

DANIEL BUSSOLARO

**DIFERENTES ABORDAGENS PARA A AVALIAÇÃO DA EXPOSIÇÃO
DE PEIXES DE ÁGUA DOCE AO MeHg, PCBs, PESTICIDAS
ORGANOCLORADOS E NANOPARTÍCULAS DE PRATA**

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 Ciências, Área de Concentração: Biologia Celular e Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro


CURITIBA
2010


PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA
CELULAR E MOLECULAR

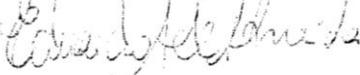
Departamento de Biologia Celular e Departamento de Fisiologia
Setor de Ciências Biológicas
Universidade Federal do Paraná
Instituto Carlos Chagas (ICC/FIOCRUZ)

PARECER

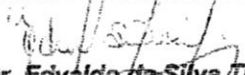
A banca examinadora, instituída pelo colegiado do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, do Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná, composta por:


Prof. Dr. Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro
Orientador e presidente da banca
Universidade Federal do Paraná - UFPR


Prof. Dr. José Maria Monserrat
Universidade Federal do Rio Grande - FURG


Prof. Dr. Eduardo Aives de Almeida
Universidade Estadual de São Paulo - UNESP

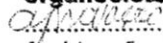

Profa. Dra. Lia Sumie Nakao
Universidade Federal do Paraná - UFPR


Prof. Dr. Edvaldo da Silva Trindade
Universidade Federal do Paraná - UFPR

E tendo como suplentes,

Profa. Dra. Helena Cristina Silva de Assis
Universidade Federal do Paraná

Profa. Dra. Andrea Senff Ribeiro
Universidade Federal do Paraná

Após argüir o doutorando **Daniel Bussolaro**, em relação ao seu trabalho de tese intitulada: "Diferentes abordagens para avaliação da exposição ao MeHg, PCBS, pesticidas organoclorados e nanopartículas de Ag em peixes de água doce", é de parecer favorável à  do acadêmico, habilitando-o(a) ao título de DOUTOR em Biologia Celular e Molecular. A obtenção do título está condicionada à implementação das correções sugeridas pelos membros da banca examinadora e ao cumprimento integral das exigências estabelecidas no Regimento interno deste Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 18 de novembro de 2010

Prof. Dr. Edvaldo da Silva Trindade
Coordenador do Programa de Pós-Graduação
em Biologia Celular e Molecular - UFPR
Matr. 185795

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Paraná, ao setor de Ciências Biológicas e ao departamento de Biologia Celular que possibilitaram o desenvolvimento deste trabalho.

Ao professor Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro, orientador deste trabalho, pelo apoio, suporte e ensinamentos em mais esta etapa de minha formação acadêmica.

Ao professor Francisco Filipak Neto, pelas suas infinitas e valiosas contribuições em todos os aspectos relacionados a este trabalho.

Ao professor Emilien Pelletier, da *Université du Quebec à Rimouski*, pela calorosa acolhida em seu laboratório, confiança, ensinamentos e orientações importantes na etapa deste trabalho que foi desenvolvida no Canadá.

A todos os meus colegas do laboratório de toxicologia celular, por momentos de aprendizado, ajuda e amizade. Em especial, obrigado à Inês, Maritana, Samuel, Ellie, Flavio, Fabíola Valdez, Fabíola Akaishi, Anna Lucia, Daniele Dietrich e Cristina Guiloski pela colaboração em muitos momentos.

À Andressa Glinski, colaboradora deste trabalho, por sua competência e apoio na obtenção de muitos resultados apresentados nesta tese.

À minha família, pelo apoio e confiança.

Ao Anderson, pela presença, amizade, companheirismo e apoio incondicional ao longo deste período.

Ao grande, especial e querido amigo Fernando, pela amizade, pela presença e pelos seus valiosos conselhos.

Aos queridos amigos Janaína, Robson, Renata, Rosane e Loli, pelo apoio, amizade e pela companhia.

Àqueles que são muito mais do que colegas de trabalho: Eliege, Luciana, Carlos Henrique, Elena e Ana Paula Luz - obrigado pelos almoços divertidos no restaurante do colégio, pelas viagens e conversas intermináveis.

À Isabelle Desbiens, Michael, Sylvie Saint-Pierre e professor Claude Rouleau, pela acolhida e constante ajuda na realização dos experimentos realizados no Canadá; e ao Raphael, por sua calorosa amizade naquele gelado país.

Ao professor Nelson Fernandes, da UFPR Palotina, pela sua amizade, conselhos e discussões nas etapas iniciais deste trabalho.

Ao Colégio Medianeira e colegas de trabalho, pelo apoio e suporte em várias etapas deste estudo.

À Marlene, secretária do programa de pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, pela cooperação sempre que necessário.

Aos professores Marco Randi e Helena Cristina Silva de Assis, pelas contribuições importantes.

À CAPES, pela disponibilização da bolsa sanduíche no exterior.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIACÕES	v
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	vi
RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
INTRODUÇÃO GERAL	9
CAPÍTULO I	13
1. INTRODUÇÃO	14
2. OBJETIVOS	18
2.1. Objetivo geral	18
2.2. Objetivos específicos	18
3. MATERIAL E MÉTODOS	19
3.1. Obtenção e cuidado com os peixes	19
3.2. Isolamento das células.....	19
3.3. Determinação da viabilidade celular	20
3.4. Condição de cultivo celular para ensaios	20
3.5. Monitoramento da cultura	20
4. RESULTADOS	21
4.1. Viabilidade celular	21
4.2. Adesão nas diferentes garrafas de cultura	22
4.3. Morfologia dos hepatócitos em cultura	22
5. DISCUSSÃO	24
6. CONCLUSÕES	30
CAPÍTULO II	31
RESUMO	32
1. INTRODUÇÃO	33
2. OBJETIVOS	37
2.1. OBJETIVO GERAL	37
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	37
3. MATERIAL E MÉTODOS	38
3.1. Cultivo celular para exposição aos xenobióticos	38
3.2. Desenho experimental	38
3.3. Viabilidade Celular	39
3.4. Ensaio bioquímico	39
3.4.1. Concentração de Glutathione Reduzida (GSH).....	39
3.4.2. Atividade das Catalases (CAT).....	39
3.4.3. Atividade Global das Isoformas de GST	40
3.4.4. Atividade da δ -aminolevulinato desidratase (δ -ALAd).....	40
3.4.5. Peroxidação lipídica (LPO)	41
3.4.6. Quantificação de proteínas totais	42
3.6. Detecção de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs).....	42
3.7. Tratamento estatístico dos dados	43
4. RESULTADOS	45
4.1. Viabilidade Celular	45
4.2. Concentração de glutathione reduzida	46
4.3. Peroxidação lipídica	46
4.4. Atividade da Catalase	47
4.5. Atividade da GST	48
4.6. Atividade da δ -ALAd	49
4.7. Produção de EROs	50
5. DISCUSSÃO	52
6. CONCLUSÕES	58
CAPÍTULO III	59
RESUMO	60
1. INTRODUÇÃO	61
2. OBJETIVOS	64
2.1. OBJETIVO GERAL	64

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	64
3. MATERIAL E MÉTODOS	65
3.1. Obtenção dos animais e área de estudo	65
3.2. Quantificação dos poluentes organopersistentes	66
3.3. Análises bioquímicas	67
3.3.1. Concentração de Glutathiona Reduzida (GSH).....	67
3.3.2. Peroxidação lipídica (LPO)	67
3.3.3. Atividade das Catalases (CAT).....	68
3.4.4. Atividade Global das Isoformas de GST.....	69
3.3.5. Atividade da Glutathiona Peroxidase (GPx)	69
3.3.6. Atividade da Glucose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH)	70
3.3.7 Atividade das superóxido dismutases (SOD)	70
3.3.8. Atividade das Colinesterases (ChE)	71
3.4. Microscopia de Luz	71
3.4.1. Análise do material.....	71
3.5. Análises estatísticas.....	72
4. RESULTADOS	73
4.1. Quantificação de PCBs e pesticidas organoclorados	73
4.2. Análises bioquímicas	79
4.3. Análises histopatológicas.....	80
5. DISCUSSÃO	83
6. CONCLUSÕES.....	92
CAPÍTULO IV	93
RESUMO.....	94
1. INTRODUÇÃO	95
2. OBJETIVOS.....	100
2.1. OBJETIVO GERAL	100
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	100
3. MATERIAL E MÉTODOS	101
3.1. Animais e nanopartículas utilizadas.....	101
3.2. Experimento de exposição hídrica às nanopartículas (NPs) radiomarcadas	101
3.3. Detecção da atividade emitida pela prata radiomarcada - “ <i>in vivo</i> gamma counting” (IVGC).....	102
3.4. Autorradiografia (WBARG – “ <i>Whole-body Autoradiography</i> ”)	103
3.5. Experimento de exposição hídrica às NPs sem marcação	103
3.6. Experimento de exposição trófica às NPs sem marcação	103
3.7. Microscopia eletrônica de transmissão.....	104
3.8. Microscopia de luz	104
4. RESULTADOS	105
4.1. Absorção e eliminação das NPs	105
4.2. Absorção e eliminação da Ag dissolvida	105
4.3. Autorradiografia: Distribuição tecidual das NPs e Ag dissolvida	106
4.4. Análises histológicas - Microscopia de Luz	107
4.5. Análises histológicas - Microscopia eletrônica de transmissão	107
5. DISCUSSÃO	110
6. CONCLUSÕES.....	115
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	116
REFERÊNCIAS	119

LISTA DE ABREVIACÕES

CAT – catalase(s)
DDT - diclorodifeniltricloroetano
EDTA – Ácido etileno diamino tetracético (do inglês *Ethylenediaminetetracetic Acid*)
ERO(s) – espécie(s) reativa(s) de oxigênio
FOX - do inglês *Ferrous Oxidation / Xylenol Orange Method*
G6PDH – glucose-6-fosfato desidrogenase
GPx – glutaciona peroxidase
GR – glutaciona redutase
GSH – glutaciona
GST – glutaciona S-transferase(s)
H₂O₂ – peróxido de hidrogênio
HCH – hexaclorocicloexano
HEPES – do inglês *N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-Ethanesulfonic Acid*
LPO – peroxidação lipídica (do inglês *lipid peroxidation*)
MeHg – monometilmercúrio
MET - microscopia eletrônica de transmissão
ML - microscopia de luz
NP - nanopartículas
O₂^{•-} (radical) ânion superóxido
PBS - tampão fosfato salino (do inglês *phosphate buffer saline*)
PCBs – bifenilas policloradas (do inglês *polychlorinated biphenyls*)
POC(s) – pesticida(s) organoclorado(s)
POPs – poluentes organopersistentes
SOD – superóxido dismutase(s)
δ-ALAd – delta-aminolevulinato desidratase

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 01. Exemplos de <i>Hypostomus commersoni</i>	12
FIGURA 02. Viabilidade celular dos hepatócitos em cultura.....	21
FIGURA 03. Morfologia dos hepatócitos em cultura.....	23
FIGURA 04. Viabilidade celular após exposição ao MeHg e DDT.....	45
FIGURA 05. Concentração de glutatona reduzida.....	46
FIGURA 06. Peroxidação lipídica.....	47
FIGURA 07. Atividade da catalase.....	48
FIGURA 08. Atividade da GST.....	49
FIGURA 09. Atividade da δ -ALAd.....	50
FIGURA 10. Concentração de peróxido de hidrogênio.....	51
FIGURA 11. Concentração de ânion superóxido.....	51
FIGURA 12. Mapa de localização da área de estudo.....	65
FIGURA 13. Distribuição de congêneres de PCBs em fígado de <i>H. commersoni</i>	75
FIGURA 14. Distribuição de congêneres de PCBs em músculo de <i>H. commersoni</i>	75
FIGURA 15. Concentração de organoclorados em fígado de <i>H. commersoni</i>	77
FIGURA 16. Concentração de organoclorados em músculo de <i>H. commersoni</i>	77
FIGURA 17. Concentração total de POCs em fígado e músculo de <i>H. commersoni</i>	78
FIGURA 18. Histopatologia de fígado de <i>H. commersoni</i>	81
FIGURA 19. Histopatologia de brânquias de <i>H. commersoni</i>	82
FIGURA 20. Exemplar da espécie <i>Salvelinus alpinus</i>	101
FIGURA 21. Nanopartículas de prata observadas através de MET.....	101
FIGURA 22. Absorção e eliminação de nanopartículas.....	106
FIGURA 23. Autoradiografia de <i>S. alpinus</i> após exposição à prata.....	108
FIGURA 24. Microscopia eletrônica de transmissão de fígado de <i>S. alpinus</i>	109
TABELA 01. Congêneres e conteúdo de PCB em fígado e músculo de <i>H. commersoni</i>	74
TABELA 02. Concentração de POCs em fígado e músculo de <i>H. commersoni</i>	76
TABELA 03. Correlação entre os biomarcadores e concentração de PCBs e POCs em fígado de <i>H. commersoni</i>	79
TABELA 04. Ocorrência de lesões hepáticas e branquiais.....	82

RESUMO

O presente trabalho teve como principal objetivo investigar os efeitos de alguns poluentes aquáticos utilizando como modelo de estudo a espécie *Hypostomus commersoni*, um peixe de água doce que vive associado aos sedimentos em rios e lagos do sul do continente americano. Observações demonstram que esta espécie é normalmente resistente em ambientes impactados por poluentes, onde outras espécies são raras ou não estão presentes. Desta forma, um estudo foi realizado para verificar se as respostas celulares desta espécie são também mais eficientes quando comparadas às respostas de outros peixes, como a espécie *Hoplias malabaricus* (traíra). Inicialmente, um protocolo para isolamento e cultivo de hepatócitos de *H. commersoni* foi estabelecido para que estas células pudessem ser utilizadas como ferramenta em estudos de citotoxicidade. Após o cultivo ter sido estabelecido e as características destes hepatócitos em cultura serem conhecidas, a segunda etapa deste trabalho consistiu em avaliar os efeitos tóxicos do DDT e do metilmercúrio nestas células. Para esta abordagem, utilizou-se os níveis de glutathiona, peroxidação de lipídios, produção de peróxido de hidrogênio e ânion superóxido, além das atividades das enzimas catalase, glutathiona-S-transferase e δ -aminolevulinato desidratase como biomarcadores. Todos os grupos de células expostas foram influenciados de alguma forma devido à exposição a estes dois poluentes. Após conhecer as respostas celulares *in vitro*, realizou-se um estudo *in vivo* para investigar os efeitos de bifenis policlorados e pesticidas organoclorados em peixes da mesma espécie. Para isto, treze indivíduos foram coletados e utilizados como bioindicadores. Análises químicas foram realizadas em tecido do fígado e músculo destes organismos para detectar a presença dos poluentes organopersistentes, além de análises bioquímicas e histopatológicas para conhecer o efeito tóxico dos mesmos. Todos os indivíduos apresentaram bioacumulação dos poluentes analisados e alguns parâmetros bioquímicos apresentaram correlação com a presença destes poluentes. A quarta e última fase deste estudo foi parte de um estágio de doutorado sanduíche na *Université du Québec à Rimouski - Canadá*, com o objetivo de estudar a cinética de absorção e eliminação de nanopartículas de prata na espécie de peixe *Salvelinus alpinus*, bem como seus efeitos tóxicos através de microscopia de luz e eletrônica de transmissão. Por meio deste estudo, foi possível verificar que os peixes absorveram as nanopartículas com facilidade e as mesmas acumularam-se em diversos órgãos-alvo destes animais. Os resultados obtidos ao longo deste estudo são provenientes de diferentes metodologias, no entanto, convergem demonstrando os efeitos adversos de poluentes aquáticos em células e organismos expostos.

ABSTRACT

This study aimed to investigate the effects of water pollutants in the fish *Hypostomus commersoni*, a fresh water species which feeds from planktonic organisms and is a very common fish in rivers and lakes of Brazil, living in direct contact with the water bottom sediments. Some important observations demonstrate that this species is commonly resistant to impacted environments, where other species are rare or absent. Therefore, an investigation was developed to verify if the cell responses of *H. commersoni* are also more efficient when compared to the fish *Hoplias malabaricus*. Firstly, one procedure for isolation and culture of *H. commersoni* hepatocytes was established for utilisation of these cells as a model for toxicity studies. After the establishment of the culture conditions and the hepatocytes characteristics, the second step of this work was carried to evaluate the effects of DDT and methyl mercury in these cells. For this purpose, the reduced glutathione concentration, lipid peroxidation, hydrogen peroxide and superoxide anion levels in addition to catalase, δ -aminolevulinic acid dehydratase and glutathione S-transferase activity were evaluated as biomarkers. All the exposed groups were affected in some way due to the pollutant exposure. An *in vivo* study was also carried out to investigate the effects of polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides in *H. commersoni*. Thus, thirteen animals were obtained from an impacted area and used as bioindicators. Chemical analyses were performed in liver and muscle to measure the presence of the cited pollutants. In order to know the toxic effects, biochemical and histopathological analyses were also performed. All the animals bioaccumulated the analysed pollutants and some biochemical assays were co-related with their presence. The last step of this work was developed in the *Université du Québec à Rimouski* - Canada, in which the fish *Salvelinus alpinus* (Arctic char) was used to investigate the absorption and elimination of silver nanoparticles as well as their toxic effects through electron and light microscopy. With this study, it was possible to verify that the fish easily absorbed the nanoparticles and accumulated them in several target organs. The overall results presented in this study were obtained through different methodologies. However, they all converge showing the adverse effects of water pollutants on cells and exposed organisms.

INTRODUÇÃO GERAL

O crescente aumento populacional, acompanhado pelo desenvolvimento industrial, tem contribuído de forma contínua e significativa para o comprometimento dos ambientes em que vivemos e isto tem atingido não apenas os ecossistemas de forma mais direta, mas também as populações humanas. Diferentes contaminantes são freqüentemente lançados nos diversos ambientes incluindo os corpos d'água, solo e ar, sendo que alguns deles são particularmente críticos neste processo, porque devido a características químicas próprias, entram facilmente na cadeia trófica. A exposição a produtos químicos tóxicos no ambiente é uma constante ameaça em potencial para a saúde e qualidade de vida do homem e de outras espécies, já que todas as formas de vida podem ser afetadas por estes componentes. Além disso, a manifestação dos efeitos tóxicos depende da dose e da forma química em que estes se encontram, podendo distribuir-se por todo o organismo, afetando vários órgãos e alterando os processos bioquímicos e a fisiologia celular.

