PBS e meio de cultura, as células são semeadas e cultivadas por até vinte e três dias a 22-24 °C e pCO₂ atmosférica. Aproximadamente 6,9-9,4x10⁷ hepatócitos são obtidos por grama de fígado, com viabilidade média de 75%. É necessário de dois a três dias para as células aderirem completamente e os ensaios com xenobióticos devem ter início após esse período de tempo. A proporção dos tampões no meio de cultura foi ajustada para 15 mM de HEPES e 6 mM de bicarbonato de sódio, a fim de manter o pH estável (7,8) sem o uso de incubadora de CO₂. O meio escolhido foi o RPMI 1640 suplementado com 0,1-0,2 U.ml⁻¹ de insulina mista (bovino-suína) e 5-10% de soro bovino fetal. As mudanças morfológicas típicas de hepatócitos em cultura e análise sob microscopia de contraste de fase, de campo claro, eletrônica de varredura e de transmissão, bem como teste de viabilidade celular indicam que as condições necessárias para a recriação de um ambiente adequado à sobrevivência dos hepatócitos são supridas. A quantidade de hepatócitos e a viabilidade celular obtidas permitem que, a partir da população de células provenientes de um único animal, vários grupos experimentais sejam estabelecidos, havendo um bom uso de número reduzido de espécimes, o que é fundamental do ponto de vista ético. Além disso, a iniciativa em implantar o presente modelo é fundamental, uma vez que não há relatos até o presente momento de que culturas primárias de hepatócitos de espécies de peixes nativas brasileiras estejam sendo empregadas para ensaios com qualquer tipo de xenobiótico.

Publicação referente ao presente capítulo:

FILIPAK NETO, F.; ZANATA, S.M.; RANDI, M.A.F.; PELLETIER, É.; OLIVEIRA RIBEIRO, C.A. Hepatocytes primary culture from the Neotropical fish trahira *Hoplias malabaricus* (BLOCH, 1794). **J. Fish Biol.**, v.69, p.1524-1532, 2006.

1. INTRODUÇÃO

A toxicologia utiliza diversas e diferentes abordagens para identificar ameaças e entender os processos básicos que ocorrem nos sistemas biológicos. Modelos *in vitro* que retenham as características básicas de condições *in vivo* mais complexas e que possam ser experimentalmente manipulados para fins de investigação, como o cultivo de células normais⁶, são particularmente proveitosos (BAKSI e FRAZIER, 1990) nesse campo de pesquisa.

Dentre as diversas células diferenciadas de vertebrados, os hepatócitos são provavelmente as mais versáteis do ponto de vista metabólico. Sabe-se que nesses organismos o fígado é fundamental para a manutenção da homeostase, sendo o sítio, bem como o alvo, de processos complementares que mantêm as funções hepáticas em harmonia com os requerimentos metabólicos de todo o organismo (GUILLOUZO *et al.*, 1990). Logo, modelos *in vitro* empregando hepatócitos são ferramentas aplicáveis em diversos estudos. Alguns desses estudos enfocam no metabolismo, na regulação do pH, no transporte através de membrana, na síntese protéica, na regulação e na interação hormonal. Já outros estudos visam investigar a citotoxicidade, a genotoxicidade ou a biotransformação de xenobióticos (BAKSI e FRAZIER, 1990).

Dentre os diversos tipos de modelos *in vitro* com hepatócitos, o cultivo primário merece um destaque especial, pois permite ensaios biomecanísticos bastante elaborados e sofisticados (SEGNER, 1998), onde células intactas são mantidas sem a complexidade da interação sistêmica (ENDERSON e DEWAIDE, 1969; SEGNER, 1998) encontrada no organismo ileso. Além disso, como benefícios desse modelo, citam-se: a possibilidade de um controle rigoroso das condições experimentais; a facilidade em se aumentar o número de réplicas e na interpretação dos resultados; a baixa variabilidade experimental; a pequena quantidade de produtos químicos requeridos para estudos de concentração-resposta completos, com a geração de menos

⁶ O termo “células normais” foi utilizado em oposição ao cultivo de linhagens celulares, que são anormais em pelo menos um aspecto, a transposição da barreira de senescência (não há, em geral, redução gradual no tamanho telômeros ao longo das mitoses). Por esse motivo, as células de linhagens estabelecidas podem realizar uma quantidade elevadíssima de mitoses.

resíduos tóxicos; o menor número de espécimes requeridos para os estudos; e o fato dos ensaios serem geralmente rápidos e de custo não elevado (BAKSI e FRAZIER, 1990; GUILLOUZO *et al.*, 1997; SEGNER, 1998). Em posição de destaque, não pode deixar de ser mencionado que os ensaios com hepatócitos em cultura não causam sofrimento aos animais utilizados, senão àquele do seu sacrifício.

Hepatócitos recém isolados respondem aos sinais para os quais eles respondiam antes da dissociação do fígado e são ricos em enzimas de metabolismo de drogas e xenobióticos⁷ (GUILLOUZO *et al.*, 1990). Em outras palavras, os hepatócitos mantêm um fenótipo diferenciado durante algum tempo em cultura.

Um aspecto importante da função diferenciada do fígado é a rápida perda da capacidade de metabolismo de xenobióticos nos cultivos em monocamada longos. Particularmente, os níveis celulares de algumas isoformas⁸ do citocromo P450 decrescem *in vitro* (GUGUEN-GUILLOUZO e GUILLOUZO, 1983; SINGH *et al.*, 1996) com o tempo em cultura. Isso não representa uma perda total da atividade das enzimas, mas sim parece ser uma desdiferenciação das células hepáticas (SEGNER, 1998).

Os dados empíricos disponíveis indicam uma maior estabilidade em enzimas de biotransformação de teleósteos que de mamíferos (STEGEMAN *et al.*, 1993; PESONEN e ANDERSSON, 1997). Vários autores relataram constância ou até aumento nos níveis de 7-etoxiresorufina-O-desetilase - EROD (PESONEN e ANDERSSON, 1991; BRAUNBECK e STORCH, 1992; STEGEMAN *et al.*, 1993) e conservação da atividade de enzimas da fase II, como das Glutathione S-transferases (GST) e das UDP-glucuroniltransferases (PESONEN e ANDERSSON, 1991) para hepatócitos de peixes de algumas espécies.

Para se cultivar hepatócitos de teleósteos por um período de tempo prolongado é necessário identificar as condições de cultivo que previnam, ou ao menos reduzam, a perda da diferenciação e da viabilidade das células

⁷ Enzimas convencionalmente divididas em enzimas de fase I (catalisam processos geralmente oxidativos, redutores e hidrolíticos) e de fase II (enzimas que catalisam, em geral, conjugações) (GUILLOUZO *et al.*, 1990).

⁸ Isoformas - duas ou mais formas moleculares de uma subunidade protéica ou proteínas funcionalmente relacionadas que diferem levemente em sua estrutura (STENESH, 1989).

isoladas. Os fatores que mudam com a transferência do ambiente *in vivo* para o *in vitro* incluem o suprimento de sangue (provisão de nutrientes, fatores endócrinos, remoção de metabólitos etc) e o microambiente celular (contato celular heterotípico⁹ e homotípico¹⁰ e componentes da matriz extracelular) (SEGNER, 1998). Logo, parece ser necessário que fatores como os componentes solúveis do meio, a matriz extracelular e as interações célula-célula sejam recriados *in vitro* para a sobrevivência e manutenção da diferenciação fenotípica dos hepatócitos cultivados (GUGUEN-GUILLOUZO e GUILLOUZO, 1983; GOULET *et al.*, 1988; GUILLOUZO *et al.*, 1990; GUGUEN-GUILLOUZO e CORLU, 1993; SKETT, 1994).

As metodologias de isolamento de hepatócitos já são bem conhecidas para diversos peixes exóticos de ambiente dulcícola (truta, carpa, peixe-lua etc) e de ambiente marinho (diabo-marinho, linguado, salmão, peixe-escorpião etc). Contudo, a recriação de um ambiente capaz de manter os hepatócitos totalmente diferenciados em culturas mais longas ainda é um desafio.

A seleção das espécies para preparações de hepatócitos tem sido baseada em critérios como a facilidade em se obter e manter a espécie, a existência de informação biológica relevante e a função metabólica que se quer investigar com o ensaio (BAKSI e FRAZIER, 1990). Além desses critérios, a representatividade do modelo é um fator que não pode deixar de ser considerado. A história evolutiva de peixes exóticos é, geralmente, diferente da vivida por espécies nativas. Logo, modelos importados não necessariamente aplicam-se aos ecossistemas brasileiros, o que requer o desenvolvimento de modelos empregando espécies nativas, como a espécie *Hoplias malabaricus*.

Por questões de cunho científico, técnico, ético e econômico, o cultivo primário de células normais representa uma ferramenta indispensável para estudos de toxicidade e de mecanismos moleculares envolvidos na ação de xenobióticos. Os hepatócitos de *Hoplias malabaricus* provêm de uma espécie de peixe predadora nativa, que se mostrou excelente modelo *in vivo*. Então, a padronização de metodologias de isolamento e cultivo primário dessas células é de extrema importância para possibilitar ensaios complementares, ou que vislumbrem a investigação de aspectos mecanísticos da toxicidade de agentes

⁹ Entre hepatócitos e outros tipos celulares.

¹⁰ Entre hepatócitos apenas.

químicos estressores de interesse. A padronização do modelo em questão é o assunto tratado no presente capítulo.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Padronizar uma metodologia de isolamento e cultivo primário de hepatócitos de *Hoplias malabaricus* para estudos com xenobióticos.

2.2 Objetivos específicos

- Aprimorar o método para o isolamento em laboratório e o cultivo primário de hepatócitos de *Hoplias malabaricus*;
- Investigar as condições celulares durante e após o procedimento de cultivo através de microscopia de luz (óptica) e a ultraestrutura celular através da microscopia eletrônica;
- Estabelecer um protocolo para a utilização desse tipo celular em experimentos de citotoxicidade com base no modelo padronizado.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção e cuidados com os peixes

Exemplares de *Hoplias malabaricus* de 200 g a 1 kg foram obtidos em piscicultura e chácara particular e transportados para o Laboratório de Bioensaios do Departamento de Biologia Celular (Setor de Ciências Biológicas) da UFPR. Os espécimes foram mantidos individualmente em aquários de 30 litros ou caixas de fibra de vidro de 80 litros (conforme tamanho do organismo). As condições controladas foram: aeração constante, fotoperíodo claro/escuro de 12 h e alimentação em intervalos de dois a três dias até saciação, com lambaris (*Astyanax* sp) ou carpas (*Cyprinus carpio*) juvenis vivos e/ou pedaços de músculo de traíras previamente sacrificadas. Antes de serem utilizados para a obtenção de células, os peixes permaneceram em jejum¹¹ durante três a quatro dias.

3.2 Isolamento das células

Para cada cultura primária realizada, um espécime de peixe foi anestesiado (MS222 a 0,02% em água) e sacrificado por secção espinhal logo abaixo do crânio. Após a remoção de um conjunto de escamas na região ventral do peixe, assepsia com etanol a 70% e clorexidina alcoólica a 2%, o espécime foi levado ao fluxo laminar e o lobo hepático esquerdo (ou ambos os lobos) foi(ram) cuidadosamente removido(s) para uma placa de *Petri*. Então, o fígado foi perfundido manualmente por injeção, com emprego de seringa e agulha, de tampão fosfato salino (PBS¹², pH 7,8, 4°C) acrescido de 2 mM de EDTA (ácido etileno diamino tetracético) sal dissódico durante um período de 30 a 70 min. Essa perfusão foi realizada inicialmente pela veia porta-hepática e, em seguida, por injeção do PBS-EDTA em outros vasos sanguíneos do fígado, a fim de que o órgão recebesse a referida solução de perfusão em toda sua extensão. O órgão foi, em seguida, cortado com auxílio de pinças e lâmina de bisturi e pressionado com o bulbo de uma pipeta *Pasteur* de plástico estéril contra uma tela de metal (poros de aproximadamente 1 mm) para melhor

¹¹ O jejum é necessário para esvaziamento dos conteúdos estomacal e intestinal. Isso facilita o procedimento de extirpação do fígado e reduz o risco de rompimento do intestino.

¹² PBS: NaCl a 136,5 mM, KCl a 2,68 mM, Na₂HPO₄ a 5,4 mM, KH₂ PO₄ a 1,76 mM.

dissociação das células. As células foram coletadas em PBS ou meio de cultura, lavadas e centrifugadas em baixa rotação ($100 - 120 \times g$)¹³ para remoção de células rompidas e restos do fígado.

3.3 Rendimento do isolamento

O número de células isoladas no procedimento supracitado foi determinado por contagem manual em câmara de *Neubauer* e correlacionado com a massa do fígado (verificada antes da dissociação das células, tomando-se o cuidado de não expor o órgão em ambiente não estéril).

3.4 Determinação da viabilidade celular

A viabilidade celular foi estimada através do teste de exclusão do corante azul de tripan¹⁴. Com essa finalidade, meio de cultura contendo células em suspensão (40 μ l) e o corante azul de tripan a 0,4% (10 μ l) foram adicionados a um tubo de 0,5 ml e misturados. Após 1 min, 200 células foram classificadas visualmente em células viáveis¹⁵ e não viáveis¹⁶ sob microscopia de campo claro.

3.5 Pré-tratamentos para melhorar a adesão celular (fase de padronização)

Além de alguns ensaios previamente realizados (FILIPAK NETO, 2003) nos quais garrafas de cultura e lamínulas de vidro foram tratadas *overnight* a temperatura ambiente com fibronectina de soro humano (10 μ g.ml⁻¹), poli-L-lisina (0,1 mg.ml⁻¹) e matrigel (10 μ g.ml⁻¹), testou-se a adesão de hepatócitos em duas outras marcas de garrafas de cultura, com e sem pré-tratamento com colágeno do tipo I desnaturado (gelatina) a 1,5%.

3.6 Condições escolhidas para o cultivo celular

As células foram semeadas em garrafas de cultura Corning® sem pré-tratamento numa densidade de $0,5-1 \times 10^6$ células por mililitro de meio de cultura RPMI 1640 (pH 7,8) suplementado com HEPES (15 mM), bicarbonato de sódio

¹³ Fórmula para conversão de RPM (rotações por minuto) em g (força g): $g = 0,0000118 \times \text{raio do rotor da centrifuga (em cm)} \times (\text{rpm})^2$

¹⁴ Observar que o ensaio não quantifica células rompidas.

¹⁵ Células não coradas (membrana íntegra).

¹⁶ Células coradas de azul (membrana não íntegra, logo permeável ao corante).

(6 mM), insulina mista ($0,2 \text{ U.ml}^{-1}$), sulfato de gentamicina (40 mg.l^{-1}) e soro de feto bovino (5-10% v.v⁻¹). As garrafas de cultura contendo as células foram mantidas a 22-24 °C e pCO₂ atmosférica (em estufa convencional) por variados períodos de tempo.

3.7 Monitoramento da cultura

Mudanças evidentes na morfologia celular, crescimento de células contaminantes, reorganização e morte das células ao longo do tempo foram monitoradas com emprego de microscópio de contraste de fase.

3.8 Ultraestrutura Celular

3.8.1 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Para MET, as células foram cultivadas durante cinco/sete dias. Após esse períodos de tempo, elas foram removidas das garrafas de cultura por raspagem com *cellscraper*, fixadas em solução de *Karnovsky* modificado (glutaraldeído a 2,5%, paraformaldeído a 1%, CaCl₂ a 5 mM, NaCl a 20 mM, cacodilato de sódio 100 mM, pH 7,8) por 30 min a 4 °C, pós-fixadas em OsO₄ (2%) por 1 h (também a 4 °C), desidratadas em série crescente de etanol (50, 70, 80, 90, 100, 100%) e óxido de propileno por 2-5 min e embebidas com resina PoliEmbed 812 DER736 (Polysciences), conforme procedimento rotineiro. Após polimerização por três dias a 60 °C, cortes ultrafinos (60 a 70 nm, espessura de coloração prateada) foram obtidos no ultramicrotomo Sorvall-Blum/MT2-B, contrastados com acetato de uranila a 2% por 20 min e citrato de chumbo alcalino por 10 min e analisados sob o microscópio eletrônico de transmissão JEOL – 1200 EXII no Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR.

3.8.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Após cinco e vinte e três dias de cultivo, as células foram fixadas nas próprias garrafas de cultura por glutaraldeído a 3% durante 1 h e preservadas em etanol a 70% em geladeira. Em momento propício, o fundo da garrafa foi cuidadosamente cortado e as células aderidas sobre os pedaços de plástico foram desidratadas em série crescente de etanol (50, 70, 80, 90, 100, 100%) por 5 min, saturadas de CO₂ (ponto crítico) e metalizadas com ouro em pó para

observação sob o microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM – 6360 LV no Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR.

Alguns pedaços do fundo da garrafa foram empregados para observação em microscópio de campo claro. Nesse caso, as células foram coradas com *Giemsa* conforme procedimento rotineiro (FILIPAK NETO, 2003).

4. RESULTADOS

4.1 Variação de pH no meio de cultura, viabilidade celular e rendimento do isolamento

O meio de cultura, quando mantido em garrafas de cultura fechadas ou placas de cultura vedadas com fita adesiva, sofreu oscilações de pH (7,8 a 7,95), que não afetam negativamente as culturas. Quanto ao rendimento de células (total de células isoladas por grama de órgão), obteve-se de 6,9 a $9,4 \times 10^7$ hepatócitos por grama de fígado com viabilidade celular média de 75%.

4.2 Adesão dos hepatócitos após tratamento de garrafas de cultura

Hepatócitos aderiram pobremente em garrafas de cultura sem pré-tratamento, exceto naquelas da marca Corning®. Colágeno desnaturado do tipo I (gelatina) melhorou consideravelmente a adesão dos hepatócitos nas três marcas de garrafa de cultura testadas, como havia sido observado anteriormente para o matrigel (FILIPAK NETO, 2003).

4.3 Mudanças na cultura ao longo do tempo

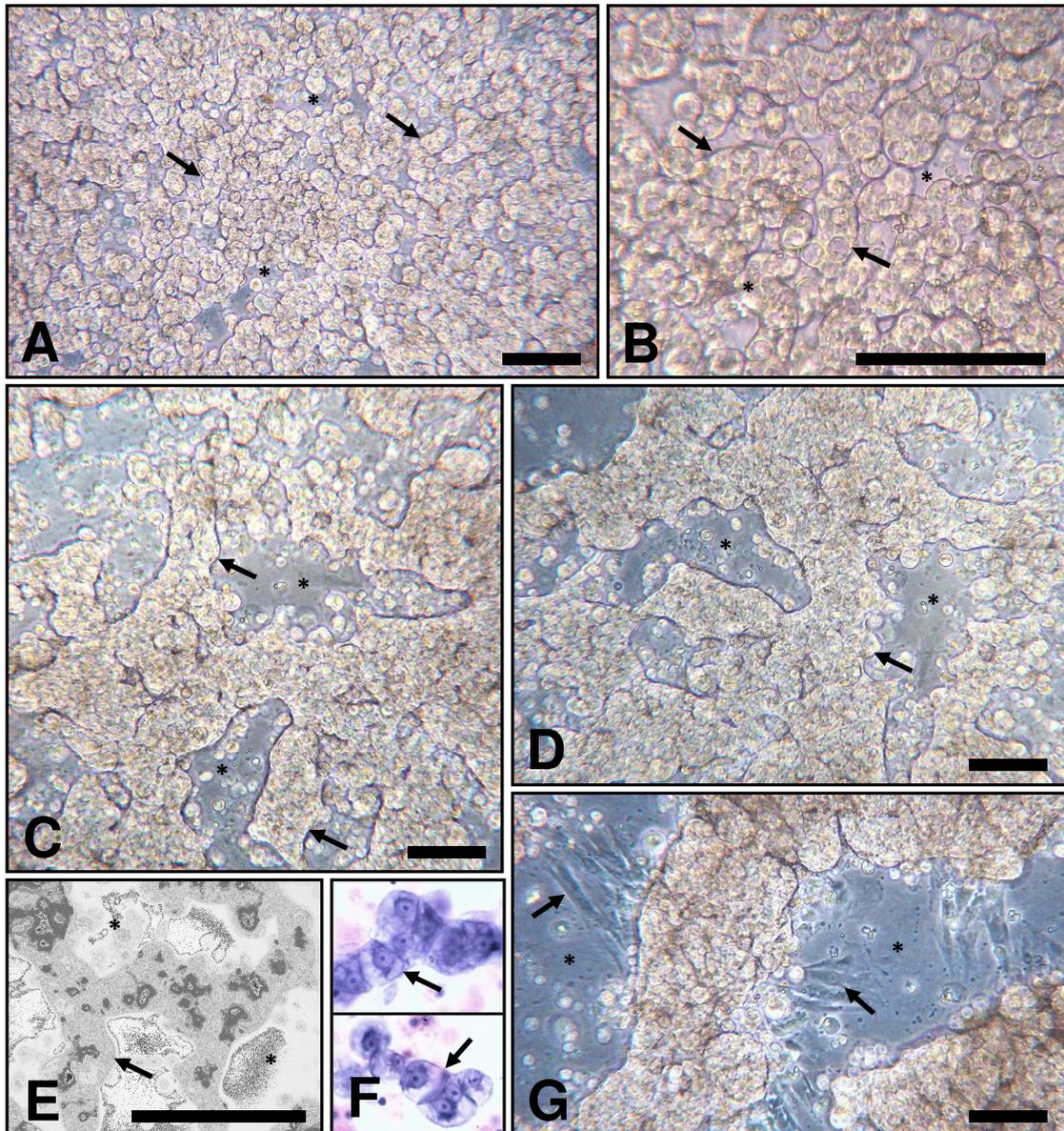
Nas primeiras 24 h em cultura, os hepatócitos de *Hoplias malabaricus* agregaram-se em pequenos grupos, que se tornaram gradualmente maiores em número de células. Após 5-7 dias, grupos de dezenas a centenas de hepatócitos puderam ser observados em grandes cordões de células (Figuras 2A-B, 2E-F, 3A-C), sendo que as células hepáticas que falharam em aderir ou se agregar morreram após poucos dias em cultura. A presença de restos do fígado, oriundos do procedimento de isolamento, nas garrafas de cultura, juntamente com os hepatócitos, parece melhorar qualitativamente a adesão dessas células. Contudo, independente das condições de adesão testadas, foi necessário um período de dois a três dias para que houvesse uma adesão completa dos hepatócitos. Após esse período, células não viáveis puderam ser removidas por uma lavagem suave das garrafas de cultura com PBS ou, preferencialmente, meio de cultura. A presença de células contaminantes como fibroblastos tornou-se perceptível apenas após seis a sete dias nas culturas com baixa densidade de células ou depois de oito a doze dias nas culturas com densidade celular mais elevada. Embora capacitadas em proliferar, essas

células não chegaram a completar muitos ciclos de divisão *in vitro*, logo não comprometeram o cultivo dos hepatócitos. Pelo contrário, a presença de outras células hepáticas aparentemente auxiliou na manutenção de condições adequadas para sobrevivência dos hepatócitos, sobretudo em culturas mais longas (Figuras 2C-D, 2G). Nessas culturas, as células de linhagem não hepatocítica localizavam-se principalmente nos espaços delimitados pelos cordões de hepatócitos; ambas, células hepatocíticas e não hepatocíticas gradualmente depositaram uma rica matriz extracelular (Figuras 3D-M). O processo continuado de migração e morte celular ao longo de vinte e três dias em cultura levou a formação de “verdadeiros corredores” com restos de células e matriz entre “paredões” de células e matriz (Figura 3D).

4.4 Morfologia dos hepatócitos em cultura

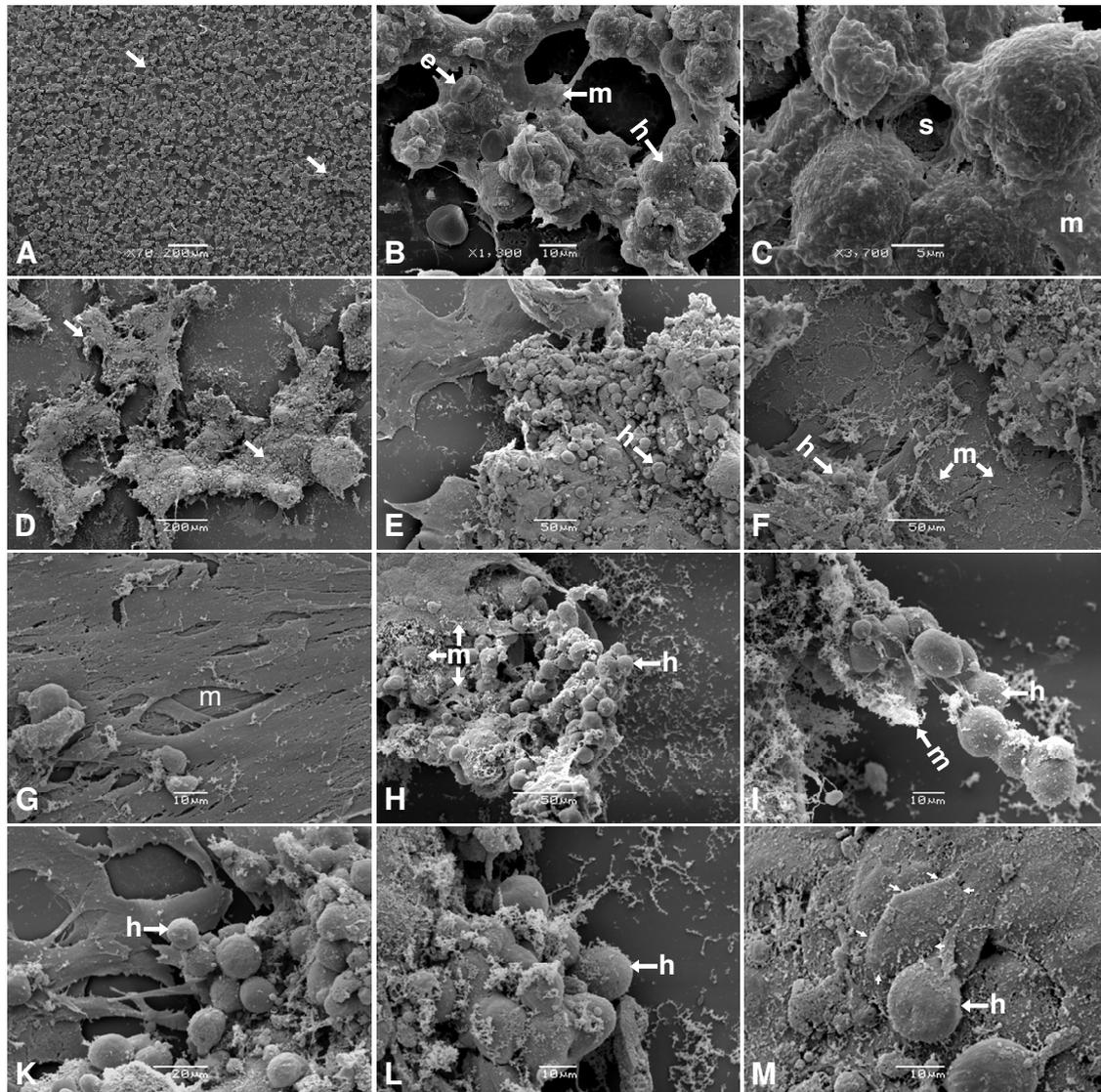
Hepatócitos de *Hoplias malabaricus* são células mono ou binucleadas que possuem de 13 a 20 μm de diâmetro. Os núcleos são, em geral, arredondados, com 4 a 6 μm de diâmetro e apresentam nucléolos bastante evidentes (Figuras 2F, 4A). Logo após serem isolados e semeados, os hepatócitos iniciaram um processo de migração e reorganização em cultura, o que pôde ser evidenciado pelas mudanças no formato celular após sua adesão, reorganização de especializações de membrana e pela delimitação de espaços não ocupados por células (Figuras 2A-G, 3A-G, 4C-D), semelhantes aos canalículos biliares observados *in vivo*. Quando reagregados *in vitro*, os hepatócitos apresentaram formato levemente poliédrico a arredondado (Figuras 2E-F, 3B, 3I, 3M), membranas plasmáticas entre células adjacentes bastante próximas e especializações de membrana do tipo desmossomos (Figuras 4C-D). Grande número de mitocôndrias (Figuras 4B, 4F), retículo endoplasmático (Figuras 4E-F) bastante desenvolvido e diversos complexos de Golgi (Figura 4G) puderam ser observados sob MET no citoplasma dos hepatócitos após cinco dias nas culturas. A cromatina dos hepatócitos mostrou-se pouco condensada e um nucléolo central e evidente pôde ser observado (Figura 4A), assim como muitos polissomos no citoplasma (Figura 4E). Além disso, a microscopia eletrônica permitiu a observação de vesículas de transporte em massa (Figura 4I), poros nucleares (Figura 4B), rosetas de glicogênio (Figuras

4B, 4G), pequenos espaços na interseção de hepatócitos (Figuras 3C, 4D) e a presença de macrófagos (Figura 4I).

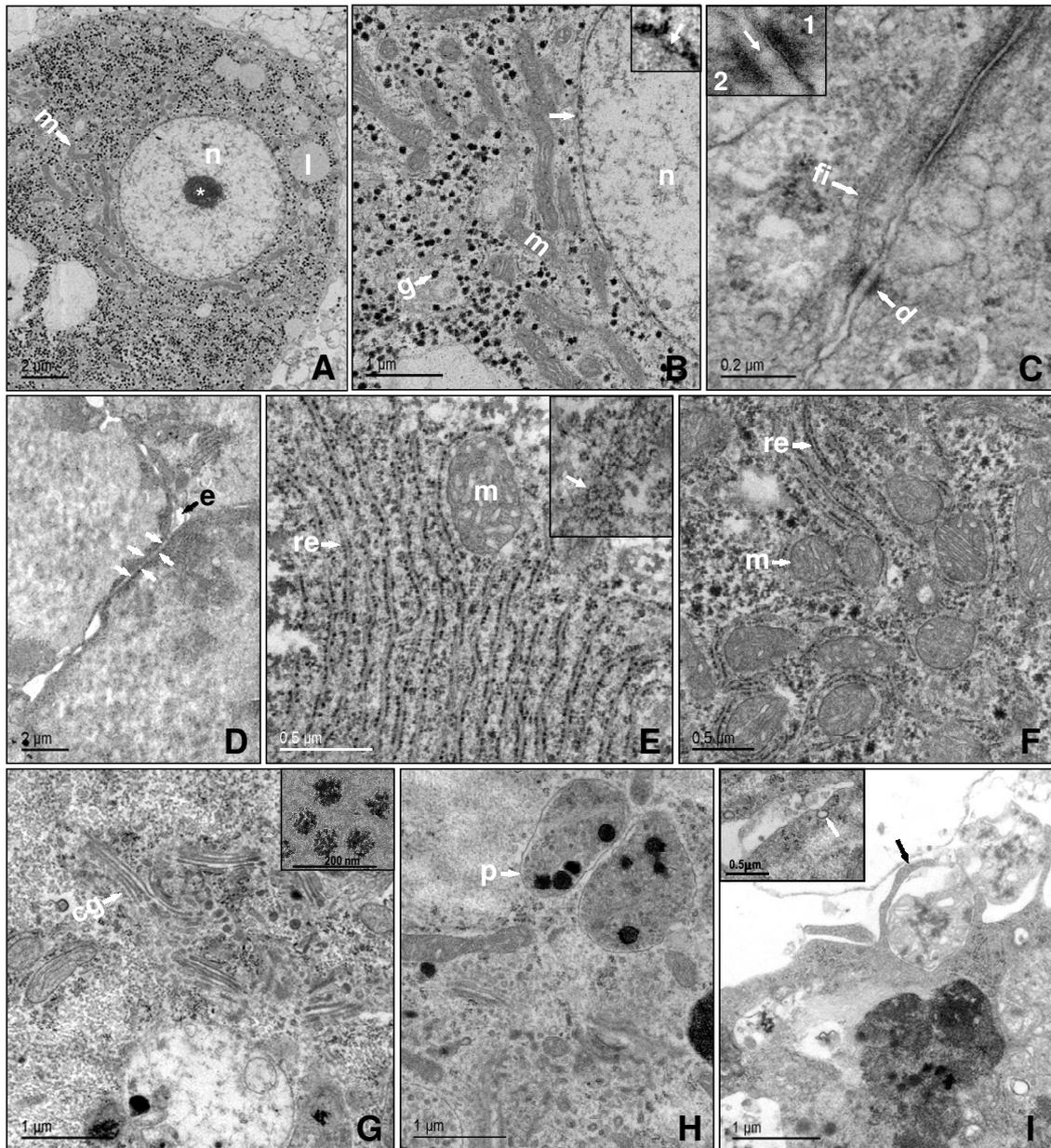
FIGURA 2. Hepatócitos de *H. malabaricus* sob microscopia de luz (óptica).

Hepatócitos após cinco (A,B,E,F) e vinte e um (C,D,G) dias em cultura sob microscopia de contraste de fase (A-D,G) e de campo claro (E-F). As células que inicialmente ocupavam toda a superfície da garrafa de cultura iniciaram um processo de migração e reorganização em cordões de células (A-F: setas), com delimitação de espaços (*) que lembram os canaliculos biliares encontrados *in vivo*. Crescimento de células não-hepatocíticas (G, setas) entre os agregados de hepatócitos nas culturas mais longas. Imagens de hepatócitos corados com *Giemsa* cultivados sob lamínulas, nos quais é possível se visualizar núcleos e nucléolos (F)¹⁷. Barra = 200 μ m.

¹⁷ As duas imagens que compõem "F" foram retiradas de trabalho anterior (FILIPAK NETO, 2003).

FIGURA 3. Culturas de hepatócitos de *H. malabaricus* sob MEV.

Hepatócitos após cinco (A-C) e vinte e três (D-M) dias em cultura sob microscopia eletrônica de varredura. Aspecto geral da cultura com hepatócitos organizado em cordões (A, setas) e imensos agregados (D, setas). (B) detalhe de um grupo de hepatócitos agregados (h), eritrócitos remanescentes do processo de isolamento (e) e matriz extracelular já sendo depositada (m). (C) agrupamentos de alguns hepatócitos com a delimitação de pequenos espaços (s) resultantes da própria morfologia das células e matriz extracelular associada (m). (E-L) diversos campos da cultura com hepatócitos associados (h), mas mantendo uma morfologia arredondada, e matriz extracelular (m). (M) detalhe de pequenos filopódios de um hepatócito (setas).

FIGURA 4. Culturas de hepatócitos de *H. malabaricus* sob MET.

Hepatócitos (e macrófago) após cinco/sete dias¹⁸ em cultura. (A) hepatócito típico com núcleo (n) rico em eucromatina e nucléolo evidente (*), mitocôndrias (m) e gotículas lipídicas (l). (B) detalhe de mitocôndrias (m), glicogênio (g) e poros nucleares (setas/*insert*). (C) contato entre dois hepatócitos com especialização de membrana do tipo desmossoma (*d/insert*) e filamentos intermediários (fi); no *insert*: seta (centro do desmossoma formado por caderinas), números (domínio intramembrana dos hepatócitos associados 1 e 2). (D) limite entre três hepatócitos delimitando um pequeno espaço (e) e justaposição das membranas (setas). (E) retículo endoplasmático (re) com ribossomos associados, mitocôndria (m) e polissomos (seta/*insert*). (F) mitocôndrias (m) e retículo endoplasmático (re). (G) diversos complexos de Golgi (cg); detalhe de rosetas de glicogênio (*insert*). (H) peroxissomos (p); (I) macrófago encontrado na cultura em processo de fagocitose (seta); hepatócitos em processo de endocitose (*insert*).

¹⁸ Não houve diferenças ultraestruturais entre hepatócitos cultivados por cinco a sete dias.

5. DISCUSSÃO

O fígado é o principal sítio metabólico de xenobióticos em vertebrados e está intimamente implicado com a manutenção da homeostase nesses organismos. Quando intactamente isolados do fígado, os hepatócitos representam bem o compromisso indispensável entre os ensaios reducionistas *in vitro* e a necessidade do modelo de ser tão próximo quanto possível da situação *in vivo* (ZUCCO *et al.*, 2004). Logo, o cultivo de hepatócitos normais translocados para um ambiente adequado, onde as interações sistêmicas são reduzidas, representa um modelo precioso para estudos mecanísticos e de toxicidade de xenobióticos.

Atualmente o procedimento mais difundido para obtenção de células hepáticas viáveis a partir do fígado baseia-se em técnicas já bem estabelecidas como a proposta por BERRY e FRIEND (1969). Essas técnicas envolvem a perfusão hepática em duas etapas, inicialmente com um quelante de cálcio/magnésio e em seguida com uma enzima, em geral, colagenase IV bacteriana, tanto para peixes quanto para mamíferos. Contudo, a presença de outras proteases em determinados lotes de colagenase pode afetar alguns ensaios bioquímicos dependentes da integridade de certos receptores presentes na membrana plasmática dos hepatócitos (SEDDON e PROSSER, 1999; QUERAL *et al.*, 1984).

Mais recentemente, SEDDON e PROSSER (1999) ajustaram para a espécie *Ictalurus punctatus* (*channel catfish*) um procedimento não enzimático de dissociação hepática proposto por BERRY e colaboradores (1983). Sem dúvida, o grande atrativo desse método é o custo, que é muito inferior aos sistemas baseados em colagenase, pelo fato de requerer apenas a remoção intercelular de íons cálcio e magnésio por um quelante (p.ex. EDTA) e, com isso, o enfraquecimento da adesão celular¹⁹ dependente desses íons. Tendo essas informações em mente, buscou-se ajustar o procedimento descrito por SEDDON e PROSSER (1999) para obtenção de células hepáticas de *Hoplias malabaricus*.

¹⁹ Vários tipos de adesão entre células e entre células e matriz extracelular dependem dos íons cálcio e magnésio (ALBERTS *et al.*, 2002).

O primeiro ajuste necessário foi obter um anti-séptico adequado para reduzir o risco de contaminação veiculada pelo muco secretado por glândulas na pele do peixe no momento da incisão e remoção do fígado. Nesse sentido, o melhor resultado proveio de assepsia com álcool a 70% seguido por clorexidina alcoólica (clorexidina a 2%, álcool a 70%), havendo uma redução considerável na secreção de muco pós-sacrifício do animal.

O segundo ajuste realizado foi a substituição da solução tamponada por bicarbonato de sódio utilizada para perfusão do fígado, por uma solução tamponada por fosfato (PBS-EDTA). A última foi escolhida por apresentar maior estabilidade de pH após esterilização sob calor úmido (autoclave) e armazenamento a 4°C e pCO₂ atmosférica. Além disso, ao invés de uma solução salina com cálcio, empregou-se o próprio meio de cultura para as etapas finais de lavagem das células, fornecendo nutrientes e condições ótimas mais rapidamente aos hepatócitos recém isolados.

Tanto o meio RPMI 1640 quanto L-15 possibilitaram o crescimento de hepatócitos de *Leiostomus xanthurus* (*spot*) na presença e ausência de pressão parcial de CO₂ de 5% (FAISAL *et al.*, 1995), sendo que esses meios de cultura são vastamente aplicados no cultivo de hepatócitos de peixes. Para o cultivo de hepatócitos de *Hoplias malabaricus*, o meio RPMI 1640 foi escolhido e empregado com pequenas modificações em seu preparo quanto ao sistema de tamponamento²⁰ (NaHCO₃ a 6 mM, HEPES a 15 mM, pH 7,8). Nessas condições, o pH manteve-se estável (7,8-7,95) sem a necessidade de uma incubadora de CO₂ e a osmolaridade estimada²¹ mostrou-se adequada para a manutenção de hepatócitos de *Hoplias malabaricus*, espécie cuja osmolaridade e pH plasmáticos são de 299±22,7 mOsm (FREIRE, C. comunicação pessoal) e 7,8-8,0 (RIOS, 2001), respectivamente.

²⁰ Deve-se enfatizar que apesar do sistema de tamponamento por bicarbonato ser biologicamente difundido e haver sugestão de que este íon é essencial para a síntese eficiente de DNA em culturas primárias de hepatócitos de rato (*Ratus ratus*) (MITAKA *et al.*, 1991), alguns pesquisadores não se valem desse sistema no cultivo de células de peixe. Na ausência de bicarbonato, não há necessidade de utilização de incubadora de CO₂.

²¹ A partir da osmolaridade indicada pelo fabricante do meio RPMI 1640 na presença (NaHCO₃ a 23,8 mM; 290 mOsm + 5%) e na ausência (246 mOsm + 5%) de bicarbonato de sódio (CULTILAB, 2003), uma estimativa de osmolaridade para o meio empregado nas culturas foi realizada. Foram consideradas para a estimativa: a quantidade média de NaOH necessária para ajustar o pH e a quantidade de bicarbonato (6 mM) e HEPES (15 mM) acrescentada ao meio de cultura.

Em termos de rendimento celular e viabilidade, os valores obtidos para *Hoplias malabaricus*²² foram inferiores aos relatados²³ por SEDDON e PROSSER (1999). Aparentemente, a espécie doadora de células tem papel fundamental no sucesso das culturas (FAISAL *et al.*, 1995) e o rendimento celular após perfusão hepática varia com a espécie, sexo, idade (MOMMSEN *et al.*, 1994), estado nutricional e tipo de dieta²⁴ do peixe (SEGNER, 1998). Logo, diferenças interespecíficas com relação à fisiologia, ao comportamento alimentar e ao tipo de dieta, somados ao procedimento de perfusão empregado (sem canulação cardíaca, sem emprego de bomba peristáltica e sem gaseificação da solução de perfusão com O₂), devem ter contribuído para o rendimento e viabilidade celulares obtidos para *Hoplias malabaricus*.

Os hepatócitos obtidos podem ser separados de outras células hepáticas através de centrifugação em gradientes de *percoll* ou *ficoll*, procedimentos que permitem o estabelecimento de culturas mais homogêneas. Contudo, para a maioria dos estudos com xenobióticos, essa separação parece não ser necessária, visto que as células quantitativamente predominantes são hepatócitos (> 85%); as células de linhagem não hepatocítica parecem participar de importantes processos tóxicos e neoplásicos; e a presença de interações celulares heterotípicas, assim como homotípicas, é fundamental na expressão e manutenção de funções hepatoespecíficas em mamíferos e peixes (GUILLOUZO *et al.*, 1990; SKETT, 1994; SEGNER, 1998).