Poluentes em geral e seus metabólitos ativos, podem induzir lesões celulares que poderão tornar-se persistentes caso os mecanismos de destoxificação e reparo não intervenham rapidamente. Desta forma, disfunções fisiológicas e teciduais poderão ocorrer e serem responsáveis por efeitos a níveis populacionais. Disfunções imunes causadas por estes elementos podem causar também um aumento na sensibilidade ao estresse ambiental e favorecer processos infecciosos e a ocorrência de parasitismo (VASSEUR e COSSU-LEGUILLE, 2006).

Os ecossistemas aquáticos, em particular, são considerados receptores finais de diversos tipos de poluentes, pois acumulam estes componentes tóxicos através da deposição atmosférica e escoamento pelas águas das chuvas. Os problemas relacionados a estes poluentes, provenientes em sua maioria das atividades antrópicas, não foram ainda totalmente elucidados. Desta forma, novas informações são necessárias para conhecer os efeitos tóxicos destes poluentes, principalmente em organismos aquáticos.

A presença de produtos químicos tóxicos no ambiente muitas vezes está associada à localização de regiões industriais e agrícolas, onde geralmente verifica-se a contaminação dos ecossistemas por metais pesados e poluentes organo-persistentes (POPs) - dentre os quais se encontram os bifenis policlorados (PCBs) e pesticidas. Embora os mecanismos pelos quais os metais pesados ocasionam a inibição de algumas habilidades funcionais das células ainda não estejam muito bem compreendidos, pode-se dizer que a exposição a estes poluentes acaba pelo menos reduzindo a duração e a amplitude de diversas atividades das células que estão expostas de alguma forma a estes contaminantes (BISHAYI e SENGUPTA, 2003). No interior da célula, os metais pesados em geral podem aumentar a geração de radicais livres, seja por diminuir os níveis intracelulares de antioxidantes ou pela produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) (KLEIN et al, 1991). Além disso, geralmente os metais pesados são mais perigosos quando agem em combinação com outros poluentes.

A ampla utilização e a consecutiva liberação de poluentes organo-persistentes resultou na contaminação de diversos ambientes e acumulação destes tóxicos em organismos aquáticos através de diferentes mecanismos. Desta forma, atualmente, existe uma grande preocupação em relação aos POPs e pouco se conhece sobre os efeitos adversos destes poluentes na fisiologia celular. A Convenção de Estocolmo (2001) banuiu a utilização de 8 pesticidas (aldrin, endrin, dieldrin, clordano, heptacloro, hexaclorobenzeno, mirex e toxafeno), proibiu imediatamente a produção de PCBs e determinou a interrupção gradual no seu uso ao longo do tempo. No entanto, os problemas relacionados a estes componentes podem continuar, já que possuem a capacidade de permanecer disponíveis durante muito tempo nos ecossistemas e bioacumularem-se nos animais. Além disso, a identificação de biomarcadores para efeitos tóxicos destes componentes nas populações ainda é um desafio para os ecotoxicologistas (VASSEUR e COSSU-LEGUILLE, 2006).

Resíduos de pesticidas, especialmente organoclorados (DDT e metabólitos, BHC, aldrin, heptacloro e outros), estão presentes nas áreas mais remotas da Terra. Podem ser retidos no organismo de animais migrantes marinhos (LEE et al., 1997) e

transportados por grandes distâncias através do planeta por correntes de ar e oceânicas. Já foram também detectados nos Andes Chilenos, em altitudes elevadas. Os organoclorados acumulam-se principalmente através da cadeia trófica e devido à grande lipossolubilidade e à lenta metabolização, ficam armazenados no tecido adiposo dos organismos (D'AMATO et al., 2002).

Como o ambiente aquático é afetado por uma mistura complexa de contaminantes químicos, há uma necessidade crescente em identificar estes contaminantes e avaliar seu potencial tóxico através de organismos aquáticos (PESONEN e ANDERSSON, 1997). Peixes são utilizados como modelos experimentais em toxicologia ambiental, em pesquisas genéticas, em biomedicina, neurobiologia, endocrinologia e ecologia, como uma ferramenta para obter informações básicas nas áreas das ciências biológicas. A vantagem deste modelo animal é representada pelo fato de que diferentes espécies muitas vezes possuem características que as fazem especiais para que sejam utilizadas em questões específicas (BOLIS, 2001).

O processo de biomagnificação de diversos poluentes através da cadeia alimentar é bem conhecido, apresentando as maiores concentrações nos organismos de nível trófico mais elevado, como os peixes carnívoros (D'AMATO et al., 2002). Assim, além dos efeitos tóxicos dos pesticidas organoclorados para a exposição humana, a possibilidade das espécies de níveis tróficos elevados serem afetadas pode acarretar desequilíbrio na estrutura das comunidades. Ainda há os peixes que não estão em níveis tróficos superiores, mas que poderão atingir altos níveis de contaminação ao absorverem nutrientes que possuem grande carga de poluentes, por estes se associarem aos sedimentos de fundo (MATSUSHITA e SOUZA, 1994; BRESSA et al., 1997). Este é o caso da espécie *Hypostomus commersoni*, o peixe escolhido como modelo de estudo em parte deste trabalho.

A espécie *Hypostomus commersoni* (ordem Siluriformes, família Loricariidae), popularmente conhecido como cascudo, é uma espécie de peixe de água doce que alimenta-se de organismos planctônicos (Figura 1). Este animal é comumente encontrado no Sudeste e Sul do Brasil e vive nas regiões mais profundas de rios e lagos, em contato direto com os sedimentos. A escolha desta espécie para investigar

os efeitos de poluentes aquáticos deveu-se à escassez de dados referentes a mesma e pelo fato de que as famílias de *Hypostomus sp* mostram-se bastante resistentes em ambientes que contêm quantidades consideráveis de poluentes. Assim, este estudo visou observar se a referida espécie possuía também os mecanismos das respostas celulares mais eficientes à presença de poluentes ambientais, comparados à traíra (*Hoplias malabaricus*), já utilizada como modelo *in vivo* e *in vitro* em nosso laboratório.

Desta forma, este trabalho foi organizado em quatro capítulos assim distribuídos: Capítulo I: Padronização de isolamento e cultivo primário de hepatócitos de *H. commersoni* como ferramenta para estudos de toxicidade; Capítulo II: Utilização de metodologia desenvolvida no primeiro capítulo para avaliar os efeitos *in vitro* do DDT e monometilmercúrio em hepatócitos cultivados de *H. commersoni*, avaliando os mecanismos de resposta celular relacionados ao estresse oxidativo; Capítulo III: Através de análises químicas, bioquímicas e histopatológicas realizar um estudo de biomonitoramento utilizando a mesma espécie avaliando a aplicabilidade do uso dos mesmos biomarcadores utilizados *in vitro*. Finalmente, no Capítulo IV, este trabalho apresenta um estudo realizado no Canadá, com o objetivo de introduzir no grupo de pesquisa uma nova linha e uma nova ferramenta no estudo dos efeitos de poluentes em organismos aquáticos. Sendo assim, foi desenvolvido um estudo com nanopartículas de prata, e, através de técnicas utilizando radionuclídeos, avaliou-se a cinética de absorção, distribuição e eliminação das nanopartículas bem como seus efeitos tóxicos nos organismos. Para isso, foi utilizada outra espécie de peixe de água doce, a truta *Salvelinus alpinus*.



Figura 1: Exemplos de *Hypostomus commersoni*.

CAPÍTULO I

PADRONIZAÇÃO DE METODOLOGIA PARA ISOLAMENTO E CULTIVO DE HEPATÓCITOS DE *Hypostomus commersoni*

RESUMO

Um método para o isolamento e cultivo primário de hepatócitos da espécie *Hypostomus commersoni* foi desenvolvido com o intuito de utilizar estas células em ensaios com xenobióticos. Esta metodologia foi desenvolvida a partir de adaptações de protocolos já existentes para o cultivo de hepatócitos de peixes. A metodologia padronizada consistiu em retirar o fígado do peixe, cortá-lo em pequenos pedaços e realizar a dissociação das células em uma placa de *Petri* com auxílio de uma pipeta *Pasteur* durante 20 minutos. A solução utilizada para este procedimento foi PBS acrescido de EDTA. Depois de seguidas lavagens em PBS e meio de cultura, as células foram cultivadas por até quatorze dias a 22-24°C e pCO₂ atmosférica. Foram necessários de dois a três dias para as células aderirem completamente nos frascos de cultura. 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 utilizado 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. A viabilidade das células em cultura manteve-se em 97% após o procedimento de dissociação, ficando em torno de 55% após 14 dias em cultura. As análises provenientes da microscopia de contraste de fase revelaram que a morfologia dos hepatócitos sofre modificações ao longo do período de cultivo, ou seja, as células apresentaram formato esférico após o procedimento de dissociação e isolamento e, ao longo do tempo, agregaram-se umas às outras. As características dos hepatócitos cultivados neste estudo, tais como viabilidade e morfologia, permitem a sua utilização em estudos de resposta celular frente à exposição a xenobióticos de interesse.

Palavras-chave: *Hypostomus commersoni*, cultivo, hepatócitos.

1. INTRODUÇÃO

O fígado possui importância crucial na manutenção da homeostase interna de organismos vertebrados. Este órgão adapta-se a condições ambientais através de contínuos reajustes das estruturas hepatocelulares tais como: metabolismo de nutrientes, armazenamento de energia (glicogênio e lipídeos), síntese e secreção de proteínas (albumina, vitelogenina, lipoproteínas), manutenção dos níveis de glicose plasmáticos, eliminação dos componentes nitrogenados após a formação da amônia ou uréia, metabolismo de hormônios, metabolismo de xenobióticos e formação da bile. A natureza dinâmica do fígado e suas funções regulatórias em muitos processos metabólicos e fisiológicos, fazem deste órgão um importante modelo para estudar vários mecanismos e processos. Apesar da importância do fígado para a manutenção da homeostase do organismo sob condições ambientais variáveis, o conhecimento fisiológico e toxicológico do fígado de peixes é bastante restrito. Poucos trabalhos têm utilizado o potencial das culturas primárias para estudar a fisiologia básica do fígado de peixes, respostas adaptativas a mudanças ambientais ou mecanismos de processos tóxicos (SEGNER, 1998).

O cultivo de hepatócitos de peixes é uma ferramenta valiosa para estudos de toxicidade. Métodos de isolamento de células intactas e funcionais do fígado de mamíferos tornaram-se viáveis durante o final da década de 1960. Os hepatócitos isolados mantêm os benefícios de uma célula intacta (funcionalidade das organelas, interações enzimáticas, concentração de metabólitos, etc) sem a complexidade de interações que ocorrem em um organismo inteiro. Além do que, vários tipos de condições experimentais podem ser utilizados com populações celulares obtidas a partir de um único animal (SEGNER, 1998).

Tem-se demonstrado que hepatócitos de peixes mantêm muitas funções importantes em culturas primárias que são pré-requisitos para a obtenção de resultados relevantes em relação ao que acontece em situações *in vivo*. Assim, culturas primárias de hepatócitos de peixes têm sido utilizadas para avaliar o metabolismo de xenobióticos, formação de produtos tóxicos, indução de danos no DNA, alterações enzimáticas e proliferação de peroxissomos, permitindo que seja

possível analisar maiores detalhes do que seria permitido em estudos *in vivo* (PESONEN e ANDERSSON, 1997).

Culturas primárias de hepatócitos de teleósteos têm sido utilizadas para estudar vários aspectos das funções e estruturas hepáticas, tais como temperatura e aclimatação (JENSEN et al. 1996; KENNEDY et al. 1991) senescência celular (BRAUNBECK e STORCH, 1992), interações célula – célula (BALDWIN e CALABRESE, 1994; BLAIR et al. 1990), metabolismo de lipoproteínas (GJOEN e BERG, 1993), metabolismo de nutrientes e regulação endócrina (DUAN, et al. 1993; MOMMSEN e LAZIER, 1986), síntese de vitelogenina (FLOURIOT et al. 1993; JOBLING e SUMPTER, 1993) e estudos toxicológicos (HYLLNER et al. 1989; MILLER et al. 1993).

O mais freqüente uso de hepatócitos em cultura para estudos de toxicidade é a determinação dos mecanismos que causam hepatotoxicidade. Culturas de hepatócitos são utilizadas para identificar metabólitos tóxicos e/ou enzimas envolvidas em sua formação. Hepatócitos isolados também são utilizados para avaliar o potencial genotóxico de alguns xenobióticos baseando-se em sua capacidade de causar adutos com o DNA, mutações e aberrações cromossômicas (GUILLOUZO, et al. 1997).

Entre as várias alternativas possíveis para cultura de células em monocamadas, as culturas de hepatócitos são particularmente promissoras, além disso as culturas primárias são um modelo atrativo para estudar processos tempo-dependentes sob condições experimentais definidas. No entanto, o uso em potencial deste sistema, que permite que se entendam aspectos básicos da fisiologia do fígado de peixes e suas respostas adaptativas a mudanças ambientais, ainda é pouco explorado (SEGNER, 1998). Outro dado importante é que em culturas primárias de teleósteos, os dados disponíveis indicam que ocorre uma grande estabilidade das enzimas de biotransformação existentes nas células hepáticas (PESSONEN e ANDERSSON, 1997).

Modelos *in vitro* empregando hepatócitos são ferramentas aplicáveis em diversos estudos, alguns com enfoque no metabolismo, na regulação do pH, no transporte através de membrana, na síntese protéica, na regulação e na interação

hormonal, enquanto outros visando investigar a citotoxicidade, a genotoxicidade ou a biotransformação (detoxificação ou bioativação) de xenobióticos (BAKSI e FRAZIER, 1990). Dentre as vantagens que este modelo apresenta, destaca-se também o fato de que nestes estudos de toxicidade são necessárias menores quantidades de xenobióticos (PESONEN e ANDERSSON, 1996).

As metodologias de isolamento de hepatócitos já são bem conhecidas para diversos peixes exóticos de ambiente dulcícola (truta, carpa, peixe-lua e outros) e ambiente marinho (diabo-marinho, linguado, salmão, peixe-escorpião) e para espécies nativas brasileiras há apenas um registro na literatura, o de hepatócitos de *Hoplias malabaricus* (FILIPAK NETO et al., 2006). 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).

Ainda não existem dados na literatura sobre o cultivo primário de hepatócitos de *Hypostomus commersoni*, portanto, foi necessário estabelecer um protocolo para isolar e cultivar estas células. Desta forma, este capítulo apresenta informações inéditas sobre o cultivo de hepatócitos desta espécie, que podem ser utilizados como ferramenta em estudos toxicológicos.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Padronizar uma metodologia de isolamento e cultivo de hepatócitos de *Hypostomus commersoni* para estudos de citotoxicidade.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Adaptar metodologias já existentes para isolamento e obtenção de hepatócitos de outras espécies de peixes para a espécie *H. commersoni*;

Verificar a viabilidade das células em cultura ao longo do tempo;

Estudar as condições dos hepatócitos em cultivo através da observação das células em microscopia de luz.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Obtenção e cuidado com os peixes

Exemplares de *Hypostomus commersoni* foram obtidos de uma fazenda de peixes comercial e mantidos no Laboratório de Bioensaios do Departamento de Biologia Celular da UFPR. Os espécimes foram mantidos separados em aquários de 30 litros, com aeração constante e fotoperíodo de 12 horas. Os peixes foram mantidos nestas condições por aproximadamente 15 dias antes de serem utilizados nos experimentos. Durante este período, não receberam nenhum tipo de alimentação, já que em seu ambiente natural, alimentam-se exclusivamente de organismos planctônicos associados aos sedimentos.

3.2. Isolamento das células

Para cada cultura primária realizada, dois a três espécimes foram anestesiados (MS222 a 0,02% em água) e sacrificados por secção espinhal na altura do crânio. Foi realizada assepsia em todo o corpo do animal com etanol a 70% e clorexidina alcoólica a 2% e em fluxo laminar. Porções¹ do fígado foram removidas para uma placa de *Petri* e lavadas em tampão fosfato salino (PBS, pH 7,8, 4°C). Em seguida, as porções do órgão foram cortadas em partes menores com auxílio de pinças e bisturi e os pedaços restantes foram aspirados e eliminados constantemente utilizando-se uma pipeta *Pasteur* de plástico estéril por aproximadamente 15 minutos em uma solução de PBS pH 7,8, 4°C, acrescido de 2 mM de EDTA (ácido etileno diamino tetracético) dissódico para ocorrer a dissociação das células. A suspensão resultante deste processo foi filtrada com o auxílio de uma tela de metal (poros de aproximadamente 1mm). As células foram lavadas 3 vezes em PBS e 1 vez em meio de cultura e centrifugadas em baixa rotação (100 - 120 x g) para remoção de células rompidas e restos do tecidos do fígado (FILIPAK NETO et al., 2006, com modificações).

¹ A disposição e o formato do fígado desta espécie não permite que o órgão seja retirado por inteiro, desta forma, as porções do fígado foram retiradas separadamente.

3.3. Determinação da viabilidade celular

A viabilidade celular foi estimada utilizando-se Câmara de Neubauer através do teste de exclusão do corante Azul de Tripán (0,05 a 0,1% v.v⁻¹), com a identificação visual das células viáveis (membrana íntegra) e não viáveis (membrana permeável ao corante vital).

3.4. Condição de cultivo celular para ensaios

As células foram semeadas em garrafas de cultura Corning®, Sarstedt® e TTP® com e sem pré-tratamento numa densidade de $0,5 \times 10^6$ células por mililitro de meio de cultivo RPMI 1640 (pH 7.8) 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 fetal bovino (5% v.v⁻¹). Nas garrafas que receberam pré-tratamento, foi utilizado colágeno do tipo I desnaturado (gelatina) a 1,5%, durante 1 hora antes de as células serem adicionadas. As garrafas de cultivo contendo as células foram mantidas a 22-24°C e pCO₂ atmosférica (em estufa convencional) (FILIPAK NETO et al., 2006).

3.5. Monitoramento da cultura

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

4. RESULTADOS

4.1. Viabilidade celular

A viabilidade dos hepatócitos foi testada para acompanhar as condições gerais da cultura, bem como monitorar a sobrevivência das células ao longo do tempo. A viabilidade foi verificada imediatamente após o procedimento de dissociação do órgão e isolamento das células, antes de serem distribuídas nas garrafas de cultura. Neste momento (tempo zero - T0), 97% das células permaneceram viáveis (Figura 2). Após 24 horas em cultura (T1), um novo teste foi realizado e foi possível verificar uma porcentagem de células viáveis semelhante ao tempo inicial. No terceiro dia (T3), a porcentagem de hepatócitos viáveis era de 80%, diminuindo para 73% após 7 dias em cultura (T7). Após 14 dias em cultura, a viabilidade celular diminuiu consideravelmente, permanecendo em torno de 55%.

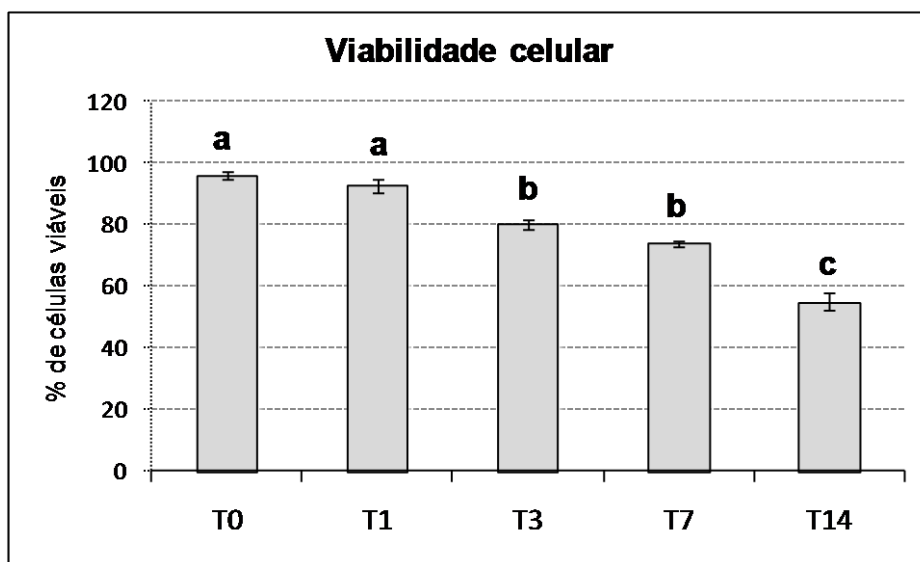


Figura 2: Viabilidade celular em número de células viáveis a cada 100 células. Média \pm erro padrão da média. Letras diferentes indicam grupos estatisticamente distintos ($p < 0,05$).

4.2. Adesão nas diferentes garrafas de cultura

Os resultados provenientes dos testes de adesão demonstraram que os hepatócitos aderiram com mais facilidade nas marcas *Corning*[®] e *Sarstedt*[®] após 3 dias em cultura. Em relação à marca *TTP*[®], a adesão também ocorreu, embora tenha sido menos significativa. Quando as garrafas das três marcas foram tratadas com colágeno tipo I, a adesão melhorou significativamente, isto é, a quantidade de hepatócitos aderidos foi maior e o tempo necessário para que as células aderissem foi ligeiramente menor. Mesmo após o tratamento, as marcas *Corning* e *Sarstedt* demonstraram vantagem em relação à adesão nas garrafas *TTP*. (Dados não mostrados)

4.3. Morfologia dos hepatócitos em cultura

Acompanhando a cultura ao longo do tempo, foi possível observar que os hepatócitos sofreram diversas modificações em sua morfologia. Além disso, verificou-se que a densidade celular influencia diretamente a capacidade de adesão e sobrevivência das células em cultura, ou seja, um número muito baixo de células ($<0,5 \times 10^6$ por mL de meio) parece dificultar a manutenção da cultura. Estes hepatócitos possuem formato esférico no período inicial do cultivo, sendo que, após o procedimento de isolamento, dispõem-se separadamente ao longo da área da garrafa (Figura 3 A e B). Após 2 dias em cultura, foi possível observar que os hepatócitos sofreram mudanças em sua morfologia, perdendo o formato esférico, agregando-se uns aos outros (Figura 3 C). No sétimo dia da cultura, observou-se que a maioria das células estavam unidas, iniciando um processo de migração, reorganização e produção de matriz extracelular (Figura 3 D). Após 14 dias, a morfologia das células alterou-se significativamente, ocorrendo reorganização semelhante a um tecido, já que as células espalharam-se ao longo da área da garrafa, unindo-se umas às outras. Em função disto, foi possível observar os núcleos com nucléolos evidentes, além do limite da membrana plasmática de cada célula. Células que não haviam aderido até este momento, ainda apresentavam formato esférico (Figura 3 E). Não foi observada com clareza a presença de outras células como macrófagos e fibroblastos. No vigésimo primeiro dia em cultura, muitas células haviam desadrido, entrando em processo de morte celular (Figura 3 F).

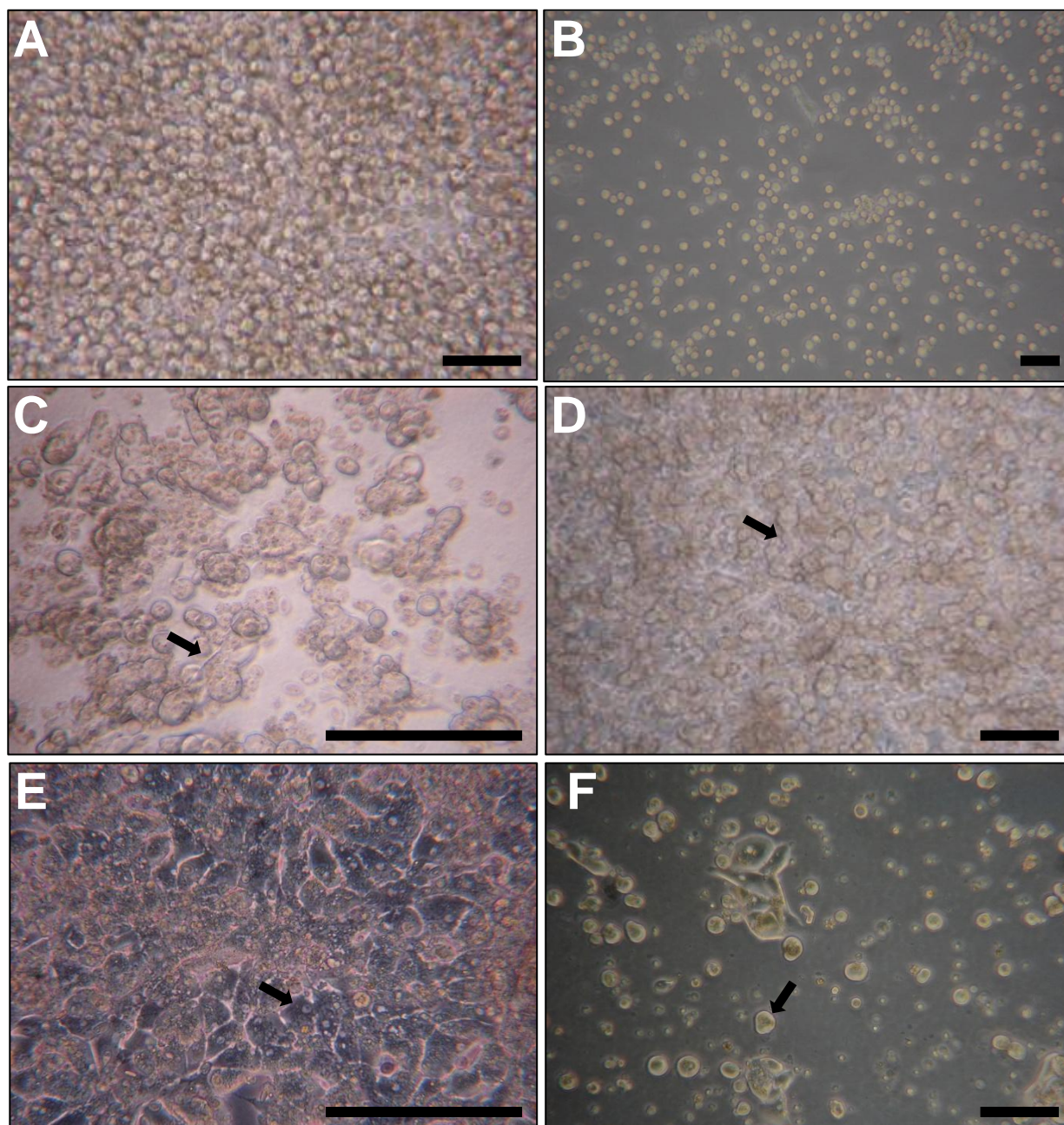


Figura 3: Características morfológicas dos hepatócitos de *H. commersoni* em cultura. A e B: Tempo 0, logo após o procedimento de dissociação e isolamento. C: após três dias em cultura. D: após sete dias em cultura. E: após 14 dias em cultura. F: após 21 dias em cultura. As células iniciaram um processo de reorganização, unindo-se umas às outras (C e D, setas). Núcleo o nucléolo tornaram-se visíveis após 14 dias em cultura (E, seta). Células apresentando formato esférico após 21 dias em cultura (F, seta). Barra: 200 μ m.

5. DISCUSSÃO

O desenvolvimento de ferramentas para estudos de biomonitoramento é cada vez mais necessário devido aos poluentes que estão presentes nos ecossistemas aquáticos. Nesta perspectiva, o uso de culturas celulares tem se mostrado interessante, já que as células possuem um nível de organização e respostas cruciais para o entendimento dos mecanismos de toxicidade (CASTANO et al. 2003). Células em cultura têm sido utilizadas como modelos alternativos em estudos mecanísticos e identificação de toxicidade em ecotoxicologia.

Células de peixes, particularmente, possuem muitas funções similares às aquelas encontradas em células de mamíferos, além de apresentarem algumas vantagens em relação ao seu uso. Dentre elas, podemos citar o fato de que podem ser cultivadas em temperatura ambiente (20-28 °C) e podem ser expostas a diferentes poluentes com diferentes graus de osmolaridade. Além disso, células provenientes de cultivo primário mantêm a maior parte de suas características genéticas e bioquímicas originais, além de grande atividade metabólica. Estas características fazem com que as células de peixes forneçam uma série de possibilidades para testes de toxicidade *in vitro* (CHEN et al., 2003).

Culturas primárias de células hepáticas de peixes como carpa e trutas já foram padronizadas e têm sido utilizadas há muito tempo em estudos de toxicidade e outros estudos com elevado grau de sucesso. Em nosso laboratório, já estão bem estabelecidos os protocolos para o cultivo de hepatócitos de *Hoplias malabaricus*, uma espécie de peixe predadora nativa, que se mostrou excelente modelo *in vivo* e recentemente *in vitro* (FILIPAK NETO et al., 2006 e 2008). Desta forma, metodologias de isolamento e cultivo primário dessas células são necessárias com outros tipos de peixes, para possibilitar ensaios que forneçam respostas relativas à espécie no que diz respeito aos mecanismos de toxicidade de xenobióticos de interesse.

O primeiro passo necessário para a obtenção de hepatócitos isolados de *H. commersoni* consistiu em realizar uma adaptação dos protocolos já existentes para outras espécies de peixes, sendo que o método considerado mais viável foi semelhante ao utilizado para a espécie *H. malabaricus*, envolvendo inicialmente digestão do tecido com enzimas específicas e separação mecânica das células. Técnicas para cultura

primária de células de mamíferos têm sido adaptadas para espécies de peixes com certo grau de sucesso por pesquisadores que utilizam a cultura primária de hepatócitos (BIRNBAUM et al. 1976; BRAUNBECK e SEGNER 2000; CAMPBELL et al. 1983; HA YASHI e OOSHIRO 1985; FERRARIS et al. 2002; KLAUNIG 1984; MOON et al. 1965; MOMMSEN et al. 1994; PESONEN e ANDERSSON 1991; SEGNER 1998; RIOL et al. 2001), sendo que o método clássico para cultura primária destas células de peixe envolve a perfusão completa de todo o fígado. Birnbaum et al. (1976) foram os primeiros a adaptar as técnicas de perfusão para obter células de fígado de peixes isoladas em suspensão, e, desta forma, métodos para cultura primária de hepatócitos de peixes tornaram-se disponíveis a partir dos anos 80 (BLAIR et al. 1990; KLAUNIG et al. 1985). Desde então, esta ferramenta é cada vez mais empregada em estudos toxicológicos (BRAUNBECK e SEGNER 2000; MOMMSEN et al. 1994; MONOD et al. 1998; PESONEN e ANDERSSON 1991; SEGNER 1998).

O passo inicial das técnicas de perfusão seguida de dissociação mecânica, como foram originalmente desenvolvidas para o isolamento de hepatócitos de mamíferos, consiste em remover o sangue do fígado utilizando-se frequentemente soluções salinas. Em espécies como salmonídeos, que possuem uma veia-porta bem desenvolvida, a perfusão normalmente é realizada através deste vaso. Para espécies como carpas que não possuem uma veia-porta diferenciada, o fígado pode ser canulado via artéria cólica (BOUCHE et al., 1979; SEGNER et al., 1995; VOGT e SEGNER, 1997) ou por perfusão retrógrada através do coração. Para traíras, FILIPAK NETO et al. (2006) realizaram perfusão através da veia porta, utilizando solução contendo EDTA e tripsina. A adição de agentes quelantes como EDTA para remover o cálcio (e assim romper as conexões celulares dependentes de cálcio) podem também melhorar o rendimento celular. Num segundo momento, normalmente uma enzima é adicionada à solução de perfusão para desagregar as células (SEGNER, 1998).

Embora alguns autores como Ferraris et al. (2002) defendam a idéia de que a aplicação desta técnica melhora o rendimento celular obtido por grama de fígado, com alta viabilidade, para o peixe *H. commersoni*, a realização da perfusão não foi possível. Isto devido à disposição e formato do fígado desta espécie, que encontra-se aderido

em meio aos intestinos do animal, impedindo a remoção do órgão por inteiro. Desta maneira, foi necessário estabelecer um protocolo que não levasse em conta a perfusão, mas que ainda assim, garantisse um bom rendimento e viabilidade dos hepatócitos. Assim, as células foram isoladas mecanicamente utilizando-se unicamente solução salina (PBS) contendo EDTA. Devido a características próprias da espécie, não foi necessária a utilização de enzimas digestivas como tripsina ou pancreatina para desagregar as células. Este fato foi vantajoso e provavelmente auxiliou na manutenção da viabilidade celular, que permaneceu alta (97%) após o procedimento de isolamento, mesmo com a dissociação mecânica. De acordo com MOMMSEN (1994), o rendimento celular pós perfusão varia de acordo com a espécie, peso, sexo e idade do peixe doador, assim como o estado nutricional, que também pode influenciar significativamente no rendimento celular.

Para a manutenção dos hepatócitos em cultura, é necessário garantir que estas células consigam aderir ao substrato para que permaneçam viáveis. Uma melhoria na adesão pode ser obtida tratando-se as garrafas de cultura com diferentes tipos de substratos que fazem o papel de matriz extracelular (BLAIR et al., 1990; HASCHEMEYER e MATHEWS, 1983; RABERGH, 1995) ou utilizando garrafas com algum tipo de pré tratamento, o que facilita a adesão. Para os hepatócitos de *H. commersoni*, a aplicação de colágeno tipo I foi necessária visto que os hepatócitos não aderiram com facilidade em garrafas pré-tratadas comercialmente. De acordo com SEGNER (1998), diferenças no comportamento de adesão podem estar relacionadas a características da espécie, embora variações no protocolo de isolamento também possam interferir. PESSONEN e ANDERSSON (1991), por exemplo, melhoraram a adesão de hepatócitos de trutas após aumentarem os níveis de cálcio na solução de perfusão. Neste trabalho, o colágeno desnaturado tipo I foi escolhido como substrato por ter respondido de forma favorável à adesão dos hepatócitos, pelo fato de ser barato e de fácil obtenção, poder ser esterilizado em autoclave e ter sua composição conhecida.

Além da adesão, observou-se que outro fator importante para a manutenção da cultura e sobrevivência dos hepatócitos foi a densidade celular. Este aspecto foi crucial

para os hepatócitos de *H. commersoni*, que aderiram com mais facilidade e sobreviveram por mais tempo em culturas com densidades mais elevadas. Em culturas com baixo número de células, observou-se que a adesão foi prejudicada. Estes resultados são corroborados por Filipak Neto et al. (2006), que demonstraram que os hepatócitos de *Hoplias malabaricus* mantiveram-se em boas condições 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. Nessas culturas, a maioria das células permaneceu viável por pelo menos sete dias.

Outra característica importante para a manutenção das culturas são as interações realizadas entre as células presentes. As células obtidas do fígado de teleósteos contém uma certa variedade de tipos celulares, entretanto, os hepatócitos são as células dominantes, ocupando 80% do volume original do fígado. As células não hepatocíticas presentes incluem células do epitélio biliar, células sinusóides endoteliais e melanomacrófagos. Embora o número de células não hepatocíticas seja baixo, acredita-se que estas células participem de importantes processos tóxicos e neoplásicos (SEGNER, 1998). Contatos heterotípicos (entre hepatócitos e células biliares) e homotípicos (entre hepatócitos somente) possuem importante função para a manutenção da cultura e funções específicas do fígado (CLAYTON et al., 1995; GOULET et al., 1988; GUGUEN-GUILLOUZO e GUILLOUZO, 1983). Segundo Filipak Neto et al., (2006) a presença destas células em cultura também contribui para a sobrevivência dos hepatócitos.