As ressalvas citadas são corroboradas: (1) pela tendência das células hepáticas em se reagregar²⁵ em cordões após isolamento; (2) pela rápida perda de propriedades funcionais em hepatócitos que falham no processo de reagregação (SEGNER, 1998); (3) pela retenção da capacidade de transcrição de genes específicos (FRASLIN *et al.*, 1985) nos hepatócitos agregados e (4) pela produção e deposição de componentes da matriz extracelular mais precocemente em hepatócitos co-cultivados²⁶ (GUGUEN-GUILLOUZO *et al.*, 1983). Para hepatócitos de *Hoplias malabaricus* é evidente a melhor adesão e

²² 6,9 a 9,4 x 10⁷ hepatócitos por grama de fígado, 65 a 85% de viabilidade celular.

²³ 2,1 x 10⁸ hepatócitos por 100 g de peixe, 95-99% de viabilidade celular.

²⁴ Quanto ao tipo de dieta, há em *Cyprinus carpio* maior rendimento de células para espécimes submetidas à dieta rica em lipídios que a dietas ricas em carboidratos ou proteínas (SEGNER, 1998).

²⁵ Agregados formados não apenas por hepatócitos.

²⁶ A afirmação de GUGUEN-GUILLOUZO e colaboradores refere-se à hepatócitos de mamíferos.

mais prolongada sobrevivência em culturas onde nitidamente observa-se a presença de outras células hepáticas e, em algumas culturas, a presença de restos do fígado resultantes do procedimento de isolamento.

A densidade celular pode afetar a manutenção da funcionalidade (HAYASHI e OOSHIRO, 1986) e a proliferação (NAKAMURA *et al.*, 1983) de hepatócitos, de modo que há, em geral, estímulo proliferativo e perda mais rápida de funções hepatoespecíficas em hepatócitos cultivados em densidades mais baixas. No presente estudo, foi possível constatar que os hepatócitos de *Hoplias malabaricus* mantiveram-se bem em culturas com densidades tão altas quanto $0,5 \times 10^6$ células por cm^2 , ocupando quase que todo o espaço disponível na superfície das garrafas de cultura. Nessas culturas, a maioria das células permaneceu viável por pelo menos sete dias e não pareceu haver proliferação de hepatócitos²⁷. Em hepatócitos semeados em baixas densidades, houve pouquíssima adesão celular.

O pré-tratamento de garrafas de cultura com matrigel ou colágeno I desnaturado melhorou a adesão de hepatócitos de *Hoplias malabaricus*, assim como observado, em menor grau, para fibronectina em estudo anterior (FILIPAK NETO, 2003). Os dois primeiros substratos possibilitaram uma adesão similar àquela observada em garrafas da marca Corning® sem pré-tratamento, o que fornece três boas opções para o cultivo primário de hepatócitos de *Hoplias malabaricus*: garrafas cobertas por matrigel²⁸, garrafas cobertas por gelatina²⁹, ou o emprego de garrafas da marca Corning® sem pré-tratamento. Nas três situações os hepatócitos conservaram seu formato globular (não sofrem quase espalhamento), o que parece ser necessário à manutenção de funções hepáticas diferenciadas em hepatócitos de ratos e babuínos (GUGUEN-GUILLOUZO *et al.*, 1982).

Mesmo nas condições padronizadas, hepatócitos de *Hoplias malabaricus* requereram dois a três dias para aderir à superfície das garrafas de cultura e até cinco/sete dias para se reagregar completamente e restabelecer interações celulares. Após o período de adesão, boa parte das

²⁷ Não foi observada nenhuma figura mitótica sob microscopia. Contudo, para se afirmar que não há proliferação, deve-se realizar um ensaio específico de proliferação em uma cultura com hepatócitos apenas. Uma possibilidade é quantificar a incorporação de timina radioativa ao DNA (a timina não está presente no RNA).

²⁸ Mistura de composição complexa formada principalmente por laminina (BISELL *et al.*, 1987).

²⁹ Rica em colágeno I (baixo custo).

células não aderidas e/ou mortas e restos celulares podem ser removidos através de lavagem das garrafas de cultura com PBS ou meio de cultura, o que permite ter um número razoável de células funcionais para os ensaios desejados.

Quanto ao meio de cultura, diversas suplementações já foram propostas para hepatócitos de peixes. Alguns pesquisadores sugerem o emprego de meio com composição inteiramente definida e livre de soro (ENAT *et al.*, 1984; HAYASHI e OOSHIRO, 1986), ao invés de meio suplementado com soro fetal de mamíferos. Para culturas de hepatócitos de ratos, já foi demonstrado que algumas atividades metabólicas são dependentes da presença de soro fetal (PRINCEN e MEIJER, 1990). Isso gera um impasse, visto que (1) não há suprimento comercial de soro de peixes³⁰; (2) existe um alto risco de contaminação no caso da obtenção de soro do próprio peixe; (3) o número de espécimes necessários para a obtenção de volume considerável de soro é elevado³¹; (4) os dados sobre os malefícios do emprego do soro de mamíferos em culturas de células de peixe não são conclusivos; e (5) meio livre de soro com as suplementações necessárias para hepatócitos tem custo muito elevado. Para o cultivo de hepatócitos de *Hoplias malabaricus*, optou-se por suplementar o meio de cultura com soro bovino fetal³² (5 a 10%), o que parece ser a melhor alternativa disponível até o momento.

As análises de morfologia e ultraestrutura indicaram que os hepatócitos cultivados mantiveram-se metabolicamente muito ativos³³, responderam ao estímulo proveniente da insulina de mamíferos³⁴, reagregaram-se e depositaram matriz típica (lâmina basal) por pelo menos sete dias em cultura. Assim sendo, as observações em hepatócitos de *Hoplias malabaricus* permitem sugerir que o método padronizado é aplicável e viável para estudos de curta duração (\leq sete dias) com xenobióticos. Essa duração máxima deve

³⁰ Um suprimento comercial provavelmente seria de soro de peixes adultos, pois larvas/alevinos são geralmente muito pequenos.

³¹ Observar que peixes têm menor volume de sangue que mamíferos de massa semelhante.

³² O soro fetal tem, além de fatores que favorecem a adesão de células de mamíferos, fatores de crescimento (fatores que estimulam a proliferação celular). A adesão e sobrevivência de hepatócitos de *Hoplias malabaricus* foram similares tanto na suplementação de 5% de soro, quanto na de 10%.

³³ Atividade sugerida por características como núcleo ricamente eucromático, nucléolo evidente, retículo endoplasmático abundante, presença de muitas mitocôndrias etc. Consultar o tópico "Resultados" para detalhes.

³⁴ Armazenaram grande quantidade de glicogênio.

ser preferencialmente respeitada, embora seja possível manter as células por até três semanas em cultura, porque o processo de desdiferenciação, a perda de funções hepatoespecíficas e o desalojamento e morte celular geralmente ocorrem em culturas mais longas.

6. CONCLUSÕES

Hepatócitos de *Hoplias malabaricus* puderam ser isolados através de um procedimento de fácil reprodução e de baixo custo e cultivados durante um período de tempo condizente com o objetivo de se empregar essas células em futuros estudos com xenobióticos, de modo que o método descrito enquadra-se aos requerimentos e a disponibilidade técnico-logística para o qual foi padronizado.

A reagregação e ultraestrutura dos hepatócitos são indícios de que os requerimentos necessários para o bom funcionamento das células cultivadas foram supridos.

Para aplicações na toxicologia, os desenhos experimentais deverão impreterivelmente considerar que dois a três dias são necessários para os hepatócitos aderirem à superfície das garrafas de cultura e que as culturas não deverão preferencialmente exceder sete dias ao total³⁵.

³⁵ Isso porque problemas quanto à morte e perda da diferenciação celular geralmente ocorrem em culturas mais longas segundo a literatura científica disponível.

CAPÍTULO II

CAPÍTULO II: Caracterização da toxicidade de uma mistura complexa de pesticidas organoclorados em hepatócitos de *Hoplias malabaricus*

RESUMO

Tendo uma metodologia para o isolamento e o cultivo primário de hepatócitos de *Hoplias malabaricus* padronizada, decidiu-se por aplicar o modelo em ensaios com xenobióticos lipofílicos clorados extraídos da gordura hepática de enguias provenientes da reserva de Camarguè (França). Um *pool* de extratos individuais de pesticidas ($\alpha/\beta/\gamma/\delta$ -hexaclorocicloexano, heptacloro, heptacloro epóxido, aldrin, dieldrin, endrin, endrin aldeído, α/γ -clordano, fipronil, α/β -endosulfan, endosulfan sulfato - todos com concentrações conhecidas) foi utilizado para expor hepatócitos em cultura. Duas concentrações dos pesticidas (10 e 50 ng.ml⁻¹, grupos P10 e P50 respectivamente) que podem ser encontradas no fígado de peixes foram testadas, com grupos controles externo (controle) e interno (DMSO a 0,1%) mantidos em paralelo. Hepatócitos foram isolados, cultivados por três dias (período de adesão e recuperação do estresse de isolamento) e expostos aos xenobióticos por dois dias. Após exposição, as respostas/efeitos celulares da mistura foram verificadas com o emprego de alguns biomarcadores. Foram realizados dois experimentos independentes para cada biomarcador (exceto ensaio *TUNEL*, realizado uma vez) e o número de réplicas por experimento variou de duas (ensaio *TUNEL*) a dez-quinze (ensaios bioquímicos). Observaram-se: (1) redução da viabilidade celular (ensaio com azul de tripan) em P50; (2) aumento na incidência de apoptose (ensaio *TUNEL*) em DMSO; (3) acréscimo nas atividades das enzimas glutationa *S*-transferases e catalases (P10 e P50); (4) aumento (DMSO) e redução (P50) na concentração de glutationa reduzida (GSH); (5) acréscimo na peroxidação lipídica (ensaio *FOX*) em DMSO e P10; e (6) aumento nos escores de quebra de DNA (ensaio Cometa) em DMSO e P50. Alguns dos resultados obtidos indicam efeito do solvente utilizado (2,5,6), enquanto outros são claramente efeitos da mistura de contaminantes testados (1,3,4). A utilização dos pesticidas em questão, sujeitos aos processos de captação, bioacumulação e biomagnificação em tecidos biológicos, configura-se numa iniciativa nova de se simular a situação *in vitro* tão próxima quanto a *in vivo* no que se refere à reprodução das concentrações e formas químicas de xenobióticos. Apesar da maioria dos pesticidas presentes na mistura já terem tido o seu uso proibido, muitos deles pertencem à classe dos poluentes organopersistentes (POPs), que possuem características em comum como uma alta lipofilicidade, persistência no ambiente e dispersão. POPs são encontrados virtualmente em praticamente qualquer lugar da superfície terrestre.

Publicação referente ao presente capítulo:

FILIPAK NETO, F.; ZANATA, S.M.; SILVA DE ASSIS, H.C.; BUSSOLARO, D.; FERRARO, M.V.M.; RANDI, M.A.F.; ALVES COSTA; J R.M.; CESTARI, M.M.; ROCHE, H.; OLIVEIRA RIBEIRO, C.A. Use of hepatocytes from *Hoplias malabaricus* to characterize the toxicity of a complex mixture of lipophilic halogenated compounds. *Toxicol. In Vitro*, v.21, p.706-715, 2007.

1. INTRODUÇÃO

Pesticidas são agentes químicos manufacturados com a finalidade de apresentar toxicidade a um determinado organismo ou grupo de organismos, em geral insetos. Contudo a especificidade ao alvo biológico não é absoluta, fato que pode colocar em risco espécies naturais não-alvo (APREA *et al.*, 2002).

Os pesticidas organoclorados (POCs) compõem uma ampla classe de agentes químicos que foram vastamente utilizados como inseticidas principalmente nos anos de 1950 a 1970. Como alguns POCs persistem no ambiente durante meses a anos e podem viajar longas distâncias por correntes de água e ar (WARREN *et al.*, 2003; LI *et al.*, 2006), ao final dos anos 60, já era detectada a contaminação de mamíferos aquáticos no ártico por POCs originados de zonas temperadas e quentes do planeta (LI e MACDONALD, 2005). A Suécia foi o primeiro país a banir o uso de diversos POCs em 1970, seguida, pouco depois, por vários outros países, excetuando-se o uso para programas de controle de doenças (D'Amato *et al.*, 2002).

A onipresença e persistência de alguns poluentes orgânicos, entre eles vários POCs, aliadas ao risco potencial à saúde humana e ambiental, levaram à assinatura da Convenção de Estocolmo (Suécia, 2001) sobre poluentes organo-persistentes (POPs). Essa convenção baniu definitiva e imediatamente oito pesticidas organoclorados (aldrin, endrin, dieldrin, clordano, heptacloro, hexaclorobenzeno, mirex e toxafeno), proibiu imediatamente a produção de PCBs (bifenilas policloradas) e determinou a interrupção gradual no seu uso ao longo do tempo. Além disso, restrições importantes foram impostas quanto ao uso do DDT e a liberação de dioxinas e furanos no ambiente (ZIGLIO e COMEGNA, 2004).

Os POCs são muito lipossolúveis, sendo rápida e eficazmente absorvidos pelo trato gastrintestinal. Eles distribuem-se uniformemente pelo organismo, concentrando-se nos tecidos gordurosos, especialmente no tecido abdominal, cérebro e fígado (LARINI, 1997). O fato dos POCs serem hidrofóbicos tem importante consequência na sua ação tóxica, pois possibilita que atravessem a membrana plasmática das células e com isso possam induzir dano.

Dentre os efeitos biológicos mencionados na literatura científica sobre POCs, cita-se que: o dieldrin e o γ -HCH³⁶ podem estar implicados como fatores importantes na etiologia da doença de Parkinson em humanos (UVERSKY *et al.*, 2002); o DDT (SCIPPO *et al.*, 2003), metoxicloro (BRODY e RUDEL, 2003), dieldrin e endosulfan (ANDERSEN *et al.*, 2002) são potencialmente estrogênicos; o heptacloro, DDT, aldrin e dieldrin podem promover tumor em roedores (SCRIBNER e MOTTET, 1981; ABRAHAM *et al.*, 1983; BUSSE e LUTZ, 1987; REUBER, 1987); e o fipronil pode induzir câncer de tireóide e causar neurotoxicidade em roedores (HURLEY *et al.*, 1998). Os hepatócitos são alvo potencial para ação de POCs por serem ricos em lipídios³⁷ e por sua capacidade de bioativar muitas dessas moléculas.

O impacto de POCs no tecido hepático tem sido estudado em mamíferos e peixes. Um dos principais efeitos já identificados foi a indução de enzimas hepáticas metabolizantes de drogas, isto é, enzimas não específicas que catalisam etapas no metabolismo de moléculas endógenas como esteróides e ácidos graxos (LINCER e PEAKALL, 1970), produtos lipofílicos exógenos, poluentes e xenobióticos carcinogênicos (PORTER e COON, 1991). A indução da transcrição de isoformas CYP2B e/ou CYP3A pelo DDT, metoxicloro (LI *et al.*, 1995), clordano, dieldrin e endosulfan (COUMOUL *et al.*, 2002) e fipronil (TANG *et al.*, 2004) em mamíferos já foi demonstrada. Como essas isoformas do citocromo P450 estão envolvidas com o metabolismo hepático da testosterona em ratos, a exposição a esses xenobióticos pode induzir anormalidades reprodutivas (LEMAIRE *et al.*, 2004) nesses organismos.

No caso de peixes, já foi relatado que alguns POCs podem induzir a expressão de vitelogenina (principal componente do vitelo dos ovos de peixes) em agregados de hepatócitos de truta em cultura³⁸ (PETIT *et al.*, 1997), sendo que alto nível de vitelogenina em machos é indicativo de exposição a estrógenos ou compostos capazes de agir como estrógenos (SUMPTER, 1995). OKOUMASSOUN e colaboradores (2002) classificaram os POCs testados em cultura de hepatócitos de truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) segundo seu efeito na produção de vitelogenina na seguinte ordem: *o,p'*-

³⁶ Gama hexaclorocicloexano

³⁷ Lipídios que compõem as membranas biológicas e gotículas de lipídios armazenadas no citoplasma.

³⁸ Concentrações na ordem de centena de micromolar.

DDT>dielrin>aldrin>DDT, sendo que hepatócitos expostos ao aldrin e dielrin levaram mais tempo (cinco dias) do que os expostos ao *o,p'*-DDT (dois dias) e ao DDT (um dia) para secretar vitelogenina. O heptacloro, POC também testado, não apresentou propriedade estrogênica, conforme já havia sido verificado em estudo de outros pesquisadores (SOTO *et al.*, 1994).

A maioria dos estudos envolvendo a toxicidade de xenobióticos é conduzida para avaliar o efeito de um agente químico individual ou resíduo específico (YANG, 1994; GROTEN *et al.*, 1999). Como consequência, os efeitos combinados de misturas complexas de poluentes na biota são ainda pouco conhecidos. Recentemente, tem se dado ênfase aos estudos com misturas químicas, uma vez que os organismos estão de fato expostos a misturas complexas (OLGUN *et al.*, 2004) de xenobióticos que podem agir aditivamente, sinergicamente ou antagonicamente (KÖNEMANN, 1981) ao nível subcelular.

À luz do discorrido, conduziu-se um estudo visando verificar os efeitos de uma mistura de POCs em hepatócitos de *Hoplias malabaricus* num desenho experimental inovador. Nesse desenho, empregou-se uma mistura de xenobióticos extraídos da gordura hepática de enguias (*Anguilla anguilla*)³⁹, o que reproduz com bastante fidelidade o perfil de contaminação no que se refere à forma química dos POCs e de metabólitos⁴⁰ e as concentrações tissulares, pois considera os processos de biotransformação e bioacumulação⁴¹ nos sistemas biológicos. Como modelo de estudo, culturas primárias de hepatócitos de *Hoplias malabaricus* foram empregadas, o que é interessante em pelo menos dois aspectos, o tipo celular e a espécie. Hepatócitos são

³⁹ No momento em que se planejaram os experimentos não havia POCs obtidos de *Hoplias malabaricus* disponíveis. Por isso, os peixes utilizados como fonte de xenobióticos e os peixes doadores de hepatócitos não são da mesma espécie, o que não representa problemas, pois os mesmos POCs são encontrados em *Hoplias malabaricus* no Brasil em concentrações até superiores às encontradas em *Anguilla anguilla* da França (Vide material e métodos para detalhes).

⁴⁰ Metabólito = qualquer substância ou composto produzido por metabolismo (HOLANDA FERREIRA, 2004).

⁴¹ Conceitos importantes (LEBLANC, 1995; D'AMATO *et al.*, 2002):

- Bioconcentração – é a absorção do composto diretamente do meio abiótico, resultando em uma concentração do composto no organismo maior que no meio abiótico que o cerca.
- Bioacumulação - é a absorção e retenção do composto pelo organismo do meio abiótico ou biótico, podendo ou não a concentração exceder a da fonte.
- Biomagnificação – é o aumento da concentração do composto ao longo da cadeia alimentar, influenciada pela posição trófica do organismo, devido à elevada absorção e baixa eliminação do composto. Ocorre biomagnificação quando as concentrações do composto nos tecidos de um organismo excedem as concentrações do nível trófico adjacente inferior em mais de 100%.

importantes alvos para ação de POCs. *Hoplias malabaricus* é uma espécie predadora brasileira que pode acumular altas concentrações de POCs (MIRANDA, 2006). Logo, hepatócitos de *Hoplias malabaricus* configuram-se num modelo excelente para verificar os efeitos celulares e subcelulares de uma mistura de POCs provenientes de organismos (sub)cronicamente expostos em ambiente natural.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Verificar os efeitos de uma mistura de POCs extraídos de tecido animal em cultura primária de hepatócitos de *Hoplias malabaricus*, introduzindo o modelo padronizado (Capítulo I) em investigações com xenobióticos.

2.2 Objetivos específicos

- Cultivar hepatócitos de *Hoplias malabaricus* e expô-los à mistura de POCs (10 e 50 ng.ml⁻¹) por 48 horas através do meio de cultura;
- Avaliar os possíveis efeitos da mistura de POCs utilizando os seguintes biomarcadores⁴²: (1) viabilidade celular; (2) morte celular por apoptose; (3) fragmentação do DNA; (4) atividade das catalases; (5) atividade das glutathione S-transferases; (6) concentração de glutathione reduzida; e (7) peroxidação de lipídios.

⁴² Alguns outros conceitos (VAN GESTEL e VAN BRUMMELEN, 1996).

- Biomarcador – qualquer resposta biológica a um agente químico ambiental ao nível subindividual, medido dentro de um organismo ou em seus produtos (urina, fezes, cabelo, penas etc), que indica um desvio do estado normal, o qual não pode ser detectado no organismo intacto.

- Bioindicador – é conceituado como um organismo que fornece informação sobre as condições ambientais do seu *habitat* por sua presença, ausência ou comportamento.

- Indicador ecológico – é um parâmetro do ecossistema que descreve a estrutura e o funcionamento do mesmo.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção e cuidados com os peixes

Capítulo I, subitem 3.1

3.2 Isolamento das células

Capítulo I, subitem 3.2

3.3 Condições para o cultivo celular

As células foram semeadas em garrafas de cultura Corning® de 25 e 75 cm² sem pré-tratamento numa densidade de 0,5-1x10⁶ células por mililitro de meio de cultura RPMI 1640 (pH 7,8)⁴³ suplementado com HEPES (15 mM), bicarbonato de sódio (6 mM), insulina mista (0,2 U.ml⁻¹), sulfato de gentamicina (40 mg.l⁻¹) e soro de feto bovino (10% v.v⁻¹). As células foram mantidas a 22°C em estufa convencional (continuação do protocolo - subitem 3.4.2 - desenho experimental adotado).

3.4 Teste com mistura de pesticidas organoclorados

3.4.1 Preparo da mistura e escolha das concentrações testadas

POCs e alguns de seus metabólitos polares (designados apenas por POCs) foram extraídos, purificados e quantificados a partir da gordura hepática do fígado de 28 enguias (*Anguilla anguilla*)⁴⁴ capturadas na Reserva Natural de Camarguè (França) por OLIVEIRA RIBEIRO e colaboradores (2005)⁴⁵. Uma mistura desses extratos de POCs foi obtida com diluição em dimetilsulfóxido (DMSO)⁴⁶ e utilizada como mistura estoque para exposição de hepatócitos de *Hoplias malabaricus*. Tendo em vista que *Cynoscion guatucupa* capturadas na Argentina e *Anguilla anguilla* capturadas na França apresentaram 32-59 ng

⁴³ As garrafas de 25 e 75 cm² receberam, respectivamente, 12 e 36 ml de meio de cultura.

⁴⁴ A variedade e concentração total (em ng por g de tecido seco) de compostos organoclorados identificados no fígado de enguias capturadas (n: 16; concentração: 558 ng.g⁻¹) são inferiores às observadas em espécimes de *Hoplias malabaricus* (MIRANDA, 2006) amostradas em Ponta Grossa, Brasil (n: 26; concentração: 1100 ng.g⁻¹). Todos os organoclorados identificados em enguias foram encontrados em *Hoplias malabaricus*.

⁴⁵ Consultar os trabalhos de OLIVEIRA RIBEIRO e colaboradores (2005) ou FILIPAK NETO e colaboradores (2007) caso haja interesse na metodologia empregada para obtenção e análise dos extratos de POCs que foram empregados no presente capítulo de tese.

⁴⁶ Para exposição de células é necessário que os xenobióticos sejam dissolvidos em meio de cultura. Como os POCs são hidrofóbicos, empregou-se o DMSO para solubilizá-los.

(LANFRANCHI *et al.*, 2006) e 17-102 ng (OLIVEIRA RIBEIRO *et al.*, 2005) de POCs por grama de fígado⁴⁷, respectivamente, determinou-se as concentrações de 10 e 50 ng de POCs por mililitro de meio de cultura, já acrescido das suplementações (Tabela 1), como concentrações-teste.

⁴⁷ Massa úmida

TABELA 1. Relação e concentração dos POCs identificados⁴⁸ presentes na mistura empregada para expor os hepatócitos e suplementos do meio de cultura.

Constituintes do meio	Grupos Experimentais Testados				DMSO	Controle
	P50	P10	P50	P10		
POCs	ng.ml ⁻¹	nM	ng.ml ⁻¹	nM		
α-HCH [⊙]	0,57	1,97	0,11	0,39		
β+γ-HCH [⊙]	4,69	16,11	0,94	3,22		
δ-HCH [⊙]	2,13	7,33	0,43	1,47		
Heptacloro [⊙]	1,47	3,94	0,29	0,79		
Heptacloro epóxido*	4,92	12,64	0,98	2,60		
Fipronil [#]	5,44	12,45	1,09	2,49		
Aldrin [⊙]	1,91	5,23	0,38	1,05	0	0
Dieldrin* [⊙]	1,99	5,22	0,40	1,04		
Endrin [⊙]	1,76	4,62	0,35	0,92		
Endrin aldeído*	3,14	8,25	0,63	1,65		
α-clordano [⊙]	1,51	3,68	0,30	0,74		
γ-clordano [⊙]	9,08	22,16	1,82	4,43		
α-endosulfan	3,33	8,17	0,67	1,64		
β-endosulfan	6,14	15,09	1,23	3,02		
Endosulfan sulfato*	1,93	4,56	0,39	0,91		
Σ POCs + metabólitos	50 ng.ml ⁻¹	10 ng.ml ⁻¹	0 ng.ml ⁻¹	0 ng.ml ⁻¹		
DMSO	0,1% v.v ⁻¹	0,1% v.v ⁻¹	0,1% v.v ⁻¹	0% v.v ⁻¹		
Comuns às etapas de adesão celular (três dias) e de exposição aos xenobióticos (dois dias)						
Meio RPMI 1640	Mistura nutritiva com 2 g.l ⁻¹ (~11,1 mM) de D-glucose					
Soro bovino fetal	10%v.v ⁻¹					
Insulina mista (bovina + suína)	0,2 U.l ⁻¹					
Sulfato de gentamicina	40 mg.l ⁻¹					
Bicarbonato de sódio	6 mM					
HEPES	15 mM					

* Produtos de metabolismo, ⊙ banidos na Convenção de Estocolmo (pertencente ao grupo dos POPs), # pesticida pertencente à família fenilpirazol (e não dos organoclorados).

⁴⁸ O procedimento utilizado para obtenção dos extratos por OLIVEIRA RIBEIRO e colaboradores (2005) assegura que, se houver outros compostos lipofílicos (não identificados) nos extratos, esses compostos são halogenados e possuem polaridade equivalente a dos compostos organoclorados analisados. Alguns exemplos dos compostos não presentes nos extratos são as bifenilas policloradas (PCBs) e as substâncias menos polares (ambos eliminados com hexano ou retidas na coluna de florisil), os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs, normalmente extraídos com um solvente mais polar, o diclorometano, ou retidos na coluna) e os piretróides (mais polares, utilizados em concentrações bem baixas em *Camarguè* e rapidamente degradados). Já as uréias substituídas, triazinas e organofosforados são mais polares, mas não é possível se afirmar com certeza que uma pequena quantidade deles não passe na coluna juntamente com os organoclorados.

Alguns picos não foram identificados na cromatografia. Esses picos podem corresponder a metabólitos ou organoclorados desconhecidos ou não identificados. Além disso, as moléculas mais voláteis e menos estáveis devem ser eliminadas durante a preparação e o processamento dos extratos. Logo, os compostos organoclorados, excluindo-se os menos polares como o DDT, são as moléculas mais logicamente encontradas na fase analisada (FILIPAK NETO *et al.*, 2007) e empregada para expor os hepatócitos de *Hoplias malabaricus*.

3.4.2 Desenho experimental adotado

Primeiramente as células mantidas em cultura por três dias para que houvesse adesão, recuperação do procedimento de isolamento e reorganização parcial dos hepatócitos. Depois desses três dias em cultura, boa parte das células mortas e/ou não aderidas foi removida por lavagem suave das garrafas de cultura com PBS⁴⁹. Quatro grupos experimentais foram então estabelecidos: controle, controle do solvente empregado (DMSO), mistura de POCs a 10 ng.ml⁻¹ (P10) e a 50 ng.ml⁻¹ (P50) para cada cultura primária realizada. A exposição foi realizada através da substituição do meio de cultura por novo meio contendo as mesmas suplementações, exceto pela presença ou não dos POCs e de DMSO (Tabela 1). Após dois dias de exposição, as células foram removidas: (1) com o emprego de *cellscraper* para ensaios bioquímicos e (2) tripsinizadas (EDTA dissódico a 0,02%, tripsina a 0,05% em PBS à temperatura ambiente, durante o tempo necessário para as células se desagregarem e desaderirem das garrafas de cultura (em média, 10-15 min)) para o ensaio cometa, *TUNEL* e teste de viabilidade celular.

3.5 Determinação da viabilidade celular

Capítulo I, subitem 3.4

3.6 Ensaio Cometa

Para o Ensaio Cometa foi utilizado o protocolo de SINGH e colaboradores (1988), com algumas modificações. Células dissociadas foram ressuspensas em agarose de baixo ponto de fusão a 0,5% e estendidas, com o emprego de lamínula, sobre lâminas de vidro cobertas previamente com agarose de ponto de fusão normal a 1,5%, de modo a se ter um total de 1-2x10³ células por lâmina. Após a solidificação da agarose de baixo ponto de fusão, as lamínulas foram cuidadosamente removidas e as lâminas foram colocadas em solução de lise (NaCl a 220 mM, EDTA a 9 mM, Tris-base a 0,9 mM, Triton X-100 a 1%, DMSO a 10%, sarcosinato de sódio a 0,9%, pH

⁴⁹ PBS: NaCl a 136,5 mM, KCl a 2,68 mM, Na₂HPO₄ a 5,4 mM, KH₂ PO₄ a 1,76 mM, pH 7,8.

10) por 24 h⁵⁰ a 4°C. Em seguida, as lâminas foram reservadas em tampão de eletroforese (NaOH a 300 mM, EDTA a 1 mM, DMSO a 2%, pH>13) para permitir o desenrolamento do DNA por 25 min, período após o qual um campo elétrico de diferença de potencial de 25 V e intensidade de corrente de 300 mA foi aplicado durante 25 min. Terminada a eletroforese, as lâminas foram neutralizadas em solução de Tris-HCl a 400 mM (pH 7,5) por 15 min e preservadas por etanol PA por 10 min. Por fim, o DNA foi fluorescentemente marcado com brometo de etídio a 2 µg.ml⁻¹. Todos os procedimentos até então relatados foram realizados sob luz vermelha⁵¹. Em cada lâmina cem nucleóides foram visualmente classificados de acordo com o comprimento do rastro de migração (dano 0, 1, 2 e 3) sob microscópio de fluorescência (ZEISS Axiophot HBO 50). Então, um escore para cada lâmina foi calculado através de uma média ponderada da classe de dano pela porcentagem de incidência do mesmo (Escore = $\sum(\text{classe do dano} \times \% \text{ de incidência})$).

3.7 Ensaio TUNEL

Para detecção de pequenos fragmentos de DNA (~ 50 pares de base) gerados pelo aumento da atividade de endonucleases durante o programa apoptótico (ENARI *et al.*, 1998; SAKAHIRA *et al.*, 1998; WALKER *et al.*, 1993), empregou-se o ensaio TUNEL (*terminal deoxynucleotidyltransferase dUTP nick end labeling*). Desoxiuridina trifosfato conjugada com o fluorocromo FITC (*FITC-dUTP*) e demais reagentes foram fornecidos no Kit APO-DIRECT™ (BD Biosciences Pharmingen), exceto pelo PBS, etanol e paraformaldeído, e utilizados para detecção de células apoptóticas por citometria de fluxo.

Células tripsinizadas foram lavadas em PBS e fixadas por paraformaldeído a 1% em PBS (pH 7,8, 4°C) durante 1 h, ressuspensas em etanol gelado a 70% e mantidas a -20°C. No prosseguimento do protocolo, 1-2x10⁶ células foram lavadas duas vezes com tampão de lavagem e incubadas em 50 µl de solução de marcação (0,75 µl da enzima *TdT* (*terminal desoxynucleotidyl transferase*), 8 µl de solução de *FITC-dUTP*, 10 µl de

⁵⁰ O tempo de lise para hepatócitos é superior ao utilizado para eritrócitos de peixes, provavelmente devido à presença de maior quantidade de membranas biológicas no primeiro tipo celular.

⁵¹ A utilização de luz vermelha reduz o aparecimento de artefatos na técnica; nesse caso quebras no DNA durante os procedimentos. Além disso, o λ do vermelho não excita o etídio, logo minimiza a perda de fluorescência antes das análises.

tampão de reação e 32 µl de água desionizada) durante 2 h a 37°C (BD PHARMINGEN™ TECHNICAL DATA SHEET, 2005). As células foram lavadas duas vezes em tampão de enxágüe, ressuspensas em 1 ml de PBS e avaliadas em citômetro de fluxo *FACSCalibur* (Becton Dickinson). Os elétrons do fluorocromo foram excitados com laser de Argônio azul (15 mW) a 488 nm, sendo que a fluorescência emitida pelo *FITC-dUTP* foi registrada no filtro FL-1 (530/30 nm). Um total de 4×10^4 eventos por aquisição (quatro aquisições de dados por grupo experimental) foram analisados com o emprego do *software CellQuest®* (Becton Dickinson). Antes da análise das amostras, utilizaram-se duas suspensões de células fornecidas no kit (controle positivo e negativo) com a finalidade de se verificar se o método estava funcionando conforme parâmetros aceitáveis. Para aquisição dos dados, os detectores e amplificadores do citômetro de fluxo foram previamente e satisfatoriamente ajustados (procedimento rotineiro) com a mesma população de células empregadas para as análises, exceto pela não incubação com solução de marcação.

3.8 Ensaio bioquímicos

Posteriormente a sua remoção, lavagem, ressuspensão em PBS (500 µl para LPO e 800 µl para os demais ensaios) e rápido congelamento em nitrogênio líquido, as células foram mantidas em *freezer* a -76°C até a continuidade dos protocolos específicos. Precauções tomadas nos ensaios foram garantir que o sobrenadante estivesse límpido e cristalino (transparente) após centrifugação; que não houvesse qualquer tipo de precipitação no fundo das microplacas⁵² nas leituras, pois isto levaria ao registro de valores de absorvância incorretos (principalmente no caso da peroxidação lipídica, onde o uso de tampões fosfato (de sódio ou potássio) a 100 mM ou sobrenadantes de amostras não cristalinos podem levar a precipitação no fundo dos poços das microplacas após o acréscimo do meio de reação); e se realizar muitas réplicas para evitar ou pelo menos minimizar falsos negativos e positivos. Inicialmente empregou-se solução de Tris-sacarose (10 mM Tris-HCl, 250 mM sacarose, pH 7,8) para o congelamento das amostras. Em momento posterior, por não haver diferença na conservação da atividade das enzimas analisadas entre o

⁵² Todos os procedimentos doravante (CAPÍTULOS II e III) que indiquem o uso de microplaca referem-se às microplacas de 96 poços de fundo chato utilizadas em leitor de ELISA.

congelamento com Tris-sacarose e PBS, o PBS passou a ser utilizado. Logo, todos os procedimentos descritos não incluem Tris-sacarose e sim PBS.

3.8.1 Peroxidação lipídica (LPO)

A produção de hidroperóxidos lipídicos foi verificada pelo método de FOX (*Ferrous Oxidation / Xylenol Orange Method*). Esse método tem por princípio a rápida oxidação do Fe^{+2} mediada por peróxidos sob condições ácidas e posterior formação do complexo Fe^{+3} - laranja de xilenol (fonte de absorção de luz) na presença do estabilizador hidroxitolueno butilado (JIANG *et al.*, 1991, 1992).

As amostras foram descongeladas em gelo, submetidas ao ultra-som por 2 min em gelo, após acréscimo de metanol PA (500 μl) e centrifugadas a 1.000 x *g* por 10 min a 4°C. Para as leituras, 30 μl do sobrenadante da amostra mais 270 μl de meio de reação [(laranja de xilenol a 100 μM , H_2SO_4 a 25 mM, BHT (hidroxitolueno butilado) a 4 mM, $\text{FeSO}_4\cdot\text{NH}_4$ (sulfato ferroso amoniacal) a 250 μM (acrescentados na seqüência descrita em metanol a 90%⁵³)] foram adicionados em microplaca. Após 30 min de reação a temperatura ambiente em microplacas tampadas, para reduzir a evaporação do metanol, procedeu-se a medida de absorbância ($\lambda = 570 \text{ nm}$; faixa de leitura = 550-570 nm). Em paralelo às amostras, 30 μl de metanol a 50% e 1 μl de peróxido de hidrogênio a 30% foram empregados, respectivamente, como branco e controle positivo. Além disso, fez-se em momento oportuno uma curva-padrão com peróxido de hidrogênio (0, 1, 2, 5, 10, 20, 40 μM) para se averiguar se a forma de cálculo adotada estava verossimilhantermente determinando a concentração de hidroperóxidos. Como o resultado dessa curva-padrão não será posteriormente relatado, é válido citar que a equação da reta encontrada para o peróxido de hidrogênio ($y=0,0042x$, $r^2 > 0,99$), quando empregada no cálculo da concentração de hidroperóxidos, resulta em valores semelhantes aos obtidos quando o coeficiente de extinção molar proposto por JIANG e colaboradores (1991), $4,3 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$, é empregado. Empregou-se então, no presente estudo, o coeficiente de extinção citado, pois ele foi calculado pelos autores para outros hidroperóxidos, além do peróxido de hidrogênio.

⁵³ Solução apresenta uma coloração dourada, caso seja preparada adequadamente. Após acréscimo do H_2O_2 no controle positivo, o dourado torna-se púrpura.

Forma de cálculo empregada:

[Hidroperóxidos] = Abs. x diluição x ϵ^{-1} x d⁻¹ x [proteínas]⁻¹
Onde: [Hidroperóxidos] em micromoles de hidroperóxidos por miligrama de proteínas Abs. = valor de absorvância registrado ($\lambda = 570$ nm) após descontar o valor do “branco” Diluição (da amostra) = 30 μ l de amostra em 300 μ l de volume final, ou seja, 10x. ϵ = coeficiente de extinção molar aproximado para H ₂ O ₂ , hidroperóxido de cumeno ou hidróxido de butila ($\lambda = 560$ nm) = $4,3 \times 10^4$ M ⁻¹ .cm ⁻¹ d = caminho óptico (para 300 μ l nos micropoços) $\approx 0,9$ cm [proteínas] = concentração de proteínas totais em miligrama por mililitro
Fórmula simplificada: $[\text{Hidroperóxidos}] = \frac{0,258 \times \text{Abs}}{[\text{proteína}]} \quad \mu\text{moles de hidroperóxidos} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$

3.8.2 Concentração de Glutathiona Reduzida (GSH)

As amostras foram descongeladas em gelo e submetidas ao ultra-som (seis ciclos de 4 s cada). Então, separou-se uma alíquota de 150 μ l para posterior quantificação de proteínas. Para cada 250 μ l de amostra, foram adicionados 50 μ l de ácido tricloroacético (TCA) a 48% para precipitação protéica. Em seguida, a amostra foi centrifugada a 1.000 x *g* por 15 min a 4°C⁵⁴. Para as leituras, foram adicionados 50 μ l do sobrenadante da amostra e 230 μ l de tampão Tris-base (400 mM, pH 8,9) a uma microplaca. Como branco, foi utilizado 230 μ l do tampão Tris-base a 400 mM mais 50 μ l de TCA a 8% em PBS. Por último, 20 μ l de DTNB (ácido 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzóico) a 2,5 mM (em metanol a 25%, tampão Tris-base 300 mM, pH 8,9) foram rapidamente acrescentados; e procederam-se imediatamente as medidas de absorvância ($\lambda = 415$ nm) (SEDLAK e LINDSAY, 1968). A determinação do conteúdo de GSH foi realizada através de comparação com curva-padrão de GSH (0, 1, 2, 4, 8, 16, 24 e 32 nM GSH)⁵⁵.

⁵⁴ É importante manter uma temperatura baixa (4°C) para preservar melhor o GSH na sua forma reduzida, principalmente antes da acidificação da solução e completa precipitação protéica, visto que GSH pode ser utilizado por enzimas como a GST e GPx (glutathiona peroxidases), reagir com espécies reativas ou ser oxidado mais facilmente em pH mais elevado, como o citosólico.

⁵⁵ Notar que o volume das soluções-padrão de GSH acrescentado na microplaca deve ser semelhante ao de amostra, isto é, 50 μ l. Dessa forma, não é necessário considerar uma

Forma de cálculo empregada:

[GSH] = Abs. x diluição x α^{-1} x [proteínas]⁻¹
Onde: [GSH] em micromoles de GSH por miligrama de proteínas Abs. = valor de absorvância registrado ($\lambda = 415$ nm) após descontar o valor do “branco” Diluição na precipitação protéica = 250 μ l de amostra mais 50 μ l de TCA (300 μ l de volume final) = 1,2x. OBS: deve-se considerar essa diluição porque a alíquota para medir a concentração de proteínas foi separada antes da precipitação protéica α = coeficiente angular da curva-padrão (curva de 1º grau passando por x=0; y=0). [proteínas] = concentração de proteínas totais em miligrama por mililitro
Fórmula simplificada: $[\text{GSH}] = \frac{1,2 \times \text{Abs}}{\alpha \times [\text{proteína}]} \text{ } \mu\text{moles de GSH} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$

3.8.3 Atividade das Catalases (CAT)

As amostras (células em PBS) foram descongeladas como descrito anteriormente para GSH e centrifugadas⁵⁶ a 9.000 x g por 20 min a 4°C. As leituras de cinética enzimática procederam-se em intervalos de 2 s ($\lambda = 240$ nm) imediatamente após serem adicionados a uma cubeta de quartzo e misturados por inversão, 980 μ l de meio de reação (peróxido de hidrogênio a aproximadamente 20 mM, Tris-base a 50 mM, EDTA dissódico a 0,25 mM, pH 8, 25°C) e 20 μ l do sobrenadante da amostra. O decréscimo gradual na absorvância, devido à degradação do peróxido de hidrogênio (AEBI, 1984), foi monitorado e registrado num intervalo total de 1 min e 10 s. A partir dos valores de absorvância escolheu-se, através de regressão linear, o primeiro intervalo de 30 s com $r^2 \geq 0,99$ para o cálculo do Δ absorvância por minuto. É fundamental mencionar que antes de se verificar a atividade das catalases, um ensaio prévio foi realizado, onde a concentração de peróxido de hidrogênio presente no meio de reação foi padronizada (testaram-se as concentrações de

segunda diluição de amostra (em relação ao volume final de soluções na microplaca, ou seja, 300 μ l) para o cálculo.