As alterações morfológicas dos hepatócitos de *H. commersoni* foram evidentes ao longo dos dias em cultura. Após dois dias, as células perderam o formato esférico e apresentaram padrões semelhantes aqueles encontrados no tecido hepático. Segundo Segner (1998), o estabelecimento de interações célula-célula *in vitro* é acompanhado pelo desenvolvimento de diferenciações da membrana, da mesma forma que apresentam nos hepatócitos *in vivo*. A reconstituição morfológica e funcional dos canalículos biliares representam um processo complexo que requer uma extensiva redistribuição e novas inserções de componentes de membrana. Ao mesmo tempo, isto indica que as células em cultura foram capazes de se reestabelecer, adquirindo

características semelhantes às aquelas *in vivo*. O fato de as células reagregarem-se após o isolamento parece ser uma tendência comum nos hepatócitos de peixes em cultura e isto pôde ser confirmado pela constatação de que os hepatócitos que não conseguem aderir perdem várias propriedades funcionais e acabam morrendo.

A viabilidade dos hepatócitos neste estudo foi considerada satisfatória (70%) até sete dias em cultura, o que permitiu a determinação de protocolos para ensaios com xenobióticos. Estes aspectos devem ser levados em consideração, porque em culturas de curto prazo, as células em monocamadas conservam a expressão de genes hepato-específicos (SEGNER, 1998). Segundo o mesmo autor, hepatócitos de peixes em cultura mantêm suas estruturas e funções por 5 a 8 dias. Após este período, processos degenerativos têm início, comprovados por mudanças na morfologia, fisiologia e viabilidade celular. A regressão funcional dos hepatócitos normalmente está associada a uma progressiva desadesão do substrato da cultura. Neste trabalho, estas mesmas características foram observadas, pois a maioria dos hepatócitos desadriu das garrafas e a viabilidade diminuiu em torno de 50% após 14 dias em cultura.

Devido ao fato dos hepatócitos terem permanecido pelo tempo mínimo de sete dias em cultura, foi necessário trocar o meio de cultivo pelo menos uma vez durante este período para garantir a sobrevivência destas células. Segundo SCHREER et al., (2005), o meio *Dulbecco's modification of eagle's medium* (DEMEM) é um dos meios de cultivo mais utilizados para culturas em geral e o meio 199 (M199) é classicamente utilizado para hepatócitos de peixes. L-15 é um meio especial para ser utilizado na ausência de CO₂ para balancear o pH em estufas convencionais. Neste trabalho, optou-se por utilizar o meio RPMI, que já havia demonstrado eficácia nas culturas de hepatócitos de *H. malabaricus*, acrescido de tampão bicarbonato e HEPES para manter o pH estável, já que os hepatócitos foram cultivados em estufa sem gás carbônico.

Após as condições de isolamento e cultivo dos hepatócitos de *H. commersoni* terem sido conhecidas, foi possível estabelecer um desenho experimental para investigar os efeitos tóxicos do DDT e metilmercúrio nestas células, realizando um estudo comparativo com as respostas dos hepatócitos de traíra, expostos aos mesmos xenobióticos. Para isto, três dias foram empregados para recuperação do procedimento

de isolamento e quatro dias para exposição aos xenobióticos e estes dados estão presentes no Capítulo II.

6. CONCLUSÕES

A dissociação mecânica não enzimática foi eficaz para o isolamento das células, mantendo a viabilidade dos hepatócitos de *H. commersoni* para iniciar a cultura.

Os hepatócitos de *H. commersoni* podem ser empregados em estudos com xenobióticos pois são células estáveis e mantêm boa viabilidade em cultura.

Dois dias constituem um período suficiente para que os hepatócitos se recuperem do procedimento de isolamento e possam aderir à superfície do frasco antes de serem utilizados em estudos de citotoxicidade.

CAPÍTULO II

APLICAÇÃO DA METODOLOGIA ESTABELECIDADA *IN VITRO* PARA AVALIAR OS EFEITOS CITOTÓXICOS DO DDT e METILMERCÚRIO NOS HEPATÓCITOS DE *Hypostomus commersoni*

Publicação relacionada ao presente capítulo:

D. BUSSOLARO, F. FILIPAK NETO, C. A. OLIVEIRA RIBEIRO. Responses of hepatocytes to DDT and methyl mercury exposure. **Toxicology in Vitro**, n. 24, 1491–1497, 2010.

RESUMO

O principal objetivo do presente capítulo foi investigar os efeitos do diclorodifeniltricloroetano (DDT) e do monometil mercúrio (MeHg) em cultura primária de hepatócitos de *Hypostomus commersoni*. Com o intuito de verificar os impactos do DDT e MeHg no ambiente redox, as células foram expostas durante quatro dias a 50 nM de DDT, 0,25 ou 2,5 μ M de MeHg e a uma combinação de 50 nM de DDT e 0,25 μ M de MeHg. Estas concentrações são consideradas realísticas, uma vez que já foram encontradas em músculo e fígado de peixes da região Amazônica e outras áreas impactadas e comparadas com concentrações já publicadas por Filipak Neto et al. (2008) para o peixe predador *Hoplias malabaricus* (traíra). Os efeitos foram mais significativos na concentração da glutathiona reduzida e atividade da glutathiona-S-transferase que diminuíram em três e dois dos grupos tratados, respectivamente. O mesmo ocorreu com a atividade da enzima δ -aminolevulinato desidratase, que diminuiu nos grupos de células expostas a 0,25 μ M de MeHg e nos grupos expostos à combinação de MeHg e DDT. Os níveis de peroxidação lipídica foram diferentes em comparação ao controle somente no grupo de células expostas ao do DDT e MeHg em combinação. A atividade da enzima catalase aumentou no grupo exposto a 2,5 μ M de MeHg sendo que os níveis de peróxido de hidrogênio diminuíram em todos os grupos expostos. Os níveis do ânion superóxido diminuíram nos grupos expostos a 2,5 μ M de MeHg e na combinação de DDT e MeHg. A viabilidade celular diminuiu somente nos grupos expostos ao DDT. Apesar de o MeHg e DDT terem interferido no balanço da glutathiona reduzida, os resultados demonstraram que os mecanismos de defesa antioxidante são mais eficientes nos hepatócitos de *H. commersoni* em relação às mesmas células de *H. malabaricus*, onde os níveis de peroxidação lipídica e peróxido de hidrogênio aumentaram e a viabilidade celular diminuiu. Estes resultados corroboram a resistência e ocorrência da espécie *H. commersoni* em ambientes poluídos e suportam a hipótese de que os hepatócitos desta espécie são mais resistentes à exposição ao DDT e MeHg do que os hepatócitos do peixe predador *H. malabaricus*.

Palavras-chave: hepatócitos, DDT, MeHg, estresse oxidativo.

1. INTRODUÇÃO

Os organismos aquáticos podem ser expostos aos pesticidas organoclorados e aos metais já que estes compostos atingem os ambientes aquáticos com grande facilidade. O organoclorado diclorodifeniltricloroetano (DDT) e o mercúrio (Hg), um metal não essencial, são considerados contaminantes ambientais de escala global. O DDT é derivado exclusivamente de atividades antrópicas (MAGOS et al., 1998), como a agricultura, enquanto atividades humanas e fontes naturais contribuem para a contaminação ambiental causada pelo mercúrio. Apesar dos níveis de mercúrio e DDT serem comumente relacionados à espécies de peixes predadoras (MOREL et al., 1998; TORRES et al., 2002), peixes de diferentes níveis tróficos também bioacumulam estes contaminantes (FORD e HILL, 1991; SAPOZHNIKOVA et al., 2004), que podem afetar a reprodução, fisiologia, comportamento e sobrevivência destes organismos.

Algas e bactérias possuem a capacidade de metilar o Hg disponível em ambientes aquáticos, transformando-o em metilmercúrio (MeHg), que é um contaminante ambiental muito perigoso, e por isso, são bem conhecidos os riscos que este poluente oferece à saúde humana (SHANKER, 2005). O MeHg causa danos irreparáveis ao sistema nervoso central, sendo que vários problemas cerebrais relacionados ao composto já foram reportados (DARÉ et al., 2001). Peixes provenientes de áreas contaminadas por MeHg são a principal fonte de exposição da população humana a este contaminante, que possui a capacidade de causar bioacumulação e biomagnificação na cadeia trófica aquática (MOREL et al., 1998).

Em níveis celulares, Shafer et al. (2002) observaram que a exposição prolongada ao metilmercúrio em baixas concentrações reduz os níveis de íons Na^+ e Ca^+ em canais de membranas de células em cultura. Parran et al. (2003) descobriram que o metilmercúrio inibe atividades importantes de receptores transmembrana além de prejudicar o funcionamento de fatores de crescimento de algumas células nervosas. Alguns dos possíveis alvos moleculares do MeHg têm sido demonstrados por Castoldi et al., (2001) e incluem moléculas do citoesqueleto, produção de neurotransmissores, sinalização celular, proteínas, DNA, síntese de RNA e o sistema de respiração celular. Íons de mercúrio têm alta afinidade por biomoléculas que contêm grupos tiol, tais como a glutatona, N-acetilcisteína (NAC), metalotioneínas (MT) e albumina. Assim, em

sistemas biológicos, o mercúrio está sempre ligado a um ou mais destes compostos (BRIDGES e ZALUPS, 2005).

O estresse oxidativo tem sido associado a uma ampla variedade de condições patológicas, e sabe-se que sua indução ocorre facilmente através da presença de metais tóxicos (ALMAZAN et al., 2000; BUSH, 2000). Estudos *in vivo* e *in vitro* utilizando culturas de células nervosas expostas ao MeHg, têm demonstrado aumentos significativos na formação de espécies reativas (GASSO et al., 2001; PARK et al., 1996; SHANKER et al., 2004). Em células hepáticas de peixes, o aumento dos níveis de espécies reativas de oxigênio, em decorrência do estresse oxidativo, causa danos através da oxidação de lipídios, proteínas, açúcares, DNA e RNA (DEMPLE e LEVIN, 1991; LITTAUER e DE GROOT, 1992; CARACENI et al., 1997; ZULUETA et al., 1997; ZAR et al., 1998).

O DDT é considerado uma das substâncias sintéticas mais utilizadas e estudadas no século XX (D'AMATO et al., 2002). A América do Sul é o continente onde o DDT foi mais utilizado, além de toxafeno e lindano (CONNELL et al. 1999). As propriedades físico-químicas e biológicas do DDT e seus metabólitos, e demais organoclorados, fazem com que estes compostos sejam rapidamente absorvidos pelos organismos. As taxas de acumulação variam entre as espécies de acordo com a concentração, condições ambientais e o tempo de exposição (D'AMATO et al., 2002).

A utilização do DDT foi banida em 1970 em muitos países, baseando-se em sua toxicidade para os organismos vivos. Entretanto, este pesticida ainda é comumente utilizado em programas para controle de vetores de doenças como a malária, febre-amarela e dengue em vários países em desenvolvimento (NUNEZ et al., 2002). No Brasil, o DDT foi banido para usos na agricultura em 1985, no entanto, seu uso ainda é permitido de forma restrita para o controle do vetor da malária.

Uma vez internalizado pelo organismo, o DDT pode ser metabolizado em diclorodifenildicloroetileno (DDE) e diclorodifenildicloroetano (DDD). Segundo SIJM e OPPERHUIZEN (1989), esta biotransformação também contribui para a acumulação de organoclorados em organismos aquáticos, como é o caso do metabólito DDE, que tem sido encontrado em muitas espécies de peixes (VAN DER OOST, 2003).

Sedimentos e bivalves foram utilizados para monitorar os níveis de DDT, DDE e DDD ao longo da costa do estado de São Paulo (TAVARES et al., 1999) e de acordo com os autores, os altos níveis de DDT encontrados são indicativos de sua ampla utilização nas últimas décadas. Apesar da investigação em ovos de aves (VIEIRA et al., 2001), plasma de mulheres grávidas (SARCINELLI et al., 2003), e leite humano (PAUMGARTTEN et al., 2000), todos conduzidos no Rio de Janeiro, poucos trabalhos foram desenvolvidos no Brasil a respeito da bioacumulação do DDT e seus metabólitos em peixes.

O DDT é considerado um organoclorado persistente, com alta solubilidade em lipídios e longa vida no ambiente. Com a proibição e controle no uso do DDT após os anos 70, a concentração deste pesticida em animais aquáticos teve uma diminuição significativa, mas, pode ainda ser encontrado em muitos compartimentos ambientais, como ar, sedimentos, peixes e mamíferos, ainda apresentando, desta forma, riscos à saúde humana (HITES et al., 2004).

A internalização do DDT pode ser influenciada pelas suas propriedades físico-químicas que propiciam sua deposição em tecidos ricos em gorduras. Este pesticida pode difundir-se pelas células através de diferença de gradiente de concentração após associar-se a uma gama de moléculas lipídicas na membrana externa. Em peixes, a água é processada pelas brânquias e o DDT é seletivamente difundido para o tecido adiposo, enquanto a principal rota de entrada para pequenos organismos como fitoplâncton e zooplâncton não depende somente da sua superfície respiratória, mas também da sua composição lipídica. Isto indica que o DDT possui um baixo potencial de eliminação e é bastante resistente aos mecanismos de defesa em peixes comparado a outros compostos tóxicos (WANG e WANG, 2005).

O DDT é capaz de induzir apoptose em diferentes espécies, porém, o mecanismo desta indução em células expostas a este inseticida não está bem compreendido (PEREZ-MALDONADO et al. 2005). O DDT também é responsável pelo aumento do estresse oxidativo em diferentes tipos celulares, contribuindo para os mecanismos apoptóticos destas células (CHIARAMONTE et al. 2001; CARNEVALI et al., 2003). O estudo do estresse oxidativo como um possível mecanismo de toxicidade

de vários pesticidas tornou-se foco de pesquisas toxicológicas desde que este processo biológico passou a ser associado a algumas patologias humanas como câncer, imunossupressão e doenças neurodegenerativas (BANERJEE et al. 2001; KONER et al. 1998; MAYNE, 2003; PONG, 2003).

De acordo com van der OOST et al. (2003), o estresse oxidativo pode ser utilizado como um importante biomarcador em peixes, em decorrência da exposição a poluentes ambientais. Mesmo com o grande número de espécies de peixes existentes no Brasil, poucos estudos foram realizados para avaliar os mecanismos de toxicidade celular do MeHg e DDT em espécies nativas, apesar da ocorrência destes contaminantes em tecidos de muitas espécies de peixes já ter sido reportada (TORRES et al., 2002; DOREA et al., 2006; MIRANDA et al., 2008). Diante do exposto, o principal objetivo deste capítulo foi investigar os efeitos tóxicos do DDT e MeHg em culturas primárias dos hepatócitos de *H. commersoni* devido ao importante papel destas células na biotransformação e bioacumulação de poluentes, fornecendo assim, um interessante modelo para avaliar aspectos do metabolismo hepático, incluindo as respostas bioquímicas e celulares envolvidas na ativação de químicos tóxicos e poluentes ambientais (MOON et al., 1985; BAKSI e FRASIER, 1990; BLAAUBOER et al., 1994; ROGIERS et al., 1995; GUILLOUZO, 1997; KELLY et al., 1998; FILIPAK NETO et al., 2008). Outro aspecto desenvolvido nesta etapa do trabalho, foi um estudo similar àquele já realizado com *Hoplias malabaricus*, no intuito de comparar as respostas celulares de cada espécie.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Investigar os efeitos do DDT e MeHg em cultura primária de hepatócitos de *Hypostomus commersoni*.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Medir a viabilidade celular dos hepatócitos após exposição ao DDT e MeHg;

Analisar os efeitos do DDT e MeHg na atividade das enzimas catalase, glutathione S-transferases e δ -aminolevulinato desidratase após exposição dos hepatócitos;

Avaliar os níveis de peroxidação lipídica, produção de peróxido de hidrogênio e ânion superóxido e a concentração de glutathione reduzida após exposição dos hepatócitos ao DDT e MeHg;

Comparar os resultados obtidos com hepatócitos de outra espécie de teleosteo, *Hoplias malabaricus*, conhecidamente menos resistente ao impacto ambiental que a espécie em questão.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Cultivo celular para exposição aos xenobióticos

Após os hepatócitos terem sido isolados conforme protocolo descrito no Capítulo I, as células foram semeadas em garrafas de cultura Corning®, pré-tratadas com colágeno tipo I desnaturado a 1,5%, numa densidade de $0,5 \times 10^6$ células por mililitro de meio de cultivo RPMI 1640 (pH 7,8) suplementado com HEPES (15 mM), bicarbonato de sódio (6 mM), insulina mista ($0,2 \text{ U.ml}^{-1}$), sulfato de gentamicina (40 mg.l^{-1}) e soro fetal bovino (5% v.v⁻¹). As garrafas de cultivo contendo as células foram mantidas a 22-24°C e pCO₂ atmosférica (em estufa convencional).

3.2. Desenho experimental

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

3.3. 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 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$). 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.

3.4. Ensaio bioquímicos

3.4.1. Concentração de Glutathiona Reduzida (GSH)

As amostras foram descongeladas em gelo e submetidas ao ultrassom (seis ciclos de 4 s cada). Então, separou-se uma alíquota de 150 μl para posterior quantificação de proteínas. Para cada 250 μl de amostra, foram adicionados 50 μl 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°C. Para as leituras, foram adicionados 50 μl do sobrenadante da amostra e 230 μl de tampão Tris-base (400 mM, pH 8,9) a uma microplaca. Como branco, foi utilizado 230 μl do tampão Tris-base a 400 mM mais 50 μl de TCA a 8% em PBS. Por último, 20 μl 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 absorbância ($\lambda = 415$ 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).

3.4.2. Atividade da Catalase (CAT)

As amostras (células em PBS) foram descongeladas como descrito anteriormente para GSH e centrifugadas 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 μl 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 µl 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.

3.4.3. Atividade Global das Isoformas de GST

A atividade global das Glutathione S-transferases (GST) foi monitorada através do aumento de absorvância ($\lambda = 340$ 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; 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 $r^2 \geq 0,99$ para o cálculo do Δ absorvância por minuto.

3.4.4. 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 ultrassom, mas não centrifugadas) foi adicionado em tubos e 550 µl de tampão fosfato de sódio a 100 mM contendo δ -aminolevulinato-hidroclorato (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 (HgCl₂) 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-aminobenzaldeído a 18,18 mg.ml⁻¹, HgCl₂ a 3,18 mg.ml⁻¹, ácido acético glacial a 76,36% e ácido perclórico a 18,18%) foram adicionados a uma microplaca. Após 15 min, os valores de absorbância foram registrados ($\lambda = 550-570$ nm). Em paralelo, uma curva-padrão de porfobilinogênio (0, 2, 5, 10, 20, 30, 40, 80 µM) foi realizada. O conteúdo protéico foi determinado em alíquotas mantidas em separado e a atividade enzimática calculada por comparação a curva padrão de PBG.

3.4.5. 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, H₂SO₄ a 25 mM, BHT (hidroxitolueno butilado) a 4 mM, FeSO₄.NH₄ (sulfato ferroso amoniacal) a 250 µM (acrescentados na seqüência descrita em metanol a 90%)] 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 ($\lambda = 570$ 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 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.

3.4.6 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 proteínas. 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 absorvância ($\lambda = 620 \text{ nm}$; faixa de leitura = 595-620 nm). Como branco utilizou-se PBS. A concentração de proteínas foi determinada a partir da comparação dos valores de absorvância.

3.6. Detecção de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs)

Dois marcadores fluorescentes foram empregados para detectar a produção de EROs, a diclorofluoresceína diacetato (H_2DCFDA) e o diidroetídio (DHE). O DHE é rapidamente oxidado pelo $\text{O}_2^{\cdot -}$ originando etídio que se intercala no DNA. A H_2DCFDA difunde-se passivamente nas células, é desacetilada (DCFH_2) e subsequenteemente oxidada via reação catalisada por H_2O_2 / peroxidase/ Fe^{2+} / citocromo *c* e, possivelmente diretamente por outras EROs, originando $2^{\cdot -}$ - 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) 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.

3.7. Tratamento estatístico dos dados

Para todos os ensaios bioquímicos, viabilidade celular e produção de EROs, quatro análises estatísticas foram realizadas. Os testes de variância *ANOVA* de uma via e *Tukey-Kramer* de múltiplas comparações foram utilizados para comparar os grupos controle, DDT, MeHg I e MeHg II, e para comparar os grupos DDT, MeHg I e DDT*MeHg I. A primeira análise foi utilizada para indicar se houve efeito devido à exposição aos xenobióticos (DDT e ambas as concentrações de MeHg), enquanto a segunda análise indicou se a combinação dos dois xenobióticos, ao invés de cada um isoladamente, foi responsável pelo efeito no grupo DDT*MeHg I. O teste T não paramétrico foi empregado para comparar os grupos controle e DDT*MeHg I; e para comparar os grupos MeHg II e DDT*MeHg I. Este teste possibilitou analisar se a combinação de DDT e MeHg I foi responsável pelas alterações em relação ao grupo controle, enquanto a última análise foi somente realizada se (1) houve efeito resultante da combinação de DDT e MeHg I e (2) se MeHg II foi diferente do controle, indicando se a magnitude dos efeitos de MeHg II e DDT*MeHg I era similar ou não. DDT e MeHg foram testados em três experimentos independentes (provenientes de diferentes

culturas celulares) para os ensaios bioquímicos e dois experimentos independentes para a produção de EROs e viabilidade celular. Os hepatócitos foram cultivados em garrafas para os ensaios, sendo duas garrafas para cada grupo experimental, para cada experimento independente. Em cada garrafa, populações de células obtidas representavam uma réplica. Assim, cada réplica significa uma leitura diferente no espectrofotômetro ou no citômetro de fluxo. Este número de réplicas foi utilizado para fornecer uma análise estatística segura, no entanto, o número de réplicas não foi o mesmo devido à características próprias de cada ensaio, tais como variabilidade, complexidade, tempo e custo de alguns reagentes. Deste modo, o número de réplicas por ensaio foi: 8 para a detecção de EROs (2 experimentos x 4 réplicas por experimento); 20 para viabilidade celular (2 experimentos x 10 réplicas); 34 para GSH (3 experimentos x 11-12 réplicas); 42 para LPO (3 experimentos x 14 réplicas). Para atividade enzimática, foram 36 réplicas para CAT (3 experimentos x 12 réplicas); 39 para GST (3 experimentos x 13 réplicas) e 36 para δ -ALAd (3 experimentos x 12 réplicas).

4. RESULTADOS

4.1. Viabilidade Celular

Com o intuito de analisar a toxicidade do DDT e MeHg, a viabilidade celular foi investigada. Os resultados demonstraram que somente o DDT foi responsável por causar um efeito tóxico, contribuindo para a morte celular. A viabilidade celular diminuiu 16% no grupo DDT, permanecendo similar entre os demais grupos em relação ao controle (Figura 4).

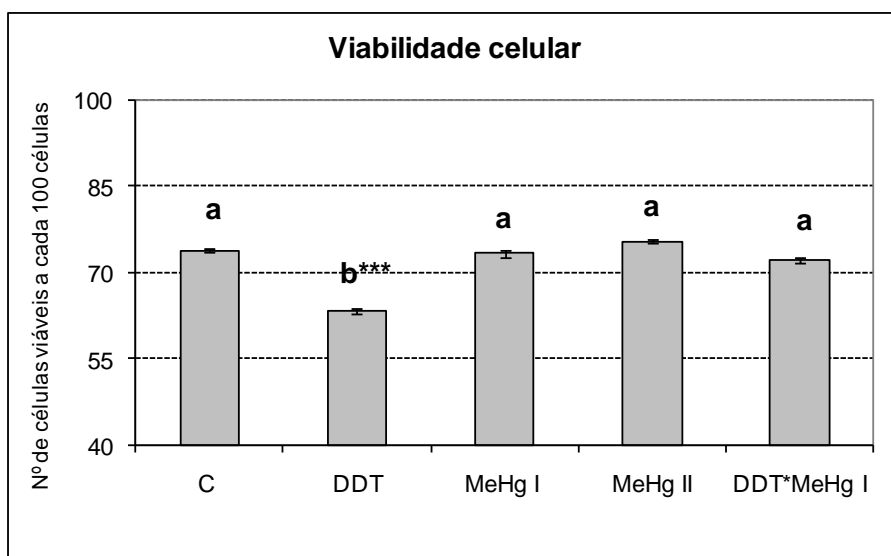


Figura 4: Viabilidade celular em número de células viáveis a cada 100 células. Média ± erro padrão da média. *** $p < 0,001$ (asteriscos em comparação com o grupo controle). Letras diferentes indicam grupos estatisticamente distintos.

4.2. Concentração de glutatona reduzida

A GSH foi medida para verificar a interferência do DDT e MeHg na concentração desta importante molécula antioxidante. O conteúdo de GSH permaneceu similar no grupo MeHg I em comparação ao grupo controle, mas diminuiu no grupo DDT (49%), MeHg II (63%) e DDT*MeHg I (61%). Neste último grupo, a presença do DDT parece ter sido o fator que mais interferiu na redução da concentração de GSH (Figura 5).

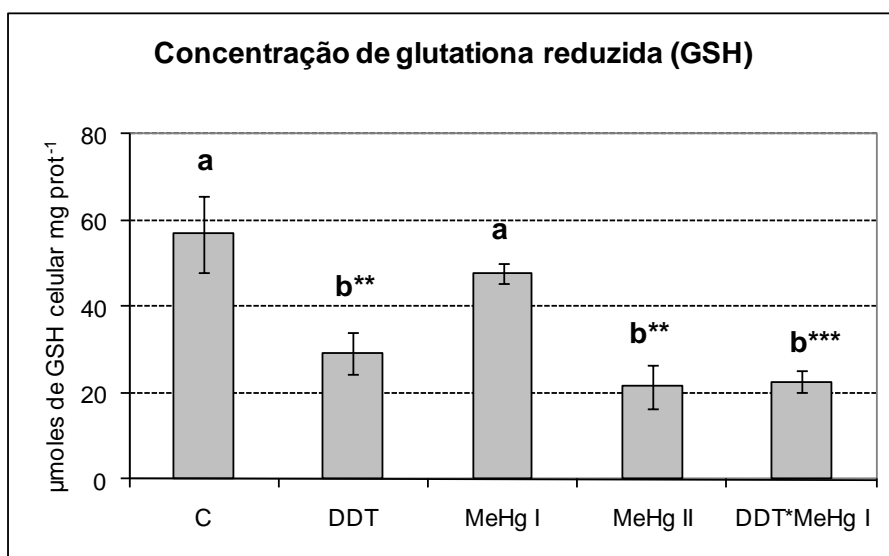


Figura 5: Concentração em micromoles de GSH por miligrama de proteínas totais. Média \pm erro padrão da média. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ (asteriscos em comparação com o grupo controle). Letras diferentes indicam grupos estatisticamente distintos.

4.3. Peroxidação lipídica

Em relação à peroxidação dos lipídios, não houve diferenças significativas nas células expostas ao DDT e MeHg em comparação ao grupo controle. Apesar disto, um aumento de 25% nos níveis de peroxidação lipídica foi detectado nas células do grupo DDT*MeHg I em comparação ao grupo MeHg I. Este fato é indicativo de que a combinação do DDT e MeHg foi significativamente mais tóxica para os lipídios do que o MeHg a 0,25 μ M isoladamente (Figura 6).

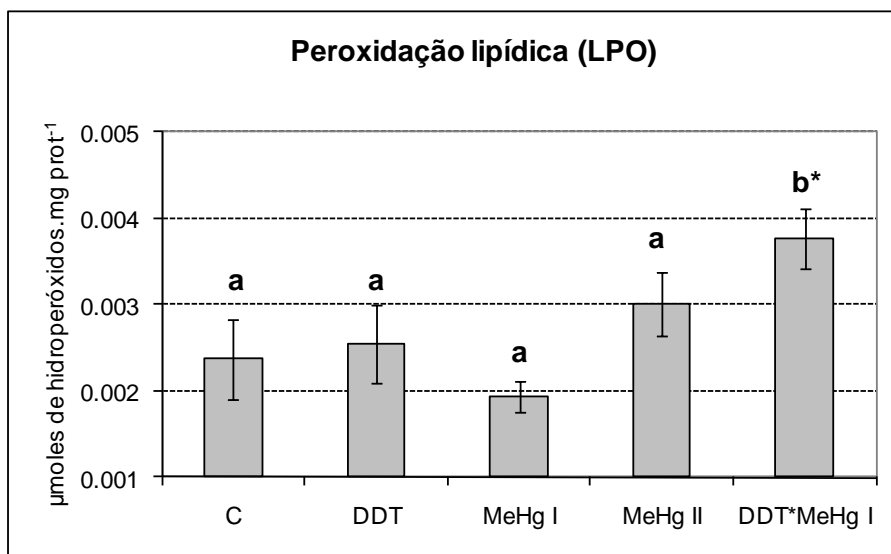


Figura 6: Concentração em micromoles de hidroperóxidos por miligrama de proteínas totais. Média \pm erro padrão da média. * $p < 0,05$ (asteriscos em comparação com o grupo controle). Letras diferentes indicam grupos estatisticamente distintos.

4.4. Atividade da Catalase

Para verificar a resposta de defesa celular diante da geração de H_2O_2 , a atividade da enzima antioxidante catalase, também responsável pela degradação do peróxido de hidrogênio, foi mensurada. Um aumento na atividade desta enzima foi observado nas células expostas ao MeHg II (33%), sendo que o mesmo não ocorreu nos demais grupos, nos quais a atividade da enzima permaneceu similar ao grupo controle (Figura 7).

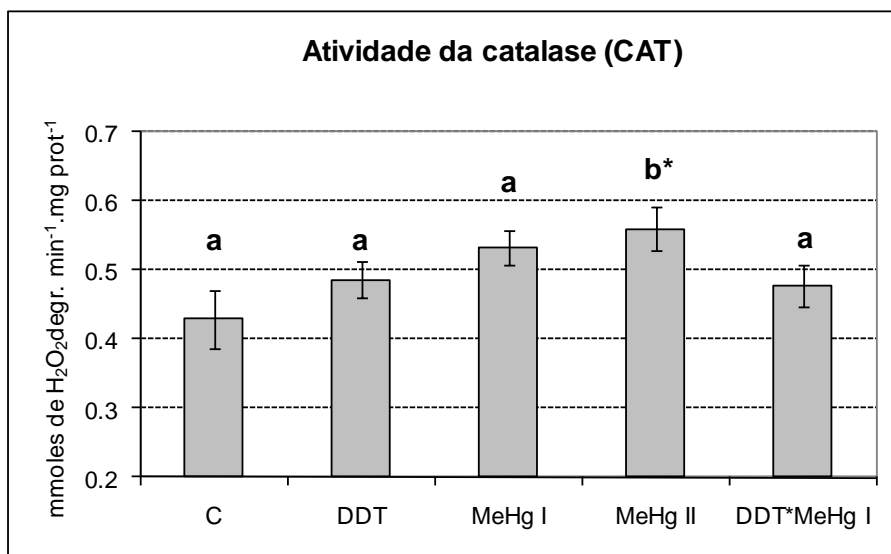


Figura 7: Atividade em milimoles de peróxido de hidrogênio degradado por minuto por miligrama de proteínas totais. Média \pm erro padrão da média. * $p < 0,05$ (asteriscos em comparação com o grupo controle). Letras diferentes indicam grupos estatisticamente distintos.

4.5. Atividade da GST

A GST é uma enzima responsável pela conjugação de metabólitos com a GSH, facilitando a excreção dos mesmos. Também exerce papel antioxidante pela degradação de peróxidos lipídicos ou biotransformação de compostos endobióticos. Pela sua importância, sua atividade foi investigada e apresentou diminuição nos grupos DDT (35%), MeHg I (25%) e DDT*MeHgI (50%) em relação ao grupo controle. O grupo MeHg II não apresentou diferenças significativas (Figura 8).

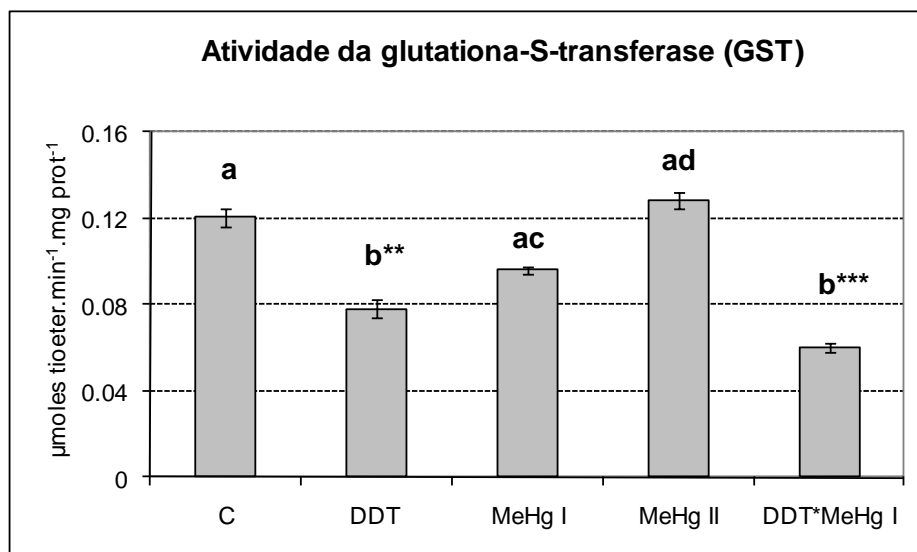


Figura 8: Atividade em micromoles do tioéter GSH-CDNB formado por minuto por miligrama de proteínas totais. Média ± erro padrão da média. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ (asteriscos em comparação com o grupo controle). Letras diferentes indicam grupos estatisticamente distintos.

4.6. Atividade da δ -ALAd

A atividade da enzima δ -ALAd diminuiu aproximadamente 33% e 50% nos grupos MeHg I e DDT*MeHg I, respectivamente. Esta enzima é essencial para a síntese do grupo prostético heme e tem papel antioxidante diminuindo os níveis de ácido aminolevulínico, que pode causar a produção de espécies reativas no interior das células (Figura 9).

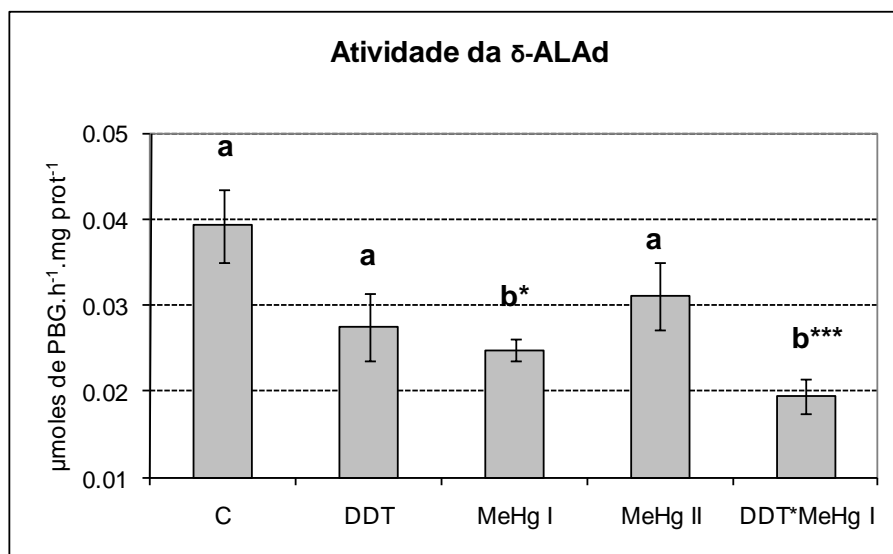


Figura 9: Atividade em micromoles de porfobilinogênio (PBG) formado por hora por miligrama de proteínas totais. Média \pm erro padrão da média. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ (asteriscos em comparação com o grupo controle). Letras diferentes indicam grupos estatisticamente distintos.