⁵⁶ A fração sobrenadante resultante de centrifugação a 9.000 x g é denominada fração S9.

5, 10, 15, 20, 30, 40 e 50 mM de H₂O₂), de modo a se ter uma curva de primeiro grau decrescente com r² alto⁵⁷.

Forma de cálculo empregada:

Atividade das CAT = $\Delta \text{ Abs. min}^{-1} \times \text{diluição} \times \epsilon^{-1} \times d^{-1} \times [\text{proteínas}]^{-1}$
Onde: Atividade das Catalases em milimoles por minuto por miligrama de proteínas $\Delta \text{ Abs. min}^{-1} = \text{Absorbância final} - \text{Absorbância inicial} \times 2$, sendo que o intervalo final - inicial é de 30 s. Diluição (da amostra) = 20 μl de amostra em 1000 μl de volume final, ou seja, 50x. ϵ = coeficiente de extinção molar do H ₂ O ₂ ($\lambda = 240 \text{ nm}$) = 40 M ⁻¹ .cm ⁻¹ d = caminho óptico (na cubeta) = 1 cm [proteínas] = concentração de proteínas totais em miligrama por mililitro
Fórmula simplificada: $\text{Ativ. das CAT} = \frac{1,25 \times \Delta \text{ Abs. min}^{-1}}{[\text{proteína}]} \text{ mmoles de H}_2\text{O}_2 \text{ degradado. min}^{-1} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$

3.8.4 Atividade Global das Isoformas de GST

A atividade global das Glutathione S-transferases (GST) foi monitorada através do aumento de absorvância ($\lambda = 340 \text{ nm}$) resultante da formação de um tioéter pelos substratos GSH (molécula endobiótica) e 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB, substrato sintético utilizado para determinar a atividade da maioria das isoformas de GST já identificadas em mamíferos).

As amostras foram descongeladas em gelo, como descrito para GSH, e centrifugadas a 9.000 xg por 20 min a 4 °C (como descrito para CAT). O volume de 50 μl do sobrenadante da amostra foi adicionado a uma microplaca e, imediatamente antes das leituras, 100 μl do meio de reação (GSH a 1,5 mM, CDNB a 2 mM, etanol a 4%, tampão fosfato de potássio a 100 mM, pH 6,5) foram rapidamente acrescentados (HABIG *et al.*, 1974 e KEEN *et al.*, 1976). O aumento gradual na absorvância foi registrado em intervalos de 12 s durante 2 min, para posterior seleção do primeiro intervalo de 1 min com r² $\geq 0,99$ para o cálculo do Δ absorvância por minuto. Notar que o CDNB apresenta baixa hidrossolubilidade, logo se deve dissolvê-lo em etanol PA (CDNB a 40 mM em etanol PA) antes do preparo do meio de reação. É importante salientar que

⁵⁷ A atividade das catalase mensurada não é a atividade máxima da enzima, assim como a de TODAS as enzimas que tiveram sua atividade quantificada na presente tese. As atividade medidas estão na faixa crescente de atividade na curva de concentração de substrato(s) x atividade.

antes de se verificar a atividade das GST, um ensaio prévio de padronização das concentrações dos substratos CDNB e GSH (0,5, 1, 1,5, 2, 3, 4 mM de CDNB / GSH) foi realizado. A partir dos valores da padronização, escolheu-se a concentração de GSH (\approx cinco vezes o K_M) e de CDNB (\approx o próprio valor de K_M) a serem empregadas nos ensaios. OBS: a concentração de CDNB não pode ser muito alta, pois acarreta na necessidade de mais etanol para sua solubilização no meio de reação.

Forma de cálculo empregada:

Atividade das GST = $\Delta \text{ Abs. min}^{-1} \times \text{diluição} \times \epsilon^{-1} \times d^{-1} \times [\text{proteínas}]^{-1}$
Onde: Atividade global das GST em micromoles por minuto por miligrama de proteínas $\Delta \text{ Abs. min}^{-1} = \text{Absorbância final} - \text{Abs. inicial} $, sendo que o intervalo final - inicial é de 1 min Diluição (da amostra) = 50 μl de amostra em 150 μl de volume final, ou seja, 3x d = caminho óptico (para 150 μl nos micropoços) \approx 0,45 cm ϵ = coeficiente de extinção molar ($\lambda = 340 \text{ nm}$) em pH = 6,5 para o CDNB = $9,6 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ $[\text{proteínas}]$ = concentração de proteínas totais em miligrama por mililitro
Fórmula simplificada: $\text{Ativ. das GST} = \frac{0,694 \times \Delta \text{ Abs. min}^{-1}}{[\text{proteína}]} \mu\text{moles de GSH-CDNB formado. min}^{-1} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$

3.8.5 Quantificação de proteínas totais

Com a finalidade de normalizar os dados obtidos nos diferentes ensaios bioquímicos, foi necessária a quantificação de proteínas totais nas amostras. Durante os ensaios reservaram-se 100 μl das amostras para quantificação de proteínas⁵⁸. Em microplaca, adicionou-se 10 μl do sobrenadante das amostras (6-10 réplicas) seguidos de 250 μl do reativo de *Bradford* (“*Coomassie brilliant blue*” BG-250) e procederam-se as leituras de absorbância ($\lambda = 620 \text{ nm}$; faixa de leitura = 595-620 nm)⁵⁹. Como branco utilizou-se PBS. A concentração de proteínas foi determinada a partir da comparação dos valores de absorbância

⁵⁸ Para a quantificação de proteínas utilizam-se os sobrenadantes das amostras obtidos após centrifugação, cuja velocidade e tempo devem ser semelhantes aos empregados para cada ensaio específico, isto é, CAT, GST, GSH, LPO etc. Observar que o metanol e o TCA precipitam proteínas quando em altas concentrações, logo foram reservadas alíquotas em separado às utilizadas nos ensaios LPO e GSH para quantificação de proteínas.

⁵⁹ O método de Bradford é baseado na interação entre o corante BG-250 e macromoléculas de proteínas que contém aminoácidos de cadeias laterais básicas ou aromáticas. No pH de reação, a interação entre a proteína de alta massa molecular e o corante BG-250 provoca o deslocamento do equilíbrio do corante para a forma aniônica, que absorve fortemente luz no comprimento de onda de 595 nm (COMPTON e JONES, 1985; ZAIA *et al.*, 1998).

com àqueles provenientes de curva-padrão de BSA (albumina de soro bovina) nas concentrações de 0, 125, 250, 500, 750 e 1000 µg de BSA por mililitro de volume final de solução (BRADFORD, 1976). A curva-padrão incluía pelo menos quatro réplicas por concentração de BSA e esteve presente em todos os ensaios de quantificação de proteínas.

3.9 Tratamento estatístico dos dados

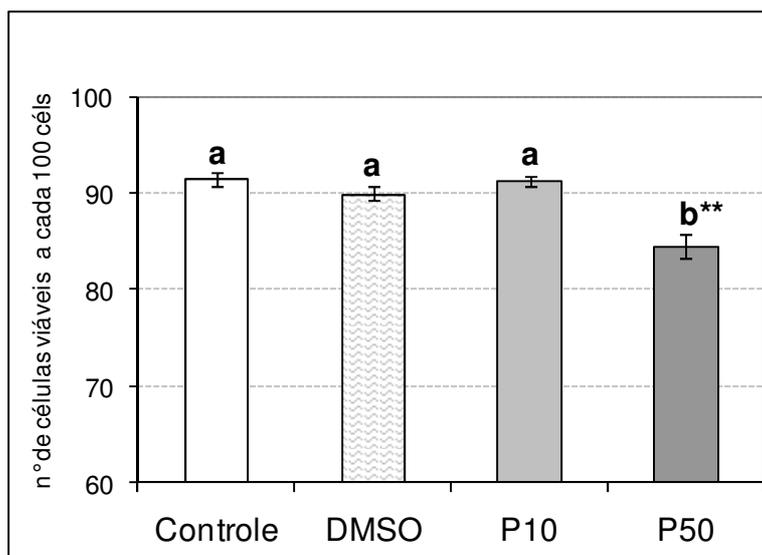
Para os ensaios bioquímicos, de viabilidade celular e ensaio *TUNEL*, utilizou-se a Análise de Variância de uma Via (*one way ANOVA*) seguida, quando aplicável, do pós-teste de *Tukey-Kramer*. Para a avaliação das quebras de DNA nos escores calculados no ensaio Cometa, o teste não paramétrico de *Kruskal-Wallis* foi empregado. Os resultados de cada ensaio realizado no presente capítulo provêm de dois experimentos independentes, exceto para o ensaio *TUNEL* (realizado apenas uma vez) e para o ensaio de LPO (realizado três vezes), sendo que para cada experimento (cultura celular) havia a representação dos quatro grupos experimentais (controle, DMSO, P10 e P50). Ao final dos ensaios, os dados foram reunidos, normalizados e uma análise estatística global foi realizada. O total de réplicas foi de trinta (CAT), quarenta e seis (GST), quarenta e duas (GSH), sete (teste de viabilidade), quatro (ensaio de apoptose), seis (ensaio cometa) e sessenta (ensaio de LPO).

4. RESULTADOS⁶⁰

4.1 Viabilidade Celular e Apoptose

A viabilidade celular após dois dias de exposição à mistura de POCs sofreu um decréscimo de aproximadamente 7,5% no grupo P50, embora não tenha havido diferenças significativas entre os grupos controle, DMSO e P10 (Figura 5).

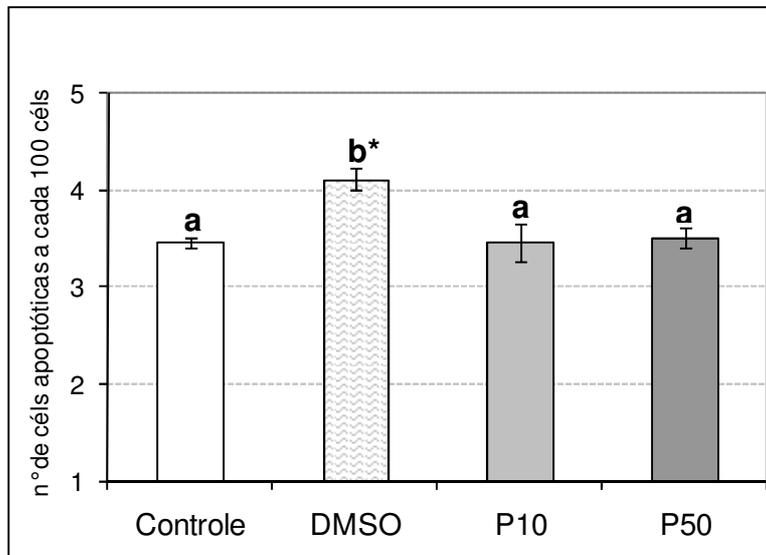
FIGURA 5. Viabilidade celular estimada através do ensaio de exclusão do azul de tripan.



Média \pm erro padrão da média. Viabilidade em número de células viáveis a cada 100 células. ** $p < 0,01$ (asteriscos em comparação com o grupo controle). OBS: letras diferentes indicam grupos estatisticamente distintos. Total de réplicas = 7; número de réplicas por experimento ≥ 3 (2 experimentos independentes).

A incidência de células apoptóticas determinada por citometria de fluxo foi 19% superior no grupo DMSO (Figura 6) em relação ao controle. Já os demais grupos (controle, P10 e P50) foram estatisticamente similares. Como o solvente DMSO também estava presente em P10 e P50 a 0,1%, observou-se um efeito antiapoptótico da mistura de POCs em relação ao grupo DMSO.

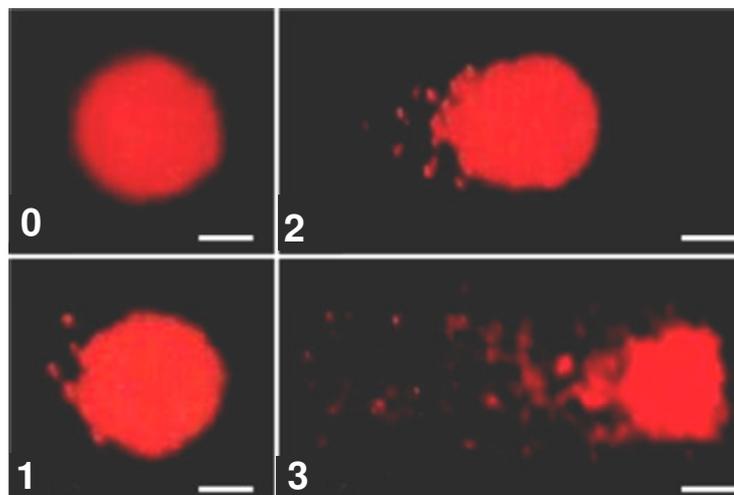
⁶⁰ Para a apresentação dos resultados foi realizada uma comparação de todos os grupos entre si. Dessa forma, caso as letras sobre as barras de erro padrão da média sejam diferentes, os grupos também serão. Já os asteriscos, sobrescritos nas letras, indicam especificamente o grau de significância em relação ao grupo controle externo (controle), uma vez que o objetivo aqui foi de discutir também o efeito do DMSO. Logo, se o grupo solvente (DMSO) e os grupos P10 ou P50 apresentarem letras diferentes, eles são estatisticamente diferentes ($p < 0,05$ ou valor menor), embora não necessariamente apresentem asteriscos.

FIGURA 6. Apoptose estimada pelo ensaio *TUNEL*.

Média \pm erro padrão da média. Apoptose em número de células marcadas positivamente pelo *FITC-dUTP* (apoptóticas) a cada 100 células. * $p < 0,05$ (asteriscos em comparação com o grupo controle). OBS: letras diferentes indicam grupos estatisticamente distintos. Total de réplicas = 4 (1 experimento).

4.2 Ensaio Cometa

Para o ensaio cometa, os nucleóides (núcleos desprovidos de membranas) foram classificados pela atribuição de um valor numérico arbitrário, conforme o comprimento dos “rastros de DNA” (Figura 7). Então um escore de dano foi calculado (Tabela 2). Dessa maneira, os grupos DMSO e P50 apresentaram escores de dano superiores aos do grupo controle e P10.

FIGURA 7. Nucleóides de hepatócitos de *Hoplias malabaricus* visualizados no ensaio Cometa.

DNA íntegro (classe 0) e progressivamente danificado (classes 1, 2 e 3) corados por brometo de etídio. Barras = 8 μ m.

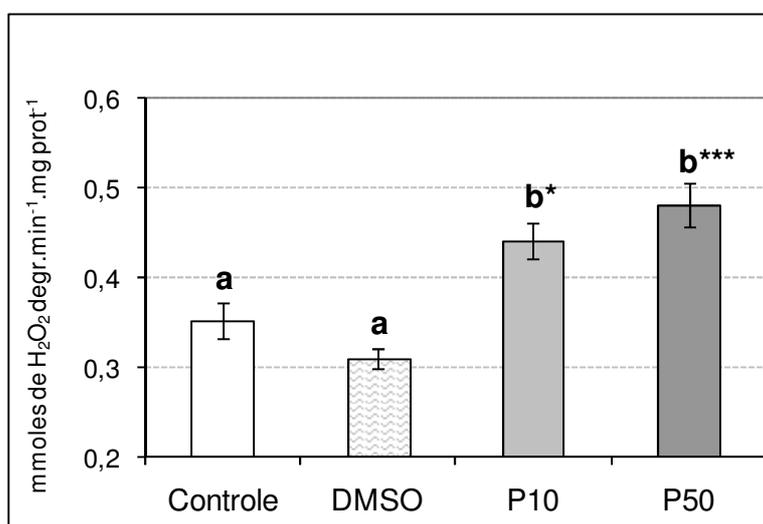
TABELA 2. Percentagem de incidência das classes de dano ao DNA (0, 1, 2 e 3) e escores.

Grupos	Classes de dano no DNA				Escore
	0	1	2	3	
Controle	70,2 ± 10,8	21,0 ± 6,6	6,3 ± 3,1	2,5 ± 1,3	41 ± 16 ^a
DMSO	16,3 ± 4,4	48,5 ± 5,0	26,2 ± 4,3	9,0 ± 2,4	128 ± 12 ^{b**}
P 10	54,9 ± 8,7	28,2 ± 4,9	10,9 ± 3,1	6,0 ± 1,3	68 ± 15 ^a
P 50	20,7 ± 4,0	48,2 ± 5,7	17,3 ± 3,6	13,8 ± 2,3	124 ± 5 ^{b*}

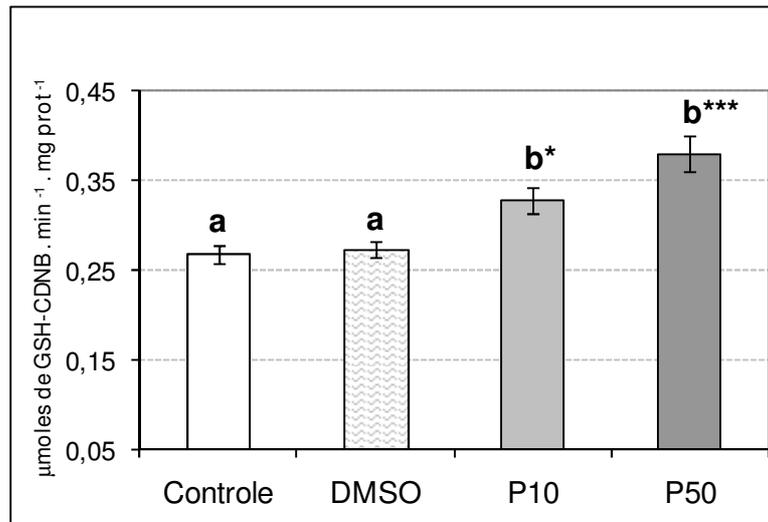
Média ± erro padrão da média. Escore = $\sum(\text{classe do dano} \times \% \text{ de incidência})$. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ (asteriscos em comparação com o grupo controle). OBS: letras diferentes indicam grupos estatisticamente distintos. Total de réplicas = 6; número de réplicas por experimento = 3 (2 experimentos independentes).

4.3 Ensaio Bioquímicos

Quando comparados, os grupos DMSO e controle apresentaram valores similares para as atividades das CAT e GST. Por outro lado, tanto no grupo P10 quanto no P50 houve aumento nessas atividades enzimáticas. Para as CAT (Figura 8) houve um aumento na sua atividade de 25% (P10) e 36% (P50), enquanto que para as GST (Figura 9) esse aumento foi de 22% (P10) e 42% (P50), com relação ao grupo controle. Para ambas, CAT e GST, não houve diferença estatística entre os grupos P10 e P50.

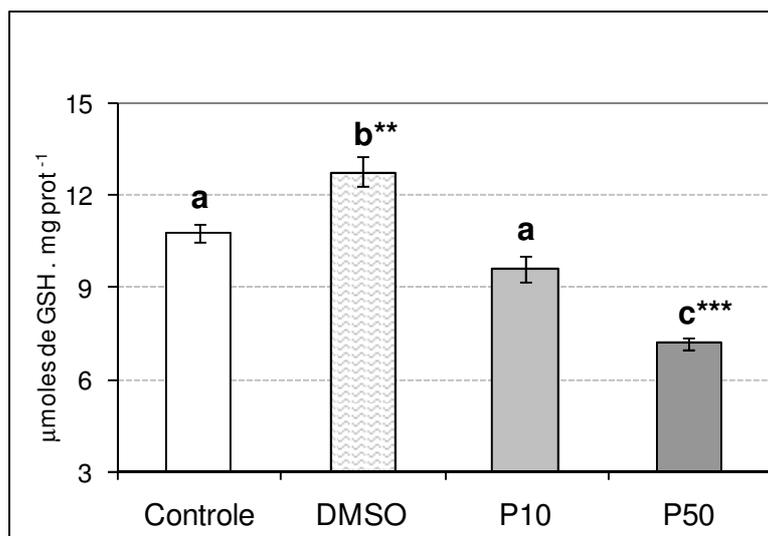
FIGURA 8. Atividade específica das CAT.

Média ± erro padrão da média. Atividade em milimoles de peróxido de hidrogênio degradado por minuto por miligrama de proteínas totais. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ (asteriscos em comparação com o grupo controle). OBS: letras diferentes indicam grupos estatisticamente distintos. Total de réplicas = 30; número de réplicas por experimento ≥ 12 (2 experimentos independentes).

FIGURA 9. Atividade específica das GST.

Média \pm erro padrão da média. Atividade em micromoles do tioéter GSH-CDNB formado por minuto por miligrama de proteínas totais. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ (asteriscos em comparação com o grupo controle). OBS: letras diferentes indicam grupos estatisticamente distintos. Total de réplicas = 46; número de réplicas por experimento ≥ 22 (2 experimentos independentes).

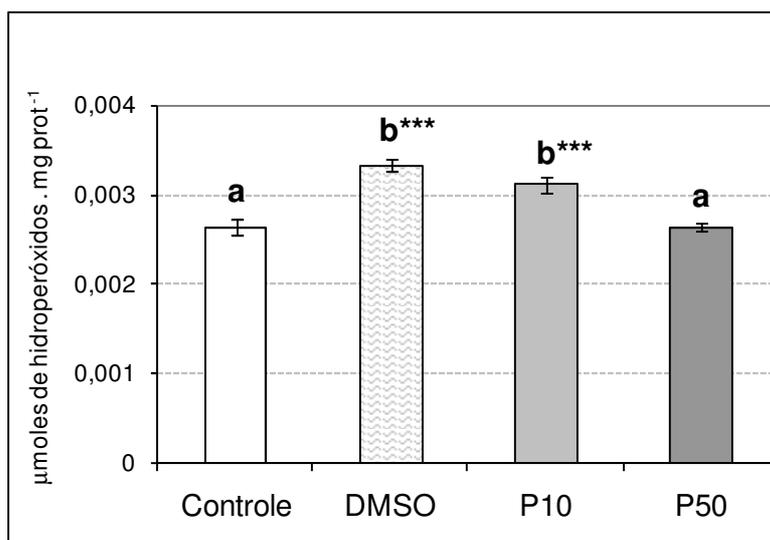
A concentração de glutathiona reduzida quantificada foi 19% superior no grupo DMSO e 33% inferior em P50 (efeito oposto entre DMSO e P50), ambos em relação ao grupo controle. Os grupos P10 e controle apresentaram concentrações estatisticamente semelhantes de GSH (Figura 10).

FIGURA 10. Concentração de glutathiona reduzida (GSH).

Média \pm erro padrão da média. Concentração em micromoles de GSH por miligrama de proteínas totais. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ (asteriscos em comparação com o grupo controle). OBS: letras diferentes indicam grupos estatisticamente distintos. Total de réplicas = 42; número de réplicas por experimento ≥ 18 (2 experimentos independentes).

A quantidade de hidroperóxidos lipídicos nas células indicou que a peroxidação lipídica estava aumentada com relação ao grupo controle, em 26% no grupo DMSO e 18% em P10. Esses dois grupos não apresentaram diferenças estatísticas entre si, assim como os grupos P50 e controle quando comparados (Figura 11). De fato, houve uma redução da peroxidação de lipídios em P50 comparativamente ao grupo DMSO, ou seja, mais uma vez houve efeito oposto entre ambos.

FIGURA 11. Peroxidação lipídica – concentração de hidroperóxidos lipídicos



Média \pm erro padrão da média. Concentração em micromoles de hidroperóxidos por miligrama de proteínas totais. *** $p < 0,001$ (asteriscos em comparação com o grupo controle). OBS: letras diferentes indicam grupos estatisticamente distintos. Total de réplicas = 60; número de réplicas por experimento ≥ 18 (3 experimentos independentes).

5. DISCUSSÃO

Um desenho experimental um pouco diferente dos desenhos comumente utilizados para a investigação do efeito de xenobióticos foi empregado para verificar os efeitos de uma mistura de POCs em hepatócitos de *Hoplias malabaricus*. Para atender essa finalidade, os referidos xenobióticos foram obtidos a partir da gordura hepática de enguias. Por serem hidrofóbicos, os POCs foram previamente solubilizados em DMSO antes de sua aplicação em meio de cultura. Após a exposição, os efeitos da mistura em questão sobre as células cultivadas foram avaliados através do uso de alguns biomarcadores.

O primeiro biomarcador avaliado foi a atividade das enzimas CAT, que aumentou em ambos os grupos expostos à mistura de POCs (P10 e P50), conforme já relatado em peixes expostos a esse grupo de xenobióticos (RODRIGUEZ-ARIZA *et al.*, 1993). Esse acréscimo pode resultar, por exemplo, de uma maior produção de peróxido de hidrogênio⁶¹ e, conseqüentemente, aumento na síntese das enzimas mencionadas.

As CAT compõem uma família de hemoproteínas (GAO *et al.*, 2003) envolvidas na dismutação do peróxido de hidrogênio⁶² e na destoxificação⁶³ de alguns substratos, como fenol, alcoóis, ácido fórmico e formaldeído⁶⁴ (NORDBERG e ARNÉR, 2001; ALBERTS *et al.*, 2002). A NADPH (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida) é ligada a essas enzimas peroxissomais, o que previne a inativação e aumenta a atividade molar (KIRKMAN *et al.*, 1999) das CAT.

Um dos papéis antioxidantes das CAT é reduzir o risco de formação do radical⁶⁵ hidroxila (HO•) a partir do H₂O₂ via reação de Fenton⁶⁶ (NORDBERG e ARNÉR, 2001) ou por reação com ânion superóxido⁶⁷ (O₂•⁻). Isso é

⁶¹ O metabolismo de POCs no ciclo do citocromo P450 pode funcionar como uma importante fonte de H₂O₂ e O₂•⁻ (ZANGAR *et al.*, 2004). EROs como o H₂O₂ podem ativar fatores (modificação da porção tiol) que levam a transcrição de enzimas antioxidantes (GASCH *et al.*, 2000; MOYE-ROWLEY, 2002; GEZZI, 2005).

⁶² $2 \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2 \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$ (NORDBERG e ARNÉR, 2001).

⁶³ Destoxificação – do inglês *detoxification* (HOLANDA FERREIRA, 2004).

⁶⁴ $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{R}'\text{H}_2 \rightarrow \text{R}' + 2 \text{H}_2\text{O}$ (R': substrato orgânico) (ALBERTS *et al.*, 2002).

⁶⁵ Radical livre = qualquer íon, átomo ou molécula, carregado ou neutro, que possui um ou mais elétrons desemparelhados em sua estrutura (NORDBERG e ARNÉR, 2001; HOLANDA FERREIRA, 2004; NAKAO, 2006).

⁶⁶ $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Cu}^+/\text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{OH}^- + \text{Cu}^{2+}/\text{Fe}^{3+} + \text{HO}^\bullet$ (NORDBERG e ARNÉR, 2001).

⁶⁷ $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2^{\bullet-} \rightarrow \text{OH}^- + \text{HO}^\bullet + \text{O}_2$

importantíssimo, uma vez que a permeabilidade das membranas biológicas ao H_2O_2 é superior a de qualquer outra espécie reativa de oxigênio (ERO) (NORDBERG e ARNÉR, 2001; CUI *et al.*, 2004) e o H_2O_2 pode servir como uma fonte de geração localizada de HO^{\bullet} ⁶⁸.

O HO^{\bullet} é provavelmente a ERO capaz de causar mais dano aos sistemas biológicos (DIPLOCK *et al.*, 1998; BETTERIDGE, 2000; NORDBERG e ARNÉR, 2001), porquanto pode oxidar qualquer biomolécula, incluindo o DNA, proteínas e lipídios (BREEN e MURPHY, 1995; COHEN *et al.*, 1998; GIROTTI, 1985; GARDNER, 1989; STADTMAN e LEVINE, 2000; YLÄ-HERTTUALA, 1999; MARNETT, 2000), apesar de sua baixa capacidade de difusão (CUI *et al.*, 2004)⁶⁹. Conseqüentemente, o excesso de H_2O_2 pode direta e indiretamente comprometer a integridade de moléculas localizadas em diferentes sítios dentro das células (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1989; COCHRANE, 1991), alguns pouco acessíveis às demais EROs. Uma das formas de neutralizar o HO^{\bullet} e o H_2O_2 é através de reação com GSH, o segundo biomarcador avaliado.

A redução da concentração de GSH verificada no grupo P50 (em relação aos grupos DMSO e controle) e no grupo P10 (em relação ao grupo DMSO) foi um achado importante, uma vez que o par GSH / GSSG (glutationa dissulfeto) é o principal determinante não enzimático do ambiente redox celular; o par glutatona possui uma concentração molar muito superior a dos demais pares redox (SCHAFER e BUETTNER, 2001). Essa redução pode decorrer de uma maior produção de EROs e do aumento da atividade das GST após exposição aos POCs, visto que o GSH serve como molécula endobiótica na destoxificação⁷⁰ de diversos substratos (ARMSTRONG, 1997; VAN BLADEREN, 2000) e na redução de hidroperóxidos orgânicos (ROOH)⁷¹ pelas

⁶⁸ H_2O_2 e $O_2^{\bullet-}$ parecem não atacar o DNA ou iniciam a peroxidação de lipídios, ao contrário do HO^{\bullet} (HWANG e KIM, 2006).

⁶⁹ Como HO^{\bullet} é muito reativo, instável e se difunde pouquíssimo através das membranas biológicas, a formação local desta ERO tem importante papel na oxidação de componentes celulares (NORDBERG e ARNÉR, 2001; HWANG e KIM, 2006).

⁷⁰ No caso dos processos de destoxificação, a atividade catalítica das GST ocorre através da adição nucleofílica do GSH a um centro eletrofílico do xenobiótico (VAN BLADEREN *et al.*, 1979; KLASSEN *et al.*, 1996). As conjugações ocorrem através de reações de substituição, nas quais o GSH desloca um grupamento eletronegativo, e reações de adição, nas quais o GSH é adicionado a uma dupla ligação ou a um sistema cíclico (KLASSEN *et al.*, 1996).

⁷¹ $ROOH + 2 GSH \rightarrow GSSG + 2 H_2O + ROH$ (função antioxidante das GST; ação sobre ROOH pelas GPx) (NORDBERG e ARNÉR, 2001).

GST (ARTEEL e SIES, 2001). Além disso, o GSH participa na redução do próprio H_2O_2 ⁷² nas reações catalisadas pelas glutathiona peroxidases (GPx) e reage prontamente com HO^\bullet ⁷³.

Sabe-se que o DMSO é um potente *scavenger* do radical HO^\bullet (DORFMAN e ADAMS, 1973; QIAN *et al.*, 2005) e que dessa interação surgem os radicais metila ($\text{H}_3\text{C}^\bullet$) (BYVOET *et al.*, 1995; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999), que podem produzir, sob condições aeróbicas, os radicais metoxila ($\text{H}_3\text{CO}^\bullet$), metilperoxila ($\text{H}_3\text{COO}^\bullet$), gás metano e formaldeído (COHEN e CEDERBAUM, 1980; KLEIN *et al.*, 1981; BRITIGAN *et al.*, 1990; BURKITT e MASON, 1991). Essa propriedade do DMSO poderia influenciar na manutenção do GSH na forma reduzida, por reduzir diretamente a concentração de HO^\bullet . De fato, observou-se um aumento na concentração de GSH no grupo DMSO, o que não foi acompanhado quando POCs estavam presentes (P10 e P50). Sendo assim, o efeito resultante da presença conjunta dos POCs e do DMSO é oposto no que se refere à concentração de GSH; e a presença de POCs deve aumentar as taxas de oxidação e conjugação do GSH e/ou reduzir sua síntese, interferindo no ambiente redox celular.

O ambiente redox celular é um dos determinantes finais para a execução de apoptose (CAI e JONES, 1998; KAMATA e HIRATA, 1999; SCHAFER e BUETTNER, 2001; HANCOCK *et al.*, 2003), o terceiro biomarcador avaliado no presente estudo. A depleção de GSH induz apoptose⁷⁴ em vários tipos de células (HIROI *et al.*, 2005). Contudo, P10 e P50 não apresentaram aumento na incidência de apoptose, embora a concentração de GSH tenha sofrido um decréscimo nesses grupos. Isso se deve a pelo menos dois fatos: primeiro, os hepatócitos foram expostos a uma mistura complexa de POCs, na qual alguns componentes não agem aditiva ou sinergicamente; e segundo, o decréscimo na concentração de GSH não foi, supostamente, suficiente para ativar a morte celular programada. Com relação ao primeiro fato, já foi relatado, por exemplo, que o dieldrin pode afetar a função mitocondrial irreversivelmente (BERGEN,

⁷² $\text{H}_2\text{O}_2 + 2 \text{GSH} \rightarrow \text{GSSG} + 2 \text{H}_2\text{O}$

⁷³ $\text{GSH} + \text{HO}^\bullet \rightarrow \text{GS}^\bullet + \text{H}_2\text{O}$ (neste caso forma-se o radical glutatiíla que é reativo).

⁷⁴ Supostamente parece haver a interação entre o GSH e a proteína antiapoptótica bcl-2 (VOEHRINGER, 1999), regulação negativa das enzimas quinase c (PKC) (WARD *et al.*, 1998) e bloqueio na atividade da quinase C-jun NH_2 -terminal (WILHELM *et al.*, 1997) pelo GSH. Também, a função da p53 parece ser sensível ao estado redox celular (RAINWATER *et al.*, 1995).

1971) e ativar a caspase-3 (KANNAN *et al.*, 2000), enquanto que o heptacloro pode estimular a atividade das PKC, induzir a expressão da bcl-2 e impedir a liberação do citocromo c da mitocôndria (OKOUMASSOUN *et al.*, 2003). Também, as respostas negativas na genotoxicidade do heptacloro sugerem carcinogenicidade através de via epigenética (OKOUMASSOUN *et al.*, 2003), o que não ocorre para o dieldrin. O dieldrin produz intermediários metabólicos reativos carcinogênicos que causam a formação de adutos de DNA e mutações que, muitas vezes, progridem para tumores hepáticos (ASHWOOD-SMITH, 1981; BACHOWSKI *et al.*, 1997). Então, aparentemente o processo de morte celular por necrose foi o único responsável pelo decréscimo de viabilidade celular em P50 (já que a incidência de apoptose não aumentou) e o aumento da concentração de GSH foi insuficiente para evitar a ocorrência de apoptose no grupo DMSO⁷⁵.

O DMSO não altera a expressão de membros pró-apoptóticos e antiapoptóticos da família *bcl-2*⁷⁶, não obstante majore a despolarização da membrana mitocondrial, o que sugere que o DMSO pode estimular a ocorrência de apoptose através da via mitocondrial de morte celular programada (VONDRÁČEK *et al.*, 2006). Nesse caso, o colapso do potencial da membrana mitocondrial e a liberação do citocromo c da mitocôndria para o citosol (LIU *et al.*, 2001), o aumento da concentração citoplasmática de íons cálcio (NYGREN *et al.*, 1987) e ainda a ativação da transcrição das caspases⁷⁷ 9 e 3 (LIU *et al.*, 2001) corroboram para uma indução de apoptose pelo DMSO. Comparando os grupos DMSO, P10 e P50, é plausível sugerir que nos grupos expostos aos POCs, o efeito resultante das interações na mistura é antiapoptótico, uma vez que o solvente DMSO mostrou-se apoptótico e estava presente também nos grupos P10 e P50.

Além dos biomarcadores já citados, avaliou-se a fragmentação do DNA através do ensaio cometa. Tais dados revelam a ocorrência de um aumento nos danos ao DNA nos grupos P50 e DMSO (ambos em relação ao grupo controle). Em P50, o aumento na fragmentação do DNA parece resultar da

⁷⁵ A manutenção do GSH na forma reduzida pode proteger as células da execução do programa de apoptose.

⁷⁶ Em linhagem celular de leucemia mielóide humana.

⁷⁷ Observar que a ativação da transcrição das caspases citadas não significa necessariamente que a cascata de caspases ocorrerá, pois há necessidade de haver tradução dos transcritos (RNAm) e sua ativação a partir dos respectivos zimogênios (procaspases 3 e 9).

ação conjunta do DMSO e dos POCs a 50 ng.ml^{-1} , visto que em P10, grupo no qual o DMSO estava presente em igual concentração, não houve aumento nas quebras de DNA. Logo, em P10 parece que os efeitos do DMSO, da mistura de POCs e supostamente das EROs produzidas foram bem contrabalanceados pelo acréscimo nas atividades das enzimas antioxidantes CAT e GST, pelo menos no que se refere a danos ao DNA⁷⁸. No caso do grupo DMSO, a fragmentação do DNA pode resultar, entre outros fatores, da própria apoptose⁷⁹ e da geração de alguns aldeídos reativos originados de dano oxidativo causado por EROs a lipídios.

As EROs são geradas durante o metabolismo oxidativo e existe um limiar de tolerância bastante estreito a elas em todos os organismos aeróbicos (TEW e RONAI, 1999). Elas reagem com vários aminoácidos (ÇAKATAY *et al.*, 2001), o que favorece o aparecimento de enzimas modificadas ou menos ativas e, em alguns casos, proteínas desnaturadas ou não funcionais (BUTTERFIELD *et al.*, 1998). As EROs podem afetar diretamente a conformação e/ou a atividade de moléculas contendo grupamentos –SH (sulfidril) por oxidação da porção tiol (NORDBERG e ARNÉR, 2001). A modificação oxidativa de proteínas pode afetar uma grande variedade de funções celulares envolvendo proteínas e contribuir para a ocorrência de dano secundário a outras biomoléculas, como ao DNA pela inativação e/ou redução da funcionalidade de enzimas de reparo do DNA e/ou perda da fidelidade das DNA polimerases na replicação do DNA (EVANS *et al.*, 1999). Enzimas de reparo do DNA como a endonuclease III (FU *et al.*, 1992) e a poli ADP-ribose polimerase I (HUGHES, 2002) possuem grupamentos sulfidril cruciais, que, caso afetados, poderiam reduzir o reconhecimento do dano ao DNA e, conseqüentemente, impossibilitar seu reparo. É possível que o dano ao DNA observado no presente estudo resulte de um mau funcionamento do sistema de reparo do DNA aliado a produção de EROs e radicais orgânicos capazes de danificar o DNA⁸⁰, tanto no grupo DMSO quanto em P50.

⁷⁸ P10 apresenta inclusive escores de quebras no DNA inferiores aos encontrados para o grupo DMSO.

⁷⁹ A fragmentação do DNA por endonucleases ativadas via cascata de caspases é um dos eventos finais do processo de morte celular programado, a apoptose (ALBERTS *et al.*, 2002).

⁸⁰ Através de quebras no DNA, ligação cruzada entre o DNA e proteínas, açúcares ou lipídios oxidados, oxidação de purinas etc (KROEMER *et al.*, 1998).

Os radicais orgânicos alquila (NIKI *et al.*, 1993) e peroxila, os radicais provenientes de lipídios hidrofóbicos e vários tipos de EROs (WEI *et al.*, 1999) estão intimamente envolvidos com o processo de peroxidação lipídica (LPO), o que pode explicar o porquê da elevação da LPO nos hepatócitos cultivados na presença de DMSO. Realmente, o DMSO parece ter sido um agente importantíssimo na elevação da LPO nos grupos DMSO e P10 (ambos em relação ao grupo controle). Já no grupo P50, a elevação de sistemas enzimáticos de defesa parece ter possibilitado a manutenção de concentrações mais baixas de hidroperóxidos orgânicos (em relação ao grupo DMSO), com níveis semelhantes aos encontrados no grupo controle. Do ponto de vista funcional, quando os ácidos graxos são peroxidados, eles tornam-se mais hidrofílicos, perturbando as funções normais da membrana⁸¹ (ACWORTH e BAILEY, 1995), seja a membrana plasmática, sejam as membranas de organelas como mitocôndrias, lisossomos etc. Logo, a peroxidação lipídica traz conseqüências sérias às células.

Não somente a peroxidação lipídica, mas também os danos ao DNA observados no grupo DMSO parecem resultar dos produtos da reação do HO• com o DMSO e da formação local⁸² desse radical. Além disso, já foi descrito que o DMSO pode alterar a permeabilidade e a estabilidade das membranas lisossomais *in vitro* (MACKIE *et al.*, 1989). A peroxidação das membranas lisossomais com conseguinte extravasamento de DNAses e a formação de adutos de DNA por alguns radicais orgânicos e produtos de peroxidação

⁸¹ Os hidroperóxidos lipídicos formados durante a LPO podem interagir com outros ácidos graxos, principalmente os poliinsaturados, gerando uma cadeia autocatalítica de peroxidação lipídica, a qual pode levar à modificação estrutural de construções complexas de lipídios e proteínas como as membranas biológicas (ABUJA e ALBERTINI, 2001; KÜHN e BORCHERT, 2002). A integridade física das membranas biológicas é um pré-requisito indispensável para a regulação de muitos processos celulares. A alteração de importantes parâmetros celulares como a fluidez, a permeabilidade, o potencial elétrico e o transporte controlado através da membrana (CUI *et al.*, 2004), devido à peroxidação lipídica, é um evento comum no dano celular (PURI e KOHLI, 1995; STRMAC e BRAUNBECK, 2002). Além de hidroperóxidos também são formados os hidroxialquenos durante a LPO, que possuem maior tempo de vida e capacidade de difusão que as EROs e os hidroperóxidos (WANG e BALLATORI, 1998).

⁸² Via reação de Fenton nas vizinhanças do DNA, onde o íon cobre é requerido para a adesão do DNA à matriz nuclear (COLLINS, 1999); ou nas vizinhanças de membranas ricas em hemepróteínas (RYTER e TYRRELL, 2000).

lipídica⁸³ devem ser outros fatores importantes que contribuem para o escore atípico de quebras no DNA relatadas.

Os biomarcadores “danos ao DNA” e “peroxidação lipídica” não apresentaram, quando analisados conjuntamente, padrões de resposta esperados nos grupos P10 e P50. A LPO aumentou, porém não os danos ao DNA no grupo P10, enquanto que o inverso ocorreu em P50. Para explicar essa aparente discrepância, deve-se evocar a formação localizada de EROs altamente reativas como o HO[•] e a susceptibilidade diferenciada do DNA, ácidos graxos e proteínas ao dano oxidativo como fatores hipotético-explanatórios, uma vez que uma investigação mais minuciosa seria necessária para que determinadas afirmações fossem feitas com relação aos resultados obtidos para os dois biomarcadores citados, danos ao DNA e peroxidação lipídica. Embora existam vários fatores que podem fragmentar o DNA, a peroxidação de lipídios é quase sempre relacionada com um excesso de agentes oxidantes, sejam EROs ou não.