4.7. Produção de EROs

A concentração intracelular de peróxido de hidrogênio e ânion superóxido foi mensurada para investigar a produção de EROs. Os níveis de H_2O_2 diminuíram em todos os grupos, especialmente no grupo DDT*MeHg I. Para o $O_2^{\cdot-}$, a diminuição foi verificada nos grupos MeHg II e DDT*MeHg I. A partir da observação destes resultados, é possível afirmar que as concentrações de DDT e MeHg utilizadas neste estudo não interferiram com o balanço redox de forma suficiente para causar algum desequilíbrio na célula. Ou ainda, o mais provável é que os efeitos dos xenobióticos tenham sido balanceados pelos mecanismos antioxidantes das células (Figuras 10 e 11).

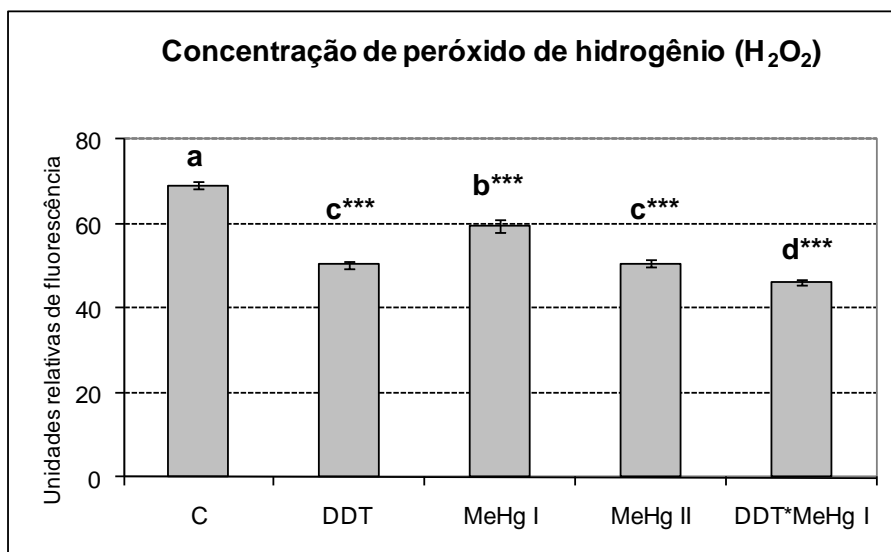


Figura 10: Produção de peróxido de hidrogênio em unidades relativas de intensidade de fluorescência. Média \pm erro padrão da média. *** $p < 0,001$ (asteriscos em comparação com o grupo controle). Letras diferentes indicam grupos estatisticamente distintos.

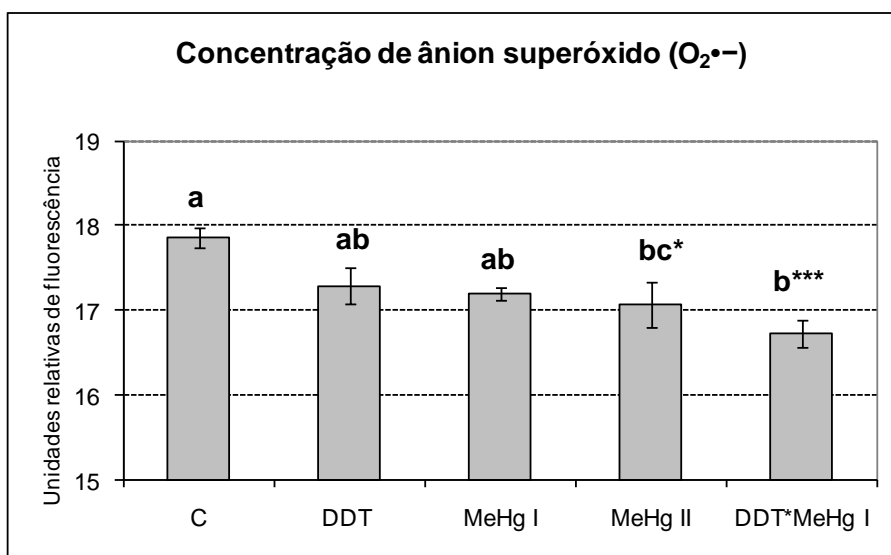


Figura 11: Produção de ânion superóxido em unidades relativas de intensidade de fluorescência. Média \pm erro padrão da média. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ (asteriscos em comparação com o grupo controle). Letras diferentes indicam grupos estatisticamente distintos.

5. DISCUSSÃO

Ao longo da evolução, as células desenvolveram um conjunto de mecanismos de defesa antioxidante para prevenir o aumento nas taxas de espécies reativas, limitando seus efeitos deletérios em macromoléculas celulares. Estes mecanismos incluem enzimas para inativar peróxidos, proteínas para sequestrar metais de transição e uma variedade de compostos para eliminar os radicais livres. As espécies reativas que são geradas no interior das células podem oxidar moléculas biológicas causando morte celular e danos aos tecidos (ZWART et al., 1999). Muitos contaminantes ambientais e seus metabólitos são responsáveis por efeitos tóxicos devido ao estresse oxidativo causado por diferentes mecanismos, incluindo depleção de moléculas antioxidantes como a GSH e por prejudicar as funções das enzimas antioxidantes como a CAT e a GST (ABDOLLAHI, 2004; BANERJEE et al., 2001). Organismos que possuem diferentes histórias evolutivas podem apresentar diferentes graus de sensibilidade ao estresse induzido por contaminantes e por isso o efeito tóxico destes compostos químicos deve ser avaliado em diferentes espécies de peixes para um melhor entendimento dos mecanismos de defesa. Assim sendo, os dados discutidos a seguir comparam as respostas dos hepatócitos de *H. commersoni* e *H. malabaricus* - espécies de peixes que ocupam posições diferentes nas cadeias tróficas e níveis de associação a sedimentos nos ecossistemas aquáticos. Como o fígado é um órgão-alvo para a maioria dos compostos tóxicos, suas células estão entre as mais afetadas pelo DDT e MeHg mesmo em exposições naturais.

Após a exposição dos hepatócitos ao DDT e MeHg, foi possível observar que estes poluentes, que desregularam o balanço redox intracelular causando morte celular e estresse oxidativo nos hepatócitos de *Hoplias malabaricus* (FILIPAK NETO et al., 2008), não prejudicaram o metabolismo celular dos hepatócitos de *H. commersoni* com a mesma intensidade. As evidências que corroboram esta afirmação são as diferentes alterações observadas nos biomarcadores analisados e, deste modo, pode-se afirmar que os hepatócitos de *H. commersoni*, podem ser de alguma forma mais resistentes à exposição ao DDT e MeHg do que os hepatócitos do peixe predador *H. malabaricus*. De fato, em várias áreas impactadas onde outras espécies de peixes são

raras ou ausentes devido à contaminação (MIRANDA, et al., comunicação pessoal), a espécie *H. commersoni* está presente em grande número, indicando maior resistência à presença de contaminantes em relação a outras espécies. Esta maior resistência pode ser confirmada neste estudo *in vitro* com os hepatócitos expostos ao MeHg e DDT.

De acordo com Abdollahi et al. (2004) e Franco et al. (2009), o estresse oxidativo pode ser definido como um desbalanço entre a produção de radicais livres e a capacidade das defesas antioxidantes da célula em neutralizá-los. Os radicais livres podem ser definidos como átomos ou moléculas que possuem um ou mais elétrons desemparelhados e estão normalmente envolvidos com a peroxidação das membranas lipídicas das células. Espécies reativas de oxigênio incluem os radicais livres derivados do oxigênio, como o radical ânion superóxido e o radical hidroxil, além do peróxido de hidrogênio, sendo que a produção de espécies reativas do oxigênio é o resultado de um ambiente aeróbico (FRANCO et al., 2009). É importante considerar que o balanço entre a produção de radicais livres e as defesas antioxidantes têm implicações diretas na saúde e equilíbrio do organismo: Se há grande quantidade de radicais livres ou pouca proteção antioxidante, uma condição de estresse oxidativo pode desenvolver-se, o que pode causar danos crônicos e permanentes (HARMAN, 1999).

A partir dos resultados obtidos, foi possível afirmar que o estresse oxidativo não ocorreu nos hepatócitos de *H. commersoni* baseando-se na viabilidade celular, atividade da catalase, produção de EROs e peroxidação lipídica. Por outro lado, a diminuição da atividade da GST e concentração de GSH, indicaram uma notável sensibilidade à exposição ao DDT nos grupos DDT e DDT*MeHg I.

A conjugação de compostos eletrofílicos (ou metabólitos de fase I) com a GSH é catalizada pelas glutationa-S-transferases, uma superfamília multigênica de enzimas diméricas. Além de exercerem funções essenciais no transporte intracelular (grupos heme, bilirrubina e ácidos biliares) e na biossíntese de leucotrienos e prostaglandinas, estas enzimas possuem um importante papel na defesa do organismo contra danos oxidativos e compostos peroxidativos de DNA e lipídios. Outra característica importante em relação a estas enzimas é que a toxicidade de muitos compostos exógenos pode

ser modulada pela indução das GSTs e isto foi observado em muitas espécies de peixes (GEORGE, 1994).

A GSH possui papel central na biotransformação e eliminação de xenobióticos e na defesa das células contra o estresse oxidativo, é o mais abundante tiol celular de baixa massa molecular e é encontrada intracelularmente em altas concentrações em todos os organismos aeróbicos. Esta importante molécula também participa dos principais eventos biológicos como a transdução de sinais, transcrição gênica, síntese de DNA e proteínas, ciclo celular e diferenciação celular (PRETEL e GARCÍA, 2006). Muitas das reações da GSH envolvem o grupo sulfidrila (SH), altamente polarizável, tornando-o um bom nucleófilo para reações com compostos químicos eletrofílicos. Esta habilidade de doar elétrons a outros compostos também faz da glutathiona um bom redutor. A combinação de sua abundância nos organismos aeróbicos e das propriedades químicas do grupo sulfidrila suporta a proposta de que a GSH surgiu na evolução bioquímica como uma proteção contra espécies reativas de oxigênio e compostos eletrofílicos gerados por processos oxidativos, tanto no organismo quanto no ambiente em que este vive (HUBER et al., 2008).

Um dos mecanismos que envolvem o aumento do estresse oxidativo são os níveis intracelulares da GSH (LEE, et al., 2001). A diminuição nos níveis da GSH é prejudicial à célula, pois interfere nas funções mitocondriais, incluindo a formação de energia e aumento da produção de radicais livres, provocando a morte celular (BELETTI et al., 2002). Assim, o estresse oxidativo associado aos níveis de GSH e às disfunções mitocondriais, podem representar eventos-chave na citotoxicidade causada pelo MeHg. Desta forma, são de grande importância os estudos que investigam as alterações nos níveis intracelulares de GSH e a formação de EROs em células expostas ao MeHg (SHANKER, 2005).

A diminuição da GSH pode comprometer a habilidade redox das células e a diminuição simultânea da GSH e GST podem ter consequências diretas na toxicidade do DDT. Os metabólitos do DDT são substratos para a conjugação com a GSH pela GST e, desta forma, a diminuição da viabilidade celular no grupo DDT pode ser uma consequência de um desequilíbrio na detoxificação deste organoclorado. Além disso,

as GSTs catalizam a conjugação de uma ampla gama de compostos com a GSH, incluindo carcinógenos, poluentes ambientais, drogas, epóxidos, quinonas e produtos provenientes da peroxidação de lipídios (TEW, 1994; HAYES e PULFORD, 1995; CNUBBEN et. al., 2001) e assim o DDT pode tornar os hepatócitos mais suscetíveis a estressores adicionais. Em relação à GSH, sua diminuição provavelmente afetou a eliminação de EROs (FRANCO et al., 2009) corroborada pela diminuição dos níveis de peróxido de hidrogênio e ânion superóxido gerados nos hepatócitos. No caso dos hepatócitos de *H. malabaricus*, entretanto, embora a diminuição de GSH também tenha ocorrido nos grupos DDT, MeHg I e DDT*MeHg I (FILIPAK NETO et al., 2008), bem como em *H. commersoni*, a interrelação entre os níveis de GSH e a eliminação de EROs foi somente clara para o ânion superóxido no grupo MeHg II. Dados da literatura reportam que o MeHg e o DDT provocam a diminuição da GSH e apoptose pela via mitocondrial (ROBERTSON e ORRENIUS, 2000; GATTI et. al., 2004; KAUR et. al., 2007; AHMED et. al., 2008; SONG et. al., 2008), mas neste estudo, ficou claro que concentrações ambientalmente relevantes de ambos os poluentes, isto é, concentrações não fictícias e que são encontradas naturalmente em organismos expostos, não apresentaram o efeito esperado, baseando-se na literatura e no trabalho prévio com *H. malabaricus*.

A peroxidação de lipídios é uma importante consequência do estresse oxidativo e pode ser provocada por um único radical livre que promove uma série de reações bioquímicas deletérias (van der OOST, 2003). A LPO pode ser definida como uma cascata de eventos bioquímicos resultante da ação dos radicais livres sobre os lipídios insaturados das membranas celulares, levando à destruição de sua estrutura, falência dos mecanismos de troca de metabólitos e, numa condição extrema, à morte celular (BENZIE, 1996). As alterações nas membranas, ocasionadas pela LPO, levam a transtornos da permeabilidade, alterando o fluxo iônico e o fluxo de outras substâncias, o que resulta na perda da seletividade para entrada e/ou saída de nutrientes e substâncias tóxicas à célula, alterações do DNA e comprometimento dos componentes da matriz extracelular (proteoglicanos, colágeno e elastina) (LIMA e ABDALLA, 2001).

Outra descoberta importante deste estudo foi que o DDT, quando utilizado sozinho, foi responsável pela diminuição da GSH e GST e provavelmente pelo aumento da LPO, enquanto o MeHg foi responsável pela diminuição da atividade da δ -ALAD no grupo DDT*MeHg I, e, neste caso, nenhum efeito foi relacionado à associação de ambos os poluentes. Estes resultados são similares aos encontrados por Alves Costa et al. (2007), onde a exposição subcrônica de *H. malabaricus* ao MeHg resultou em inibição da atividade da δ -ALAD em eritrócitos. Mais uma vez, há diferenças significativas entre *H. commersoni* e *H. malabaricus* a serem notadas em relação à fisiologia dos hepatócitos, uma vez que efeitos provenientes da combinação de DDT e MeHg para a GST (aumento na atividade) ocorreu em *H. malabaricus*, acompanhado pelo aumento dos níveis de peroxidação lipídica em todos os grupos expostos. O aumento da LPO e a diminuição da GSH em *H. malabaricus* foram associadas à morte celular nesta espécie predadora, enquanto a ausência de níveis significativos de danos aos lipídios pode ter contribuído para a sobrevivência dos hepatócitos de *H. commersoni*.

A catalase é uma das principais enzimas do sistema antioxidante da célula e está presente em animais, plantas, bactérias e fungos (ZAMOCKY e KOLLER, 1999). É uma enzima tetramérica que catalisa a decomposição do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio molecular, protegendo as células do H_2O_2 e desempenhando um importante papel no sistema de defesa antioxidante em adaptação ao stresse oxidativo. A expressão gênica desta enzima é regulada pela taxa de H_2O_2 no citosol (MATES et al., 1999).

Embora o MeHg e DDT possam induzir a formação de EROs e radicais livres, observou-se diminuição dos níveis de H_2O_2 e $O_2^{\cdot-}$ em todos os grupos de hepatócitos expostos, indicando que os mecanismos de defesa antioxidantes como a atividade da CAT foram ativados. A atividade desta enzima aumentou no grupo MeHg II e a viabilidade dos hepatócitos não foi alterada, exceto no grupo DDT. Por outro lado, a inibição da CAT acompanhada pela diminuição da viabilidade celular ocorreu nos hepatócitos de *H. malabaricus* (FILIPAK NETO et al., 2008). Curiosamente, aumento na atividade da CAT foi verificado em ambos os grupos MeHg, para as duas espécies

de peixe, ou seja, no grupo MeHg II para *H. commersoni* e MeHg I para *H. malabaricus*. É importante notar que este aumento foi diferente para cada grupo, sendo que os hepatócitos de traíra estavam expostos a uma concentração dez vezes menor no grupo MeHg I em relação ao grupo MeHg II. As células normalmente respondem à concentrações realísticas de contaminantes através do aumento da atividade de enzimas de defesa, enquanto concentrações excessivas podem inibi-las. Deste modo, seriam os hepatócitos de *H. commersoni* mais capazes de lidar com altos níveis de MeHg em relação aos hepatócitos de *H. malabaricus*? A resposta parece ser “sim” levando-se em consideração a atividade da CAT e GST, mas não a atividade da enzima δ -ALAd, já que esta enzima teve sua atividade inibida nos grupos MeHg I e DDT*MeHg I. Diante disto, é muito mais complicado de explicar a razão pela qual *H. commersoni* é uma espécie robusta, mesmo que parte da resposta tenha sido apresentada e é mais uma vez recapitulada: o estresse oxidativo não ocorreu em níveis semelhantes nos hepatócitos de *H. commersoni* em relação ao mesmo tipo de células de *H. malabaricus*, testando-se as mesmas concentrações de MeHg e DDT, utilizando-se o mesmo desenho experimental.

6. CONCLUSÕES

As respostas dos hepatócitos de *H. commersoni*, ou a ausências delas, parecem ser mais significativas contra os efeitos tóxicos do DDT e MeHg do que aquelas provenientes de *H. malabaricus*.

Não é possível concluir se a posição na cadeia trófica pode ser responsável pelas diferenças na fisiologia celular, ou se outros aspectos da história evolutiva presentes nas respostas celulares das espécies comparadas podem ser a chave para o entendimento das diferenças entre as duas espécies.

Diferenças químicas existentes entre o DDT e MeHg, seu tempo de coexistência no ambiente (o DDT, por ser um composto fabricado pelo homem é considerado novo em comparação ao MeHg, presente naturalmente em baixas concentrações na biota) além da composição do meio de cultura utilizado, podem ser responsáveis pela maior toxicidade do DDT em comparação ao MeHg em ambas espécies.

Embora possa ser sugerido que o MeHg e o DDT podem representar riscos para a espécie predadora *H. malabaricus*, baseando-se em descobertas provenientes de estudos *in vivo* e *in vitro* (MELA et al., 2007; OLIVEIRA RIBEIRO et al., 2006; FILIPAK NETO et al., 2008; MIRANDA et al., 2008), estes riscos podem ser considerados menores para a espécie *H. commersoni*.