O termo “estresse oxidativo” denota um desbalanço entre a produção de agentes pró-oxidantes e os respectivos sistemas de defesa antioxidantes de uma célula ou organismo (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999; CUI *et al.*, 2004). Esse desequilíbrio favorece, conseqüentemente, o estabelecimento de um ambiente mais oxidante que o normal⁸⁴. Como esperado, parece que os hepatócitos de *Hoplias malabaricus* ativaram alguns sistemas de defesa antioxidantes (CAT e GST) para restabelecer o balanço redox após a exposição à mistura de POCs. Já a presença do DMSO causou efeitos (Figura 12) de importância igual ou superior aos causados pelos próprios POCs em biomarcadores (Figura 13) que indicam dano celular (LPO, quebras no DNA), como conseqüência provável, em parte, da não alteração mensurável das enzimas CAT e GST. Além desses efeitos, já foi descrito que o DMSO pode inibir a atividade das isoformas de citocromo P450 CYP2C9, 2C19, 3A4 e 2E1

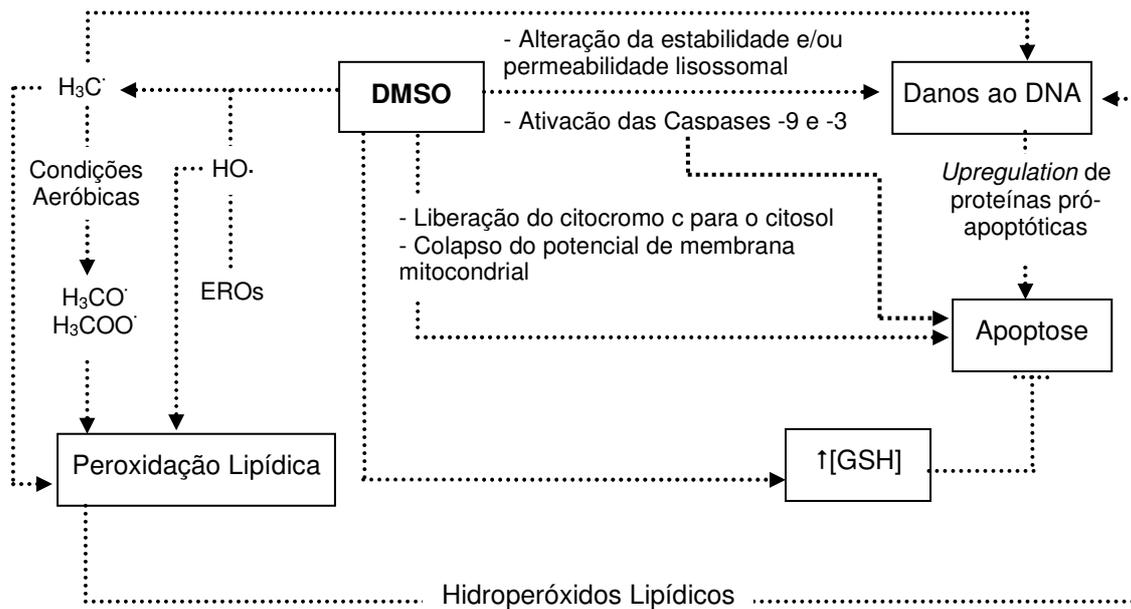
⁸³ Alguns aldeídos bastante reativos como o malonaldeído, crotonaldeído, acroleína, 4-hidroxi-2-nonenal etc (NAIR e OFFERMAN, 1985; ESTERBAUER *et al.*, 1991; LOUREIRO *et al.*, 2002; MARTINEZ *et al.*, 2003).

⁸⁴ A produção excessiva e desregulada de EROs pode ter graves conseqüências às células. Contudo, em baixas concentrações, as EROs e ERNs (espécies reativas de nitrogênio) têm importante papel no contexto biológico. Elas são importantes reguladores fisiológicos na sinalização celular, participando de processos envolvidos na proliferação celular, relaxamento endotelial, destruição de patógenos, apoptose etc (PALMER *et al.*, 1987; SUNDARESAN *et al.*, 1995; IRANI *et al.*, 1997; MANNICK e SCHONHOFF, 2002).

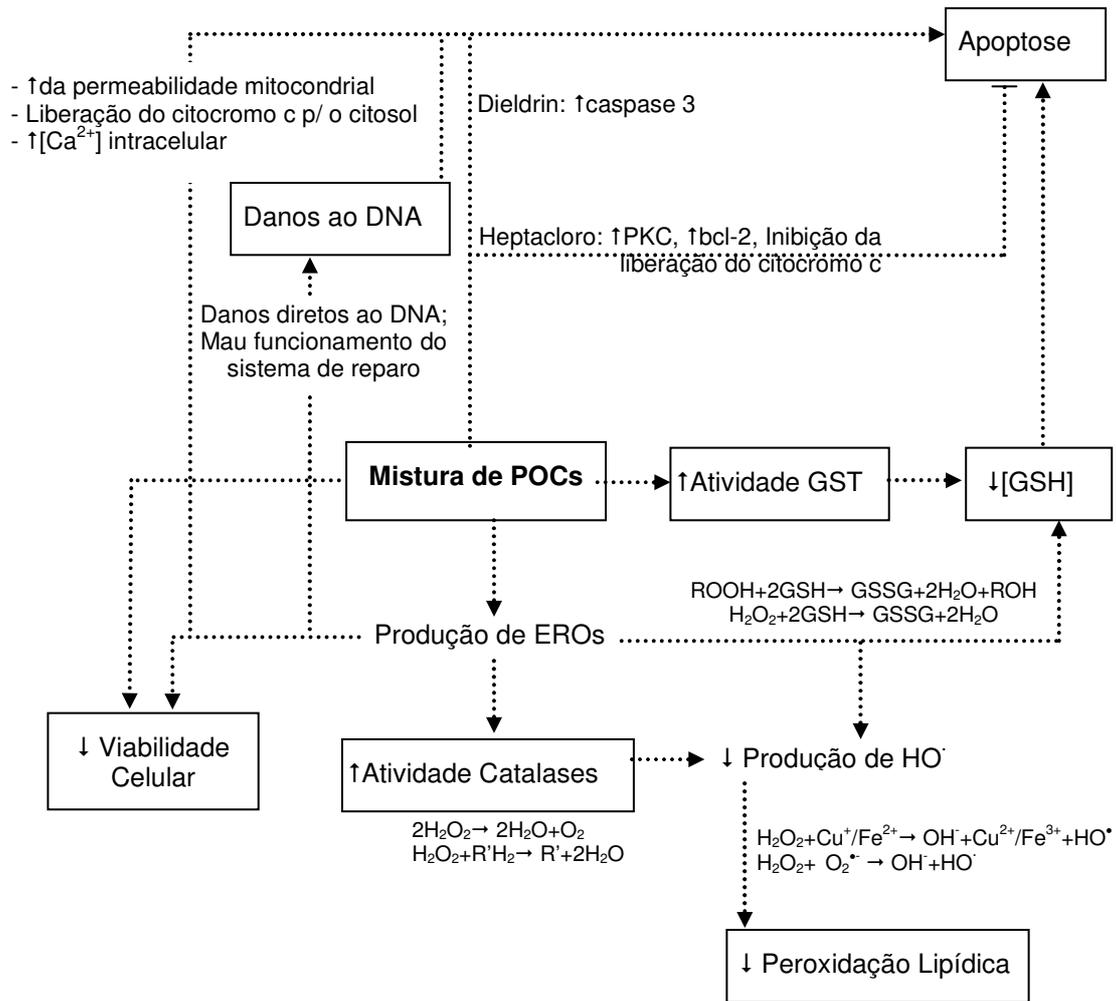
em hepatócitos de humanos (EASTERBROOK *et al.*, 2001). Considerando que muitas dessas isoformas podem ser evolutivamente conservadas e que algumas delas são induzidas por POCs, estando envolvidas no seu metabolismo (TANG *et al.*, 2004), o DMSO poderia estar “camuflando” ou retardando determinados efeitos dependentes da biotransformação de alguns dos pesticidas que compõem a mistura empregada nos ensaios *in vitro* realizados.

A exposição de células *in vitro* a uma mistura de poluentes parece permitir importantes interações, o que efetivamente ocorre *in vivo*. Todavia, esse tipo de ensaio dificulta atribuir um efeito específico a um agente causador exclusivo, isto é, a um estressor químico em particular. Então, a mistura deve ser considerada como sendo um agente com propriedades múltiplas, as quais dependem da composição específica e das concentrações de cada um dos componentes dessa combinação.

Em um sistema biológico complexo como uma célula, os resultados finais da ação múltipla de uma mistura de xenobióticos precisam ser determinados empiricamente, sendo esta determinação uma condição imprescindível para um melhor entendimento do que acontece com organismos expostos no seu ambiente de vida. Essa foi, irrefutavelmente, a justificativa determinante para a realização do presente estudo.

FIGURA 12. Efeitos causados pelo DMSO e alguns mecanismos hipotéticos.

O DMSO produz o radical metila ($H_3C\cdot$) através de reação com o radical hidroxila ($HO\cdot$). O radical metila gera, sob condições aeróbicas, os radicais metoxila ($H_3CO\cdot$) e metilperoxila ($H_3COO\cdot$), os quais podem, assim como os próprios radicais metila e hidroxila, iniciar a peroxidação de lipoproteínas e de lipídios de membrana, principalmente os poliinsaturados. O DMSO pode também alterar a permeabilidade e/ou estabilidade da membrana lisossomal e ativar as caspases -9 e -3, o que poderia causar dano adicional ao DNA àquele originado da interação de espécies radiculares e dos hidróperóxidos lipídicos com o DNA, por levar a ativação de endonucleases; as caspases efetoras podem levar a inativação da proteína seqüestradora da DNA endonuclease. Como o DMSO seqüestra radicais hidroxila, ele poderia influenciar na concentração de GSH; contudo não está claro o porquê do aumento da concentração do GSH. Nas mitocôndrias, o DMSO pode induzir a liberação do citocromo c e o colapso do potencial de membrana, ambos decorrentes do aumento da permeabilidade de membrana mitocondrial. Esses efeitos e a *upregulation* de proteínas pró-apoptóticas pelos próprios danos ao DNA, mas não o aumento na concentração de GSH, contribuem para a ocorrência de apoptose.

FIGURA 13. Efeitos causados pela mistura de POCs e alguns mecanismos hipotéticos.

Os POCs podem causar o aumento da atividade de algumas isoformas de GST e durante a biotransformação desses pesticidas EROs são geradas. A reação do GSH com o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) ou hidroperóxidos orgânicos (ROOH) e o aumento da atividade global das GST devem contribuir para a oxidação do GSH e, conseqüentemente, para o decréscimo na sua concentração molar. A produção de EROs e em última instância, peróxido de hidrogênio, pode causar aumento na síntese das CAT e, como resultado, aumento na sua atividade. A neutralização e degradação do peróxido de hidrogênio (pelo GSH e CAT) levam a menor formação do radical hidroxila, logo a menos peroxidação de lipídios. O excesso de EROs pode causar danos ao DNA e a morte de células por necrose. Ao mesmo tempo, a produção de EROs em excesso pode aumentar a permeabilidade mitocondrial, a concentração de íons cálcio intracelular e provocar a liberação do citocromo c da mitocôndria para o citosol, o que leva, muitas vezes, à apoptose. Ainda, o decréscimo da concentração de GSH e a ativação de caspases por alguns pesticidas (por exemplo, o dieldrin) contribuem positivamente para as vias apoptóticas. Entretanto, outros pesticidas (por exemplo, o heptacloro) podem agir antagonicamente, impedindo a ocorrência de apoptose através da inibição da liberação do citocromo c, aumento da atividade das PKC e ativação de proteínas antiapoptóticas como a bcl-2. A soma desses eventos e a intensidade de cada um deles determina se a célula segue ou não as vias que culminam em apoptose.

6. CONCLUSÕES

O modelo padronizado (capítulo I) mostrou-se adequado para investigações com xenobióticos, permitindo a verificação de alguns efeitos causados por esses agentes já numa primeira aplicação investigativa.

Alguns dos efeitos induzidos e/ou causados pela mistura de pesticidas testada foram nos sistemas de defesa enzimáticos CAT e GST, na concentração de GSH e na viabilidade celular. Outros efeitos como a peroxidação lipídica, danos ao DNA e apoptose parecem ser causados ou fortemente influenciados pelo DMSO. Para os últimos biomarcadores, a mistura de POCs e o DMSO apresentaram efeitos finais opostos.

Apesar de o DMSO ser freqüentemente empregado para solubilizar POCs e PCBs, a fim de possibilitar sua aplicação em culturas celulares, ele não é um solvente apropriado para ensaios com hepatócitos de *Hoplias malabaricus*, uma vez que alterou a resposta de importantes biomarcadores. Logo, é necessário encontrar um substituto para o DMSO em futuros ensaios com xenobióticos lipofílicos no modelo supracitado. Uma possibilidade seria o emprego do próprio soro bovino fetal, visto que o soro é rico em lipídios e os POCs são particionados nessas moléculas. Outra opção seria a complexação dos POCs com a proteína albumina. Ambos os procedimentos supracitados são interessantes, pois empregam moléculas que não são estranhas aos hepatócitos.

Capítulo III

CAPÍTULO III: Caracterização da toxicidade do DDT, metilmercúrio (MeHg) e mistura DDT+MeHg em hepatócitos de *Hoplias malabaricus*

RESUMO

O MeHg e o DDT são poluentes que bioacumulam e biomagnificam facilmente, muitas vezes coexistindo em alguns ambientes como na região Amazônica. Em peixes, o fígado e o músculo são tecidos-alvo preferenciais para ambos os contaminantes. O MeHg é um organo-metal gerado a partir da metilação do mercúrio inorgânico por bactérias, que pode ser de origem natural ou de atividade antrópica, constituindo a forma predominante encontrada em tecidos biológicos, a qual apresenta afinidade por grupamentos tiól (-SH) de peptídeos/proteínas. Já o DDT é um inseticida organoclorado sintético produzido em larga escala a partir de 1945, que começou a ter seu uso proibido (exceto para o controle de vetores de doenças) ao início de 1970. Mundialmente, o DDT ainda pode ser utilizado, em alguns casos, para o controle dos vetores de malária e leishmaniose visceral. O DDT pertence ao grupo dos POPs e é altamente bioacumulado em reservas lipídicas de tecidos animais. Tendo esses dados em mente, decidiu-se por expor hepatócitos de *Hoplias malabaricus* cultivados a duas concentrações de MeHg (MeHg I = 0,25 μM , $\sim 53,9 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ e MeHg II = 2,5 μM , $\sim 539 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$), uma concentração do isômero predominante na fórmula comercial do DDT, o *p,p'*-DDT (DDT = 50 nM, $\sim 17,7 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$) e à mistura de ambos os xenobióticos (MeHg I + DDT = 50 nM de DDT + 0,25 μM de MeHg), com um grupo controle mantido em paralelo. Hepatócitos foram isolados, cultivados por três dias e então expostos por quatro dias aos xenobióticos em meio de cultura. Observaram-se: (1) redução na viabilidade celular em todos os grupos expostos; (2) aumento na incidência de apoptose (DDT); (3) decréscimo (MeHg II) e acréscimo (DDT, MeHg I, DDT+MeHg I) na atividade das CAT; (4) decréscimo na atividade global das GST (DDT); (5) redução (MeHg I, DDT+MeHg I) e aumento (MeHg II) da atividade da glutatona dissulfeto redutase (GR); (6) diminuição (DDT e MeHg II) da atividade das superóxido dismutases (SOD); (7) aumento (MeHg II e DDT+MeHg I) da atividade da glucose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH); (8) aumento (MeHg II) da atividade da delta aminolevulinato desidratase (δ -ALAD); (9) redução da concentração de GSH (DDT, MeHg II, DDT+MeHg I); (10) aumento da peroxidação lipídica em todos os grupos expostos; (11) acréscimo (MeHg II e DDT+MeHg I) na carbonilação de proteínas (PCO); (12) aumento da produção de H_2O_2 (DDT, MeHg I e DDT+MeHg I); e (13) diminuição da produção de O_2^{\bullet} (MeHg II). O conteúdo de glicogênio manteve-se similar em todos os grupos experimentais. Foram realizados um (2), dois (1,12,13) e três/quatro (3-11) experimentos independentes. Destaques importantes: as concentrações utilizadas são encontradas naturalmente no fígado de *Hoplias malabaricus* da região Amazônica; o DDT foi testado em concentração abaixo do seu limite de solubilidade em água (por isso a ausência de grupo solvente); e as concentrações de DDT e MeHg testadas, mesmo sendo consideradas baixas, alteraram a resposta de vários dos biomarcadores avaliados.

Artigo referente ao presente capítulo: Oxidative and Toxic Effects of DDT and Methyl Mercury on the Hepatocytes from *Hoplias malabaricus*. Submetido para publicação, 2007.

1. INTRODUÇÃO

Por volta de 1945, o DDT (diclorodifeniltricloroetano), inseticida sintético do grupo dos organoclorados, começou a ser produzido em larga escala, passando a ser utilizado na agricultura e pecuária como pesticida por cerca de 25-30 anos (D'AMATO *et al.*, 2002). No período de 1946-1970 todos os programas de controle da malária se apoiavam quase que totalmente no emprego do DDT, tamanha sua eficiência contra formas adultas dos mosquitos vetores e seu prolongado efeito residual (REY, 1991). Nos anos 60, já havia indícios de que o DDT⁸⁵ era persistente no ambiente e tóxico para organismos cronicamente expostos, fato que culminou em restrições no uso do DDT a partir de 1970.

Com essas restrições, a concentração de DDT em animais aquáticos começou a decrescer gradualmente ao longo dos anos. Contudo, ainda hoje concentrações importantes de DDTs (DDT e subprodutos/produtos de biotransformação) podem ser detectadas em diversos compartimentos do ambiente, como água, ar, sedimentos e animais (ALBAIGES *et al.*, 1987; NHAN *et al.*, 1998; BINDELMAN *et al.*, 1990; FOX *et al.*, 2001, HITES *et al.*, 2004). Animais carnívoros tendem a acumular mais DDTs que animais pertencentes a outros níveis tróficos⁸⁶, embora fatores como teor lipídico no organismo⁸⁷, tamanho, idade, espécie e comportamento também afetem as taxas de bioacumulação e bioconcentração do DDT.

Em geral, peixes de latitudes tropicais bioacumulam menores concentrações de compostos organoclorados como o DDT que peixes de regiões temperadas e frias, o que pode ser explicado pela maior taxa de eliminação por metabolismo (PANDIT *et al.*, 2006) e pelo menor tempo de

⁸⁵ O inseticida comercial DDT é constituído, em geral, pela seguinte formulação: *p,p'*-DDT (77,1%), *o,p'*-DDT (14,9%), *p,p'*-DDD (0,3%), *o,p'*-DDD (0,1%) e impurezas (3,5%). Todos os isômeros são substâncias com a fórmula empírica C₁₄H₉Cl₅ (WHO, 1989). Ao perder uma molécula de HCl, por degradação biológica ou ambiental, o *p,p'*-DDT forma o metabólito DDE (2,2-bis-*p*-clorofenil-1,1-dicloroetileno), que é ainda mais resistente às degradações que o DDT e responde por 50–70% da massa de DDT no ambiente (NEWSOME e ANDREWS, 1993). Outros subprodutos importantes são o DDD (2,2-bis-*p*-clorofenil-1,1-dicloroetano), DDMU (1-cloro-2,2-bis(*p*-clorofenil)etano), DDMS (1-cloro-2,2-bis(*p*-clorofenil)etano), DDNU (1,1-bis(*p*-clorofenil)etano), DDOH (2,2-bis(*p*-clorofenil)etanol), DDOCH (2,2-bis(*p*-clorofenil) etanal), DDA (bis(*p*-clorofenil) ácido acético), CCl₄ (tetracloroeto de carbono) (ATSDR, 2002; D'AMATO *et al.*, 2002).

⁸⁶ Devido ao processo de biomagnificação.

⁸⁷ O DDT é muito lipofílico (HARRIS *et al.*, 2003).

residência no ambiente tropical (WANIA e MACKAY, 1993; PANDIT *et al.*, 2006). Nesses ambientes, POPs como o DDT tendem a evaporar, sendo então transportados via atmosfera e depositados em regiões temperadas, polares (LI e MACDONALD, 2005) e/ou montanhosas (LI *et al.*, 2006), que agem como condensadores frios (BLAIS *et al.*, 1998), num processo conhecido como destilação global.

O processo de distribuição atmosférica, uso indiscriminado do DDT durante mais de 20 anos e a persistência de concentrações importantes de DDT nos ambientes naturais até a atualidade fazem com que DDT ainda represente risco potencial para alguns organismos, sobretudo quando há co-exposição desses organismos a outros xenobióticos como o mercúrio (Hg)⁸⁸.

O Hg é um metal altamente tóxico para os seres vivos e é abundante em muitos ecossistemas. Em vertebrados, esse metal pode afetar, de forma deletéria, células especializadas muito importantes como, por exemplo, células renais, neurônios e hepatócitos. Historicamente, a maior parte das investigações a respeito do Hg em peixes preocupa-se com as fontes antrópicas⁸⁹ que resultam em altos níveis de Hg nesses organismos (KIM, 1995). Contudo, em algumas regiões, fontes naturais de Hg respondem por altas concentrações deste metal na biota, como no caso de alguns rios⁹⁰ (VALLE *et al.*, 2005) e lagos.

No sedimento de lagos e rios, o Hg inorgânico pode ser metilado a monometilmercúrio (MeHg) por bactérias (COMPEAU e BARTHA, 1984), o que se configura no passo mais importante para a entrada do Hg na cadeia alimentar aquática. Em geral, a transmissão do MeHg através da cadeia trófica é muito superior à captação da forma iônica do Hg da água por peixes (BARBOSA *et al.*, 2003), sendo que os peixes carnívoros adquirem grande quantidade de MeHg que é bioacumulado nas matrizes protéicas⁹¹ desses organismos, principalmente em função do tamanho do peixe (BARBOSA *et al.*, 2003).

⁸⁸ Sempre que Hg é citado, faz-se referência ao mercúrio em geral.

⁸⁹ Mineração de ouro, processos industriais, queima de combustíveis fósseis etc.

⁹⁰ Por exemplo, o rio Negro (FADINI e JARDIM, 2001).

⁹¹ O acúmulo do Hg nas matrizes protéicas e a distribuição pelo organismo são, em grande parte, resultantes da afinidade do metal com aminoácidos que contêm enxofre (ROONEY, 2007).

O metal Hg e o inseticida DDT representam risco potencial para a manutenção de comunidades aquáticas naturais, pois eles podem sofrer bioconcentração, bioacumulação e biomagnificação, atingindo, muitas vezes, concentrações tóxicas na biota exposta. Ambos os xenobióticos constituem um problema global e podem coexistir em uma grande variedade de ecossistemas, como os ecossistemas da Amazônia.

Embora alguns estudos ofereçam dados a respeito das concentrações tissulares de DDT e Hg em peixes (Tabela 3) da Amazônia, os efeitos de concentrações realísticas desses xenobióticos em espécies de peixes nativas do Brasil ainda são pouco conhecidos, sobretudo os efeitos tóxicos em células-alvo, como os hepatócitos.

Em luz dos fatos mencionados, hepatócitos de *Hoplias malabaricus* foram cultivados e expostos, pela primeira vez, a concentrações realísticas de DDT, MeHg e combinação de ambos, visando-se, com isso, verificar os efeitos desses xenobióticos em células de uma espécie de peixe brasileira.

TABELA 3. Concentrações de DDT e Hg detectadas em músculo (M) e fígado (F) de peixes amostrados em diferentes regiões da Terra.

Área de coleta	Espécies de peixes	Concentrações	Referências
Rios Madeira e Tapajos (região Amazônica, Brasil)	<i>Hoplias malabaricus</i> <i>Brachyplatystoma vaillanti</i> <i>Plagioscion squamosissimus</i>	20 ng <i>p,p'</i> -DDT.g ⁻¹ M 389 ng <i>p,p'</i> -DDT.g ⁻¹ M 209 ng <i>p,p'</i> -DDT.g ⁻¹ M	TORRES <i>et al.</i> , 2002
Estuário Douro (Portugal)	<i>Platichthys flesus</i> <i>Mugil cephalus</i>	161,3 ng ΣDDTs.g ⁻¹ F 33,7 ng ΣDDTs.g ⁻¹ F	FERREIRA <i>et al.</i> , 2004
Lago Salton Sea (Califórnia, EUA)	<i>Cynoscion xanthulu</i> <i>Tilapia mossambique</i>	22,5 ng <i>p,p'</i> -DDT.g ⁻¹ F 17,9 ng <i>p,p'</i> -DDT.g ⁻¹ F	SAPOZHNIKOVA <i>et al.</i> , 2004
Rio Dniester (Moldova)	<i>Chondrostoma nasus</i>	27,7 <i>p,p'</i> -DDT.g ⁻¹ M	SAPOZHNIKOVA <i>et al.</i> , 2005
Linha costeira de Mumbai (Índia)	<i>Scoliodon laticaudus</i>	29,8 ng <i>p,p'</i> -DDT.g ⁻¹ M	PANDIT <i>et al.</i> , 2006
Rio Ouémé (área de Bonou, Benin)	<i>Clarias gariepinus</i>	60 ng <i>p,p'</i> -DDT.g ⁻¹ M	PAZOU <i>et al.</i> , 2006
Mar Mediterrâneo	<i>Xiphias gladius</i>	106 ng ΣDDTs.g ⁻¹ F	STORELLI e MARCOTRIGIANO, 2006
Peixes comprados em mercados de Hong Kong	<i>Epinephelus bleekeri</i> <i>Nemipterus virgatus</i> <i>Trachinotus blochii</i> <i>Pseudosciaena crocea</i>	25,8 ng <i>p,p'</i> -DDT.g ⁻¹ M 59,8 ng <i>p,p'</i> -DDT.g ⁻¹ M 133 ng <i>p,p'</i> -DDT.g ⁻¹ M 26 ng <i>p,p'</i> -DDT.g ⁻¹ M	CHEUNG <i>et al.</i> , 2007
Lagoa Lesina (Costa do mar Adriático, Itália)	<i>Anguilla anguilla</i>	22 ng <i>p,p'</i> -DDTs.g ⁻¹ M	STORELLI <i>et al.</i> , 2007
Lago Rotomahana (Platô do CNI, Nova Zelândia)	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	1840 ng MeHg.g ⁻¹ M	KIM, 1995
Bangladesh	<i>Mystus seenghala</i> <i>Wallago attu</i>	402 ng MeHg.g ⁻¹ M 305 ng MeHg.g ⁻¹ M	HOLSBECK <i>et al.</i> , 1997
Rio Kyeburn (Nova Zelândia)	<i>Anguilla dieffenbachia</i>	651 ng Hg.g ⁻¹ M	REDMAYNE <i>et al.</i> , 2000
Reserva de Camarguè (Lago Vacarè, França)	<i>Anguilla anguilla</i>	610 ng Hg.g ⁻¹ M 760 ng Hg.g ⁻¹ F	OLIVEIRA RIBEIRO <i>et al.</i> , 2005
Lagos Mirror, Cli, Little Doctor e Ste. Therese (bacia do rio Mackenzie, Canadá)	<i>Coregonus clupeaformis</i> <i>Salvelinus namaycush</i> <i>Esox lucius</i> <i>Stizostedion vitreum</i>	350 ng Hg.g ⁻¹ M 790 ng Hg.g ⁻¹ M 740 ng Hg.g ⁻¹ M 1430 ng Hg.g ⁻¹ M	EVANS <i>et al.</i> , 2005
Rio Negro (região Amazônica, Brasil)	<i>Hoplias malabaricus</i> <i>Hydrolycus scomberoides</i> <i>Cychla spp</i>	247–1537 ng Hg.g ⁻¹ M 114–5437 ng Hg.g ⁻¹ M 160–2441 ng Hg.g ⁻¹ M	DOREA <i>et al.</i> , 2006
Lagoa Lesina (Costa do mar Adriático, Itália)	<i>Anguilla anguilla</i>	180 ng Hg.g ⁻¹ M	STORELLI <i>et al.</i> , 2007
Rio Madeira (região Amazônica, Brasil)	<i>Hoplias malabaricus</i>	681 ng Hg.g ⁻¹ M 920 ng Hg.g ⁻¹ F	SEBRENSKI SILVA, 2007

Os valores de concentração são em relação à massa úmida de tecido biológico.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Verificar os efeitos de concentrações fatauais de MeHg e DDT em cultura primária de hepatócitos de *Hoplías malabaricus*.

2.2 Objetivos específicos

- Expor os hepatócitos durante quatro dias ao MeHg e ao DDT isoladamente e em combinação através de meio de cultura;
- Avaliar os possíveis efeitos citotóxicos através de biomarcadores bioquímicos (atividade das catalases, das glutathione *S*-transferases, da glutathione dissulfeto redutase, das superóxido dismutases, da glucose-6-fosfato desidrogenase, da δ -aminolevulinato desidratase; concentração de glutathione reduzida e de glicogênio; produção de peróxido de hidrogênio e de ânion superóxido; peroxidação de lipídios e carbonilação de proteínas) e de viabilidade e morte celular (apoptose).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção e cuidados com os peixes

Capítulo I, subitem 3.1

3.2 Isolamento das células

Para o isolamento de células hepáticas de *Hoplias malabaricus* foi empregado o procedimento descrito no Capítulo I (subitem 3.2), com as seguintes modificações⁹²:

- Adicionou-se 1 g.l⁻¹ de D-glucose ao PBS-EDTA empregado na perfusão;
- Ao final da perfusão, o fígado foi transferido à outra placa de *petri* e cortado com lâmina de bisturi em solução de PBS contendo EDTA a 0,02%, tripsina a 0,05% e D-glucose a 1 g.l⁻¹. Empregando pipetas *Pasteur* de plástico estéreis, os pedaços de tecido e células em suspensão foram gentilmente aspirados e espirados durante 10-20 min. A suspensão de células então sofreu o processo de dissociação mecânica e limpeza conforme protocolo original.

3.3 Condições para o cultivo celular

A suspensão celular foi ajustada para uma densidade de 0,5-1x10⁶ céls.ml⁻¹ em meio RPMI 1640 (D-glucose a 2 g.l⁻¹, pH 7,8) suplementado com HEPES (15 mM), NaHCO₃ (6 mM), insulina mista (0,1 U.ml⁻¹), sulfato de gentamicina (40 mg.l⁻¹) e soro bovino fetal (5%). Então, aproximadamente 3x10⁵, 6-8x10⁶ e 2-3x10⁷ células (viabilidade > 90%) foram, respectivamente, semeadas em microplacas de 96 poços, garrafas de cultura de 25 e 75 cm² (Corning-Costar®) sem pré-tratamento e mantidas a 24°C em estufa convencional (pCO₂ atmosférica).

3.4 Desenho experimental

Primeiramente as células foram cultivadas por três dias para que houvesse recuperação do procedimento de isolamento, adesão e reagregação.

⁹² As modificações no protocolo de dissociação original permitiram a obtenção de maior quantidade de células viáveis (em algumas perfusões foram obtidas 7,2 x 10⁸ céls.kg⁻¹ de peixe, com viabilidade superior a 97%).

Então, a maioria das células não aderidas e mortas foi removida através de uma lavagem suave com PBS, e as células aderidas foram utilizadas nos experimentos. A partir da população de hepatócitos de um mesmo peixe, cinco grupos experimentais foram estabelecidos: grupo controle (sem exposição aos xenobióticos), DDT (células expostas a 50 nM (~17,7 ng.ml⁻¹) de *p,p'*-DDT), MeHg I (células expostas a 0,25 µM (~53,9 ng.ml⁻¹) de monometilmercúrio), MeHg II (células expostas a 2,5 µM (~539 ng.ml⁻¹) de monometilmercúrio) e DDT+MeHg I (células expostas a mistura de *p,p'*-DDT a 50 nM e monometilmercúrio a 0,25 µM). As células foram cultivadas com (grupos expostos) e sem (grupo controle) os xenobióticos durante quatro dias, sem troca de meio de cultura durante a exposição. As culturas foram periodicamente monitoradas para identificar eventuais mudanças como contaminação por microrganismos, acidificação do pH do meio de cultura e desalojamento (desadesão) celular.

Visto que o DDT é pouquíssimo hidrofílico (hidrossolubilidade de aproximadamente 25 ng.ml⁻¹ ou 70 nM a 25°C (HOWARD e MEYLAN, 1997)), os cristais de DDT foram primeiramente dissolvidos em etanol (4,5 µg de DDT por 1 µl de etanol) sob ultra-som (10 ciclos de 1 min cada) e o etanol contendo DDT foi adicionado e solubilizado em soro bovino fetal. O soro foi então mantido a 37°C em um béquer estéril sob agitação por 2 h para possibilitar a evaporação de parte do etanol, filtrado e mantido a -20°C em alíquotas. Um procedimento similar foi realizado para o soro utilizado para os grupos experimentais não expostos ao DDT incluindo o controle, exceto pela não adição do DDT ao soro. Os experimentos foram conduzidos utilizando soro pertencente ao mesmo lote. A concentração final de etanol máxima, no caso de não ter havido evaporação alguma durante o procedimento supracitado, seria de aproximadamente 0,00039%, considerada desprezível para esse tipo de experimento.

Após os quatro dias de exposição, as células foram removidas com o emprego de *cellscraper* para os ensaios bioquímicos e por tripsinização (EDTA a 0,02%, tripsina a 0,05% em PBS a temperatura ambiente) para os ensaios de viabilidade celular e *TUNEL* e de detecção de EROs.

3.5 Viabilidade Celular

Após tripsinização as células foram centrifugadas, lavadas e ressuspendidas em PBS gelado. Em seguida, iodeto de propídio foi adicionado a 500 µl de suspensão celular (aproximadamente 1×10^6 céls.ml⁻¹; concentração final do PI de 10 µg.ml⁻¹). Após 1-2 min de incubação, foi realizada a aquisição de dados através do citômetro de fluxo FACSCalibur (BD Biosciences) já calibrado com população de células sem marcação. Em cada análise, 2×10^4 eventos por réplica foram considerados.

3.6 Ensaio *TUNEL*

Capítulo II, subitem 3.7

3.7 Ensaios bioquímicos

Capítulo II, subitem 3.8

3.7.1 Peroxidação lipídica (LPO)

Capítulo II, subitem 3.8.1

3.7.2 Concentração de Glutathiona Reduzida (GSH)

Capítulo II, subitem 3.8.2

3.7.3 Atividade das Catalases (CAT)

Capítulo II, subitem 3.8.3

3.7.4 Atividade Global das Isoformas de GST

Capítulo II, subitem 3.8.4

3.7.5 Atividade da Glutathiona dissulfeto redutase (GR)

A atividade da GR foi determinada na fração S9⁹³ medindo-se o decréscimo de absorvância ($\lambda = 340$ nm) devido à oxidação do β -NADPH acoplada à redução da glutathiona dissulfeto (SIES *et al.*, 1979). Para o ensaio,

⁹³ A fração S9 é o sobrenadante obtido após centrifugação a $9.000 \times g$.

50 µl de amostra e 250 µl de meio de reação (β-NADPH a 0,5 mM, GSSG a 5 mM, tampão fosfato a 100 mM, EDTA a 5 mM, pH 7,6, 25°C) foram adicionados a uma microplaca. O decréscimo de absorvância foi monitorado durante 10 min em intervalos de 40 s e os brancos consistiam em meio de reação e PBS. Para a determinação da atividade da GR, foi selecionado o primeiro intervalo de 8 min ($r^2 > 0,95$) e utilizado o coeficiente de extinção molar para o NADPH de $6,22 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

Forma de cálculo empregada:

Atividade da GR = $\Delta \text{ Abs. min}^{-1} \times \text{diluição} \times \epsilon^{-1} \times d^{-1} \times [\text{proteínas}]^{-1}$
<p>Onde:</p> <p>Atividade da GR em micromoles de NADPH oxidado por minuto por miligrama de proteínas $\Delta \text{ Abs. min}^{-1} = \text{Absorbância final} - \text{Absorbância inicial} \times 8^{-1}$, sendo que o intervalo final - inicial é de 8 min</p> <p>Diluição (da amostra) = 50 µl de amostra em 300 µl de volume final, ou seja, 6x.</p> <p>ϵ = coeficiente de extinção molar do NADPH ($\lambda = 340 \text{ nm}$) = $6,22 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$</p> <p>$d$ = caminho óptico (para 300 µl nos micropoços) $\approx 0,9 \text{ cm}$</p> <p>[proteínas] = concentração de proteínas em miligrama por mililitro</p>
<p>Fórmula simplificada:</p> $\text{Ativ. da GR} = \frac{1,072 \times \Delta \text{ Abs. min}^{-1}}{[\text{proteína}]} \quad \mu\text{moles de NADPH oxidado. min}^{-1} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$

3.7.6 Atividade das Superóxido dismutases (SOD)

Amostras congeladas em 0,5 ml de PBS foram descongeladas em gelo e 125 µl de etanol foram adicionados. Após obter a fração S9, a atividade das SOD (Cu,Zn-SOD + Mn-SOD) foi medida com base na capacidade dessas enzimas em inibir a redução do azul de nitrotetrazólio (NBT) pelo ânion superóxido gerado a partir da auto-oxidação da hidroxilamina em pH alcalino (CROUCH *et al.*, 1981). Para os ensaios, 20 µl do sobrenadante das amostras e 35 µl de solução contendo cloreto de NBT a 572 µM e EDTA a 100 µM foram adicionados a uma microplaca. A reação foi iniciada através da adição rápida de 145 µl de solução de carbonato de sódio a 500 mM (pH 10,2) contendo 51 mM de cloreto de hidroxilamina. A redução do NBT pelo $\text{O}_2^{\bullet -}$ a *formazan* azul foi medida espectrofotometricamente como um aumento constante de absorvância ($\lambda = 560 \text{ nm}$, $r^2 > 0,98$) durante 30 min em intervalos de 5 min. A taxa de redução do NBT na ausência de extrato de tecido (solução hidro-

alcoólica ao invés de amostra) foi utilizada como taxa de referência. Uma unidade de SOD foi definida como a atividade enzimática capaz de inibir a redução do NBT em 50% do valor da taxa de referência. Notar que entre as medições é necessário manter as microplacas protegidas da luz.

Forma de cálculo empregada:

Atividade das SOD = Δ Abs. Ref. x (2 x Δ Abs. Amostra)⁻¹ x diluição x [proteínas]⁻¹
Onde: Atividade das SOD em unidades relativas de atividade por miligrama de proteínas Δ Abs. Ref. = Absorbância final – Abs. inicial da curva de referência de redução do NBT Δ Abs. Amostra = Absorbância final – Abs. inicial da amostra, sendo que o intervalo de tempo é o mesmo utilizado para o Δ Abs. Ref. Diluição (da amostra) = 20 μ l de amostra em 200 μ l de volume final, ou seja, 10x. [proteínas] = concentração de proteínas em miligrama por mililitro

3.7.7 Atividade da Glucose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH)

A atividade da G6PDH foi determinada na fração S9 de acordo com GLOCK e MCLEAN (1953), num método que tem por princípio a detecção do aumento na absorção de luz provocada pela redução da NADP⁺ a NADPH ($\lambda = 340$ nm) pela enzima G6PDH a custa de D-glucose-6-fosfato (G6P). Um volume de 30 μ l de sobrenadante seguido de 170 μ l de meio de reação (β -NADP⁺ (nicotinamida-adenina dinucleotídeo fosfato) a 1 mM, G6P a 2 mM, Tris-HCl a 100 mM, MgCl₂ a 10 mM, pH 8, 25°C) foram adicionados a uma microplaca. A absorbância foi monitorada ($\lambda = 340$ nm) durante 3 min em intervalos de 10 s e o primeiro intervalo de 1 min com $r^2 > 0,99$ foi selecionado. O coeficiente de extinção molar para o NADPH de 6,22 mM⁻¹.cm⁻¹ foi utilizado para o cálculo da atividade da G6PDH.

Forma de cálculo empregada:

Atividade da G6PDH = $\Delta \text{ Abs. min}^{-1} \times \text{diluição} \times \epsilon^{-1} \times d^{-1} \times [\text{proteínas}]^{-1}$
<p>Onde:</p> <p>Atividade da G6PDH em micromoles de NADPH oxidado por minuto por miligrama de proteínas</p> <p>$\Delta \text{ Abs. min}^{-1} = \text{Absorbância final} - \text{Absorbância inicial}$, sendo que o intervalo final - inicial é de 1 min</p> <p>Diluição (da amostra) = 30 μl de amostra em 200 μl de volume final, ou seja, 20/3 x.</p> <p>ϵ = coeficiente de extinção molar do NADPH ($\lambda = 340 \text{ nm}$) = 6,22 $\text{mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$</p> <p>$d$ = caminho óptico (para 200 μl nos micropoços) $\approx 0,6 \text{ cm}$</p> <p>[proteínas] = concentração de proteínas em miligrama por mililitro</p>
<p>Fórmula simplificada:</p> $\text{Ativ. da G6PDH} = \frac{1,786 \times \Delta \text{ Abs. min}^{-1}}{[\text{proteína}]} \text{ \mu moles de NADPH formado. min}^{-1} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$

3.7.8 Atividade da δ -aminolevulinato desidratase (δ -ALAd)

O ensaio utilizado para medir a atividade da δ -ALAd quantifica o produto formado pela enzima a partir de 2 moléculas de δ -aminolevulinato (δ -ALA), o porfobilinogênio (PBG), que produz a cor vermelho-rósea após reagir com a solução de *Ehrlich* (SASSA, 1982; ALVES COSTA, 2001; ALVES COSTA *et al.*, 2007). Para determinar a atividade da δ -ALAd, 50 μl de volume das amostras (submetidas a ultra-som, mas não centrifugadas) foi adicionado em tubos e 550 μl de tampão fosfato de sódio a 100 mM contendo δ -aminolevulinato-hidrocloreto (ALA-HCl) a 4 mM, Triton X-100 a 0,5% foram adicionados a cada tubo. O conteúdo dos tubos foi misturado em *vortex* e incubado a 25°C por 1 h. A reação foi interrompida pela adição de 400 μl de solução contendo ácido tricloroacético a 4% e cloreto de mercúrio (HgCl_2)⁹⁴ a 99,45 mM, seguido por banho em gelo. Com relação aos brancos, a reação foi interrompida antes da incubação por 1 h, por meio do procedimento supracitado. Então, os tubos foram centrifugados a 5.000 x *g* durante 5 min a 4°C. Um volume de 150 μl de sobrenadante e 150 μl da solução reativa de *Ehrlich* (*p*-dimetil-amino-benzaldeído a 18,18 $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$, HgCl_2 a 3,18 $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$, ácido acético glacial a 76,36% e ácido perclórico a 18,18%) foram adicionados a uma microplaca.

⁹⁴ O HgCl_2 é sabidamente um potente inibidor da atividade da δ -ALAd.

Após 15 min, os valores de absorvância foram registrados ($\lambda = 550-570$ nm). Em paralelo, uma curva-padrão de porfobilinogênio (0, 2, 5, 10, 20, 30, 40, 80 μ M) foi realizada. O conteúdo protéico foi determinado em alíquotas mantidas em separado e a atividade enzimática calculada por comparação a curva-padrão de PBG.

Forma de cálculo empregada:

Atividade da δ-ALAd = Abs. x diluição x α^{-1} x [proteínas]⁻¹
Onde: Atividade da δ -ALAd em micromoles de PBG formado por hora por miligrama de proteínas Abs. = valor de absorvância registrado ($\lambda = 570$ nm) após descontar o valor do “branco” Diluição (da amostra) = 50 μ l de amostra em 1000 μ l de volume final, ou seja, 20x. α = coeficiente angular da curva-padrão (curva de 1° grau passando por x=0; y=0). [proteínas] = concentração de proteínas totais em miligrama por mililitro
Fórmula simplificada: $\text{Ativ. da } \delta\text{ALAd} = \frac{20 \times \text{Abs}}{\alpha \times [\text{proteína}]} \text{ } \mu\text{moles de PBG formado} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$

3.7.9 Carbonilação de proteínas (PCO)

Proteínas podem ser carboniladas durante processo de estresse oxidativo. A carbonilação consiste na modificação de cadeias laterais de aminoácidos, com a formação de grupamentos aldeídicos, cetônicos (C=O) etc. A 2,4-dinitrofenil-hidrazina (DNPH) reage com proteínas carboniladas formando dinitrofenil-hidrazonas que podem ser detectadas a 358-370 nm (LEVINE *et al.* 1994; QUINLAN e GUTTERIDGE, 2000). A limitação do método é com relação a grupos funcionais carbonilados como ácidos carboxílicos, amidas e ésteres que não reagem como o DNPH. Proteínas solúveis da fração S9 (200 μ l) foram adicionadas a tubos. Um volume de 800 μ l de DNPH a 10 mM (preparado em HCl a 2 M) foi adicionado aos tubos utilizados na reação. Os brancos receberam igual volume de HCl a 2 M (sem DNPH). O conteúdo dos tubos foi misturado em *vortex* durante 5 min e os tubos reservados em banho-maria a 30°C por 1,5 h. Após incubação, as proteínas foram precipitadas pela adição de 1 ml de TCA a 28% e centrifugação a 9.000 x *g* por 10 min. O *pellet* de

proteínas foi lavado três vezes por ressuspensão (em etanol/acetato de etila 1:1), homogeneização em *vortex* e centrifugação. As proteínas foram então solubilizadas em cloreto de guanidina a 6 M, centrifugadas a 9.000 x *g* por 5 min para remover quaisquer resquícios de material insolúvel. O conteúdo de carbonilas foi determinado espectrofotometricamente ($\lambda = 360$ nm) em cubetas utilizando o coeficiente de absorção molar de $2,1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ para hidrazonas. O conteúdo de proteínas foi quantificado antes da reação (em uma alíquota reservada da fração S9) e após o ensaio (proteínas em cloreto de guanidina) para evitar erros devido a perdas durante o procedimento. Os resultados estão expressos em nanomoles de carbonilas por miligrama de proteínas quantificadas após o ensaio corrigidas pela concentração de proteínas inicial.

Forma de cálculo empregada:

Carbonilação de Proteínas = Abs. x ϵ^{-1} x d⁻¹ x [proteínas]⁻¹
Onde: Carbonilação de proteínas em milimoles de carbonilas por miligrama de proteínas Abs.= valor de absorbância após descontar o valor do respectivo “branco” ϵ = coeficiente de absorção molar para hidrazonas ($\lambda = 360$ nm) = $21 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ d = caminho óptico (na cubeta) = 1 cm [proteínas] = concentração de proteínas em miligrama por mililitro, quantificadas após o ensaio, mas com valor corrigido para a concentração inicial de proteínas
Fórmula simplificada: $[\text{Carbonilas}] = \frac{0,0476 \times 10^{-2} \times \text{Abs}}{[\text{proteína}]} \text{ } \mu\text{moles de carbonilas} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$

3.7.10 Conteúdo de glicogênio

O conteúdo celular de glicogênio foi determinado baseado no protocolo citado por TOGNI e colaboradores (2003). As amostras foram descongeladas e digeridas em 400 μl de KOH a 1 M durante 20 min a 70 °C. Após digestão, 100 μl de amostra foram transferidos para outro tubo, ao qual foram adicionados 15 μl de ácido acético glacial e 500 μl de meio de reação I (acetato de sódio a 110 mM, ácido acético a 0,46%, pH 4,8 e amiloglicosidase de fungo *Rhizopus* (Sigma®) a 23 U.ml⁻¹). O conteúdo dos tubos foi misturado em *vortex*, mantido

a 37°C durante 3 h para que houvesse hidrólise do glicogênio e centrifugado a 3.000 x g por 5 min. Então, 100 µl do sobrenadante (100 µl de água no caso do branco) foram transferidos para um novo tubo contendo 1 ml de meio de reação II (trietanolamina hidrocloreto a 300 mM, sulfato de magnésio (MgSO₄) a 4 mM, pH 7,5 e trifosfato de adenosina (ATP) a 9 mM, β-NADP⁺ a 0,9 mM, hexoquinase/glucose-6-fosfato desidrogenase (HK-G6P) a 0,75 U.ml⁻¹). O conteúdo dos tubos foi misturado novamente em *vortex* e mantido a temperatura ambiente por 40 min. Finalmente, 300 µl do produto de reação foram adicionados a uma microplaca e absorção de luz registrada (λ = 340 nm). O coeficiente de extinção molar para NADPH de 6,22 mM⁻¹.cm⁻¹ foi utilizado para o cálculo do conteúdo de glicogênio. Amostras digeridas foram empregadas na determinação do conteúdo protéico.

Forma de cálculo empregada:

Conteúdo de glicogênio = Abs. x diluição x ε⁻¹ x d⁻¹ x [proteínas]⁻¹
Onde: Conteúdo de glicogênio em micromoles de unidades glucosil por miligrama de proteínas Abs.= valor de absorbância após descontar o valor do “branco” Diluição = (615/100) x (1100/100) = 67,65 ε = coeficiente de absorção molar para NADPH (λ = 340 nm) = 6,22 mM ⁻¹ .cm ⁻¹ d = caminho óptico (para 300 µl nos micropoços) = 0,9 cm [proteínas] = concentração de proteínas em miligrama por mililitro
Fórmula simplificada: $[\text{glicogênio}] = \frac{12,09 \times \text{Abs}}{[\text{proteína}]} \text{ } \mu\text{moles de unidades glucosil} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$

3.7.11 Quantificação de proteínas totais

Capítulo II, subitem 3.8.5

3.8 Detecção de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs)

Dois marcadores fluorescentes foram empregados para detectar a produção de EROs, a diclorofluoresceína diacetato (H₂DCFDA) e o diidroetídio (DHE). O DHE é rapidamente oxidado pelo O₂^{•-}, originando etídio que se intercala no DNA. A H₂DCFDA difunde-se passivamente nas células, é desacetilada (DCFH₂) e subsequenteemente oxidada via reação catalisada por

H₂O₂/ peroxidase/ Fe²⁺/ citocromo c e, possivelmente diretamente por outras EROs, originando 2'7'-diclorofluoresceína (DCF) fluorescente (HAUGLAND, 1996; BENOVA *et al.*, 1998; ROYALL e ISCHIROPOULOS, 1993). Trinta minutos antes de terminar o período de exposição aos xenobióticos (isto é, 95,5 h após início da exposição), H₂DCFDA a 10 mM e DHE a 5 mM (ambos preparados em DMSO)⁹⁵ foram adicionados ao meio de cultura (relação de 1:1000) para se detectar, respectivamente, a produção de H₂O₂ e O₂^{•-}. Após 30 min de incubação a 24 °C, as células foram lavadas duas vezes em PBS, tripsinizadas, ressuspensas e mantidas em PBS (em gelo) até o momento das análises. Para a citometria de fluxo, o λ de excitação utilizado foi de 488 nm e a fluorescência emitida foi detectada em FL-1 para a DCF e em FL-2/FL-3 para o etídio. Durante todos os procedimentos, as células foram mantidas em gelo protegidas da luz para evitar perda de fluorescência. Um total de 1,5x10⁴ eventos por aquisição foi analisado através do *software Cell Quest*® (Becton Dickinson) após calibração dos detectores do citômetro de fluxo com células sem marcação e células marcadas com apenas um corante, etídio ou DCF⁹⁶. A média geométrica de intensidade de fluorescência do etídio e a intensidade média de fluorescência da DCF (BESTWICK e MILNE, 2001) foram os parâmetros analisados.

3.9 Tratamento estatístico dos dados

Para todos os ensaios bioquímicos, ensaios de viabilidade celular, *TUNEL* e de detecção de EROs, *ANOVA* de uma via e o pós-teste de *Tukey-Kramer* foram realizados. Os efeitos celulares descritos para os xenobióticos no presente capítulo resultam da análise conjunta de dados obtidos a partir de experimentos independentes, exceto no que se refere ao ensaio para apoptose (realizado uma vez apenas). Um total de dois (ensaios de detecção de EROs e de viabilidade celular) e três/quatro (ensaios bioquímicos) experimentos independentes foram realizados. Dentro de um mesmo experimento, havia quatro réplicas por grupo experimental⁹⁷ para os ensaios de detecção de EROs e de carbonilação de proteínas; seis réplicas para o ensaio de determinação do

⁹⁵ Concentrações finais: DMSO a 0,1%, H₂DCFDA a 10 μ M e DHE a 5 μ M.

⁹⁶ Em todos os ensaios da presente tese em que utilizou citometria de fluxo, o equipamento foi previamente calibrado, o que é um procedimento indispensável para análises confiáveis.

⁹⁷ Grupo experimental, isto é, grupos Controle, DDT, MeHg I, MeHg II, DDT+MeHg I.

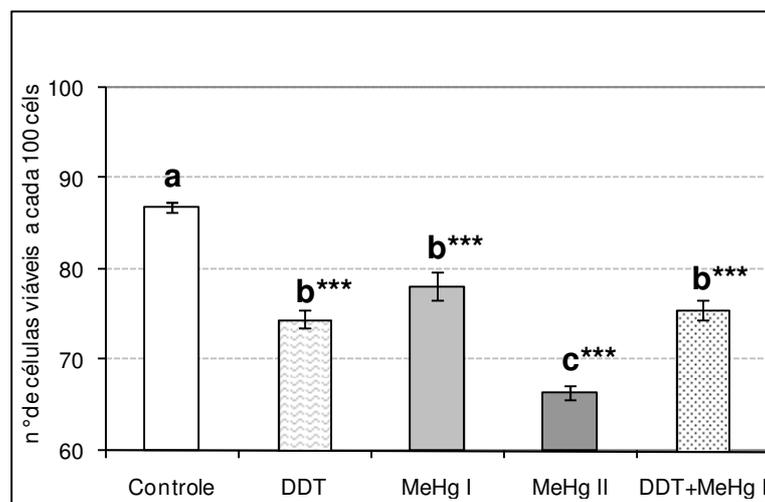
conteúdo de glicogênio; no mínimo oito réplicas para os ensaios de viabilidade celular e para os outros ensaios bioquímicos; e exatamente dez réplicas para o ensaio *TUNEL*.

4. RESULTADOS

4.1 Viabilidade celular e apoptose

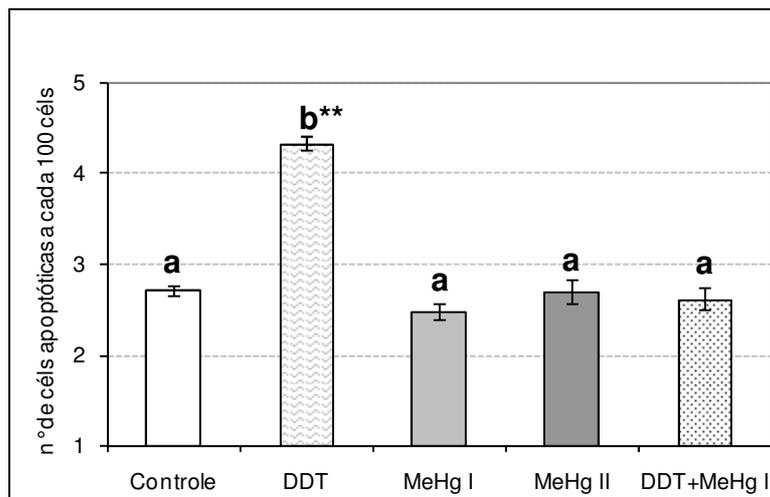
A viabilidade celular diminuiu em todos os grupos expostos. MeHg II apresentou a menor viabilidade celular (23% inferior em relação a viabilidade do grupo controle), diferindo de todos os demais grupos. Em DDT, DDT+MeHg I e MeHg I o decréscimo de viabilidade foi respectivamente de 14%, 13% e 10% (Figura 14).

FIGURA 14. Viabilidade celular estimada através de ensaio com iodeto de propídio.



Média \pm erro padrão da média. Viabilidade em número de células viáveis a cada 100 células. *** $p < 0,001$ (asteriscos em comparação com o grupo controle). OBS: letras diferentes indicam grupos estatisticamente distintos. Total de réplicas = 20; número de réplicas por experimento \geq 8 (2 experimentos independentes).

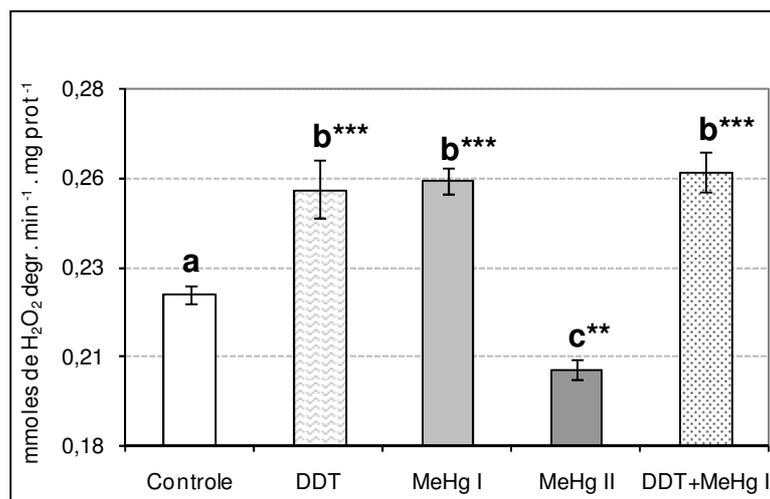
A porcentagem de células em apoptose não diferiu entre os grupos expostos, exceto pelo grupo DDT, no qual um aumento de 60% (em relação ao controle) na incidência de células marcadas positivamente com *FITC-dUTP* ocorreu (Figura 15).

FIGURA 15. Apoptose estimada pelo ensaio *TUNEL*.

Média \pm erro padrão da média. Apoptose em número de células marcadas positivamente pelo *FITC-dUTP* (apoptóticas) a cada 100 células. ^{**} $p < 0,01$ (asteriscos em comparação com o grupo controle). OBS: letras diferentes indicam grupos estatisticamente distintos. Total de réplicas = 10 (1 experimento).

4.2 Atividades enzimáticas das CAT, GST, GR, SOD, G6PDH e δ -ALAd

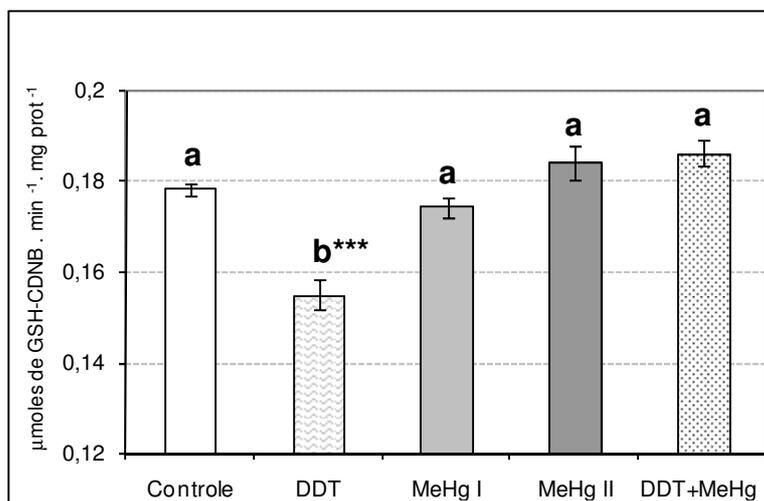
A atividade enzimática das CAT sofreu um incremento nos grupos DDT (13%), MeHg I (14%) e DDT+MeHg I (15%) e esses grupos não apresentaram diferenças entre si. No grupo MeHg II, houve um decréscimo de aproximadamente 10% na atividade das CAT (Figura 16).

FIGURA 16. Atividade específica das CAT.

Média \pm erro padrão da média. Atividade em milimoles de peróxido de hidrogênio degradado por minuto por miligrama de proteínas totais. ^{**} $p < 0,01$, ^{***} $p < 0,001$ (asteriscos em comparação com o grupo controle). OBS: letras diferentes indicam grupos estatisticamente distintos. Total de réplicas = 50; número de réplicas por experimento ≥ 10 (4 experimentos independentes).

Para as GST não houve mudanças em sua atividade enzimática nos grupos MeHg I, MeHg II e DDT+MeHg I, embora uma redução de 13% tenha ocorrido no grupo DDT em comparação com o grupo controle (Figura 17).

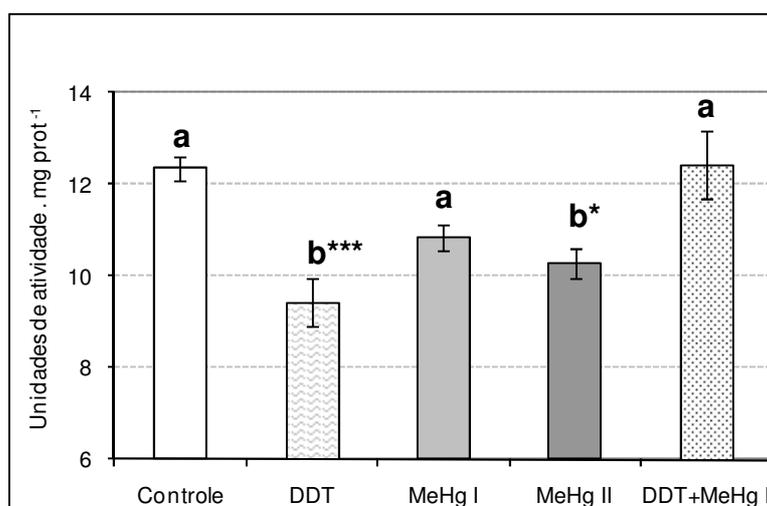
FIGURA 17. Atividade específica das GST.



Média \pm erro padrão da média. Atividade em micromoles do tioéter GSH-CDNB formado por minuto por miligrama de proteínas totais. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ (asteriscos em comparação com o grupo controle). OBS: letras diferentes indicam grupos estatisticamente distintos. Total de réplicas = 52; número de réplicas por experimento ≥ 10 (4 experimentos independentes).

A Atividade das SOD diminuiu nos grupos DDT (24%) e MeHg II (17%) e foi similar entre os grupos controle, MeHg I e DDT+ MeHg I (Figura 18).

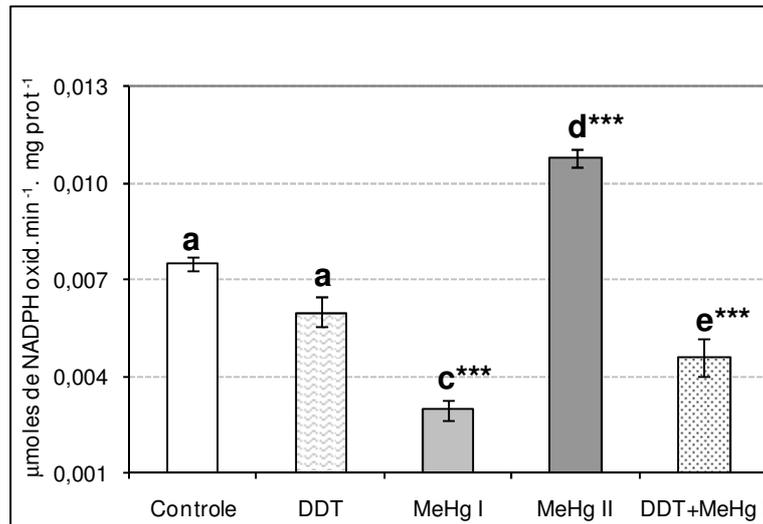
FIGURA 18. Atividade específica das SOD.



Média \pm erro padrão da média. Atividade em unidades por miligrama de proteínas totais. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ (asteriscos em comparação com o grupo controle). OBS: letras diferentes indicam grupos estatisticamente distintos. Total de réplicas = 35; número de réplicas por experimento ≥ 11 (3 experimentos independentes).

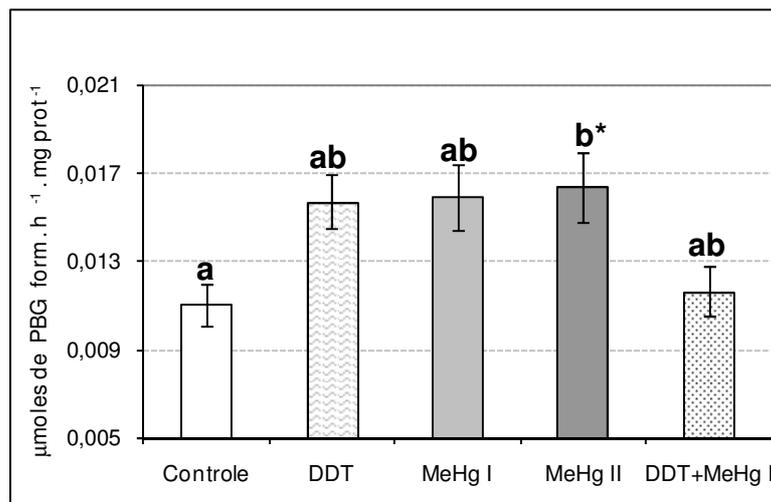
A GR sofreu redução de atividade nos grupos MeHg I (60%) e DDT+MeHg I (39%) e aumento em MeHg II (44%). DDT e controle apresentaram atividade similar da GR, bem como MeHg I e DDT+MeHg I (Figura 19).

FIGURA 19. Atividade específica da GR.



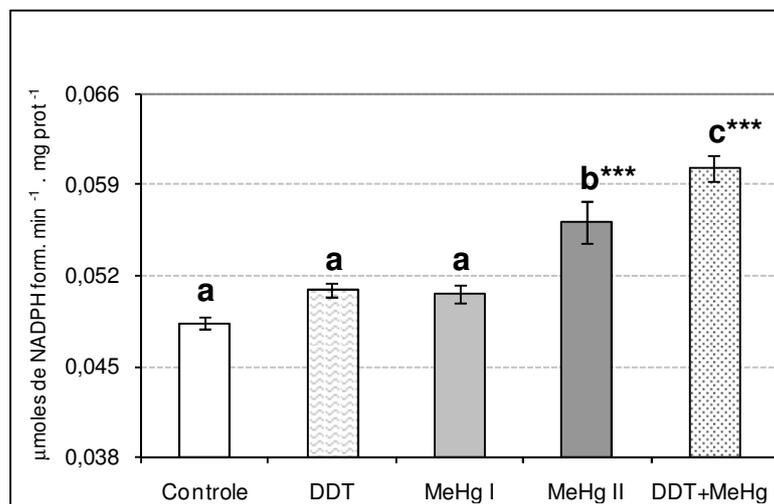
Média \pm erro padrão da média. Atividade em micromoles de NADPH oxidado a NADP⁺ por minuto por miligrama de proteínas totais.***p<0,001 (asteriscos em comparação com o grupo controle). OBS: letras diferentes indicam grupos estatisticamente distintos. Total de réplicas = 36; número de réplicas por experimento = 12 (3 experimentos independentes).

Para a δ -ALAd, a atividade da enzima foi similar em todos os grupos testados, exceto pelo grupo MeHg II, que teve um incremento de 48% (Figura 20).

FIGURA 20. Atividade específica da δ -ALAd.

Média \pm erro padrão da média. Atividade em micromoles de porfobilinogênio (PBG) formado por hora por miligrama de proteínas totais. * $p < 0,05$ (asteriscos em comparação com o grupo controle). OBS: letras diferentes indicam grupos estatisticamente distintos. Total de réplicas = 36; número de réplicas por experimento ≥ 12 (3 experimentos independentes).

Para a G6PDH, a atividade da enzima foi incrementada em 16% e 25% nos grupos MeHg II e DDT+MeHg I, respectivamente. Esses dois grupos apresentaram-se estatisticamente diferentes entre si. Controle, DDT e MeHg I tiveram atividades da G6PDH semelhantes (Figura 21).

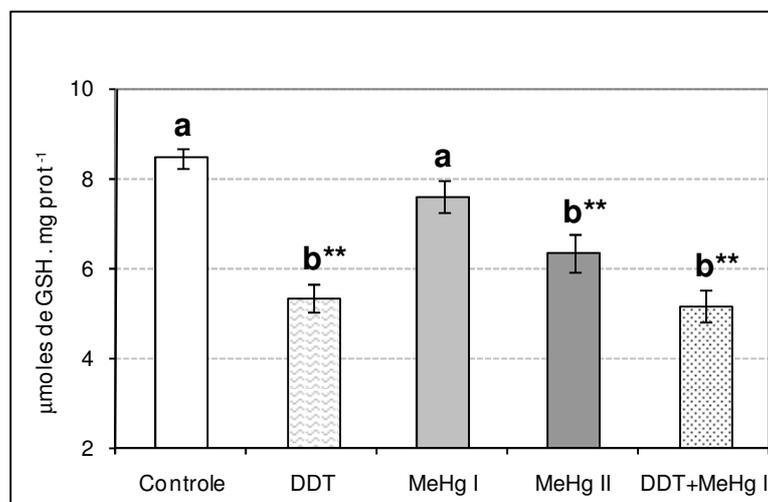
FIGURA 21. Atividade específica da G6PDH.

Média \pm erro padrão da média. Atividade em micromoles de NADPH formado a partir da redução do NADP⁺ por minuto por miligrama de proteínas totais. *** $p < 0,001$ (asteriscos em comparação com o grupo controle). OBS: letras diferentes indicam grupos estatisticamente distintos. Total de réplicas = 36; número de réplicas por experimento ≥ 12 (3 experimentos independentes).

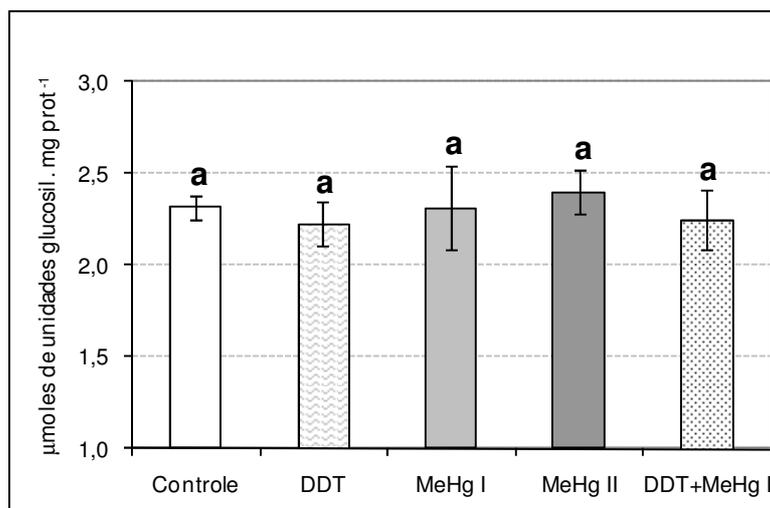
4.3 Conteúdo celular de GSH e glicogênio

A concentração de glutatona reduzida decaiu nos grupos DDT (37%), MeHg II (24%) e DDT+MeHg I (39%), porém não em MeHg I. DDT, MeHg II e DDT+MeHg I não apresentaram diferenças estatísticas entre si (Figura 22). A concentração média de glicogênio nos hepatócitos após quatro dias de exposição e um total de sete dias em cultura foi de 2,3 micromoles de unidades glucosil por miligrama de proteínas totais. Esse valor foi semelhante em todos os grupos experimentais (Figura 23).

FIGURA 22. Concentração de glutatona reduzida (GSH).



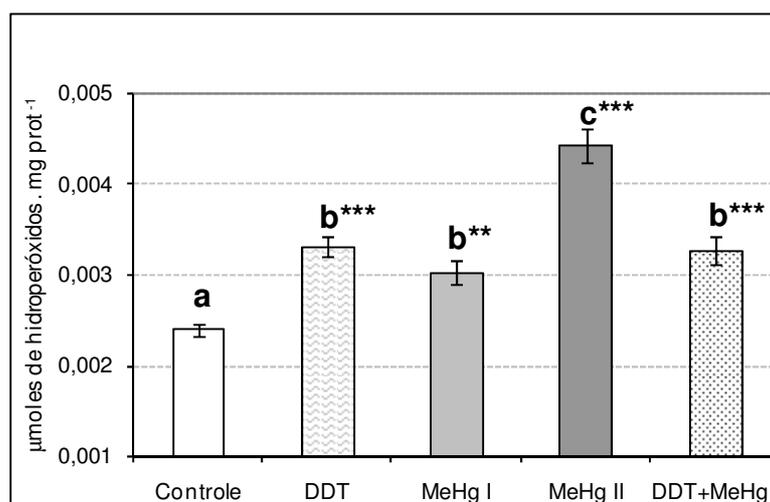
Média \pm erro padrão da média. Concentração em micromoles de GSH por miligrama de proteínas totais. ** $p < 0,01$ (asteriscos em comparação com o grupo controle). OBS: letras diferentes indicam grupos estatisticamente distintos. Total de réplicas = 34; número de réplicas por experimento ≥ 10 (3 experimentos independentes).

FIGURA 23. Conteúdo de glicogênio celular.

Média \pm erro padrão da média. Conteúdo em micromoles de unidade glucosil por miligrama de proteínas totais. OBS: Todos os grupos experimentais são estatisticamente semelhantes, fato indicado pela presença da letra "a" sobre as barras de erro padrão da média. Total de réplicas = 18; número de réplicas por experimento = 6 (3 experimentos independentes).

4.4 Peroxidação lipídica e carbonilação de proteínas

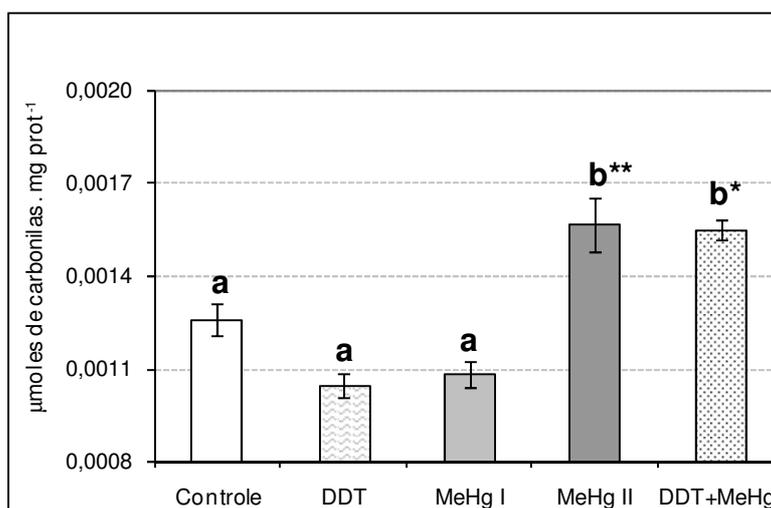
A LPO aumentou em todos os grupos testados. DDT, MeHg I, MeHg II e DDT+MeHg I sofreram incremento no conteúdo de hidroperóxidos lipídicos, respectivamente, de 39%, 27%, 85% e 37%. Estatisticamente, não houve diferenças entre os grupos citados, exceto por MeHg II (Figura 24).

FIGURA 24. Peroxidação lipídica – concentração de hidroperóxidos lipídicos.

Média \pm erro padrão da média. Concentração em micromoles de hidroperóxidos por miligrama de proteínas totais. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ (asteriscos em comparação com o grupo controle). OBS: letras diferentes indicam grupos estatisticamente distintos. Total de réplicas = 56; número de réplicas por experimento ≥ 12 (4 experimentos independentes).

A PCO aumentou em MeHg II (24%) e DDT+MeHg I (23%), mas não em DDT e MeHg I. O acúmulo de proteínas carboniladas foi semelhante entre os grupos MeHg II e DDT+MeHg I (Figura 25).

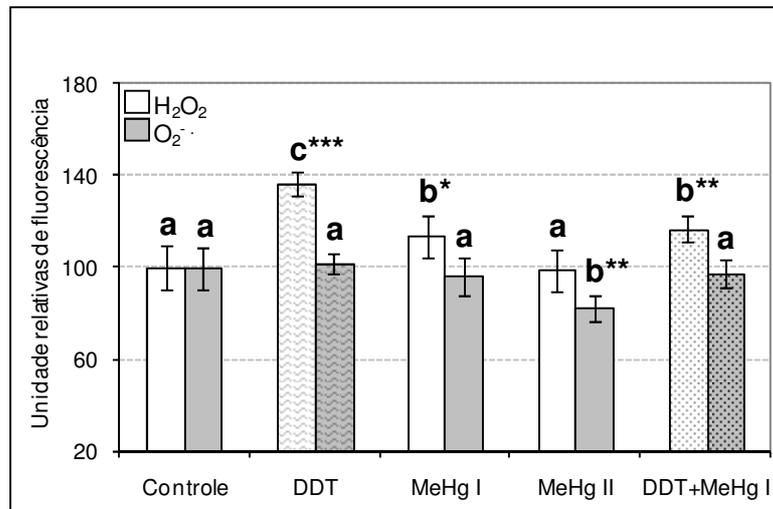
FIGURA 25. Carbonilação de proteínas.



Média ± erro padrão da média. Concentração de proteínas carboniladas em micromoles de carbonilas por miligrama de proteínas totais. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ (asteriscos em comparação com o grupo controle). OBS: letras diferentes indicam grupos estatisticamente distintos. Total de réplicas = 16; número de réplicas por experimento = 4 (4 experimentos independentes).

4.5 Detecção de espécies reativas de oxigênio

Os níveis de H_2O_2 aumentaram nos grupos DDT (36%), MeHg I (14%) e DDT+MeHg I (17%), embora não em MeHg II. O grupo DDT apresentou a maior concentração de H_2O_2 dentre todos os grupos (Figura 26). A concentração de $O_2^{\bullet-}$ foi semelhante em todos os grupos testados, com exceção do MeHg II, no qual um leve decréscimo de aproximadamente 18% foi observado (Figura 26).

FIGURA 26. Produção de espécies reativas de oxigênio.

Média \pm erro padrão da média. Produção de EROs em unidade relativa de intensidade de fluorescência. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ (asteriscos em comparação com o grupo controle). OBS: letras diferentes indicam grupos estatisticamente distintos. Total de réplicas = 8; número de réplicas por experimento = 4 (2 experimentos independentes).

5. DISCUSSÃO

O Hg e o DDT são importantes xenobióticos ambientais, os quais mesmo em baixas concentrações levam hepatócitos de *Hoplias malabaricus* a responder. A exposição ao DDT a 50 nM, MeHg a 0,25 µM ou combinação de ambos foi suficiente para afetar negativamente a viabilidade celular, o que indica uma alta citotoxicidade aos hepatócitos da referida espécie de peixe. Esse efeito foi mais acentuado para o MeHg a 2,5 µM (~539 ng.ml⁻¹), uma concentração nominal que pode ser encontrada no fígado de traíras coletadas na região amazônica, assim como o DDT a 50 nM (~17,7 ng.ml⁻¹), caso se considere 1 grama equivalente a 1 ml na comparação entre as concentrações acumuladas nos órgãos dos peixes e as concentrações empregadas em cultura (Tabela 3).

Exceto pela exposição ao DDT, a incidência de células em apoptose manteve-se similar nos grupos testados. Um aumento no número de células em apoptose já foi descrito em timócitos de ratos⁹⁸ (TEBOURBI *et al.*, 1998), embriões de camundongo (*Mus musculus*)⁹⁹ (GREENLEE *et al.*, 1999) e em células mononucleares do sangue periférico humano¹⁰⁰ (PÉREZ-MALDONADO *et al.*, 2004), o que corrobora com o efeito apoptótico observado para o DDT. Embora os mecanismos de indução de apoptose pelo DDT não sejam totalmente compreendidos, o efeito apoptótico desse xenobiótico parece envolver, pelo menos em parte, o estresse oxidativo causado após exposição.

No caso do MeHg, apenas a morte celular por necrose parece estar associada com o aumento de citotoxicidade observado, acontecimento corroborado por alguns dados em literatura, os quais indicam que a maneira pela qual as células morrem é particularmente determinada pela concentração de MeHg, isto é, “baixas” concentrações levando à apoptose e “altas” à necrose (KUNIMOTO, 1994; CASTOLDI *et al.*, 2000; NISHIOKU *et al.*, 2000; KUO e LIN-SHIAU, 2004). Então, considerando as condições experimentais nos ensaios com hepatócitos de *Hoplias malabaricus* no presente estudo,

⁹⁸ Expostos a 7,0 µg.ml⁻¹ de *p,p'*-DDT durante 4 e 6 h.

⁹⁹ Expostos a 0,1 µg.ml⁻¹ de *o,p'*-DDT por quatro dias.

¹⁰⁰ Expostas a *o,p'*-DDT, *p,p'*-DDT, *p,p'*-DDE e *p,p'*-DDD na concentração de 20 µg.ml⁻¹.

ambas as concentrações de MeHg testadas podem ser consideradas “necróticas” ao invés de “apoptóticas”.

Para a sobrevivência e bom funcionamento celulares é essencial a manutenção de um potencial redox adequado. A exposição ao DDT, MeHg a 2,5 μM e a mistura DDT+MeHg¹⁰¹ acarretou um decréscimo na concentração de GSH, o que por sua vez pode ser um dos fatores que resultaram em morte celular. Já está bem caracterizado na literatura científica que o mais importante par de tamponamento redox é o tripeptídeo glutationa¹⁰² (HOLMGREN, 2000; SCHAFER e BUETTNER, 2001; FERNANDES e HOLMGREN, 2004; WHEELER e GRANT, 2004). As funções da glutationa incluem a destoxificação de muitos xenobióticos e de produtos de peroxidação lipídica, a manutenção dos grupos sulfidril/tiol (SH) de proteínas e de diversos compostos em suas formas reduzidas, assim como a redução de ribonucleotídeos aos desoxirribonucleotídeos correspondentes etc (PASTORE *et al.*, 2003). Logo, a síntese e reparo do DNA e a correta conformação de proteínas recém sintetizadas (MEISTER, 1988; 1994) incluem-se nos papéis da glutationa nas células.

O MeHg tem uma alta afinidade pelo grupamento tiol de aminoácidos (CARTY e MALONE, 1979), podendo reagir com praticamente qualquer grupo -SH (HUGHES, 1957; SIMPSON, 1961; GOYER, 1991; BURFORD *et al.*, 2005; ALDERIGHI *et al.*, 2003), o que por conseguinte pode levar a mudanças conformacionais e inibição de muitas enzimas. Além disso, vários estudos envolvendo os efeitos do MeHg relataram a geração de EROs e a depleção de GSH (BOLANOS *et al.*, 1996; CHOI *et al.*, 1996; YEE e CHOI, 1996; SHENKER *et al.*, 2000; OLIVIERI *et al.*, 2000; SANFELIU *et al.*, 2001; JAMES *et al.*, 2005; KAUR *et al.*, 2006).

Diante disso, a proteção assegurada pelo GSH às células deve decorrer da neutralização de EROs originadas durante a interação celular com o MeHg e da redução da concentração intracelular de MeHg, uma vez que esse xenobiótico é excretado na forma de um conjugado de GSH¹⁰³ (FUJIYAMA *et al.*, 1994; COOKSON e PENTREATH, 1996; ZALUPS *et al.*, 1996). Ao mesmo

¹⁰¹ DDT (50 nM) + MeHg (0,25 μM).

¹⁰² Tripeptídeo glutationa (GSH): γ glutamil-cisteinil-glicina.

¹⁰³ $\text{MeHg} + 2 \text{GSH} \rightarrow \text{GS-Hg-SG}$

tempo, a própria inibição da captação de precursores do GSH pelo MeHg (BROOKES e KRISTT, 1989; DAVE *et al.*, 1994; SHANKER e ASCHNER, 2001; SHANKER *et al.*, 2001, 2002, 2003) deve também estar envolvida com a depleção do GSH. Então, um dos mecanismos que tem sido propostos para explicar a toxicidade do MeHg é a redução da concentração do tripeptídeo glutationa, fato conexo com prejuízos das funções mitocondriais, aumento da produção de radicais livres, peroxidação lipídica e morte celular (ASHOUR *et al.*, 1993; CHOI *et al.*, 1996; LIN *et al.*, 1996; MERAD-SAIDOUNE *et al.*, 1999; BELLETTI *et al.*, 2002; SHENKER *et al.*, 1999; SWAMY *et al.*, 2003; FARINA *et al.*, 2004).