CAPÍTULO III

**USO DOS BIOMARCADORES EMPREGADOS *IN VITRO* PARA
AVALIAÇÃO *IN VIVO* DE *Hypostomus commersoni* EXPOSTOS
NATURALMENTE A PCBs E PESTICIDAS ORGANOCLORADOS**

RESUMO

Os poluentes organopersistentes (POPs), provenientes da indústria e agricultura, ameaçam os ecossistemas e a saúde humana por serem onipresentes, persistentes e por apresentarem efeitos tóxicos mesmo em baixas concentrações. O problema associado à poluição causada pelos POPs afeta principalmente os organismos aquáticos, em particular, espécies de peixes que na maioria das vezes são consumidas pelo homem. Poucos estudos têm sido realizados para se conhecer os níveis de POPs em peixes nativos de água doce, sendo que dados relacionados à espécie *Hypostomus commersoni* são inexistentes. Desta forma, este estudo visou investigar a bioacumulação e os efeitos de POPs na referida espécie. Para isto, exemplares adultos foram coletados em uma área supostamente impactada no município de Ponta Grossa-PR e os níveis de bifenis policlorados (PCBs) e pesticidas organoclorados (POCs) foram mensurados no tecido hepático e muscular destes animais. Também foram investigados alguns parâmetros bioquímicos relacionados à homeostase dos tecidos hepático, muscular e nervoso, dentre eles, a atividade das enzimas colinesterases (ChE), catalase (CAT), glutationa-S-transferase (GST), glutationa peroxidase (GPx), glucose-6-fosfato-desidrogenase (G6PDH), superóxido dismutase (SOD), a concentração de glutationa reduzida (GSH) e níveis de peroxidação lipídica (LPO). As análises referentes à quantificação dos POPs indicaram que os organismos estudados bioacumularam quantidades importantes de organoclorados. O fígado, por ser um órgão rico em lipídios, apresentou uma concentração maior em relação ao tecido muscular. Ao contrário da bioacumulação de PCBs, a contaminação por pesticidas foi semelhante no fígado e no músculo, onde foi possível detectar níveis semelhantes de DDT e seus metabólitos. Substâncias como aldrin e dieldrin, que já tiveram seu uso banido devido as suas conhecidas propriedades tóxicas, foram também detectadas em abundância no tecido muscular. Em relação aos dados bioquímicos, observou-se que a atividade das enzimas GST, G6PDH e ChE muscular estava correlacionada à bioacumulação dos poluentes. Os resultados sugerem uma ação negativa dos contaminantes na saúde dos indivíduos desta espécie provavelmente devido ao seu uso extensivo em lavouras e às atividades industriais próximas à área de estudo.

Palavras-chave: poluentes organopersistentes, bioacumulação, *H. commersoni*.

1. INTRODUÇÃO

O ambiente é continuamente impactado por componentes químicos orgânicos - os xenobióticos, provenientes das mais diversas atividades antrópicas como a indústria e agricultura. No século XX, milhares de poluentes orgânicos, dentre eles os bifenis policlorados (PCBs) e pesticidas organoclorados (POCs), foram produzidos, e em parte, lançados no ambiente (VAN DER OOST et al., 2003).

Os PCBs são um dos contaminantes ambientais mais estudados, compondo uma classe de substâncias que formam uma mistura de compostos fabricados pelo homem e que variam entre óleos líquidos e sólidos cerosos. Os PCBs já foram amplamente utilizados pela indústria e comércio, com aplicações conhecidas em plastificantes contidos em tintas, produtos a base de plástico, borracha e corantes, sendo liberados em lixões, aterros e em outras áreas abertas (FRANCO, 2009). Em vários países, a produção de PCBs foi banida ou limitada a partir da década de 70, no entanto, estas substâncias ainda são utilizadas em aplicações de sistemas fechados (ESPANDIARI et al., 2003). Os PCBs e POCs são considerados poluentes organopersistentes (POPs), e sua presença no ambiente está relacionada ao seu extenso uso no passado, indicando que estes compostos ainda podem gerar problemas ambientais a longo prazo (ERDOGRUL et al., 2005).

É consenso que os POPs ameaçam os ecossistemas e a saúde humana devido ao seu potencial tóxico, por serem onipresentes, pouco degradáveis e apresentarem efeitos tóxicos mesmo em baixas concentrações (FRANCO, 2009). O problema associado à poluição causada pelos POPs é a contaminação de mananciais e organismos vivos, incluindo o homem. A concentração dessas substâncias tem alcançado níveis tóxicos em vários organismos terrestres e principalmente aquáticos, já que estes últimos são o receptáculo final da maioria destas moléculas, via processos atmosféricos e hidrológicos.

Os POPs estão disponíveis para os organismos aquáticos através dos sedimentos contaminados em rios e lagos, que agem como uma significativa fonte de PCBs para espécies que vivem associadas aos sedimentos no fundo destes ambientes (BRUSLE, 1991). Estes poluentes podem acumular-se nos organismos aquáticos por

diferentes mecanismos: via entrada direta através das brânquias ou pele (bioconcentração), através da entrada de partículas em suspensão (ingestão) e através do alimento contaminado (biomagnificação) (VAN DER OOST et al. 2003).

Os peixes são bons indicadores em situações de monitoramento de poluição ambiental porque concentram poluentes em seus tecidos a partir da água e através de sua dieta, possibilitando a transferência de poluentes ao longo da cadeia trófica (FISK et al., 2001; BOON et al., 2002).

POPs são substâncias altamente lipofílicas, desta forma, quando internalizadas pelo organismo, ficam armazenadas no tecido adiposo e membranas celulares (YILMAZ, 2006). Apesar dos diferentes congêneres dos PCBs apresentarem variações em sua toxicidade (YILMAZ, 2006), sabe-se que estes compostos são imunotóxicos (SILKWORTH et al., 1984), carcinogênicos (COGLIANO, 1998), neurotóxicos (CHEN et al., 1994; ROGAN e GLADEN, 1992) e causam problemas congênitos nos seres humanos e em outros animais (SAFE, 1994).

O organoclorado DDT é um dos POPs mais disseminados nos ecossistemas e ainda tem seu uso permitido em alguns países em programas de controle do vetor da malária. No Brasil, o DDT foi banido para usos na agricultura desde 1985, mas é ainda encontrado em tecidos de peixes, bem como seus metabólitos DDD e DDE, refletindo a persistência dos resíduos do DDT que foi utilizado no passado. Apesar da grande variedade de espécies de peixes encontradas no Brasil, poucos estudos foram publicados a respeito dos mecanismos de toxicidade celular causados pelo DDT e seus metabólitos em espécies nativas, embora a presença destes contaminantes em tecidos de muitas espécies já ter sido reportada (TORRES et al., 2002; MIRANDA et al., 2008).

A exposição a uma ampla variedade de pesticidas induz ao estresse oxidativo, ocasionando aumento de EROs, peroxidação de lipídios e danos no DNA (ABDOLLAHI et al., 2004). Entretanto, para certos pesticidas, os mecanismos que levam ao desbalanço da homeostase do ambiente redox das células é compreendido parcialmente. Têm-se demonstrado que os pesticidas alteram o balanço redox por diferentes mecanismos, dentre eles: (1) pela sua conversão enzimática em produtos secundários reativos e/ou EROs, (2) pela diminuição das defesas antioxidantes; e (3)

prejudicando a função de enzimas antioxidantes (BAGCHI, et al., 1995; BANERJEE et al., 2001).

Poucos estudos têm sido realizados para se conhecer os níveis de PCBs e organoclorados em peixes brasileiros de água doce. Dados relacionados à espécie *H. commersoni*, em particular, são inexistentes. Distúrbios imunológicos e fisiológicos foram recentemente encontrados em *Hoplias malabaricus* e relacionados à bioacumulação de pesticidas organoclorados e PCBs. Este trabalho foi realizado por Miranda et al. (2008), na mesma área estudada neste trabalho. Assim, o objetivo do presente capítulo foi investigar a bioacumulação de POPs no peixe *H. commersoni* para conhecer os impactos destes poluentes em uma espécie de peixe não predadora, que vive associada aos sedimentos. Os níveis de PCBs e POCs foram mensurados no tecido hepático e muscular e alguns parâmetros relacionados ao ambiente redox do fígado foram analisados. Dentre eles, a atividade das enzimas catalase (CAT), glutationa-S-transferase (GST), glutationa peroxidase (GPx), glucose-6-fosfato-desidrogenase (G6PDH), superóxido dismutase (SOD), a concentração de glutationa reduzida (GSH) e níveis de peroxidação lipídica (LPO).

Além dos parâmetros relacionados ao ambiente redox, também foram investigados os efeitos dos PCBs e pesticidas organoclorados na atividade das colinesterases (ChE), que são enzimas responsáveis pela hidrólise do neurotransmissor acetilcolina em sinapses colinérgicas tanto em vertebrados quanto invertebrados. Outro aspecto estudado neste capítulo foram os impactos causados por estes poluentes através da histopatologia, que é também uma importante ferramenta indicadora da saúde dos peixes e mostra os efeitos causados pela exposição a vários poluentes antropogênicos (HINTON et al., 1992). Deste modo, fígado e brânquias foram analisados para mapear os danos histopatológicos nestes importantes órgãos-alvo.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar os níveis de bioacumulação e os efeitos de bifenis policlorados e pesticidas organoclorados em peixes *Hypostomus commersoni* provenientes de uma área impactada.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Quantificar a presença de compostos organopersistentes e seus metabólitos em tecido de fígado e músculo dos animais estudados;

Avaliar os efeitos dos POPs e seus metabólitos através dos seguintes biomarcadores bioquímicos: atividade das catalases, das glutathione S-transferases, da glutathione peroxidase, das colinesterases, das superóxido dismutases, da glucose-6-fosfato desidrogenase, além da concentração de glutathione reduzida e peroxidação de lipídios;

Avaliar os efeitos crônicos dos POPs e seus metabólitos em fígado e brânquias através de histopatologia.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Obtenção dos animais e área de estudo

Um lago pertencente a um clube privado localizado no município de Ponta Grossa - Paraná foi escolhido como área de estudo pela grande ocorrência da espécie *Hypostomus commersoni* neste ambiente (Figura 12). Outra razão desta escolha, é que este lago encontra-se em zona industrial e rural, sendo portanto, afetado pela poluição urbana, industrial e em menor escala agrícola, pois os poluentes podem atingir este ecossistema através de correntes atmosféricas e chuvas, uma vez que o lago não tem contato com nenhum outro corpo d'água. Apesar destas características, atividades de pesca para consumo humano e esportes aquáticos são desenvolvidos neste local.

Para este estudo, 13 exemplares adultos ($30,36 \pm 5,04$ cm) da espécie *H. commersoni* foram coletados em outubro de 2008, utilizando-se rede do tipo tarrafa. Os animais foram transportados até o Setor de Ciências Biológicas da UFPR, para o Laboratório de Toxicologia Celular. Após anestesia com benzocaína (5%), foram sacrificados por secção medular e dissecados para a retirada do fígado e músculo para análises químicas de quantificação de POCs, fígado, músculo e cérebro para análises bioquímicas e fígado e brânquias para análises histopatológicas.

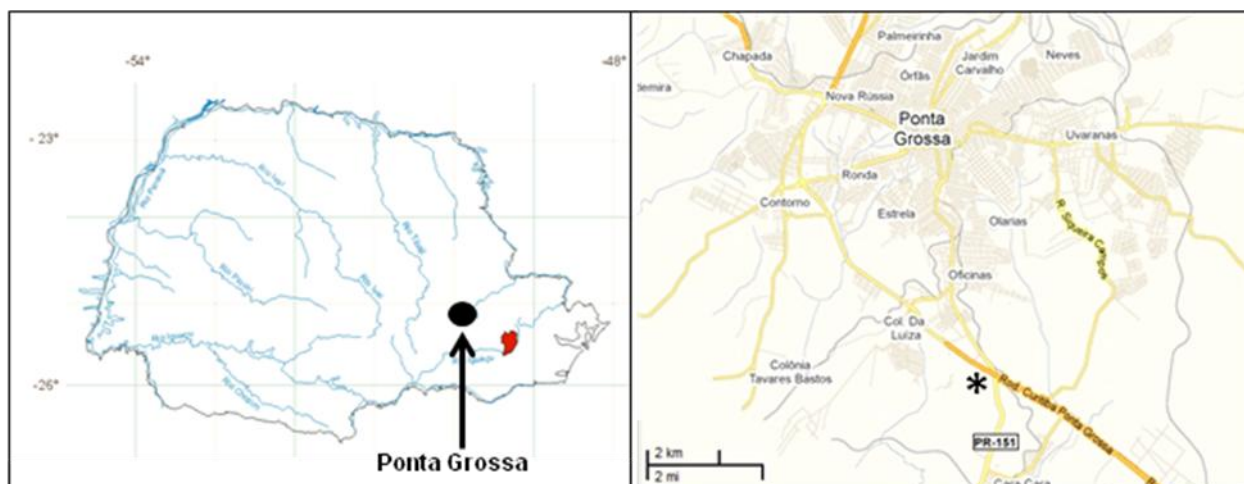


Figura 12: Localização da área de estudo. À esquerda, o mapa do Estado do Paraná, indicando o município de Ponta Grossa. O lago onde os peixes foram coletados está indicado pelo asterisco na figura à direita.

3.2. Quantificação dos poluentes organopersistentes

Fígado e músculo foram dissecados para a extração dos lipídios e os compostos lipofílicos foram obtidos utilizando-se um solvente de extração acelerada (ASE200) (Dionex, Voisins le Bretonneux, France). Em seguida, foram realizadas a extração e a purificação por SPE (Solid Phase Extraction) em coluna de florisil (MgO_3Si) segundo método do EPA 3620 (Bond Elut Florisil, 1 g, 200 μm tamanho da partícula Varian, Les Ulis, France), primeiramente com hexano para obter os compostos menos polares (PCBs, HCB, pp'-DDE entre outros) e depois com uma solução de hexano/dietiléter para os compostos mais polares (OCs e triazinas). Os pesticidas foram identificados e quantificados em cromatografia de fase gasosa, em Cromatógrafo Autosystem XL Perkin Elmer, equipado de detector de captura de elétrons (^{63}Ni Source). O gás usado como carreador foi o nitrogênio. As temperaturas do injetor e do detector foram de 280°C e 350°C respectivamente. A coluna capilar (PE-5 (5% fenil)-metilpolisiloxano) (30 m comprimento, 0.25 μm espessura) da Perkin Elmer. Após a injeção à 140°C (12 min), a temperatura do forno do GC sobe 40°C/min até 170°C (19 min), depois 40°C/min até 200°C (25 min) e finalmente at 45°C/min to 270°C (4min). O processo foi adaptado para o método EPA 17 8081a. O limite de detecção é de 0,05 a 0,20 g kg⁻¹ para tecidos de peixes. Os padrões para OCs foram da Cambridge Isotope Laboratories (Cluzeau Info Labo Paris La Defense, France). Após quantificação, as amostras foram armazenadas em hexano a - 20°C. Os seguintes compostos organoclorados (OCs) proibidos ou restritos, seus isômeros e metabólitos foram analisados: lindano (hexaclorociclohexano HCH); clorotalonil; heptacloro; alaclor; aldrin; dieldrin endrin, clordano, endosulfan, nonaclor; hexaclorobenzeno, DDTs; OCs ainda utilizados como: pretilaclor e fipronil; triazinas (simazina; atrazina; propazina terbulilazina), uréias substituídas (diuron, dicloroanilina) e oxadiazol (oxadiazon), além de congêneres de PCBs. Estas análises foram realizadas na França, no laboratório de Ecotoxicologia, Departamento de Ecologia e Evolução – Universidade de Paris Sud XI.

3.3. Análises bioquímicas

Para estas análises, fígado, músculo e cérebro foram homogeneizados em tampão fosfato a 4 °C, 0.1M, pH 7,5. A solução resultante da homogeneização foi centrifugada a 10.000 g durante 20 minutos a 4 °C para se obter a fração S9 (sobrenadante) que foi utilizada para todas as análises bioquímicas e mantida em *freezer* -80 °C. O fígado foi utilizado para medir os níveis de GSH e LPO e a atividade das enzimas CAT, GST, GPx, G6PDH e SOD. A atividade das ChE foi mensurada em músculo e cérebro. O conteúdo de proteínas de cada amostra foi medido através de método de Bradford (1976) usando albumina bovina como padrão.

3.3.1. Concentração de Glutathiona (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 µl para posterior quantificação de proteínas. Para cada 250 µl de amostra, foram adicionados 50 µl 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°C. Para as leituras, foram adicionados 50 µl do sobrenadante da amostra e 230 µl de tampão Tris-base (400 mM, pH 8,9) a uma microplaca. Como branco, foi utilizado 230 µl do tampão Tris-base a 400 mM mais 50 µl de TCA a 8% em PBS. Por último, 20 µl 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).

3.3.2. 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 μ l) e centrifugadas a 1.000 x g por 10 min a 4°C. Para as leituras, 30 μ l do sobrenadante da amostra mais 270 μ l de meio de reação [(laranja de xilenol a 100 μ M, H₂SO₄ a 25 mM, BHT (hidroxitolueno butilado) a 4 mM, FeSO₄.NH₄ (sulfato ferroso amoniacal) a 250 μ M (acrescentados na seqüência descrita em metanol a 90%)] 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 absorvância ($\lambda = 570$ nm; faixa de leitura = 550-570 nm). Em paralelo às amostras, 30 μ l de metanol a 50% e 1 μ l 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 μ M) para 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.

3.3.3. Atividade da Catalase (CAT)

As amostras foram descongeladas como descrito anteriormente para GSH e centrifugadas 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.

3.4.4. Atividade Global das Isoformas de GST

A atividade global das Glutathione S-transferases (GST) foi monitorada através do aumento de absorvância ($\lambda = 340$ 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 μ l do sobrenadante da amostra foi adicionado a uma microplaca e, imediatamente antes das leituras, 100 μ l do meio de reação (GSH a 1,5 mM, CDBN 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 $r^2 \geq 0,99$ para o cálculo do Δ absorvância por minuto.