No caso da exposição ao DDT, a reação do GSH com produtos de biotransformação desse pesticida e com EROs¹⁰⁴ deve estar envolvida com a redução do GSH. Um decréscimo na concentração de GSH já foi descrito em células HepG2¹⁰⁵ expostas agudamente (24 h) a pesticidas organoclorados como o *o,p'*-DDT (1 mM), endosulfan (5 mM), clordano (5 mM) e toxafeno (10 mM) (DEHN *et al.*, 2005) e em células WS1¹⁰⁶ expostas a 0,35 ng.ml⁻¹ de DDE por 4 h (SIMONETTI *et al.*, 2001). Dados com relação à mensuração da concentração de GSH após exposição de células de peixes ao DDT não foram encontrados.

A diminuição da concentração de GSH é muitas vezes associada a danos oxidativos às macromoléculas celulares, sejam pela peroxidação de lipídios¹⁰⁷ (LPO) e carbonilação de proteínas (PCO), sejam por outros processos. A LPO, mas não a PCO, aumentou após exposição de hepatócitos de *Hoplias malabaricus* ao DDT e ao MeHg a 0,25 µM. Por outro lado, tanto LPO quanto PCO foram intensas após exposição ao MeHg a 2,5 µM e à mistura de DDT+MeHg, sendo que no primeiro o aumento da LPO foi superior

¹⁰⁴ Existem vários processos celulares que produzem EROs. O metabolismo de xenobióticos, como o DDT, no ciclo do citocromo P450 é um deles (ZANGAR *et al.*, 2004), sendo que os produtos gerados durante esse metabolismo podem ser conjugados com o GSH por meio da ação de certas isoformas de GST (NORDBERG e ARNÉR, 2001; RODRIGUES, 2003).

¹⁰⁵ Linhagem celular humana.

¹⁰⁶ Linhagem celular de fibroblastos de feto humano.

¹⁰⁷ A LPO é um importante processo pelo qual lipídios são atacados por EROs com energia suficiente para abstrair um átomo de hidrogênio e formar um radical orgânico ($\text{HO}^\bullet + \text{RH} \rightarrow \text{R}^\bullet + \text{H}_2\text{O}$), o qual reage com oxigênio e resulta em um radical peroxila (GUTTERIDGE, 1995). Visto que os lipídios em membranas estão em próxima justaposição às cadeias transportadoras de elétrons, que podem agir como fontes de EROs mesmo em condições normais, os lipídios devem sofrer alto grau de dano (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1989).

ao dos demais grupos. Esses dados são um indicativo de que lipídios devem ser mais sensíveis a um dano oxidativo moderado que proteínas no modelo estudado e que a exposição ao MeHg na concentração de 2,5 μM ou à mistura de baixas concentrações de DDT+MeHg pode afetar gravemente a estrutura e o funcionamento celulares, em decorrência de níveis anormais da PCO e LPO.

O processo de LPO é propagado via uma cadeia autocatalítica de reações e influencia a fluidez de membrana bem como a integridade de biomoléculas associadas à membrana. O resultado da LPO pode ser dano estrutural à membrana e a geração de produtos de oxidação, alguns dos quais são quimicamente reativos e podem modificar covalentemente diversas macromoléculas, efetuando-se de tal modo dano tecidual (MONTINE *et al.*, 2004). Dados com relação a aumento da LPO após exposição a xenobióticos são bastante comuns. A LPO aumentou em fígado de peixes *Carassius auratus* expostos ao cádmio¹⁰⁸ (SHI *et al.*, 2005), em células hepáticas humanas (WRL-68) expostas ao Hg¹⁰⁹ (BUCIO *et al.*, 1999), em brânquias e glândula digestiva de mexilhão do Mediterrâneo (*Ruditapes decussatus*) após incubação com Hg ou cobre¹¹⁰ (ROMÉO e GNASSIA-BARELLI, 1997) e em fígado, cérebro e rins de ratos expostos ao endrin, com concomitante decréscimo no conteúdo de GSH nesses órgãos (NUMAN *et al.*, 1990a,b).

O decréscimo na concentração de GSH é muitas vezes acompanhado por aumento da LPO, como relatado¹¹¹ para hepatócitos de *Hoplias malabaricus*. Aumento da LPO e redução da concentração de GSH já foram relatados para células renais de suíno expostas ao Hg ou *cis*-platina¹¹² (SARGAZI *et al.*, 2006) e para sangue de camundongo após uma única injeção intraperitoneal de Hg¹¹³ (SHARMA *et al.*, 2005). Ainda, a exposição trófica de salmões juvenis (*Salmo salar* L.) ao MeHg¹¹⁴ causou aumento da LPO. Nesse

¹⁰⁸ Por via hídrica durante 24 h. Concentração: 0,5-5 mg de Cd.l⁻¹.

¹⁰⁹ Em meio de cultura por 3 h. Concentração: 0,5-5 μM de Hg.

¹¹⁰ No caso do Hg: 0,005–5 $\mu\text{g Hg.ml}^{-1}$ de água; para o cobre: 6,25–25 $\mu\text{g Cu.ml}^{-1}$ de água.

¹¹¹ Exceto para MeHg a 0,25 μM , onde a LPO aumentou, mas a concentração de GSH não sofreu redução.

¹¹² Em ambos os casos a concentração foi de 100 μM .

¹¹³ Dose: 5 mg.kg⁻¹.

¹¹⁴ Durante quatro meses. Dose: 10 mg MeHg.kg⁻¹.

mesmo estudo, houve alteração da atividade das SOD¹¹⁵ (BERNTSSEN *et al.*, 2003), uma importante proteína com atividade antioxidante.

O dano oxidativo a proteínas é bastante problemático em decorrência do grande e variado número de funções desempenhadas por proteínas (DALLE-DONNE *et al.* 2003; SHINALL *et al.*, 2005). As EROs e os lipídios, açúcares e ácidos nucleicos oxidados podem atacar proteínas, levando à formação de grupamentos carbonila não-reversíveis (C=O) na cadeia lateral de aminoácidos¹¹⁶. Essa alteração pode desfigurar a estrutura de proteínas e, em último caso, sua suscetibilidade a proteases¹¹⁷ (STERN, 1985; GRUNE, 2000; REQUENA *et al.*, 2003).

A indução de carbonilação de proteínas já foi descrita em fígado, rim e brânquias de *Channa punctata* em resposta à exposição aguda à deltametrina, endosulfan e paraquat¹¹⁸ (PARVEZ e RAISUDDIN, 2005); em fígado de enguia (*Zoarces viviparous*) após quatro dias de exposição ao óleo do tipo *bunker*¹¹⁹ (ALMROTH *et al.*, 2005); em fígado de *Carassius auratus*¹²⁰ expostos ao cádmio¹²¹ (SHI *et al.*, 2005); e em glândula digestiva e manto do mexilhão *Ruditapes decussatus* expostos ao DDE¹²² (DOWLING *et al.*, 2006).

A detecção de níveis aumentados de carbonilas em proteínas é sinal não apenas de estresse oxidativo, mas também de disfunção protéica (DALLE-DONNE *et al.*, 2003). Proteínas sabidamente sensíveis a carbonilação incluem enzimas envolvidas no metabolismo energético como a aconitase, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, piruvato desidrogenase, 2-oxoglutarato

¹¹⁵ A atividade das SOD aumentou na dose de 5 mg MeHg.kg⁻¹ e diminuiu na dose de 10 mg MeHg.kg⁻¹.

¹¹⁶ Especialmente nos aminoácidos prolina, arginina, lisina e treonina (DALLE-DONNE *et al.* 2003).

¹¹⁷ Proteínas solúveis moderadamente oxidadas são mais susceptíveis à degradação proteolítica, enquanto que proteínas severamente oxidadas podem ser estabilizadas devido à agregação, ligação cruzada e/ou solubilidade diminuída. Muitos produtos não radicalares oxidados como peróxidos, aldeídos e carbonilas formam adutos com proteínas, contribuindo, dessa forma, para a formação de grandes agregados resistentes à proteólise (GRUNE, 2000; GRUNE *et al.*, 2003), o que tem conseqüências gravíssimas ao funcionamento celular.

¹¹⁸ Nos três casos a exposição foi por via hídrica, durante dois dias. Concentrações: deltametrina = 0,75 µg.l⁻¹, endosulfan = 10 µg.l⁻¹ e paraquat = 5 mg.l⁻¹.

¹¹⁹ Óleo utilizado na aviação como combustível. O óleo testado continha 24,7% de HPAs (hidrocarbonetos policíclicos aromáticos). Concentrações testadas: 10, 100 e 1000 µg óleo.l⁻¹.

¹²⁰ *Channa punctata*, *Zoarces viviparous* e *Carassius auratus* são peixes.

¹²¹ Durante 24 h. Concentração: 0,05-5 mg Cd.l⁻¹.

¹²² Por dois dias. Concentração: 40 µg DDE.l⁻¹.

desidrogenase e ácido graxo sintase, além da Hsp60p¹²³ e Cu,Zn-SOD¹²⁴ (AGUILANIU *et al.*, 2001), sendo a última uma importante enzima envolvida na defesa celular contra EROs.

A produção de EROs é uma conseqüência inevitável do metabolismo oxidativo celular. Aliada a essa produção, muitos agentes xenobióticos têm o potencial de produzir EROs através do ciclo redox do citocromo P450 numa taxa que pode, muitas vezes, superar a proteção provida pelos mecanismos de defesa antioxidante, induzindo assim dano oxidativo (DI GIULIO *et al.*, 1989; BERLETT e STADTMAN, 1997; SHINALL *et al.*, 2005).

A produção de EROs e o dano oxidativo resultante são importantes componentes integrantes dos mecanismos de toxicidade que se manifestam em organismos expostos a uma ampla gama de xenobióticos (LIVINGSTONE, 2001), como o DDT e o MeHg. Tendo isso em mente, a produção de peróxido de hidrogênio e ânion superóxido foi avaliada em hepatócitos de *Hoplias malabaricus*. A produção de EROs é supostamente uma “marca registrada” da ação do MeHg (INSUG *et al.*, 1997; LEBEL *et al.*, 1990; SHENKER *et al.*, 1998; SHANKER *et al.*, 2005; KAUR *et al.*, 2006) como verificado no grupo exposto a 0,25 µM de MeHg; e parece ocorrer nas mitocôndrias¹²⁵, onde o MeHg pode desacoplar a fosforilação oxidativa e o transporte de elétrons¹²⁶ (VERITY *et al.*, 1994).

A clivagem homolítica¹²⁷ do MeHg configura-se numa segunda importante fonte de radicais livres (GANTHER, 1980), que podem provocar

¹²³ Hsp60p é um membro da família das Hsp60 (do inglês *heat shock protein*), proteínas chaperonas mitocondriais cuja função é assistir várias proteínas a adquirir sua conformação tridimensional adequada (ALBERTS *et al.*, 2002).

¹²⁴ As Cu,Zn-SOD são enzimas antioxidantes que catalisam a conversão do ânion superóxido em peróxido de hidrogênio. São encontradas no citosol, lisossomos, espaço intermembranas de mitocôndrias e núcleo das células. Além das SOD com Cu e Zn no seu sítio ativo, existem as MnSOD (encontrada na matriz mitocondrial), as EC-SOD (Cu,Zn-SOD presentes no ambiente extracelular) e as Fe-SOD (encontradas em bactérias) (WEISIGER e FRIDOVICH, 1973; FRIDOVICH, 1978; NORDBERG e ARNÉR, 2001; CHERUBINI *et al.*, 2005; NAKAO, 2006).

¹²⁵ Em células WRL-68 (linhagem celular hepática humana) expostas a 0,5-5 µM de HgCl₂ já foi demonstrado a distribuição subcelular do Hg²⁺ (48% nas mitocôndrias, 38% no núcleo, 8% na fração citosólica e 7% em microssomas). O acúmulo principalmente em mitocôndrias corrobora com os graves efeitos do metal no desacoplamento da fosforilação oxidativa (BUCIO *et al.*, 1999). OBS: no trabalho citado a % de Hg²⁺ totaliza 101% (e não 100%).

¹²⁶ A redução incompleta do oxigênio na fosforilação oxidativa é a principal fonte de ânion superóxido em qualquer célula aeróbica. Na própria mitocôndria o ânion superóxido pode ser convertido em peróxido de hidrogênio ou originar radical hidroxila (NORDBERG e ARNÉR, 2001).

¹²⁷ CH₃Hg⁺ → Hg²⁺ + H₃C[•]

lesão através de impacto ao estado antioxidante celular e modificação de macromoléculas (NOHL *et al.*, 1994; STOHS e BAGCHI, 1995; HAMILTON *et al.*, 1997; ALEO *et al.*, 2002; SHANKER *et al.*, 2004, 2005). Todavia, apesar do MeHg a 2,5 μM ter causado um aumento na LPO e PCO, o H_2O_2 apresentou-se em nível semelhante ao do grupo controle e o $\text{O}_2^{\bullet-}$ sofreu um leve decréscimo. Logo, é razoável que outras espécies reativas¹²⁸ que não o H_2O_2 estejam implicadas com o dano a macromoléculas e que alguma(s) via(s) de geração de $\text{O}_2^{\bullet-}/\text{H}_2\text{O}_2$ estejam sendo inibidas no caso dos hepatócitos expostos a 2,5 μM de MeHg. Considerando o último aspecto, a via de produção de EROs do sistema de monooxigenases mistas do retículo endoplasmático liso seria uma importante candidata a inibição, visto que produtos de LPO podem inativar e degradar o citocromo P450 (SVINGEN *et al.*, 1979; BESTERVELT *et al.*, 1995; REQUENA *et al.*, 1997; BUKO *et al.*, 1999; KIMZEY *et al.*, 2003; ZANGAR *et al.*, 2004), levando a um decréscimo no transporte de elétrons e, conseqüentemente, um decréscimo na produção de EROs. Além disso, a própria viabilidade celular (muito menor no grupo de hepatócitos expostos ao MeHg a 2,5 μM) pode ter algum impacto nos níveis detectados de EROs.

Para o grupo DDT, o próprio metabolismo do inseticida por meio de reações de fase I e a redução da concentração do antioxidante GSH poderiam ser preconizados como fatores significativamente envolvidos com o aumento da concentração de H_2O_2 , sendo que esses fatores devem também compor, juntamente com os mencionados para o MeHg, a explicação no caso dos hepatócitos expostos a mistura de DDT+MeHg.

A tolerância celular ao MeHg e DDT deve ser parcialmente adquirida pela elevação dos sistemas de defesa antioxidante. Esses sistemas podem ser não enzimáticos¹²⁹ ou enzimáticos¹³⁰. Uma primeira linha de defesa contra EROs é assegurada, em geral, pelo GSH, a medida que essa molécula é capaz de neutralizar radicais livres e H_2O_2 (PASTORE *et al.*, 2003). Uma segunda

¹²⁸ $\text{H}_3\text{C}^{\bullet}$ é bastante reativo. Pode formar adutos com o DNA (alquilação) e com proteínas, além de ser capaz de iniciar o processo de LPO.

¹²⁹ Como o caso do GSH, ácido úrico, NADPH, tioredoxinas, ácido ascórbico (vitamina c), alfa tocoferol (vitamina e), proteínas plasmáticas (como a transferrina, ferretina, ceruloplasmina, albumina) etc (NORDBERG e ARNÉR, 2001; TEMPLE *et al.*, 2005; NAKAO, 2006).

¹³⁰ Tais como as catalases (CAT), superóxido dismutases (SOD), glutatona S-transferases (GST), glutatona peroxidases (GPx), glutatona redutases (GR), glucose 6-fosfato desidrogenases (G6PDH), tioredoxina redutase, peroxirredoxinas (Prx), metalotioneínas, enzimas de síntese de GSH etc (NORDBERG e ARNÉR, 2001; NAKAO, 2006).

linha defensiva é, em parte, provida por enzimas que destoxificam subprodutos nocivos de alteração oxidativa de biomoléculas e auxiliam na prevenção da propagação de radicais livres e espécies reativas (PASTORE *et al.*, 2003). Em luz disso, algumas enzimas antioxidantes tiveram sua atividade mensurada em hepatócitos de *Hoplias malabaricus* após exposição aos xenobióticos DDT e MeHg.

A exposição ao DDT induziu um aumento de atividade das CAT e uma redução de atividade das SOD¹³¹ e GST. Para as CAT, a elevada concentração de H₂O₂ no grupo DDT poderia ser um estímulo para a transcrição da referida enzima e, por conseguinte, aumento de atividade, incremento que se revelou insuficiente para que houvesse uma normalização da concentração de H₂O₂¹³². Quanto às SOD, embora sua atividade tenha decaído, o nível de O₂^{•-} inesperadamente não aumentou. Para se explicar esse achado, outros ensaios far-se-iam necessários como, por exemplo, avaliar a geração de O₂^{•-} na fosforilação oxidativa ou por enzimas, após exposição ao DDT.

Efeitos inibitórios do DDT sobre focos positivos de GST- π já foram relatados em fígado de ratos após exposição a baixas doses de DDT (SUKATA *et al.*, 2002; KUSHIDA *et al.*, 2005), de um modo aparentemente ligado aos níveis de estresse oxidativo (SUKATA *et al.*, 2002). Como no presente estudo observou-se um aumento severo na concentração de H₂O₂ (superior inclusive à mensurada nos demais grupos expostos) após exposição ao DDT, é coerente supor que o excesso H₂O₂ poderia estar, de alguma forma, envolvido com a inibição da atividade das GST, biomarcador não alterado em hepatócitos expostos ao MeHg ou mistura DDT+MeHg.

As respostas e efeitos enzimáticos ao MeHg dependem da concentração do metal. A exposição ao MeHg a 0,25 μ M acarretou num aumento de atividade das CAT e na redução de atividade da GR, enquanto que uma inibição de atividade das CAT e SOD, e um acréscimo na atividade da GR foram observadas após exposição ao MeHg a 2,5 μ M. Para as SOD e CAT, os dados relatados em outros estudos indicam uma interdependência entre tipo e

¹³¹ Reação catalisada pelas SOD: $2 O_2^{\bullet-} + 2 H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$ (NORDBERG e ARNÉR, 2001).

¹³² Além das CAT, as GPx (dependentes de Se) e as Prx estão envolvidas na redução do H₂O₂ (NORDBERG e ARNÉR, 2001).

concentração do xenobiótico e o modelo de estudo na manifestação de um efeito enzimático, conforme citado adiante.

A atividade das SOD aumentou no fígado de *Carassius auratus* expostos ao cádmio¹³³, mas a atividade das CAT decaiu (SHI *et al.*, 2005). A atividade das CAT também diminuiu na glândula digestiva de vieira¹³⁴ *Adamussium colbecki* expostas¹³⁵ ao cobre e ao Hg (REGOLI *et al.*, 1998). Já em cérebro de camundongo, a atividade total das SOD diminuiu após exposição ao MeHg¹³⁶ (YEE e CHOI, 1994). Nesse estudo, a atividade da Mn-SOD sofreu redução de aproximadamente 40%, sem efeito sobre a atividade das Cu,Zn-SOD, sugerindo sensibilidade diferencial de isoformas SOD ao metal (SHINYASHIKI *et al.*, 1996).

A carbonilação de proteínas no caso das SOD e a capacidade de vários metais tóxicos como o Hg em indiretamente elevar a atividade de enzimas como as CAT e SOD quando em baixas concentrações¹³⁷ e de inibir quando em altas¹³⁸ deve compor parte do esclarecimento para os achados supramencionados, inclusive para hepatócitos de *Hoplias malabaricus*. Também, como o cádmio e o mercúrio podem inibir a captação de metais essenciais como o cálcio, ferro, cobre e zinco (BLAZKA e SHAIKH, 1992), isso poderia ser uma das razões para o decréscimo das atividades das SOD¹³⁹ e CAT¹⁴⁰, enzimas cujo funcionamento conjunto é importante para a manutenção de um ambiente redox adequado.

No ambiente intracelular redutor, a relação entre glutathiona reduzida e oxidada (GSH/GSSG) é mantida na ordem de 100/1 ou superior (SCHAFER e BUETTNER, 2001; FILOMENI *et al.*, 2002). Para manter esse balanço, a GSSG é reduzida ao GSH pela GR ao custo de NADPH¹⁴¹, que pode ser

¹³³ Durante 24 h. Concentrações: 5 mg Cd.l⁻¹ para as SOD; 0,5 e 5 mg Cd.l⁻¹ para as CAT.

¹³⁴ Vieira é uma espécie de molusco bivalve da família Pectinidae; do inglês *scallop*.

¹³⁵ Tempos de exposição: 3 a 12 dias. Concentrações: cobre = 20 µg.l⁻¹, Hg = 5 µg.l⁻¹.

¹³⁶ Durante cinco dias. Dose: 2,5 mg MeHg.kg⁻¹.

¹³⁷ Por aumentar levemente a produção de EROs, que ativam fatores (HWANG e KIM, 2006) responsáveis por sinalizar para a transcrição de enzimas antioxidantes (ITOH *et al.*, 1997; MOTOHASHI e YAMAMOTO, 2004; NAKAO, 2006; ZHU *et al.*, 2006).

¹³⁸ Por exemplo, por um excesso de EROs produzidas devido à presença do xenobiótico ou por interação com a estrutura das enzimas.

¹³⁹ Dependente de cobre e zinco (Cu,Zn-SOD) ou do manganês (Mn-SOD).

¹⁴⁰ Dependente de ferro.

¹⁴¹ GSSG + NADPH + H⁺ → 2GSH + NADP⁺ (NORDBERG e ARNÉR, 2001).

regenerado, entre outras vias, pela G6PDH¹⁴² (KLETZIEN *et al.*, 1994; SCHAFER e BUETTNER, 2001). Então, para que o GSH mantenha-se em concentrações apropriadas é imprescindível o funcionamento orquestrado entre enzimas supridoras de NADPH (como a G6PDH) e a GR.

Embora tenha afetado a atividade da GR, a LPO e a viabilidade celular, a presença do MeHg a 0,25 µM não comprometeu a concentração de GSH ou alterou atividade da G6PDH. Já na exposição ao MeHg a 2,5 µM, houve aumento da atividade da GR e da G6PDH, sendo que no caso da primeira (GR), a elevação de atividade não foi suficiente para evitar um decréscimo na concentração de GSH. A redução do conteúdo celular de GSH tem efeito direto na capacidade das células em lidar com EROs e produtos nocivos de LPO e, subseqüentemente, manterem-se viáveis. Em outras palavras, as células tornam-se extremamente susceptíveis a um modesto aumento intracelular de espécies oxidantes quando não dispõem de GSH em níveis adequados.

Baixos níveis de GSH também foram detectados em hepatócitos expostos ao DDT e DDT+MeHg, o que deve resultar, além das razões já anteriormente propostas, da não alteração da atividade da GR no primeiro grupo (DDT) e de sua inibição no último (DDT+MeHg). Aliás, a presença do MeHg, mas não do DDT, foi capaz de alterar a atividade da GR de um modo bastante peculiar, havendo inibição na menor concentração de MeHg e aumento na maior concentração desse metal. Como o funcionamento da GR depende da NADPH, que também participa na regeneração da tioredoxina¹⁴³, na redução de peróxidos orgânicos e inorgânico nas reações catalisadas pelas peroxirredoxinas (TANIGUCHI e GUTTERIDGE, 2000), na síntese de óxido nítrico, na manutenção do potencial redox celular, na proteção das CAT contra inativação, na biossíntese redutora de ácidos graxos e esteróides etc, a alteração protetora da atividade da G6PDH¹⁴⁴ deve resultar de um intercruzamento complexo de vias metabólicas nos grupos MeHg (2,5 µM) e DDT+MeHg. Para o último (DDT+MeHg), considerando apenas os dados gerados nos experimentos conduzidos com hepatócitos de *Hoplias*

¹⁴² Glucose 6-fosfato + NADP⁺ → 6-fosfogliconato + NADPH (LEHNINGER *et al.*, 2005).

¹⁴³ A tioredoxina é utilizada para redução de grupo tiol de proteínas oxidadas (reparo de proteínas oxidadas) (NORDBERG e ARNÉR, 2001).

¹⁴⁴ A G6PDH é uma enzima limitante de velocidade do ciclo das pentoses (LEHNINGER *et al.*, 2005).

malabaricus, parece que a G6PDH sofreu incremento de atividade numa tentativa das células de compensarem o estresse oxidativo resultante da presença conjunta dos dois xenobióticos, o que foi eficiente, pelo menos, para manter a concentração de H_2O_2 e a viabilidade celular com valores semelhantes à exposição isolada ao DDT e a $0,25 \mu M$ de MeHg.

Além da atividade da GR e da G6PDH, verificou-se a atividade da δ -ALAd em hepatócitos de *Hoplias malabaricus*. Essa enzima sofreu um acréscimo de atividade apenas após exposição a $2,5 \mu M$ de MeHg, concentração também responsável por um decréscimo na atividade das CAT. Hipoteticamente, os hepatócitos poderiam responder a uma inibição na atividade das CAT aumentando a produção de unidades enzimáticas CAT, isto é, número de moléculas. Como as CAT exigem grupos heme para seu funcionamento¹⁴⁵, haveria, por este motivo, a necessidade de um maior requerimento de atividade da δ -ALAd, uma enzima envolvida na síntese do mencionado grupo prostético¹⁴⁶. Igualmente, um aumento na atividade da δ -ALAd poderia ter um efeito antioxidante por reduzir a quantidade de δ -aminolevulinato (ALA) que poderia sofrer auto-oxidação¹⁴⁷ e com isso gerar EROs (RYTER e TYRRELL, 2000). Contudo, a explicação para o aumento da atividade da δ -ALAd é provavelmente mais complexa que a sugerida e requer uma investigação mais detalhada, como no caso da G6PDH. Essa complexidade deve-se, em parte, ao fato de que os produtos da G6PDH e da δ -ALAd estão envolvidos em muitos processos celulares distintos.

¹⁴⁵ No centro catalítico das CAT há uma protoporfirina IX (ZÁMOCKÝ e KOLLER, 1999) que, para ser sintetizada, necessita da ação de algumas enzimas, entre elas a δ -ALAd. No caso das CAT e dos citocromos tipo b, essa protoporfirina IX está ligada a um átomo de ferro, formando um grupo heme (LEHNINGER *et al.*, 2005). Outras hemeoproteínas dependentes da rota de síntese na qual a δ -ALAd participa incluem: GPx, hemoglobina, mioglobina, citocromos (b5, bb6, a-a3, cc1, P450 etc), dioxigenases, óxido nítrico sintases, guanilato ciclases etc (RYTER e TYRRELL, 2000).

¹⁴⁶ Grupo prostético é a porção não protéica de uma proteína ou um cofator de enzima, que é ligado fortemente, de modo que não pode ser removido por diálise (STENESH, 1989).

¹⁴⁷ $ALA + O_2 \rightarrow ALA^{\bullet} + O_2^{\bullet-}$ (na presença de Fe ou Cu),
 $ALA + O_2 + Fe(II)\text{-Hb} + 2 H^+ \rightarrow ALA^{\bullet} + H_2O_2 + Fe(III)\text{-Hb}$,
 $ALA^{\bullet} + O_2 \rightarrow \text{iminoALA} + O_2^{\bullet-}$

A resposta celular a xenobióticos após captação¹⁴⁸ e distribuição dos mesmos demanda energia. A fim de verificar se a exposição ao DDT e ao MeHg em concentrações nominais de ocorrência natural afeta o estoque energético dos hepatócitos, o conteúdo de glicogênio foi determinado. Observou-se que os xenobióticos testados não afetaram a capacidade e a eficiência dos hepatócitos em manter quantidades normais de glicogênio estocadas¹⁴⁹, mesmo na presença da maior concentração de MeHg ou no caso de exposição aos xenobióticos combinados.

O efeito combinado do DDT+MeHg apenas diferiu da exposição individual de ambos para a atividade da G6PDH e para a PCO. Para a LPO, produção de EROs, viabilidade celular, apoptose, concentração de GSH e demais atividades enzimáticas, as respostas e efeitos celulares foram similares à exposição a apenas um ou ambos xenobióticos.

Dados científicos enfocando as respostas celulares em decorrência de exposição a concentrações mais realísticas de xenobióticos são ainda insuficientes. No presente estudo, foi empiricamente demonstrado através de alguns biomarcadores as respostas de hepatócitos de *Hoplias malabaricus* em cultura ao DDT, MeHg e combinação de ambos (Figura 27).

¹⁴⁸ Uma questão ainda não respondida é como o Hg e alguns outros metais não essenciais adentram as células. Uma hipótese é que o Hg utilize carreadores independentes de energia e canais iônicos, mas isto ainda não está caracterizado (BUCIO *et al.*, 1999; ADUAYOM *et al.*, 2003). Existem também evidências de que o MeHg poderia ser transportado através da membrana via canais transportadores de aminoácidos como um complexo com cisteína ou pequenos ligantes tióis (BALLATORI e TRUONG, 1995; MOKRZAN *et al.*, 1995; KAJIWARA *et al.*, 1996; WU, 1996; ANDRÉS *et al.*, 2002). No citoplasma das células, o Hg pode associar-se a ligantes como GSH, metalotioneína etc após captação, mantendo uma concentração livre na forma de íon baixa e, com isso, favorecendo a entrada de mais Hg através de canais (ANDRÉS *et al.*, 2002). No caso do DDT, propõe-se que esse inseticida se difunde passivamente para o interior das células, seguindo um gradiente de concentração após se associar com um conjunto apropriado de moléculas lipídicas na membrana (LEBLANC, 1995; WANG e WANG, 2005; SHARIFI *et al.*, 1997). Dentro das células, o DDT é particionado principalmente nos lipídios e passa a acumular-se.

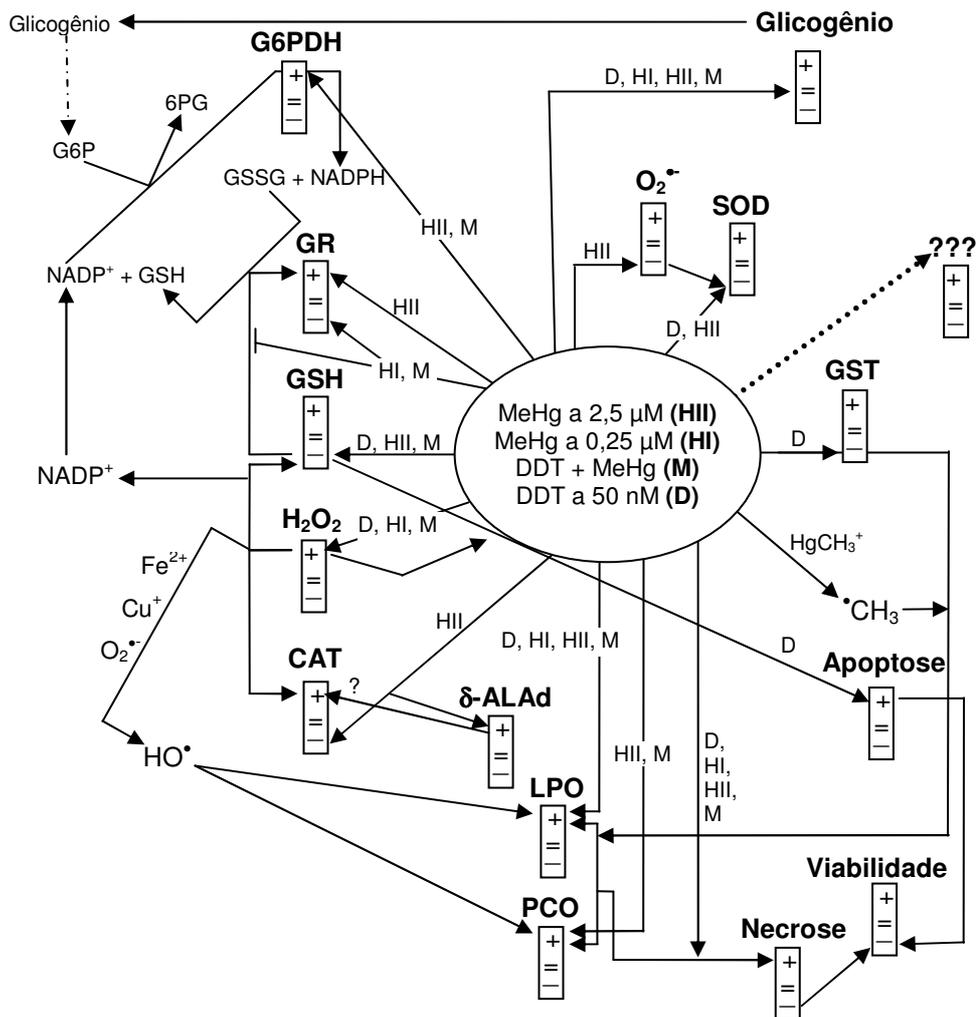
¹⁴⁹ A quantidade de glicogênio foi similar entre todos os grupos testados *in vitro*. Contudo, isso não necessariamente significa que o mesmo ocorreria *in vivo*, pois há no sistema *in vivo* interação sistêmica. Por essa interação, poderia haver uma sinalização para a disponibilização de glicose estocada, por exemplo, via o hormônio pancreático glucagon (ou hormônios de ação semelhante). Também poderia haver uma sinalização hormonal desregulada, caso os xenobióticos testados agissem sobre o sistema neuroendócrino. Além disso, hepatócitos cultivados na presença e ausência de insulina podem responder de maneira diferenciada quanto à concentração de glicogênio estocada. Como se buscou reproduzir com fidelidade a situação de hepatócitos *in vivo*, insulina foi utilizada para avaliar a capacidade das células em estocar glicose na forma de glicogênio. Poder-se-ia, se desejado, verificar a capacidade dos hepatócitos em disponibilizar glicose. Neste caso, acrescentar-se-ia glucagon ao meio de cultura.

Em cultura, o MeHg forma compostos como GS-Hg-SG após reação com o GSH presente no meio de cultura (CLARKSON, 1992) e o DDT se liga a albumina do soro e é particionado nos lipídios celulares e nas porções lipídicas de lipoproteínas do soro (GÜLDEN *et al.*, 2001, 2002), o que afeta consideravelmente a biodisponibilidade¹⁵⁰ desses xenobióticos. No entanto, essas interações também ocorrem *in vivo*, com pequenas diferenças referentes a concentrações específicas de proteínas, lipídios e pequenos compostos, com os quais esses xenobióticos podem se ligar e/ou reagir. Logo, as concentrações nominais empregadas nos ensaios com células de *Hoplias malabaricus* são certamente superiores às concentrações livres no meio de cultura, mas refletem concentrações tissulares fatuais.

Concentrações nominais baixas de DDT e MeHg causaram alterações bioquímicas no modelo celular estudado, refletindo a susceptibilidade da espécie predadora *Hoplias malabaricus* ao estresse resultante de exposição aos xenobióticos supracitados. Isso desperta preocupação, porque ações deletérias em células importantíssimas como os hepatócitos podem torná-las mais susceptíveis a estresse adicional como, por exemplo, o estresse resultante de interação com xenobióticos antrópicos cada vez mais diversificados e abundantes no ambiente natural.

¹⁵⁰ A fração que pode ser captada por sistema biológico é a fração biodisponível. A biodisponibilidade depende, entre outros fatores, da forma e afinidade química de um xenobiótico, das condições físico-químicas do ambiente em que se encontra e da possibilidade de interação espacial e temporal entre xenobiótico e sistema biológico.

FIGURA 27. Efeitos causados pelo DDT e MeHg e alguns mecanismos hipotéticos.



As respostas e efeitos celulares do MeHg a 2,5 µM (HII), MeHg a 0,25 µM (HI), DDT a 50 nM (D) e mistura de DDT a 50 nM + MeHg a 0,25 µM (M) em hepatócitos de *Hoplias malabaricus* estão indicados na forma de aumento (+) ou redução (-). Exceto pela concentração de glicogênio, não há setas indicando quando o biomarcador não sofreu alteração. As setas interligando os biomarcadores indicam a interrelação existente entre eles. Abreviações novas: G6P (glucose-6-fosfato), 6PG (6-fosfogliconato) e ??? (outros biomarcadores). O aumento de necrose observado em todos os grupos expostos aos xenobióticos deve resultar da ação direta dos xenobióticos, bem como de um aumento no dano a macromoléculas (proteínas (PCO - HII, M) e lipídios (LPO - D, HI, HII, M)). Esse dano pode ser via oxidação direta pelo HO[•], via interação entre xenobiótico/grupo reativo (metabólitos, radicais como o CH₃[•]) e macromoléculas, e/ou via ação de subprodutos de oxidação de algumas biomoléculas sobre outras. Uma concentração aumentada de HO[•] pode decorrer de aumento de H₂O₂ e incapacidade do sistema antioxidante celular em neutralizar EROs (via CAT, GSH, NADPH etc). Então, os xenobióticos podem levar a uma situação de estresse oxidativo inibindo (diretamente ou via oxidação) a atividade de enzimas como a CAT (HII), a GR (HI, M), a SOD (D, HII) e a GST (D); consumindo antioxidantes (como o GSH); gerando EROs (como o H₂O₂ - D, HI, M); e danificando macromoléculas diretamente ou via agentes pro-oxidantes. Quando o estresse celular é grave, mas não intenso o suficiente para causar necrose (D, HI, HII, M), pode haver sinalização (via redução da concentração de GSH) em algumas células para ocorrência de apoptose (D). As células tentam eliminar o excesso de EROs, sinalizando para a ativação de elementos de resposta antioxidante (via EROs), que agem elevando a transcrição de enzimas antioxidantes, como as CAT, GR, SOD etc. Quando, por alguma razão, há redução de EROs abaixo de níveis normais (O₂^{•-} - HII), pode haver inclusive redução na transcrição de algumas enzimas dependentes de sinalização por EROs (SOD - HII ?). O inter cruzamento de

vias bioquímicas e moleculares dentro das células faz com que enzimas não diretamente envolvidas na resposta antioxidante passem a ser expressas para suprir grupos funcionais, como por exemplo, o grupo heme que compõem enzimas como as CAT, GPx e citocromos (p.ex. P450). Algumas enzimas tentam ainda repor moléculas antioxidantes como o GSH (GR, enzimas de síntese) e o NADPH (G6PDH), sendo que a maior parte das respostas celulares à presença de xenobióticos requer energia, o que pode ou não levar a redução de estoques de glicogênio.

6. CONCLUSÕES

A exposição de hepatócitos de *Hoplias malabaricus* ao DDT e MeHg levou à alteração celular medida através de biomarcadores expressivos. As respostas celulares foram identificadas através de alteração na atividade de importantes enzimas (CAT, GST, GR, SOD, δ -ALAd, G6PDH), o que não necessariamente implica em efeito deletério no caso de aumento de atividade por se tratarem de respostas protetoras. Contudo, isto não é verdade quando se trata de inibição de atividade enzimática, que pode levar a uma maior susceptibilidade a estresse adicional, o que de fato ocorreu. O aumento da LPO, PCO e incidência de apoptose e a redução da viabilidade celular e da concentração de GSH configuram-se em efeitos deletérios da exposição aos xenobióticos supramencionados. No caso da produção de EROs, níveis alterados sejam eles acima ou abaixo do limiar de normalidade podem ter graves conseqüências ao bom funcionamento celular.

O solvente DMSO (responsável por importantes efeitos em hepatócitos de *Hoplias malabaricus* conforme discutido no Capítulo II) não foi utilizado para solubilizar o DDT nos ensaios do presente capítulo. Ao invés de empregá-lo, optou-se pela solubilização em soro bovino fetal, tendo em vista a hidrossolubilidade e o particionamento em lipídios do referido pesticida. Dessa maneira, foi possível reproduzir com um pouco mais de fidelidade a situação *in vivo*, embora ainda haja um distanciamento entre o que de fato ocorre *in vivo* e as simulações até o momento possíveis *in vitro*.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A geração de dados empíricos com espécies nativas a respeito da ação de xenobióticos é condição imprescindível para a compreensão dos efeitos biológicos resultantes de exposição, sendo que uma visão holística da interação xenobiótico - compartimento vivo depende da complementaridade de estudos *in situ*, *in vivo* e *in vitro*.

O emprego de ensaios *in vitro* permite um estudo mais aprofundado da bioquímica celular, passando-se da mera especulação dos passos iniciais que levam a ocorrência de um efeito biológico à descoberta de mecanismos de ação bastante detalhados. Tendo isso em mente, escolheu-se a espécie *Hoplias malabaricus* como modelo de peixe tropical predador nativo do Brasil para a padronização de um modelo *in vitro* de interesse, objeto de estudo para os três capítulos que compõem o presente trabalho.

No capítulo I, determinou-se um procedimento de fácil reprodução para o isolamento de células hepáticas, condições adequadas de cultivo e a determinação de um desenho experimental apropriado para o posterior emprego do modelo. Depois de atendidas essas condições, realizaram-se dois estudos distintos.

No capítulo II, pesticidas organoclorados extraídos de organismos expostos no ambiente natural foram empregados para simular sua ação conjunta, numa tentativa de reproduzir mais fidedignamente a forma química e a concentração de componentes individuais de uma mistura xenobiótica, numa abordagem inédita. A ocorrência de efeitos resultantes do solvente utilizado (DMSO) suscitou a necessidade de empregar uma estratégia diferente, em ensaios futuros, para solubilizar moléculas xenobióticas hidrofóbicas.

No capítulo III, igualmente inédito, hepatócitos de *Hoplias malabaricus* foram expostos ao DDT, MeHg e a uma combinação de ambos. Dispensou-se o emprego do DMSO, um número maior de biomarcadores foi avaliado e o tempo de exposição foi prolongado em relação ao capítulo II.

O emprego de diversos biomarcadores, de concentrações mais realísticas de xenobióticos e de um modelo *in vitro* ainda pouco explorado no Brasil, hepatócitos de um organismo não exótico, são os pontos de destaque dos ensaios realizados, tanto no capítulo II quanto no capítulo III.

Esses dois últimos capítulos permitem uma interessante comparação dos resultados obtidos, caso se desconsidere as diferentes condições experimentais, com relação à exposição aos organoclorados; essa exposição ocorreu nos capítulos II (mistura de POCs) e III (DDT). Primeiramente, houve redução da viabilidade e da concentração de glutathiona reduzida e aumento da atividade das CAT em ambos os experimentos, o que indica que ambos, DDT e a mistura de POCs, alteraram esses biomarcadores de modo que eles respondessem de maneira semelhante. Contudo, isso não quer dizer que as mesmas vias de alteração foram induzidas pela mistura de POCs e pelo DDT. Em segundo lugar, as interações complexas, que devem ocorrer na mistura de POCs, levaram os hepatócitos à morte celular apenas por necrose, enquanto que a exposição ao DDT ativou o programa de morte celular por apoptose e permitiu que esse programa ocorresse, de modo que os hepatócitos sofreram os dois tipos de morte celular conhecidos, apoptose e necrose. Em terceiro lugar, a exposição ao DDT isoladamente levou ao aumento na peroxidação de lipídios, o que não ocorreu após exposição à mistura de POCs. Aparentemente, a atividade das enzimas GST deve ter alguma relação com esse achado, pois as GST estão envolvidas na conjugação de produtos de metabolismo de vários POCs e na neutralização de hidroperóxidos lipídicos; a atividade das GST aumentou após exposição aos POCs, porém diminuiu após exposição ao DDT. E finalmente, diversos biomarcadores, que não foram avaliados, podem ter sido alterados. No capítulo II, a avaliação de sete biomarcadores¹⁵¹ não permitiu uma caracterização tão refinada da toxicidade dos xenobióticos como foi possível no capítulo III, onde quatorze biomarcadores foram analisados.

Do ponto de vista de uma possível aplicação dos biomarcadores analisados no diagnóstico ambiental, os resultados *in vitro* obtidos com hepatócitos de *Hoplias malabaricus* nos capítulos II e III permitem sugerir dois aspectos que devem ser considerados. Primeiro: o maior número possível de biomarcadores deve ser avaliado, como sugerido por outros pesquisadores. Segundo: caso não seja possível a avaliação de diversos biomarcadores, os biomarcadores que indicam dano ao funcionamento celular ou dano estrutural às células, isto é, danos ao DNA, proteínas, lipídios e morte celular devem ser

¹⁵¹ Limitações técnicas referentes à quantidade de POCs extraídos das enguias foram limitantes para a não avaliação de um número maior de biomarcadores no capítulo II.

priorizados, pois eles são, geralmente, o resultado avançado ou final do intercruzamento de diversas vias e processos celulares envolvidos na ação deletéria de xenobióticos. E terceiro: o fato de alguns biomarcadores não apresentarem resposta indicativa de estresse químico, não necessariamente sugere uma boa situação ambiental; uma má escolha dos biomarcadores pode inviabilizar um bom diagnóstico, visto a complexidade do ambiente celular e a possibilidade de um determinado biomarcador apresentar uma resposta protetora que mascara, em parte, o efeito dos demais biomarcadores avaliados.

Em termos de contribuição, os dados obtidos com os três capítulos integrantes da presente tese fornecem a base para novos estudos com a espécie *Hoplias malabaricus*, além de gerarem novas questões que exigem uma investigação mais aprofundada, o que necessitará a exploração de novos biomarcadores.

Por fim, o emprego de diversos biomarcadores para a avaliação do estado redox celular foi interessante pelo fato de que a maioria dos xenobióticos deve afetar o balanço redox celular em algum momento da expressão de seu efeito tóxico. Para o futuro, o modelo padronizado e os resultados obtidos na presente tese tornarão possível a exploração dos mecanismos que levaram, por exemplo, ao aumento da atividade de uma determinada enzima avaliada¹⁵² ou à sua inibição¹⁵³ em hepatócitos de *Hoplias malabaricus*, uma espécie modelo nativa do Brasil. Além disso, xenobióticos cujos efeitos *in vitro* e mecanismos de toxicidade são ainda pouco caracterizados em peixes nativos poderão ser contemplados em novos estudos.

¹⁵² Vias de sinalização como a *NRF2*, *AP-1*, *NFκB* etc.

¹⁵³ Interação direta entre xenobiótico e enzima, inibição da captação de precursores, inativação por oxidação etc.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAHAM, R.; BENITZ, K.F.; MANKES, R. Ploidy patterns in hepatic tumors induced by Mirex. **Exp. Mol. Pathol.**, v.38, p.271-282, 1983.
- ABUJA, P.M.; ALBERTINI, R. Methods for monitoring oxidative stress, lipid peroxidation and oxidation resistance of lipoproteins. **Clin. Chim. Acta**, v.306, p.1-17, 2001.
- ACWORTH; BAILEY, 1995 *In*: RODRIGUES, L. C. **Estudo das glutation s-transferases hepáticas solúveis do peixe *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (Pacu)**. Tese de doutorado em Bioquímica, Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes/UERJ, Brasil, 2003.
- ADUAYOM, I.; CAMPBELL, P.G.C.; DENIZEAU, F.; JUMARIE, C. Different transport mechanisms for cadmium and mercury in Caco-2 cells: inhibition of Cd uptake by Hg without evidence for reciprocal effects. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v.189, p.56-67, 2003.
- AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods Enzymol.**, v.105, p.121-126, 1984.
- AGUILANIU, H.; GUSTAFSSON, L.; RIGOLET, M.; NYSTRÖM, T. Protein oxidation in G0 cells of *Saccharomyces cerevisiae* depends on the state rather than rate of respiration and is enhanced in pos9 but not yap1 mutants. **J. Biol. Chem.**, v.276, p.35396-35404, 2001.
- ALBAIGES, J.; FARRAN, A.; SOLER, M.; GALLIFA, A.; MARTIN, P. Accumulation and distribution of biogenic and pollutant hydrocarbons, PCB's and DDT in tissues of western fishes. **Mar. Environ. Res.**, v.22, p.1-18, 1987.
- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Molecular Biology of The Cell**, 4^aed, Garland, New York, 2002.
- ALDERIGHI, L.; GANS, P.; MIDOLLINI, S.; VACCA, A. Co-ordination chemistry of the methylmercury (II) ion in aqueous solution: a thermodynamic investigation. **Inorganica Chim. Acta**, v.356, p.8-18, 2003.
- ALEO, M.F.; MORANDINI, F.; BETTONI, F.; TANGANELLI, S.; VEZZOLA, A.; GIULIANI, R.; STEIMBERG, P.; APOSTOLI, N.; MAZZOLENI, G. Antioxidant potential and gap junction-mediated intercellular communication as early biological markers of mercuric chloride toxicity in the MDCK cell line. **Toxicol. In Vitro.**, v.16, p.457-465, 2002.
- ALMROTH, B.C.; STURVE, J.; BERGLUND, Å.; FÖRLIN, L. Oxidative damage in eelpout (*Zoarces viviparus*), measured as protein carbonyls and TBARS, as biomarkers. **Aquat. Toxicol.**, v.73, p.171-180, 2005.
- ALVES COSTA, J.R.M. **Biomarcadores de contaminação em peixes de água doce, por exposição ao chumbo (II): ensaios laboratoriais com *Hoplias malabaricus* e *Oreochromis niloticus***. Dissertação de mestrado em Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal do Paraná, Brasil, 133f, 2001.
- ALVES COSTA, J.R.M.; MELA, M.; SILVA DE ASSIS, H.C.; PELLETIER, E.; RANDI, M.A.F.; OLIVEIRA RIBEIRO, C.A. Enzymatic inhibition and morphological changes in *Hoplias malabaricus* from dietary exposure to lead(II) or methylmercury. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v.67, p.82-88, 2007.
- ANDERSEN, H.R.; VINGGAARD, A.M.; RASMUSSEN, T.H.; GJERMANDSEN, I.M.; BONEFELD-JORGENSEN, E.C. Effects of currently used pesticides in assays for estrogenicity, androgenicity, and aromatase activity in vitro. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v.179, p.1-12, 2002.
- ANDRES, S.; LAPORTE, J-M.; MASON, R.P. Mercury accumulation and flux across the gills and the intestine of the blue crab (*Callinectes sapidus*). **Aquat. Toxicol.**, v.56, p.303-320, 2002.
- APREA, C.; COLOSIO, C.; MAMMONE, T.; MINOIA, C.; MARONI, M. Biological monitoring of pesticide exposure: a review of analytical methods. **J. Chromatogr.**, v.769, p.191-219, 2002.
- ARMSTRONG, R.N. Structure, catalytic mechanism, and evolution of the glutathione transferases. **Chem. Res. Toxicol.**, v.10, p.2-18, 1997.
- ARTEEL, G.E.; SIES, H. The biochemistry of selenium and the glutathione system. **Environ. Toxicol. Pharmacol.**, v.10, p.153-158, 2001.

- ASHOUR, H.; ABDEL-RAHMAN, M.; KHODAIR, A. The mechanism of methyl mercury toxicity in isolated rat hepatocytes. **Toxicol. Lett.**, v.69, p.87–96, 1993.
- ASHWOOD-SMITH, M.J. The genetic toxicology of aldrin and dieldrin. **Mutat. Res.**, v.86, p.137–154, 1981.
- ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry). **Toxicological profile for DDT, DDE, and DDD**. U.S. department of health and human services, 2002. Disponível em: <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/>. Acesso em: 2006.
- BACHOWSKI, S.; KOLAJA, K.L.; XU, Y.; KETCHAM, C.A.; STEVENSON, D.E.; WALBORG, E.F.Jr. Role of oxidative stress in the mechanism of dieldrin's hepatotoxicity. **Ann. Clin. Lab. Sci.**, v.27, p.196–209, 1997.
- BAKSI, S.M.; FRAZIER, J.M. Isolated fish hepatocytes – model systems for toxicology research: review. **Aquat. Toxicol.**, v.16, p.229-256, 1990.
- BALLATORI, N.; TRUONG, A.T. Mechanisms of hepatic methylmercury uptake. **J. Toxicol. Environ. Health**, v.46, p.343–353, 1995.
- BARBOSA, A.C.; SOUZA, J.; DOREA, J.G.; JARDIM, W.F.; FADINI, P.S. Mercury biomagnification in a tropical black water, Rio Negro, Brazil. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.**, v.45, p.235–246, 2003.
- BD Pharmingen™ Technical Data Sheet. **BD Biosciences Pharmingen** <http://www.bdbiosciences.com>. Acesso em: 2005.
- BEGON, M.; TOWNSEND, C.R.; HARPER, J.L. **Ecology: from individuals to ecosystems**, 4th ed., Blackwell Publishing, Oxford, p.37, 2006.
- BELLETTI, S.; ORLANDINI, G.; VETTORI, M.V.; MUTTI, A.; UGGERI, J.; SCANDROGLIO, R.; ALINOVI, R.; GATTI, R. Time course assessment of methylmercury effects on C6 glioma cells: submicromolar concentrations induce oxidative DNA damage and apoptosis. **J. Neurosci. Res.**, v.70, p.703–711, 2002.
- BENOV, L.; SZTEINBERG, L.; FRIDOVICH, I. Critical evaluation of the use of hydroethidine as a measure of superoxide anion radical. **Free Radic. Biol. Med.**, v.25, p.826-831, 1998.
- BERGEN, W.G. The in vitro effect of dieldrin on respiration of rat liver mitochondria. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v.136, p.732–735, 1971.
- BERLETT, B.S.; STADTMAN, E.R. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. **J. Biol. Chem.**, v.272, p.20313-20316, 1997.
- BERNTSEN, M.H.G.; AATLAND, A.; HANDY, R.D. Chronic dietary mercury exposure causes oxidative stress, brain lesions, and altered behaviour in Atlantic salmon (*Salmo salar*) parr. **Aquat. Toxicol.**, v.65, p.55-72, 2003.
- BERRY, M.N.; FARRINGTON, C.; GAY, S.; GRIVELL, A.R.; WALLACE, P.G. Preparation of hepatocytes in good yield without enzymatic digestion. In: HARRIS, R.A., CORNELL, N.W. (Eds), editors. **Isolation, characterization, and use of hepatocytes**. New York: Elsevier Science, p.7-10, 1983.
- BERRY, M.N.; FRIEND, D.S. High yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells. **J. Cell Biology**, v.43, p.506–520, 1969.
- BESTERVELT, L.L.; VAZ, A.D.; COON, M.J. Inactivation of ethanolinducible cytochrome P450 and other microsomal P450 isozymes by trans-4-hydroxy-2-nonenal, a major product of membrane lipid peroxidation. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v.92, p.3764–3768, 1995.
- BESTWICK, C.S.; MILNE, L. Quercetin modifies reactive oxygen levels but exerts only partial protection against oxidative stress within HL-60 cells. **Biochim. Biophys. Acta**, v.1528, p.49-59, 2001.
- BETTERIDGE, D.J. What is oxidative stress? **Metabolism**, v.49, p.3-8, 2000.
- BINDELMAN, T.F.; PATTON, G.W.; HINCKLEY, D.A.; WALLA, M.D.; COTHAM, W.E.; HARGRAVE, B.T. Chlorinated pesticides and polychlorinated biphenyls in the atmosphere of

- the Canadian arctic. *In*: KURTZ, D.A. (Ed), **Long Range Transport of Pesticides**. Lewis Publishers, Chelsea, MI, p.237–372, 1990.
- BISELL, D. M.; ARENSON, D. M.; MAHER, J. J.; ROLL, F. J. Support of cultured hepatocytes by a laminin-rich gel. Evidence for a functionally significant subendothelial matrix in normal rat liver. **J. Clin Invest.**, v.79, p.801–812, 1987.
- BLAIS, J.M.; SCHINDLER, D.W.; MUIR, D.C.G.; KIMPE, L.E.; DONALD, D.B.; ROSENBERG, B. Accumulation of persistent organochlorine compounds in mountains of western Canada. **Nature**, v.395, p.585–588, 1998.
- BLAZKA, M.E.; SHAIKH, Z.A.; Cadmium and mercury accumulation in rat hepatocytes: interactions with other metal ions. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v.113, p.118-125, 1992.
- BLOCH, M.E. *Naturgeschichte der ausländischen Fische*. Berlin, v.8, 74f, 1794.
- BOLANOS, J.P.; HEALES, S.J.; PEUCHEN, S.; BARKER, J.E.; LAND, J.M.; CLARK, J.B. Nitric-oxide mediated mitochondrial damage: a potential neuroprotective role for glutathione. **Free Radic. Biol. Med.**, v.21, p.995-1001, 1996.
- BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v.72, p.248-254, 1976.
- BRAUNBECK, T.; STORCH, V. Senescence of hepatocytes isolated from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in primary culture. An ultrastructural study. **Protoplasma**, v.170, p.138–159, 1992.
- BREEN, A.P.; MURPHY, J.A. Reactions of oxyl radicals with DNA. **Free Radic. Biol. Med.**, v.18, p.1033-1077, 1995.
- BRITIGAN, B.E.; COFFMAN, T.J.; BUETTNER, G.R. Spin trapping evidence for the lack of significant hydroxyl radical production during the respiration burst of human phagocytes using a spin adduct resistant to superoxide-mediated destruction. **J. Biol. Chem.**, v.265, p.2650–2656, 1990.
- BRODY, J.G.; RUDEL, R.A. Environmental pollutants and breast cancer. **Environ. Health Perspect.**, v.111, p.1007-1019, 2003.
- BROOKES, N.; KRISTT, D.A. Inhibition of amino acid transport and protein synthesis by HgCl₂ and methylmercury in astrocytes: selectivity and reversibility. **J. Neurochem.**, v.53, p.1228-1237, 1989.
- BUCIO, L.; GARCÍA, C.; SOUZA, V.; HERNÁNDEZ, E.; GONZÁLEZ, C.; BETANCOURT, M.; GUTIÉRREZ-RUIZ, M.C. Uptake, cellular distribution and DNA damage produced by mercuric chloride in a human fetal hepatic cell line. **Mutat. Res.**, v.423, p.65-72, 1999.
- BUKO, V.U.; ARTSUKEVICH, A.A.; IGNATENKO, K.V. Aldehydic products of lipid peroxidation inactivate cytochrome P-450. **Exp. Toxicol. Pathol.**, v.51, p.294–298, 1999.
- BURFORD, N.; EELMAN, M.D.; GROOM, K. Identification of complexes containing glutathione with As(III), Sb(III), Cd(II), Hg(II), Tl(I), Pb(II) or Bi(III) by electrospray ionization mass spectrometry. **J. Inorg. Biochem.**, v.99, p.1992-1997, 2005.
- BURKITT, M.J.; MASON, R.P. Direct evidence for in vivo hydroxyl radical generation in experimental iron overload: an ESR spin-trapping investigation. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v.88, p.8440–8444, 1991.
- BUSSER, M.T.; LUTZ, W.K. Stimulation of DNA synthesis in rat and mouse liver by various tumor promoters. **Carcinogenesis**, v.8, p.1433-1437, 1987.
- BUTTERFIELD, D.A.; KOPPAL, T.; HOWARD, B.; SUBRAMANIAM, R.; HALL, N.; HENSLEY, K.; YATIN, S.; ALLEN, K.; AKSENOV, M.; AKSENOV, A.; CAI, J.; JONES, D.P. Superoxide in apoptosis: mitochondrial generation triggered by cytochrome c loss. **J. Biol. Chem.**, v.273, p.11401-11404, 1998.
- BYVOET, P.; BALIS, J.U.; SHELLEY, S.A.; MONTGOMERY, M.R.; BARBER, M.J. Detection of hydroxyl radicals upon interaction of ozone with aqueous media or extracellular surfactant: the role of trace iron. **Arch. Biochem. Biophys.**, v.319, p.464-469, 1995.

- CAI, J.; JONES, D.P. Superoxide in apoptosis: mitochondrial generation triggered by cytochrome c loss. **J. Biol. Chem.**, v.273, p.11401-11404, 1998.
- ÇAKATAY, U.; TELCI, A.; KAYALI, R.; TEKELI, F.; AKÇAY, T.; SIVAS, A. Relation of oxidative protein damage and nitrotyrosine levels in the aging rat brain. **Exp. Gerontol.**, v.36, p.221-229, 2001.
- CARTY, A.J.; MALONE, S.F. The chemistry of mercury in biological systems. In: NRIGAU, J.O. (Ed.). **The biogeochemistry of mercury in the environment**. Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, p.433-479, 1979.
- CASTOLDI, A.F.; BARNI, S.; TURIN, I.; GANDINI, C.; MANZO, L. Early acute necrosis, delayed apoptosis and cytoskeletal breakdown in cultured cerebellar granule neurons exposed to methylmercury. **J. Neurosci. Res.**, v.59, p.775-787, 2000.
- CHERUBINI, A.; RUGGIERO, C.; POLIDORI, M.C.; MECOCCI, P. Potential markers of oxidative stress in stroke. **Free Radic. Biol. Med.**, v.39, p.841-852, 2005.
- CHEUNG, K.C.; LEUNG, H.M.; KONG, K.Y.; WONG, M.H. Residual levels of DDTs and PAHs in freshwater and marine fish from Hong Kong markets and their health risk assessment. **Chemosphere**, v.66, p.460-468, 2007.
- CHOI, B.H.; YEE, S.; ROBLES, M. The effects of glutathione glycoside in methylmercury poisoning. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v.141, p.357-364, 1996.
- CLARKSON, T.W. Mercury: major issues in environmental health. *Environ. Health Perspect.*, v.100, p.31-38, 1992.
- COCHRANE, C.G. Cellular injury by oxidants. **Am. J. Med.**, v.92C, p.23-30, 1991.
- COHEN, G.; CEDERBAUM, A.I. Microsomal metabolism of hydroxyl radical scavenging agents: Relationship to the microsomal oxidation of alcohols. **Arch. Biochem. Biophys.**, v.199, p.438-447, 1980.
- COHEN, G.; YAKUSHIN, S.; DEMBIEC-COHEN, D. Protein L-dopa as an index of hydroxyl radical attack on protein tyrosine. **Anal. Biochem.**, v.263, p.232-239, 1998.
- COLLINS, A.R. Oxidative DNA damage, antioxidants, and cancer. **Bioessays**, v.21, p.238-246, 1999.
- COMPEAU, G.C.; BARTHA, R. Sulphate-reducing bacteria principal methylators of mercury in anoxic estuarine sediment. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.50, p.498-502, 1984.
- COMPTON, S.J.; JONES, C.G. Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. **Anal. Biochem.**, v.151, p.369-374, 1985.
- COOKSON, M.R.; PENTREATH, V.W. Protective Roles of Glutathione in the Toxicity of Mercury and Cadmium Compounds to C6 Glioma Cells. **Toxicol. In Vitro**, v.10, p.257-264, 1996.
- COUMOUL, X.; DIRY, M.; BAROUKI, R. PXR-dependent induction of human CYP3A4 gene expression by organochlorine pesticides. **Biochem Pharmacol.**, v.64, p.1513-1519, 2002.
- CROUCH, R.K.; GANDY, S.C.; KIMSEY, G.; 1981. The inhibition of islet superoxide dismutase by diabetogenic drugs. **Diabetes**, v.30, p.235-241, 1981.
- CUI, K.; LUO, X.; XU, K.; VEN MURTHY, M.R. Role of oxidative stress in neurodegeneration: recent developments in assay methods for oxidative stress and nutraceutical antioxidants. *Prog. Neuropsychopharmacol.* **Biol. Psychiatry**, v.28, p.771-799, 2004.
- CULTILAB. **Cultilab – meios para cultivo celular**. Sítio disponível em: <<http://www.cultilab.com.br/bdmem.html>>. Acesso em: 2003.
- D'AMATO, C.; TORRES, J.P.M.; MALM, O. DDT (dicloro difenil tricloroetano): Toxicidade e contaminação ambiental - uma revisão. **Quim Nova**, v.25, p.995-1002, 2002.
- DALLE-DONNE, I.; ROSSI, R.; GIUSTARINI, D.; MILZANI, A.; COLOMBO, R. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. **Clin. Chim. Acta**, v.329, p.23-38, 2003.

- DAVE, V.; MULLANEY, K.J.; GODERIE, S.; KIMELBERG, H.K.; ASCHNER, M. Astrocytes as mediators of methylmercury neurotoxicity: effects on D-aspartate and serotonin uptake. **Dev. Neurosci.**, v.16, p.222–231, 1994.
- DEHN, P.F.; ALLEN-MOCHERIE, S.; KAREK, J.; THENAPPAN, A. Organochlorine insecticides: impacts on human HepG2 cytochrome P4501A, 2B activities and glutathione levels. **Toxicol. In Vitro**, v.19, p.261-273, 2005.
- DI GIULIO, R.T.; WASHBURN, P.C.; WENNING, R.J.; WINSTON, G.W.; JEWELL, C.S. Biochemical responses in aquatic animals: a review of determinants of oxidative stress. **Environ. Toxicol. Chem.**, v.8, p.1103-1123, 1989.
- DIPLOCK, T.A.; CHARLEUX, J.L.; CROZIER-WILLI, G.; KOK, F.J.; RICE-EVANS, C.; ROBERFROID, M.; STAHL, W.; VIÑA-RIBES, J. Functional food science and defense against reactive oxidative species. **Br. J. Nutr.**, v.80, p.77–112, 1998.
- DOREA, J.G.; BARBOSA, A.C.; SILVA, G.S. Fish mercury bioaccumulation as a function of feeding behavior and hydrological cycles of the Rio Negro, Amazon. **Comp. Biochem. Physiol. C, Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.**, v.142, p.275-283, 2006.
- DORFMAN, L.M.; ADAMS, G.E. **Reactivity of the hydroxyl radical in aqueous solutions. National Standard Reference Data Series 46 (NSRDS-NBS46)**, (US National Bureau of Standards), US Government Printing Office, Washington, DC, p.1-59, 1973.
- DOWLING, V.; HOARAU, P.C.; ROMEO, M.; O'HALLORAN, J.; VAN PELT, F.; O'BRIEN, N.; SHEEHAN, D. Protein carbonylation and heat shock response in *Ruditapes decussatus* following *p,p'*-dichlorodiphenyldichloroethylene (DDE) exposure: A proteomic approach reveals that DDE causes oxidative stress. **Aquat. Toxicol.**, v.77, p.11-18, 2006.
- EASTERBROOK, J.; LU, C.; SAKAI, Y.; LI, A.P. Effects of organic solvents on the activities of cytochrome P450 isoforms, UDP-dependent glucuronyl transferase, and phenol sulfotransferase in human hepatocytes. **Drug Metab. Dispos.**, v.29, p.141-144, 2001.
- ENARI, M.; SAKAHIRA, H.; YOKOYAMA, H.; OKAWA, K.; IWAMATSU, A.; NAGATA, S. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. **Nature**, v.391, p.43-50, 1998.
- ENAT, R.; JEFFERSON, D.M.; RUIZ-OPAZO, N.; GATMAITAN, Z. Hepatocyte proliferation in vitro: its dependence on the use of serum-free hormonally defined medium and substrata of extracellular matrix. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v.8, p.1411-1415, 1984.
- ESTERBAUER, H.; SCHAUR, R.J.; ZOLLNER, H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. **Free Radic. Biol. Med.**, v.11, p.81–128, 1991.
- EVANS, M.S.; LOCKHART, W.L.; DOETZEL, L.; LOW, G.; MUIR, D.; KIDD, K.; STEPHENS, G.; DELARONDE, J. Elevated mercury concentrations in fish in lakes in the Mackenzie River Basin: The role of physical, chemical, and biological factors. **Sci. Total Environ.**, v.351-352, p.479-500, 2005.
- EVANS, P.; LYRAS, L.; HALLIWELL, B. Measurement of protein carbonyls in human brain tissue. **Methods Enzymol.**, v.300, p.145–156, 1999.
- FADINI, P.S.; JARDIM, W.F. Is the Negro River Basin (Amazon) impacted by naturally occurring mercury? **Sci. Total Environ.**, v. 275, p.71–82, 2001.
- FAISAL, M.; RUTAN, B.J.; SAMI-DEMMELE, S. Development of continuous liver cell cultures from the marine teleost, spot (*Leiostomus xanthurus*, Pisces: Sciaenidae). **Aquaculture**, v.132, p.59-72, 1995.
- FARINA, M.; SOARES, F.A.A.; ZENI, G.; SOUZA, D.O.; ROCHA, J.B.T. Additive pro-oxidative effects of methylmercury and ebselen in liver from suckling rat pups. **Toxicol. Lett.**, p.146, p.227–235, 2004.
- FERNANDES, A.P.; HOLMGREN, A. Glutaredoxins: glutathione dependent redox enzymes with functions far beyond a simple thioredoxin backup system. **Antioxid. Redox Signal.**, v.6, p.63-74, 2004.

- FERREIRA, M.; ANTUNES, P.; GIL, O.; VALE, C.; REIS-HENRIQUES, M.A. Organochlorine contaminants in flounder (*Platichthys flesus*) and mullet (*Mugil cephalus*) from Douro estuary, and their use as sentinel species for environmental monitoring. **Aquat. Toxicol.**, v.69, p.347-357, 2004.
- FILIPAK NETO, F. **Cultivo primário de células hepáticas de traíra - *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794) - empregando método não enzimático de isolamento.** Monografia, Universidade Federal do Paraná, Brasil, 62f., 2003.
- FILIPAK NETO, F.; ZANATA, S.M.; SILVA DE ASSIS, H.C.; BUSSOLARO, D.; FERRARO, M.V.M.; RANDI, M.A.F.; ALVES COSTA; J R.M.; CESTARI, M.M.; ROCHE, H.; OLIVEIRA RIBEIRO, C.A. Use of hepatocytes from *Hoplias malabaricus* to characterize the toxicity of a complex mixture of lipophilic halogenated compounds. **Toxicol. In Vitro**, v.21, p.706-715, 2007.
- FILOMENI, G.; ROTILIO, G.; CIRIOLO, M.R. Cell signaling and the glutathione redox system. **Biochem. Pharmacol.**, v.64, p.1057-1064, 2002.
- FONTAINE, Y.A. Adaptations *versus* accommodations: some neuroendocrine aspects in teleost fish. **Fish Physiol. Biochem.**, v.11, p.147-154, 1993.
- FOWLER, H.W. Os peixes de água doce do Brasil. **Arquivos de Zoologia do Estado de São Paulo**, v.6, p.205-404, 1950.
- FOX, W.M.; CONNOR, L.; COPPLESTONE, D.; JOHNSON, M.S.; LEAH, R.T. The organochlorine contamination history of the Mersey estuary, UK, revealed by analysis of sediment cores from salt marshes. **Mar. Environ. Res.**, v.51, p.213-227, 2001.
- FRASLIN, J.M.; KNEIP, B.; VAULONT, S.; GLAISE, D.; MUNNICH, A.; GUGUEN-GUILLOUZO, C. Dependence of hepatocyte specific gene expression on cell-cell interactions in primary culture. **EMBO J.**, v.4, p.2487-2491, 1985.
- FRIDOVICH, I. The biology of oxygen radicals: The superoxide radical is an agent of oxygen toxicity; superoxide dismutases provide an important defense, **Science**, v.201, p.875, 1978.
- FU, W.; O'HANDLEY, S.; CUNNINGHAM, R.P.; JOHNSON, M.K. The role of the iron-sulfur cluster in *Escherichia coli* endonuclease III. A resonance Raman study. **J. Biol. Chem.**, v. 267, p.16135-16137, 1992.
- FUJIYAMA, J.; HIRAYAMA, K.; YASUTAKE, A. Mechanism of methylmercury efflux from cultured astrocytes. **Biochem. Pharmacol.**, v.41, p.1525-1530, 1994.
- GANTHER, H. E. Interactions of vitamin E and selenium with mercury and silver. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v.355, p.212-226, 1980.
- GAO, Z.; XU, H.; CHEN, X.; CHEN, H. Antioxidant status and mineral contents in tissues of rutin and baicalin fed rats. **Life Sci.**, v.73, p.1599-1607, 2003.
- GARDNER, H.W. Oxygen radical chemistry of polyunsaturated fatty acids. **Free Radic. Biol. Med.**, v.7, p.65-86, 1989.
- GASCH, A.P.; SPELLMAN, P.T.; KAO, C.M.; CARMEL-HAREL, O.; EISEN, M.B.; STORZ, G.; BOTSTEIN, D.; BROWN, P.O. Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. **Mol. Biol. Cell.**, v.11, p.4241-4257, 2000.
- GEZZI, P. Oxidation of protein thiols in redox regulation. **Biochem. Soc. Trans.**, v.33, p.1378-1381, 2005.
- GIROTTI, A.W. Mechanisms of lipid peroxidation. **Free Radic. Biol. Med.**, v.1, p.87-95, 1985.
- GLOCK, G.E.; MCLEAN, P. Further studies on the properties and assay of glucose 6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase of rat liver. **Biochem. J.**, v.55, p.400-408, 1953.
- GOULET, F.; NORMAND, C.; MORIN, O. Cellular interactions promote tissue-specific function, biomatrix deposition and junctional communication of primary cultured hepatocytes. **Hepatology**, v.8, p.1010-1018, 1988.

- GOYER, R.A. Toxic Effects of metals. *In*: AMDUR, M.O.; DOULL, J.; KLAASSEN, C.D. (Eds.), **Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons**, 4^a ed. Pergamon Press, New York, p. 257, 1991.
- GREENLEE, A.R.; QUAIL, C.A.; BERG, R.L. The antiestrogen ICI 182,780 abolishes developmental injury for murine embryos exposed in vitro to *o,p'*-DDT. **Reprod. Toxicol.**, v.14, p.225–234, 1999.
- GROTEN, J.P.; CASSEE, F.R.; VAN BLADEREN, P.J.; DEROSA, C.; FERON, V.J. Mixtures. *In*: MARGUARDT, H.; SCHAFER, S.C.; MCCLELLAN, R.; WELSCH, F. (Eds.), **Toxicology**. Academic Press, New York, p.257–270, 1999.
- GRUNE, T. Oxidative stress, aging and the proteasomal system. **Biogerontology**, v.1, p.31–40, 2000.
- GRUNE, T.; MERKER, K.; SANDIG, G.; DAVIES, K.J.A. Selective degradation of oxidatively modified protein substrates by the proteasome. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.305, p.709–718, 2003.
- GUGUEN-GUILLOUZO, C.; CLÉMENT, B.; BAFFET, G.; BEAUMONT, C.; MOREL-CHANY, E.; GLAISE, D.; GUILLOUZO, A. Maintenance and reversibility of active albumin secretion by adult rat hepatocytes co-cultured with another liver epithelial cell type. **Exp. Cell Res.**, v.143, p.47-54, 1983.
- GUGUEN-GUILLOUZO, C.; CORLU, A. Recent progress on long-term hepatocyte primary culture: importance of cell microenvironments. **Cytotechnology**, v.11, p.3–5, 1993.
- GUGUEN-GUILLOUZO, C.; GUILLOUZO, A. Modulation of functional activities in cultured rat hepatocytes. *Mol. Cell. Biochem.*, v. 5354, p.35–56, 1983.
- GUGUEN-GUILLOUZO, C.; SEIGNOUX, D.; COURTOIS, Y.; BRISSOT, P.; MARCEAU, N.; GLAISE, D.; GUILLOUZO, A. Amplified phenotypic changes in adult rat and baboon hepatocytes cultured on a Complex biomatrix. **Biol. Cell**, v.46, p.11-20, 1982.
- GUILLOUZO, A.; MOREL, F.; LANGOUËT, S.; MAHEO, K.; RISSEL, M. Use of hepatocyte cultures for the study of hepatotoxic compounds. **J. hepatology**, v.26, p.73-80, 1997.
- GUILLOUZO, A.; MOREL, F.; RATANASAVANH, D.; CHESNE, C.; GUGUEN-GUILLOUZO, C. Long-term culture of functional hepatocytes. **Toxicol In Vitro**, v.4/5, p.415-427, 1990.
- GÜLDEN, M.; MÖRCHEL, S.; SEIBERT, H. Factors influencing nominal effective concentrations of chemical compounds in vitro: cell concentration. *Toxicol. In Vitro*, v.15, p.233–243, 2001.
- GÜLDEN, M.; MÖRCHEL, S.; TAHAN, S.; SEIBERT, H. Impact of protein binding on the availability and cytotoxic potency of organochlorine pesticides and chlorophenols in vitro. **Toxicology**, v.175, p.201–213, 2002.
- GUTTERIDGE, J.M. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. **Clin. Chem.**, v.41, p.1819-1828, 1995.
- HABIG, W.H.; PABST, M.T.; JACOBY, W.B. Glutathione *S*-transferases: The first enzyme step in mercapturic acid formation. **J. Biol. Chem.**, v.249, p.7130-7139, 1974.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free Radicals in Biology and Medicine**, 2^a ed. Clarendon Press, Oxford, 1989.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free Radicals in Biology and Medicine**, 3^a ed. Oxford Science Publications, Oxford, 1999.
- HAMILTON, R.J.; KALU, C.; PRISK, E.; PADLEY, F.B.; PIERCE, H. Chemistry of free radicals in lipids. **Food Chem.**, v.60, p.193-199, 1997.
- HANCOCK, J.T.; DESIKAN, R.; NEILL, S.T. Cytochrome c, glutathione, and the possible role of redox potentials in apoptosis. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v.1010 p.446–448, 2003.
- HARRIS, H.H.; PICKERING, I.J.; GEORGE, G.N. The chemical form of mercury in fish, **Science**, v.301, p.1203, 2003.
- HAUGLAND, R.P. **Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals**, Molecular Probes, Leiden, 1996.

- HAYASHI, S.; OOSHIRO, Z. Primary culture of the eel hepatocytes in the serum-free medium. **Nippon Suisan Gakkai Shi**, v.52, p.1641-1651, 1986.
- HENDERSON, P.T.H.; DEWAIDE, J.H. Metabolism of drugs in isolated rat hepatocytes. **Biochem. Pharmacol.**, v.18, p.2087-2094, 1969.
- HIROI, M.; OGIHARA, T.; HIRANO, K.; HASEGAWA, M.; MORINOBU, T.; TAMAI, H.; NIKI, E. Regulation of apoptosis by glutathione redox state in PC12 cells exposed simultaneously to iron and ascorbic acid. **Free Radic. Biol. Med.**, v.38, p.1057-1072, 2005.
- HITES, R.A.; FORAN, J.A.; CARPENTER, D.O.; HAMILTON, M.C.; KUNTH, B.A.; SCHWAGER, S.J. Global assessment of organic contaminants in farmed salmon. **Science**, v.303, p.226-229, 2004.
- HOLANDA FERREIRA, A.B. **Novo dicionário Aurélio da língua portuguesa**. Versão eletrônica, Positivo Informática, 2004.
- HOLMGREN, A. Antioxidant function of thioredoxin and glutaredoxin systems. **Antioxid. Redox Signal.**, v.2, p.811-820, 2000.
- HOLSBECK, L.; DAS, H.K.; JOIRIS, C.R. Mercury speciation and accumulation in Bangladesh freshwater and anadromous fish. **Sci. Total Environ.**, v.198, p.201-210, 1997.
- HOWARD, P.; MEYLAN, W. **Handbook of physical properties of organic chemicals**. Lewis Publishers, Boca Raton, FL, 1997.
- HUGHES, M.F. Arsenic toxicity and potential mechanism of action. **Toxicol. Lett.**, v.133, p.1-16, 2002.
- HUGHES, W.L. A physicochemical rationale for the biological activity of mercury and its compounds. **Ann. NY Acad. Sci.**, v.65, p.454-460, 1957.
- HURLEY, P.M.; HILL, R.N.; WHITING, R.J. Mode of carcinogenic action of pesticides inducing thyroid follicular cell tumors in rodents. **Environ. Health Perspect.**, v.106, p.437-445, 1998.
- HWANG, E.-S.; KIM, G.-H., Biomarkers for oxidative stress status of DNA, lipids, and proteins in vitro and in vivo cancer research. **Toxicology**, v.229, p.1-10, 2006.
- INSUG, O.; DATAR, S.; KOCH, C.J.; SHAPIRO, I.M.; SHENKER, B.J. Mercuric compounds inhibit human monocyte function by inducing apoptosis: evidence for formation of reactive oxygen species, development of mitochondrial membrane permeability transition and loss of reductive reserve. **Toxicology**, v.124, p.211-224, 1997.
- IRANI, K.; XIA, Y.; ZWEIER, J.L.; SOLLITT, S.J.; DER, C.J.; FEARON, E.R.; SUNDARESAN, M.; FINKEL, T.; GOLDSCHMIDT-CLERMONT, P.J. Mitogenic Signaling Mediated by Oxidants in Ras-Transformed Fibroblasts. **Science**, v.275, p.1649-1652, 1997.
- ITOH, K.; CHIBA, T.; TAKAHASHI, S.; ISHII, T.; IGARASHI, K.; KATOH, Y.; OYAKE, T.; HAYASHI, N.; SATOH, K.; HATAYAMA, I.; YAMAMOTO, M.; NABESHIMA, Y. An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.236, p.313-322, 1997.
- JAMES, S.J.; SLIKKER III, W.; MELNYK, S.; NEW, E.; POGRIBNA, M.; JERNIGAN, S. Thimerosal neurotoxicity is associated with glutathione depletion: protection with glutathione precursors. **Neurotoxicology**, v.26, p.1-8, 2005.
- JIANG, Z.-Y.; HUNT, J.V.; WOLFF, S.P. Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein. **Anal. Biochem.**, v.202, p.384-389, 1992.
- JIANG, Z.-Y.; WOOLLARD, A.C.S.; WOLFF, S.P. Lipid hydroperoxides measurement by oxidation of Fe²⁺ in the presence of xylenol orange. Comparison with the TBA assay and an iodometric method. **Lipids**, v.26, p.853-856, 1991.
- KAJIWARA, Y.; YASUTAKE, A.; ADACHI, T.; HIRAYAMA, K. Methylmercury transport across the placenta via neutral amino acid carrier. **Arch. Toxicol.**, v.70, p.310-314, 1996.
- KAMATA, H.; HIRATA, H. Redox regulation of cellular signaling. **Cell. Signal.**, v.11, p.1-14, 1999.

KANNAN, K.; HOLCOMBE, R.F.; JAIN, S.K.; ALVAREZ-HERNANDEZ, X.; CHERVENAK, R.; WOLF, R.E. Evidence for the induction of apoptosis by endosulfan in a human T-cell leukemic line. **Mol. Cell Biochem.**, v.205, p.53–66, 2000.

KAUR, P.; ASCHNER, M.; SYVERSEN, T. Glutathione modulation influences methyl mercury induced neurotoxicity in primary cell cultures of neurons and astrocytes. **Neurotoxicology**, v.27, p.492-500, 2006.

KEEN, J.H.; HABIG, W.H.; JAKOBY, W.B. Mechanism for several activities of the glutathione S-transferases. **J. Biol. Chem.**, v.251, p.6183-6188, 1976.

KIM, J.P. Methylmercury in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) from Lakes Okareka, Okaro, Rotomahana, Rotorua and Tarawera, North Island, New Zealand. **Sci. Total Environ.**, v.164, p.209-219, 1995.

KIMZEY, A.L.; WEITZ, K.K.; GUENGERICH, F.P.; ZANGAR, R.C. Hydroperoxy-10,12-octadecadienoic acid stimulates cytochrome P450 3A protein aggregation by a mechanism that is inhibited by substrate. **Biochemistry**, v.42, p.12691–12699, 2003.

KIRKMAN, H.N.; ROLFO, M.; FERRARIS, A.M.; GAETANI, G.F. Mechanisms of protection of catalase by NADPH. Kinetics and stoichiometry. **J. Biol. Chem.**, v.274, p.13908-13914, 1999.

KLASSEN *et al.*; 1996 *In*: RODRIGUES, L. C. **Estudo das Glutathione S-Transferases Hepáticas Solúveis do Peixe *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (Pacu)**. Tese de doutorado em Bioquímica, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes/UERJ, Brasil, 2003.

KLEIN, S.M.; COHEN, G.; CEDERBAUM, A.I. Production of Formaldehyde during Metabolism of Dimethyl Sulfoxide by Hydroxyl Radical Generating Systems. **Biochemistry**, v.20, p.6006-6012, 1981.

KLETZIEN, R.F.; HARRIS, P.K.; FOELLM, L.A. Glucose-6-phosphatedehydrogenase: a “housekeeping” enzyme subject to tissue specific regulation by hormones, nutrients, and oxidant stress. **FASEB J.**, v.8, p.174–181, 1994.

KÖNEMANN, H. Fish toxicity tests with mixtures of more than two chemicals: A proposal for a quantitative approach and experimental results. **Toxicology**, v.19, p.229-238, 1981.

KROEMER, G.; DALLAPORTA, B.; RESCHE-RIGON, M. The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. **Annu. Rev.Physiol.**, v.60, p.619–642, 1998.

KÜHN, H.; BORCHERT, A. Regulation of enzymatic lipid peroxidation: the interplay of peroxidizing and peroxide reducing enzymes. **Free Radic. Biol. Med.**, v.33, p.154-172, 2002.

KUNIMOTO, M. Methylmercury induces apoptosis of rat cerebellar neurons in primary culture. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.204, p.310–317, 1994.

KUO, T.C.; LIN-SHIAU, S.Y. Early acute necrosis and delayed apoptosis induced by methyl mercury in murine peritoneal neutrophils. **Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.**, v.94, p.274-281, 2004.

KUSHIDA, M.; SUKATA, T.; UWAGAWA, S.; OZAKI, K.; KINOSHITA, A.; WANIBUCHI, H.; MORIMURA, K.; OKUNO, Y.; FUKUSHIMA, S. Low dose DDT inhibition of hepatocarcinogenesis initiated by diethylnitrosamine in male rats: Possible mechanisms. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v.208, p.285-294, 2005.

LANFRANCHI, A.L.; MENONE, M.L.; MIGLIORANZA, K.S.B.; JANISOT, L.J.; AIZPÚN, J.E.; MORENO, V.J. Striped weakfish (*Cynoscion guatucupa*): A biomonitor of organochlorine pesticides in estuarine and near-coastal zones. **Mar. Pollut. Bull.**, v.52, p.74-80, 2006.

LARINI, L. **Toxicologia**. 3ª ed, Manole, São Paulo, p.172-183, 1997.

LEBEL, C.P.; ALI, S.F.; MCKEE, M.; BONDY, S.C. Organometal induced increases in oxygen reactive species: the potential of 2',7'-dichlorofluorescein diacetate as an index of neurotoxic damage. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v.104, p.17–24, 1990.

LEBLANC, G.A. Trophic-level differences in the bioconcentration of chemicals: Implications in assessing environmental biomagnification. **Environ. Sci. Technol.**, v.29, p.154–160, 1995.

- LEHNINGER, A.L.; NELSON, D. L.; COX, M.M. **Principles of Biochemistry**, 4^a ed, Worth, New York, 2005.
- LEMAIRE, G.; SOUSA, G.; RAHMANI, R. A PXR reporter gene assay in a stable cell culture system: CYP3A4 and CYP2B6 induction by pesticides. **Biochem. Pharmacol.**, v.68, p.2347-2358, 2004.
- LEVINE, R.L.; WILLIAMS, J.A.; STADTMAN, E.P.; SHACTER, E. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. **Methods Enzymol.**, v.233, p.346–357, 1994.
- LI, H.C.; DEHAL, S.S.; KUPFER, D. Induction of the hepatic CYP2B and CYP3A enzymes by the proestrogenic pesticide methoxychlor and by DDT in the rat. Effects on methoxychlor metabolism. **J. Biochem Toxicol.**, v.10, p.51–61, 1995.
- LI, J.; ZHU, T.; WANG, F.; QIU, X.H.; LIN, W.L. Observation of organochlorine pesticides in the air of the Mt. Everest region. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v.63, p.33-41, 2006.
- LI, Y.F.; MACDONALD, R.W. Sources and pathways of selected organochlorine pesticides to the Arctic and the effect of pathway divergence on HCH trends in biota: a review. *Sci. Total Environ.*, v.342, p.87-106, 2005.
- LIN, T.H.; HUANG, Y.L.; HUANG, S.F. Lipid peroxidation in liver of rats administrated with methyl mercuric chloride. **Biol. Trace Elem. Res.**, v.54, p.33-41, 1996.
- LINCER, J.L.; PEAKALL, D.B. Metabolic effects of polychlorinated biphenyls in the American Kestrel. **Nature**, v.228, p.783–784, 1970.
- LIU, J.; YOSHIKAWA, H.; NAKAJIMA, Y.; TASAKA, K. Involvement of mitochondrial permeability transition and caspase-9 activation in dimethyl sulfoxide-induced apoptosis of EL-4 lymphoma cells. **Int. Immunopharmacol.**, v.1, p.63–74, 2001.
- LIVINGSTONE, D.R. Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. **Mar. Pollut. Bull.**, v.42, p.656–666, 2001.
- LOUREIRO, A.P.M.; DI MASCIO, P.; MEDEIROS, M.H.G. Formação de adutos exocíclicos com bases de DNA: implicações em mutagênese e carcinogênese. **Quim. Nova**, v.25, p.777–793, 2002.
- MACKIE, E.J.B.; DWYER, N.K.; VANIER, M.T.; SOKOL, J.; MERRICK, H.F.; COMLY, M.E.; ARGOFF, C.E.; PENTCHEV, P.G.; TYPE, C. Niemann-Pick disease: dimethylsulfoxide moderates abnormal LDL-cholesterol processing in mutant fibroblasts. **Biochim. Biophys. Acta**, v.1006, p.219–226, 1989.
- MANNICK, J.B.; SCHONHOFF, C.M. Nitrosylation: the next phosphorylation? **Arch. Biochem. Biophysics**, v.408, p.1-6, 2002.
- MARNETT, L.J. Oxyradicals and DNA damage. **Carcinogenesis**, v.21, p.361-370, 2000.
- MARTINEZ, G.R.; LOUREIRO, A.P.M.; MARQUES, S.A.; MIYAMOTO, S.; YAMAGUCHI, L.F.; ONUKI, J. ALMEIDA, E.A.; GARCIA, C.C.M.; BARBOSA, L. F.; MEDEIROS, M.H.G.; DI MASCIO, P. Oxidative and alkylating damage in DNA. **Mutat. Res.**, v.544, p.115–127, 2003.
- MEISTER A. Glutathione, ascorbate, and cellular protection. **Cancer Res.**, v.54, p.1969-1975, 1994.
- MEISTER, A. Glutathione metabolism and its selective modification. **J. Biol. Chem.**, v.263, p.17205–17208, 1988.
- MELA, M.; RANDI, M.A.F. ; VENTURA, D.F. ; CARVALHO, C.E.V. ; PELLETIER, E.; OLIVEIRA RIBEIRO, C.A. Effects of dietary methylmercury on liver and kidney histology in the neotropical fish *Hoplias malabaricus*. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, In Press, Corrected Proof, 2007.
- MERAD-SAIDOUNE, M.; BOITIER, A.; NICOLE, C.; MARSAC, C.; MARTINO, J.C.; SOLA, B.; SINET, P-M.; CEBALLOS-PICOT, I. Overproduction of Cu/Zn-superoxide dismutase or Bcl-2 prevents the brain mitochondrial respiratory dysfunction induced by glutathione depletion. **Exp. Neurol.**, v.158, p.428-436, 1999.
- MIRANDA, A.L.C. **Bioacumulação de poluentes organopersistentes (POPs) em *Hoplias malabaricus* e seus efeitos *in vitro* em células do sistema imune de *Cyprinus carpio*.**

Dissertação de mestrado em Biologia Celular e Molecular, Universidade federal do Paraná, Brasil, 2006.

MITAKA, T.; SATTLER, G.L.; PITOT, H.C. The bicarbonate ion is essential for efficient DNA synthesis by primary cultured rat hepatocytes. **In Vitro Cell Dev Biol**, v.27A, p.549-556, 1991.

MOKRZAN, E.M.; KERPER, L.E.; BALLATORI, N.; CLARKSON, T.W. Methylmercury-thiol uptake into cultured brain capillary endothelial-cells on amino-acid system-L. **J. Pharmacol. Exp. Therap.**, v.272, p.1277-1284, 1995.

MOL, J.H.; RAMLAL, J.S.; LIETAR, C.; VERLOO, M. Mercury Contamination in Freshwater, Estuarine, and Marine Fishes in Relation to Small-Scale Gold Mining in Suriname, South America. **Environ. Res.**, v.86, p.183-197, 2001.

MOMMSEN, T.P.; MOON, T.W.; WALSH, P.J. Hepatocytes: isolation, maintenance and utilization. *In*: HOCHACHKA, P.W.; MOMMSEN, T.P. (Eds), **Biochemistry and Molecular Biology of Fishes**, Analytical Techniques. Elsevier, Amsterdam. v.3, p.355-372, 1994.

MONTINE, K.S.; QUINN, J.F.; ZHANG, J.; FESSEL, J.P.; ROBERTS, L.J.; MORROW, J.D.; MONTINE, T.J. Isoprostanes and related products of lipid peroxidation in neurodegenerative diseases. **Chem. Phys. Lipids**, v.128, p.117-124, 2004.

MOTOHASHI, H.; YAMAMOTO, M. Nrf2-Keap1 defines a physiologically important stress response mechanism. **Trends Mol. Med.**, v.10, p.549-557, 2004.

MOYE-ROWLEY, W.S. Transcription factors regulating the response to oxidative stress in yeast. **Antioxid. Redox Signal.**, v.4, p.123-140, 2002.

NAIR, V.; OFFERMAN, R.J. Ring-extended products from the reaction of epoxy carbonyl-compounds and nucleic-acid bases. **J. Org. Chem.**, v.50, p.5627-5631, 1985.

NAKAMURA, T.; TOMITA, Y.; ICHIHARA, A. Density-dependent growth control of adult rat hepatocytes in primary culture. **J. Biochemistry**, v.94, p.1029-1035, 1983.

NAKAO, L.S. Disciplina do programa de pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, UFPR. **Radicais livres e espécies reativas em sistemas biológicos**, 2006.

NEWSOME, W.H.; ANDREWS, P. Organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyl congeners in commercial fish from the Great Lakes. **J AOAC Int.**, v.76, p.707-710, 1993.

NHAN, D.D.; AM, N.M.; HOI, N.C.; VAN, D.L.; CARVALHO, F.P.; VILLENEUVE, J.-P.; CATTINI, C. Organochlorine pesticides and PCBs in the Red River delta, North Vietnam. **Mar. Pollut. Bull.**, v.36, p.742-749, 1998.

NIKI, E.; NOGUCHI, N.; GOTOH, N. Dynamics of lipid peroxidation and its inhibition by antioxidants. **Biochem. Soc. Trans.**, v.21, p.313-317, 1993.

NISHIOKU, T.; TAKAI, N.; MIYAMOTO, K.; MURAO, K.; HARA, C.; YAMAMOTO, K.; NAKANISHI, H. Involvement of caspase 3-like protease in methylmercury-induced apoptosis of primary cultured rat cerebral microglia. **Brain Res.**, v.871, p.160-164, 2000.

NOHL, H.; ESTERBAUER, H.; RICE-EVANS, C. **Free Radicals in the Environment, Medicine and Toxicology**. The Richelieu Press, London, 1994.

NORDBERG, J.; ARNÉR, E.S.J. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. **Free Radic. Biol. Med.**, v.31, p.1287-13121, 2001.

NUMAN, I.T.; HASSAN, M.Q.; STOHS, S.J. Endrin induced depletion of glutathione and inhibition of glutathione peroxidase activity in rats. **Gen. Pharmacol.**, v.21, p.625-628, 1990a.

NUMAN, I.T.; HASSAN, M.Q.; STOHS, S.J. Protective effects of antioxidants against endrin-induced lipid peroxidation, glutathione depletion and lethality in rats. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.**, v.19, p.302-306, 1990b.

NYGREN, P.; LARSSON, R.; RASTAD, J.; AKERSTROM, G.; GYLFE, E. Dimethylsulfoxide increases cytoplasmic Ca²⁺ concentration and inhibits parathyroid hormone release in normal bovine and pathological human parathyroid cells. **Biochim. Biophys. Acta.**, v.928, p.194-198, 1987.

- OKOUMASSOUN, L-E.; AVERILL-BATES, D.; GAGNÉ, F.; MARION, M.; DENIZEAU, F. Assessing the estrogenic potential of organochlorine pesticides in primary cultures of male rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocyte using vitellogenin as a biomaker. **Toxicology**, v.178, p.193-207, 2002.
- OKOUMASSOUN, L-E.; AVERILL-BATES, D.; MARION, M.; DENIZEAU, F. Possible mechanisms underlying the mitogenic action of heptachlor in rat hepatocytes. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v.193, p.356–369, 2003.
- OLGUN, S.; GOGAL, R.M.Jr.; ADESHINA, F.; CHOUDHURY, H.; MISRA, H.P. Pesticide mixtures potentiate the toxicity in murine thymocytes. **Toxicology**, v.196, p.181-195, 2004.
- OLIVEIRA RIBEIRO, C.A.; FILIPAK NETO, F.; MELA, M.; SILVA, P.H.; RANDI, M.A.F.; RABITTO, I.S.; ALVES COSTA, J R.M.; PELLETIER, E. Hematological findings in neotropical fish *Hoplias malabaricus* exposed to subchronic and dietary doses of methylmercury, inorganic lead, and tributyltin chloride. **Environ. Res.**, v.101, p.74-80, 2006.
- OLIVEIRA RIBEIRO, C.A.; VOLLAIRE, Y.; SANCHEZ-CHARDI, A.; ROCHE, H. Bioaccumulation and the effects of organochlorine pesticides, PAH and heavy metals in the Eel (*Anguilla anguilla*) at the Camargue Nature Reserve, France. **Aquat Toxicol.**, v.74, p.53-69, 2005.
- OLIVERO-VERBEL, J.; BALDIRIS-ÁVILA, R.; GÜETTE-FERNÁNDEZ, J.; BENAVIDES-ALVAREZ, A.; MERCADO-CAMARGO, J.; ARROYO-SALGADO, B. *Contracaecum* sp. infection in *Hoplias malabaricus* (moncholo) from rivers and marshes of Colombia. **Vet. Parasitol.**, v.140, p.90-97, 2006.
- OLIVIERI, G.; BRACK, C.; MULLER-SPAHN, F.; STAHELIN, H.B.; HERRMANN, M.; RENARD, P.; BROCKHAUS, M.; HOCK, C. Mercury induces cell cytotoxicity and oxidative stress and increases beta-amyloid secretion and tau phosphorylation in SHSY5Y neuroblastoma cells. **J. Neurochem.**, v.74, p.231-236, 2000.
- PALMER, R.M.J.; FERRIGE, A.G.; MONCADA, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. **Nature**, v.327, p.524-526, 1987.
- PANDIT, G.G.; SAHU, S.K.; SHARMA, S.; PURANIK, V.D.; 2006. Distribution and fate of persistent organochlorine pesticides in coastal marine environment of Mumbai. **Environ. Int.**, v.32, p.240-243, 2006.
- PARVEZ, S.; RAISUDDIN, S. Protein carbonyls: novel biomarkers of exposure to oxidative stress-inducing pesticides in freshwater fish *Channa punctata* (Bloch). **Environ. Toxicol. Pharmacol.**, v.20, p.112-117, 2005.
- PASTORE, A.; FEDERICI, G.; BERTINI, E.; PIEMONTE, F. Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. **Clin. Chim. Acta**, v.333, p.19-39, 2003.
- PAZOU, E.Y.A.; LALÈYÈ, P.; BOKO, M.; VAN GESTEL, C.A.M.; AHISSOU, H.; AKPONA, S.; VAN HATTUM, B.; SWART, K.; VAN STRAALLEN, N.M. Contamination of fish by organochlorine pesticide residues in the Ouémé River catchment in the Republic of Bénin. **Environ. Int.**, v.32, p.594-599, 2006.
- PÉREZ-MALDONADO, I.N.; DÍAZ-BARRIGA, F.; DE LA FUENTE, H.; GONZÁLEZ-AMARO, R.; CALDERÓN, J.; YÁÑEZ, L. DDT induces apoptosis in human mononuclear cells in vitro and is associated with increased apoptosis in exposed children. **Environ. Res.**, v.94, p.38-46, 2004.
- PESONEN, M.; ANDERSSON, T. Characterization and induction of xenobiotic metabolizing enzyme activities in a primary culture of rainbow trout hepatocytes. **Xenobiotica**, v.21, p.461–471, 1991.
- PESONEN, M.; ANDERSSON, T. Primary hepatocyte cultures: an important model of xenobiotic metabolism. **Aquat. Toxicol.**, v.39, p.253–267, 1997.
- PETIT, F.; LE, G.-P.; CRAVEDI, J.P.; VALOTAIRE, Y.; PAKDEL, F. Two complementary bioassays for screening the estrogenic potency of xenobiotics, recombinant yeast for trout estrogen receptor and trout hepatocyte cultures. **J. Mol. Endocrinol.**, v.19, p.321–335, 1997.
- PORTER, T.D.; COON, M.J. Cytochrome P-450: Multiplicity of isoforms, substrates and catalytic and regulatory mechanism. **J. Biol. Chem.**, v.266, p.13469–13472, 1991.

- PORTO, J.I.R.; ARAUJO, C.S.O.; FELDBERG, E. Mutagenic effects of mercury pollution as revealed by micronucleus test on three Amazonian fish species. **Environ. Res.**, v.97, p.287-292, 2005.
- PRINCEN, H.M.G.; MEIJER, P. Maintenance of bile acid synthesis and cholesterol 7 - hydroxylase activity in cultured rat hepatocytes. **Biochem. J.**, v.272, p.173-275, 1990.
- PURI, S.; KOHLI, K. K. Differences in hepatic metabolizing enzymes and their response to lindane in rat, rabbit and monkey. **Pharmacol. Toxicol.**, v.77, p.136-141, 1995.
- QIAN, S.Y.; KADIISKA, M.B.; GUO, Q.; MASON, R.P. A novel protocol to identify and quantify all spin trapped free radicals from in vitro/in vivo interaction of HO· and DMSO: LC/ESR, LC/MS, and dual spin trapping combinations. **Free Radic. Biol. Med.**, v.38, p.125-135, 2005.
- QUERAL, A.E.; DEANGELO, A.B.; GARRETT, C.T. Effect of different collagenases on the isolation of viable hepatocytes from rat liver. **Anal Biochem**, v.138, p.235-237, 1984.
- QUINLAN, G.J.; GUTTERIDGE, J.M.C. Carbonyl assay for oxidative damage to proteins. *In*: TANIGUCHI, N.; GUTTERIDGE, J.M.C. (Eds), **Experimental protocols for reactive oxygen and nitrogen species**. Oxford University, New York, p.257-258, 2000.
- RABITTO, I.S.; ALVES COSTA, J.R.M.; SILVA DE ASSIS, H.C.; PELLETIER, È.; AKAISHI, F.M.; ANJOS, A.; RANDI, M.A.F.; OLIVEIRA RIBEIRO, C.A. Effects of dietary Pb(II) and tributyltin on neotropical fish, *Hoplias malabaricus*: histopathological and biochemical findings. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v.60, p.147-156, 2005.
- RAINWATER, R.; PARKS, D.; ANDERSON, M.E.; TEGTMEYER, P.; MANN, K. Role of cysteine residues in regulation of p53 function. **Mol. Cell Biol.**, v.15, p.3892-3903, 1995.
- REDMAYNE, A.C.; KIM, J.P.; CLOSS G.P.; HUNTER K.A. Methyl mercury bioaccumulation in long-finned eels, *Anguilla dieffenbachii*, from three rivers in Otago, New Zealand. **Sci. Total Environ.**, v.262, p.37-47, 2000.
- REGOLI, F.; NIGRO, M.; ORLANDO, E. Lysosomal and antioxidant responses to metals in the Antarctic scallop *Adamussium colbecki*. **Aquat. Toxicol.**, v.40, p.375-392, 1998.
- REID, S.G.; SUNDIN, L.; KALININ, A.L.; TADEU RANTIN, F.; MILSOM, W.K. Cardiovascular and respiratory reflexes in the tropical fish, traíra (*Hoplias malabaricus*): CO₂/pH chemoresponses. **Respir Physiol**, v.120, p.47-59, 2000.
- REQUENA, J.R.; FU, M.X.; AHMED, M.U.; JENKINS, A.J.; LYONS, T.J.; BAYNES, J.W.; THORPE, S.R. Quantification of malondialdehyde and 4-hydroxynonenal adducts to lysine residues in native and oxidized human low-density lipoprotein. **Biochem. J.**, v.322, p.317-325, 1997.
- REQUENA, J.R.; LEVINE, R.L.; STADTMAN, E.R. Recent advances in the analysis of oxidized proteins. **Amino Acids**, v.25, p.221-226, 2003.
- REUBER, M.D. Carcinogenicity of heptachlor and heptachlor epoxide. **J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.**, v.7, p.85-114, 1987.
- REY, L. **Parasitologia**, 2ª ed. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 1991.
- RIOS, F.S.; OBA, E.T.; FERNANDES, M.N.; KALININ, A.L.; RANTIN, F.T. Erythrocyte senescence and haematological changes induced by starvation in the neotropical fish traíra, *Hoplias malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae). **Comp. Biochem. Physiol., Part A Mol. Integr. Physiol.**, v.140, p.281-287, 2005.
- RIOS, F.S.A. **Metabolismo energético de *Hoplias malabaricus* (BLOCH, 1794) (Erythrinidae) submetidas à privação de alimento e à realimentação**. Tese de doutorado em Ecologia e Recursos Naturais, Universidade Federal de São Carlos, Brasil, 104f., 2001.
- RODRIGUES, L. C. **Estudo das glutation s-transferases hepáticas solúveis do peixe *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (Pacu)**. Tese de doutorado em Bioquímica, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes/UERJ, Brasil, 2003.
- RODRIGUEZ-ARIZA, A.; MARTINEZ-LARA, E.; PASCUAL, P.; PEDRAJAS, J.R.; ABRIL, N.; DORADO, G.; TORIBIO, F.; BARCENA, J.A.; PEINADO, J.; PUEYO, C.; LOPEZ-BAREA, J.

- Biochemical and genetic indices of marine pollution in Spanish littoral. **Sci. Total Environ.**, n°1, 109–116, 1993.
- ROMÉO, M.; GNASSIA-BARELLI, M. Effect of Heavy Metals on Lipid Peroxidation in the Mediterranean Clam *Ruditapes decussates*. **Comp. Biochem. Physiol. C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.**, v.118, p.33-37, 1997.
- ROONEY, J.P.K. The role of thiols, dithiols, nutritional factors and interacting ligands in the toxicology of mercury. **Toxicology**, v.234, p.145-156, 2007.
- ROYALL, J.A.; ISCHIROPOULOS, H. Evaluation of 2'7'-dichlorofluorescein and dihydrorhodamine-123 as fluorescent probes for intracellular H₂O₂ in cultured endothelial cells. **Arch. Biochem. Biophys.**, v.302, p.348-355, 1993.
- RYTER, S.W.; TYRRELL, R.M. The heme synthesis and degradation pathways: role in oxidant sensitivity. **Free Radic. Biol. Med.**, v.28, p.289–309, 2000.
- SAKAHIRA, H.; ENARI, M.; NAGATA, S. Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. **Nature**, v.391, p.96-99, 1998.
- SANFELIU, C.; SEBASTIA, J.; KI, S.U. Methylmercury neurotoxicity in cultures of human neurons, astrocytes, neuroblastoma cells. **Neurotoxicology**, v.22, p.317–327, 2001.
- SAPOZHNIKOVA, Y.; BAWARDI, O.; SCHLENK, D. Pesticides and PCBs in sediments and fish from the Salton Sea, California, USA. **Chemosphere**, v.55, p.797-809, 2004.
- SAPOZHNIKOVA, Y.; ZUBCOV, N.; HUNGERFORD, S.; ROY, L.A.; BOICENCO, N.; ZUBCOV, E.; SCHLENK, D. Evaluation of pesticides and metals in fish of the Dniester River, Moldova. **Chemosphere**, v.60, p.196-205, 2005.
- SARGAZI, M.; SHENKIN, A.; ROBERTS, N.B. Aluminium-induced injury to kidney proximal tubular cells: Effects on markers of oxidative damage. **J. Trace Elem. Med. Biol.**, v.19, p.267-273, 2006.
- SASSA, S. Delta-aminolevulinic acid dehydratase assay. **Enzyme**, v.28, p.133-145, 1982.
- SCHAFFER, F.Q.; BUETTNER, G.R. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. **Free Radic. Biol. Med.**, v.30, p.1191-1212, 2001.
- SCIPPO, M.L.; ARGIRIS, C.; VAN DE WEERDT, C.; MULLER, M.; WILLEMSSEN, P.; MARTIAL, J.; MAGHUIN-ROGISTER, G. Recombinant human estrogen, androgen and progesterone receptors for detection of potential endocrine disruptors. **Anal. Bioanal. Chem.**, v.25, p.25, 2003.
- SCRIBNER, J.D.; MOTTET, N.K. DDT acceleration of mammary gland tumors induced in the male Sprague–Dawley rat by 2-acetaminophenathrene. **Carcinogenesis**, v.2, p.1235–1239, 1981.
- SEBRENSKI SILVA, G. **Uso de biomarcadores morfológicos e bioquímicos para a avaliação da ação tóxica do mercúrio em peixes da espécie *Hoplias malabaricus* (BLOCK, 1794) na usina hidrelétrica de Samuel-Rondônia.** Dissertação de mestrado em Biologia Celular e Molecular, Universidade federal do Paraná, Brasil, 2007.
- SEDDON, W.L.; PROSSER, C.L. Non-enzymatic isolation and culture of channel catfish hepatocytes. **Comp. Biochem. Physiol.**, v.123A, p.9-15, 1999.
- SEDLAK, J.; LINDSAY, R.H. Estimation of total protein bound and nonprotein sulphhydryl groups in tissues with Ellman's reagent. **Anal. Biochem.**, v.25, p.192-205, 1968.
- SEGNER, H. Isolation and primary culture of teleost hepatocytes. **Comp. Biochem. Physiol.**, v.120A, p.71-81, 1998.
- SHANKER, G.; ALLEN, J.W.; MUTKUS, L.A.; ASCHNER, M. Methylmercury inhibits cysteine uptake in cultured primary astrocytes, but not in neurons. **Brain Res.**, v.914, p.159–165, 2001.
- SHANKER, G.; ASCHNER, J.L.; SYVERSEN, T.; ASCHNER, M. Free radical formation in cerebral cortical astrocytes in culture induced by methylmercury. **Mol. Brain Res.**, v.128, p.48-57, 2004.

- SHANKER, G.; ASCHNER, M. Identification and characterization of uptake systems for cystine and cysteine in cultured astrocytes and neurons: evidence for methylmercury-targeted disruption of astrocytic transport. **J. Neurosci. Res.**, v.66, p.998-1002, 2001.
- SHANKER, G.; MUTKUS, L.A.; WALKER, S.J.; ASCHNER, M. Methylmercury enhances arachidonic acid release and cytosolic phospholipase A2 expression in primary cultures of neonatal astrocytes. **Mol. Brain Res.**, v.106, p.1-11, 2002.
- SHANKER, G.; SYVERSEN, T.; ASCHNER, J.L.; ASCHNER, M. Modulatory effect of glutathione status and antioxidants on methylmercury-induced free radical formation in primary cultures of cerebral astrocytes. **Mol. Brain Res.**, v.137, p.11-22, 2005.
- SHANKER, G.; SYVERSEN, T.; ASCHNER, M. Astrocyte-mediated methylmercury neurotoxicity. **Biol. Trace Elem. Res.**, v.95, p.1-10, 2003.
- SHARIFI, M.; CONNELL, W.D.; GABRIC, A. **Influence of Dietary Fat on the Intestinal Absorption of Lipophilic Compounds in Goldfish (*Carassius auratus*)**. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v.38, p.316-321, 1997.
- SHARMA, M.K.; PATNI, R.; KUMAR, M.; KUMAR, A. Modification of mercury-induced biochemical alterations in blood of Swiss albino mice by *Spirulina fusiformis*. **Environ. Toxicol. Pharmacol.**, v.20, p.289-296, 2005.
- SHENKER, B.J.; GUO, T.L.; INSUG, O.; SHAPIRO, I.M. Induction of apoptosis in human T-cells by methylmercury: temporal relationship between mitochondrial dysfunction and loss of reductive reserve. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v.157, p.23-35, 1999.
- SHENKER, B.J.; GUO, T.L.; SHAPIRO, I.M. Low-level methylmercury exposure causes human T-cells to undergo apoptosis: evidence of mitochondrial dysfunction. **Environ. Res.**, v.77, p.149-159, 1998.
- SHENKER, B.J.; GUO, T.L.; SHAPIRO, I.M. Mercury-induced apoptosis in human lymphoid cells: evidence that the apoptotic pathway is mercurial species dependent. **Environ. Res. Section A**, v.84, p.89-99, 2000.
- SHI, H.; SUI, Y.; WANG, X.; LUO, Y.; JI, L. Hydroxyl radical production and oxidative damage induced by cadmium and naphthalene in liver of *Carassius auratus*. **Comp Biochem Physiol Part C**, v.140, p.115-121, 2005.
- SHINALL, H.; SONG, E.S.; HERSH, L.B. Susceptibility of amyloid beta peptide degrading enzymes to oxidative damage: a potential Alzheimer's disease spiral. **Biochem.**, v.44, p.15345-15350, 2005.
- SHINYASHIKI, M.; KUMAGAI, Y.; HOMMA-TAKEDA, S.; NAGAFUNE, J.; TAKASAWA, N.; SUZUKI, J.; MATSUZAKI, I.; SATOH, S.; SAGAI, M.; SHIMOJO, N. Selective inhibition of the mouse brain Mn-SOD by methylmercury. **Environ. Toxicol. Pharmacol.**, v.2, p.359-366, 1996.
- SIES, H.; KOCH, O.R.; MARTINO, E.; BOVERIS, A. Increased biliary glutathione disulfide release in chronically ethanol-treated rats. **FEBS Letters**, v.103, p.287-290, 1979.
- SIMONETTI, J.; BERNER, J.; WILLIAMS, K. Effects of *p,p'*-DDE on immature cells in culture at concentrations relevant to the Alaskan environment. **Toxicol. In Vitro**, v.15, p.169-179, 2001.
- SIMPSON, R.B. Association constants of methylmercury with sulfhydryl and other bases. **J. Am. Chem. Soc.**, v.83, p.4711-4717, 1961.
- SINGH, N.P.; MCCOY, M.T.; TICE, R.R.; SCHNEIDER, E.L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Exp. Cell Res.**, v.175, p.184-191, 1988.
- SINGH, Y.; COOKE, J.B.; HINTON, D.E.; MILLER, M.G. Trout liver slices for metabolism and toxicity studies. **Drug Metab. Dispos.**, v.24, p.7-14, 1996.
- SKETT, P. Problems in using isolated and cultured hepatocytes for xenobiotic metabolism: metabolism-based toxicity testing-solutions? **Toxicol In Vitro**, v.8, p.491-504, 1994.
- SOTO, A.M.; CHUNG, K.L.; SONNENSCHNEIN, C. The pesticides endosulfan, toxaphene, and dieldrin have estrogenic effects on human estrogen-sensitive cells. **Environ. Health Perspect.**, v.102, p.380-383, 1994.

- SOUZA LIMA, A.P.; SOUZA SARKIS, J.E.; SHIHOMATSU, H.M.; MÜLLER, R.C.S. Mercury and selenium concentrations in fish samples from Cachoeira do Piriá Municipality, Pará State, Brazil. **Environ. Res.**, v.97, p.236-244, 2005.
- STADTMAN, E. R.; LEVINE, R. L. Protein oxidation. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v.899, p.191–208, 2000.
- STEGEMAN, J.J.; MILLER, M.R.; WOODIN, B.R.; BLAIR, J.B. Effect of β -naphthoflavone on multiple cytochrome P450 forms in primary cultures of rainbow trout hepatocytes. **Mar. Environ. Res.**, v.35, p.209, 1993.
- STENESH, J. **Dictionary of biochemistry and molecular biology**, 2nd ed., John Wiley & sons, New York, 525p, 1989.
- STERN, A. Red cell oxidative damage. In: SIES, H. (Ed.), **Oxidative Stress**. Academic Press, London, p.331, 1985.
- STOHS, S.J.; BAGCHI, D. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. **Free Radic. Biol. Med.**, v.18, p.321-336, 1995
- STORELLI, M.M.; BARONE, G.; GAROFALO, R.; MARCOTRIGIANO, G.O. Metals and organochlorine compounds in eel (*Anguilla anguilla*) from the Lesina lagoon, Adriatic Sea (Italy). **Food Chem.**, v.100, p.1337-1341, 2007.
- STORELLI, M.M.; MARCOTRIGIANO, G.O. Occurrence and accumulation of organochlorine contaminants in swordfish from Mediterranean Sea: A case study. **Chemosphere**, v.62, p.375-380, 2006.
- STRMAC, M.; BRAUNBECK, T. Cytological and biochemical effects of a mixture of 20 pollutants on isolated rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v.53, p.293-304, 2002.
- SUKATA, T.; UWAGAWA, S.; OZAKI, K.; OGAWA, M.; NISHIKAWA, T.; IWAI, S.; KINOSHITA, A.; WANIBUCHI, H.; IMAOKA, S.; FUNAE, Y.; OKUNO, Y.; FUKUSHIMA, S. Detailed low-dose study of 1,1-bis(*p*-chlorophenyl)-2,2,2-trichloroethane carcinogenesis suggests the possibility of a hormetic effect. **Int. J. Cancer**, v.99, p.112-118, 2002.
- SUMPTER, J.P. Feminized responses in fish to environmental estrogens. **Toxicol. Lett.**, v.82-83, p.737–742, 1995.
- SUNDARESAN, M.; YU, Z-X.; FERRANS, V.J.; IRANI, K.; FINKEL, T. Requirement for Generation of H₂O₂ for Platelet-Derived Growth Factor Signal Transduction. **Science**, v.270, p.296-299, 1995.
- SUNDIN, L.I.; REID, S.G.; KALININ, A.L.; RANTIN, F.T.; MILSOM, W.K. Cardiovascular and respiratory reflexes: the tropical fish, traíra (*Hoplias malabaricus*) O₂ chemoresponses. **Respir Physiol**, v.116, p.181-199, 1999.
- SVINGEN, B.A.; BUEGE, J.A.; O'NEAL, F.O.; AUST, S.D. The mechanism of NADPH-dependent lipid peroxidation. The propagation of lipid peroxidation. **J. Biol. Chem.**, v.254, p.5892–5899, 1979.
- SWAMY, S.M.; HUAT, B.T. Intracellular glutathione depletion and reactive oxygen species generation are important in alpha-hederin induced apoptosis of P388 cells. **Mol. Cell. Biochem.**, v.245, p.127-139, 2003.
- TANG, J.K.; USMANI, A.; HODGSON, E.; ROSE, R.L. In vitro metabolism of fipronil by human and rat cytochrome P450 and its interactions with testosterone and diazepam. **Chem. Biol. Interact.**, v.147, p.319-329, 2004.
- TANIGUCHI, N.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Lipid peroxides, in experimental protocols for reactive oxygen and nitrogen species**. Oxford University Press, Oxford, 2000.
- TEBOURBI, O.; RHOUMA, K.B.; SAKLI, M. DDT induces apoptosis in rat thymocytes. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, v.61, p.216–223, 1998.
- TEMPLE, M.D.; PERRONE, G.G.; DAWES, I. W. Complex cellular responses to reactive oxygen species. **Trends Cell Biol.**, v.15, p.319-326, 2005.

- TEW, K.D.; RONAI, Z. **GST function in drug and stress response**. Harcourt Publishers Ltd Drug Resistance Updates, v.2, p.143–147, 1999.
- TOGNI, V.; OTA, C.C.C.; FOLADOR, A.; TCHAIKOVSKI, JR. O.; AIKAWA, J.; YAMAZAKI, R.K.; FREITAS, F.A.; LONGO, R.; MARTINS, E.F.; CALDER, P.C.; CURI, R.; FERNANDES, L.C. Cancer cachexia and tumor growth reduction in walker 256 tumor-bearing rats supplemented with n-3 polyunsaturated fatty acids for one generation. **Nutr. Cancer**, v.46, p.52-58, 2003.
- TORRES, J.P.M.; PFEIFFER, W.C.; MARKOWITZ, S.; PAUSE, R.; MALM, O.; JAPENGA, J. Dichlorodiphenyltrichloroethane in Soil, River Sediment, and Fish in the Amazon in Brazil. **Environ. Res.**, v.88, p.134-139, 2002.
- UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ. Sistema de Bibliotecas. Normas para apresentação de documentos científicos, v.2, 6, 7, 9, 10. Editora da UFPR, Curitiba, 2000¹⁵⁴.
- UVERSKY, V.N.; LI, J.; BOWER, K.; FINK, A.L. Synergistic effects of pesticides and metals on the fibrillation of α -synuclein: implications for Parkinson's disease. **Neurotoxicology**, v.23, p.527-536, 2002.
- VALLE, C.M.; SANTANA, G.P.; AUGUSTI, R.; EGREJA FILHO, F.B.; WINDMOLLER, C.C. Speciation and quantification of mercury in Oxisol, Ultisol, and Spodosol from Amazon (Manaus, Brazil). **Chemosphere**, v.58, p.779-792, 2005.
- VAN BLADEREN, P.J. Glutathione conjugation as a bioactivation reaction. **Chem. Biol. Interact.**, v.129, p.61–76, 2000.
- VAN BLADEREN, P.J.; VAN DER GEN, A.; BREIMER, D.D.; MOHN, G.R. Stereoselective activation of vicinal dihalogen compounds by glutathione conjugation. **Biochem. Pharmacol.**, v.28, p.2521–2524, 1979.
- VAN GESTEL, C.A.M.; VAN BRUMMELEN, T.C. Incorporation of the biomarker concept in ecotoxicology calls for a redefinition of terms. **Ecotoxicology**, v.5, 217-225, 1996.
- VERITY, M.A.; SARAFIAN, T.; PACIFICI, E.H.; SEVANIAN, A. Phospholipase A2 stimulation by methyl mercury in neuron culture. **J. Neurochem.**, v.62, p.705-714, 1994.
- VOEHRINGER, D.W. Bcl-2 and glutathione: alterations in cellular redox state that regulate apoptosis sensitivity. **Free Radic. Biol. Med.**, v.27, p.945-950, 1999.
- VONDRÁČEK, J.; SOUČEK, K.; SHEARD, M.A.; CHRAMOSTOVÁ, K.; ANDRYSÍK, Z.; HOFMANOVÁ, J.; KOZUBÍK, A. Dimethyl sulfoxide potentiates death receptor-mediated apoptosis in the human myeloid leukemia U937 cell line through enhancement of mitochondrial membrane depolarization. **Leuk. Res.**, v.30, p.81–89, 2006.
- WALKE R, R.P.; OKILEVA, L. K.; LEBLANC AND, J.; SIKORSKA, M. Detection of the initial stages of DNA fragmentation in apoptosis. **Biotechniques**, v.15, p.1032-1036, 1993.
- WANG, W.; BALLATORI, N. Endogenous glutathione conjugates: occurrence and biological functions. **Pharmacol Rev.**, v.50, p.335–355, 1998.
- WANG, X.; WANG, W-X. Uptake, absorption efficiency and elimination of DDT in marine phytoplankton, copepods and fish. **Environ. Pollut.**, v.136, p.453-464, 2005.
- WANIA, F.; MACKAY, D. Global fractionation and cold condensation of volatile organochlorine compounds in Polar Regions. **AMBIO**, v.22, p.10–18, 1993.
- WARD, N.E.; PIERCE, D.S.; CHUNG, S.E.; GRAVITT, K.R.; O'BRIAN, C.A. Irreversible inactivation of protein kinase C by glutathione. **J Biol Chem.**, v.273, p.12558–12566, 1998.
- WARREN, N.; ALLAN, I.J.; CARTER, J.E.; HOUSE, W.A.; PARKER, A. Pesticides and other micro-organic contaminants in freshwater sedimentary environments – a review. **Appl Geochem.**, v.18, p.159-194, 2003.
- WEI, T.; CHEN, C.; LI, F.; ZHAO, B.; HOU, J.; XIN, W.; MORI, A. Antioxidant properties of EPC-K1: a study on mechanisms. **Biophys. Chem.**, v.77, p.153-160, 1999.

¹⁵⁴ Normas seguidas para a apresentação da presente tese.

- WEISIGER, R. A.; FRIDOVICH, I. Mitochondrial superoxide dismutase: site of synthesis and intramitochondrial localization. **J. Biol. Chem.**, v.248, p.4793–4796, 1973.
- WHEELER, G.L.; GRANT, C.M. Regulation of redox homeostasis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Physiol. Plant.**, v.120, p.12–20, 2004.
- WHO, Environmental Health Criteria, v.83: **DDT and its derivatives – Environmental effects**, World Health Organization, Geneva, 1989.
- WILHELM, D.; BENDER, K.; KNEBEL ANGEL, P. The level of intracellular glutathione is a key regulator for the induction of stress-activated signal transduction pathways including jun N-terminal protein kinases and p38 kinase by alkylating agents. **Mol Cell Biol.**, v.17, p.4792–4800, 1997.
- WU, G. Methylmercury–cysteine uptake by rat erythrocytes: evidence for several transport systems. **J. Appl. Toxicol.**, 16, p.77–83, 1996.
- YANG, R.S.H. Introduction to the toxicology of chemical mixtures. *In*: YANG, R.S.H. (Ed.), **Toxicology of Chemical Mixtures: Case Studies, Mechanisms and Novel Approaches**. Academic Press, New York, p.1–10, 1994.
- YEE, S.; CHOI, B.H. Methylmercury poisoning induces oxidative stress in mouse brain. **Exp. Mol. Pathol.**, v.60, p.188-196, 1994.
- YEE, S.; CHOI, B.H. Oxidative stress in neurotoxic effects of methylmercury poisoning. **Neurotoxicology**, v.17, p.17-26, 1996.
- YLÄ-HERTTUALA, S. Oxidized LDL and atherogenesis. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, v.874, p.134-137, 1999.
- ZAIA, D.A.M.; ZAIA, C.T.B. V., LICHTIG, J. Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. **Quím Nova**, v.21, p.787-793, 1998.
- ZALUPS, R.K.; LASH, L.H. Interactions between glutathione and mercury in the kidney, liver and blood. **Toxicology of Metals**. CRC Press, Boca Raton, FL, p.145–163, 1996.
- ZÁMOCKÝ, M.; KOLLER, F. Understanding the structure and function of catalases: clues from molecular evolution and in vitro mutagenesis. **Prog. Biophys Mol Biol.**, v.72, p.19-66, 1999.
- ZANGAR, R.C.; DAVYDOV, D.R.; VERMA, S. Mechanisms that regulate production of reactive oxygen species by cytochrome P450. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v.199, p.316-331, 2004.
- ZHU, H.; ZHANG, L.; ITOH, K.; YAMAMOTO, M.; ROSS, D.; TRUSH, M.A.; ZWEIER, J.L.; LI, Y. Nrf2 controls bone marrow stromal cell susceptibility to oxidative and electrophilic stress. **Free Radic. Biol. Med.**, v.41, p.132–143, 2006.
- ZIGLIO, L.; COMEGNA, M.A. **Segurança química no Brasil: As convenções de Roterdã e Estocolmo**. Estudos geográficos, Rio Claro, v.2, p.47-55, 2004.
- ZUCCO, F.; ANGELIS, I.; TESTAI, E.; STAMMATI, A. Toxicology investigations with cell culture systems: 20 years after. **Toxicol In Vitro**, v.18, p.153-163, 2004.