3.3.5. Atividade da Glutathione Peroxidase (GPx)

A atividade desta enzima foi mensurada utilizando-se 10 μ l do sobrenadante e 130 μ l do meio de reação (tampão fosfato de sódio 0.1M, pH 7.0; 2 mM de azida sódica; 0.2 mM de β -NADPH, 1 U/ml de glutathione redutase e 2 mM de glutathione reduzida). As amostras foram colocadas em placas de 96 poços e após 2 minutos, 60 μ l de peróxido de hidrogênio (1.5 mM) foi adicionado. A absorvância foi monitorada a 340 nm durante 2 minutos em intervalos de 10 segundos, sendo que o primeiro intervalo de 1 minuto ($r^2 > 0.99$) foi selecionado.

3.3.6. 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 ($\lambda = 340 \text{ nm}$) pela enzima G6PDH a custa de D-glucose-6-fosfato (G6P). Um volume de 30 μl de sobrenadante seguido de 170 μl 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 ($\lambda = 340 \text{ nm}$) 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 $6,22 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ foi utilizado para o cálculo da atividade da G6PDH.

3.3.7 Atividade das superóxido dismutases (SOD)

Amostras 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 ânion superóxido a *formazan* azul foi medida espectrofotometricamente como um aumento constante de absorbância ($\lambda = 560 \text{ nm}$, $r^2 > 0,98$) 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.

3.3.8. Atividade das Colinesterases (ChE)

A atividade das ChE foi medida segundo o método de ELLMAN et al., (1961) modificado para microplaca por SILVA DE ASSIS (1998). É baseado na hidrólise da acetilcolina pela ChE, originando colina que, combinando-se com DTNB (5,5'-Ditio-bis-2-nitrobenzoato), produz um composto de coloração amarela, medido em espectrofotômetro. Para medir a atividade desta enzima, o homogeneizado foi diluído em água destilada (1 mg.mL^{-1}) e foi adicionado 50 μL em cada poço da placa (quatro repetições). Em seguida, foi adicionado 200 μL do DTNB (5,5'-Ditio-bis-2-nitrobenzoato), preparado a 0,75 mM em tampão fosfato e pH 7,5; 50 μL do substrato acetilcolina, preparado a 9 mM, foram acrescentados a cada amostra, iniciando a reação. Imediatamente após a adição do substrato, foram realizadas as leituras da absorbância no espectrofotômetro em 415 nm, durante 3 min.

3.4. Microscopia de Luz

Amostras de fígado e brânquias foram preservadas em solução fixadora de Alfac durante 16 horas, em seguida, passaram por uma bateria crescente de etanol para desidratação (70% a 100%) e foram emblocadas em resina Paraplast Plus (Sigma®). Cortes de 5 μm de espessura foram obtidos e montados em lâmina com albumina 1% e posteriormente corados com Hematoxilina e Eosina.

3.4.1. Análise do material

As lâminas foram analisadas em microscópio óptico Leica, utilizando a metodologia proposta por Bernet et al. (1999). Para a aplicação deste índice é necessário atribuir um valor numérico a cada lesão observada. Esse valor pode variar de 0 a 6, sendo 0 ausência de lesão e 6 lesão com maior grau de severidade. O mesmo deve ser multiplicado por um valor de importância de acordo com Bernet et al. (1999) que classifica as alterações pelo grau de importância: (1) importância patológica mínima onde a lesão é facilmente reversível; (2) importância moderada, reversível em muitos casos e (3) importância marcante, geralmente irreversível, levando à diminuição das funções do órgão. Dessa forma é obtido um índice para cada tipo de lesão em

cada órgão avaliado. Todos os índices de cada órgão são somados, obtendo-se assim um índice geral por órgão. Posteriormente, as lâminas foram fotografadas no microscópio de epifluorescência do departamento de Genética do Setor de Ciências Biológicas.

3.5. Análises estatísticas

As análises químicas foram analisadas com o software (SAS institute, Cary, NC, USA). O teste T foi aplicado para comparar as concentrações encontradas no fígado e músculo. O teste de correlação de Pearson foi aplicado entre conteúdo de lipídios e concentração dos contaminantes. As variáveis foram expressas como média \pm desvio padrão e valores [min-max]. O coeficiente de correlação de Pearson também foi utilizado para correlacionar os resultados provenientes das análises bioquímicas e a bioacumulação dos POPs.

4. RESULTADOS

4.1. Quantificação de PCBs e pesticidas organoclorados

As análises químicas provenientes da área de estudo indicaram que os organismos estudados estão consideravelmente impactados por PCBs (Tabela 1). O fígado, por ser um órgão rico em lipídios, apresentou uma concentração maior em relação ao tecido muscular. O PCB 52 foi dominante assim como outros congêneres (PCB153, PCB138, PCB118 e PCB101). Entretanto, uma significativa concentração de PCB 95 foi encontrada tanto no fígado quanto no músculo. As figuras 13 e 14 apresentam a soma de todos os PCBs encontrados nestes tecidos. Os valores mais altos do conteúdo total de PCBs e a distribuição de indicadores dos PCBs e PCBs sob a forma de dioxinas no fígado comparando-se ao músculo estão apresentados no detalhe destas figuras.

Ao contrário da bioacumulação de PCBs, a contaminação por pesticidas organoclorados foi semelhante no fígado e no músculo, onde foi possível detectar níveis semelhantes inclusive de DDT (tabela 2, figuras 15 e 16). Níveis significativos de pp'-DDE, o principal metabólito do DDT, também foram detectados em ambos tecidos, embora a concentração no fígado tenha sido maior (Figura 17). Esta mesma figura demonstra a soma dos isômeros ou metabólitos dos pesticidas organoclorados ativos.

De acordo com a Tabela 2, os pesticidas aldrin e dieldrin foram encontrados em abundância no tecido muscular. Geralmente, a impregnação de substâncias como organoclorados depende da quantidade de lipídios disponível no tecido. Neste caso, poucas destas relações foram evidenciadas. Dentre elas, a soma de indicadores de PCB, PCB138 e HCB no fígado está relacionada ao conteúdo de lipídios ($p= 0.0463$, 0.0325 e 0.0256 respectivamente). No tecido muscular, as correlações mais significativas relacionam-se ao dieldrin ($p= 0.0087$), \sum DDT ($p= 0.006$), ou seja, pp'-DDE, pp'-DDD, pp'-DDT $p = 0.015$, 0.007 , 0.036 , respectivamente.

Tabela 1

Perfil de congêneres de PCB e conteúdo de PCB em fígado e músculo de *H. commersoni*. Concentração (ng/g de tecido seco). Média \pm desvio padrão, [min-max] n=13, nd= não detectado.

	FÍGADO		MÚSCULO	
Lipídios	201 \pm 16.5	[98.9-335]	73.4 \pm 9.2	[22.0-135]
PCB8	50.0 \pm 10.6	[6.4-153]	1.5 \pm 0.3	[nd-4.2]
PCB18	18.4 \pm 5.0	[nd-57.9]	0.6 \pm 0.2	[nd-1.6]
PCB31	14.8 \pm 4.1	[nd-42.9]	5.2 \pm 3.6	[nd-46.6]
PCB28	10.5 \pm 3.0	[nd-35.2]	nd	
PCB52	38.7 \pm 9.2	[nd-93.8]	27.9 \pm 5.3	[4.6-62.9]
PCB44	22.9 \pm 4.5	[nd-49.1]	1.5 \pm 1.2	[nd-16.1]
PCB70	21.3 \pm 4.3	[nd-52.1]	2.3 \pm 1.6	[nd-20.4]
PCB95	53.7 \pm 11.3	[nd-122]	7.2 \pm 3.1	[nd-42.9]
PCB101	38.0 \pm 7.9	[10.4-103]	3.0 \pm 2.2	[nd-29.3]
PCB99	6.2 \pm 3.1	[nd-38.3]		[nd-0.8]
PCB81	12.5 \pm 4.2	[nd-53.1]		[nd-3.8]
PCB110	18.6 \pm 4.5	[nd-63.9]	2.0 \pm 1.2	[nd-15.5]
PCB77	1.7 \pm 1.7	[nd-22.7]		[nd-2.9]
PCB151	9.7 \pm 2.4	[nd-23.5]	1.2 \pm 0.6	[nd-8.2]
PCB118	39.7 \pm 8.9	[5.6-111]	4.6 \pm 2.8	[nd-35.9]
PCB123	13.1 \pm 4.9	[nd-68.8]	2.0 \pm 0.9	[nd-12.7]
PCB149	nd		nd	
PCB114	0.8 \pm 0.4	[nd-5.4]		[nd-1.2]
PCB146	15.2 \pm 4.0	[nd-50.7]		[nd-3.9]
PCB153	36.5 \pm 7.1	[5.0-83.3]	2.8 \pm 1.3	[nd-17.9]
PCB105	3.3 \pm 2.0	[nd-23.2]	nd	
PCB137	nd			[nd-0.5]
PCB138	27.1 \pm 6.0	[3.0-66.8]	3.0 \pm 2.1	[nd-25.4]
PCB126	nd		nd	
PCB183	8.1 \pm 1.4	[0.2-18.3]	nd	
PCB187	3.1 \pm 0.6	[nd-6.9]	0.8 \pm 0.4	[nd-5.0]
PCB128	2.1 \pm 0.7	[nd-7.1]		[nd-0.5]
PCB167	0.3 \pm 0.2	[nd-2.9]	nd	
PCB177	2.7 \pm 1.0	[nd-11.4]		[nd-0.3]
PCB157		[nd-1.5]	0.4 \pm 0.3	[nd-3.5]
PCB156	0.7 \pm 0.7	[nd-9.4]	0.9 \pm 0.5	[nd-5.7]
PCB180	4.9 \pm 1.5	[nd-16.3]	0.3 \pm 0.3	[nd-3.3]
PCB169	nd		nd	
PCB170	1.7 \pm 0.8	[nd-9.0]	nd	
PCB189	nd		nd	
PCB195	nd			[nd-0.6]
PCB194	0.6 \pm 0.5	[nd-5.8]	0.8 \pm 0.7	[nd-9.4]
Σ PCB	427 \pm 78.7	[140-1109]	69.2 \pm 18.1	[12.2-255]
Σ PCB indicator	225 \pm 50.6	[71.3-659]	44.1 \pm 9.4	[5.2-121]
Σ PCB dioxin like	78.9 \pm 19.2	[12.2-273]	8.8 \pm 3.2	[nd-39.6]
TEQ	7.8 \pm 1.7	[1.5-25.7]	1.4 \pm 0.4	[nd-4.0]

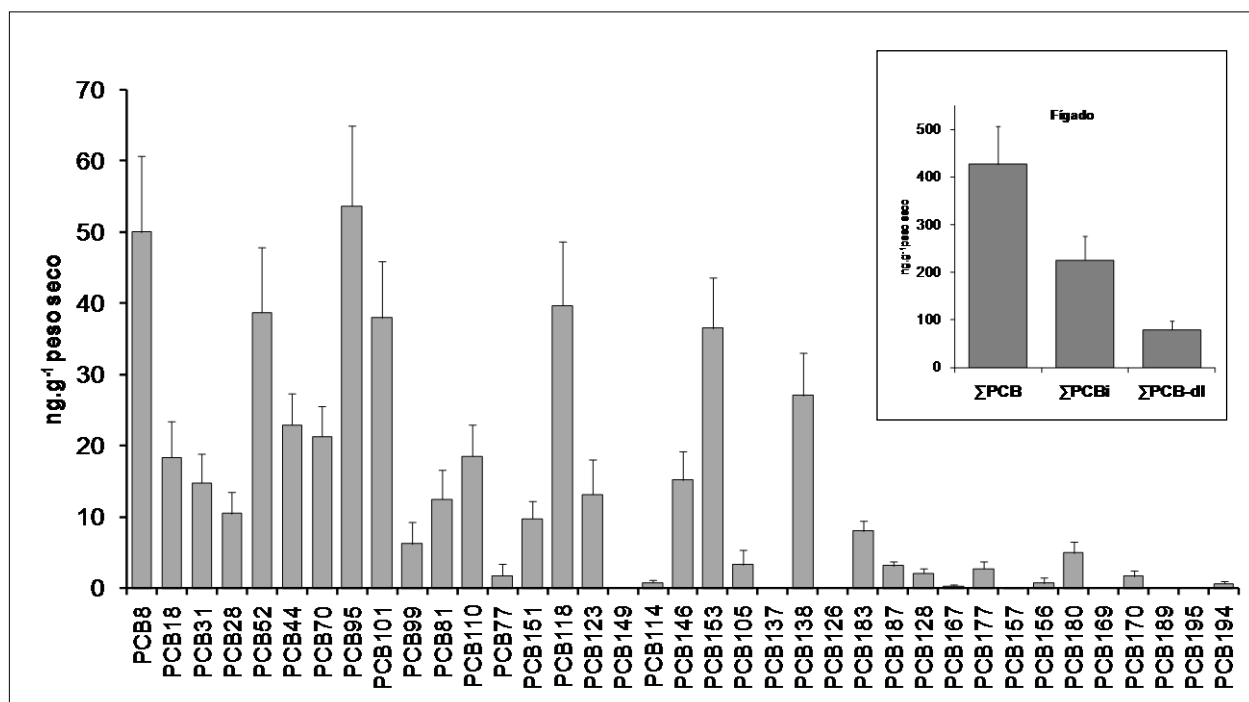


Figura 13: Distribuição dos congêneres de PCB em fígado de *H. commersoni*. Detalhe: Concentração total de PCBs em fígado. (PCBi: indicador de PCB), (PCB-dl: PCBs sob a forma de dioxinas - "dioxin like PCB").

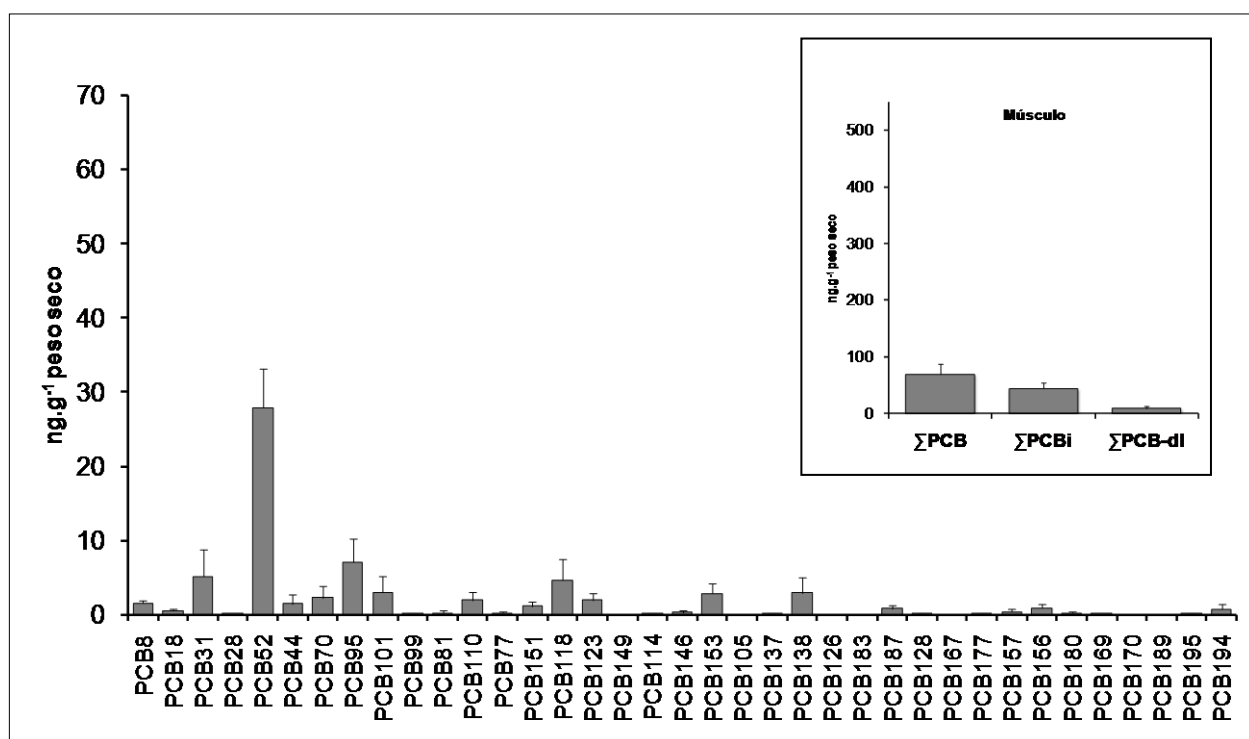


Figura 14: Distribuição dos congêneres de PCB em músculo de *H. commersoni*. Detalhe: Concentração total de PCBs músculo. (PCBi: indicador de PCB), (PCB-dl: PCBs sob a forma de dioxinas - "dioxin like PCB").

Tabela 2

Concentração de pesticidas organoclorados (ng/g de tecido seco) em fígado e músculo de *H. commersoni*. Média \pm desvio padrão, [min-max] n=13, nd= não detectado.

	FÍGADO		MÚSCULO	
HCB	10.8 \pm 2.0	[2.1-25.7]	11.2 \pm 3.1	[3.1-28.9]
α -HCH*	5.7 \pm 1.9	[0.6-26.4]	1.1 \pm 0.4	[nd-4.6]
β -HCH*	9.1 \pm 1.6	[3.6-25.4]	9.2 \pm 5.8	[0.5-76.9]
γ -HCH (lindane)*	6.3 \pm 1.7	[0.6-20.0]	6.5 \pm 2.4	[0.6-26.5]
δ -HCH*	120 \pm 44.5	[2.4-606]	4.9 \pm 1.9	[nd-21.0]
ϵ -HCH	12.0 \pm 3.7	[nd-42.6]	11.4 \pm 5.0	[nd-59.0]
Σ HCH	153 \pm 51.4	[12.4-716]	33.2 \pm 13.6	[2.5-170]
heptachloro*	13.1 \pm 2.7	[4.0-30.5]	16.0 \pm 4.6	[4.9-66.9]
heptachlor epoxide	8.7 \pm 1.3	[3.1-18.4]	3.6 \pm 1.1	[0.7-15.1]
Σ heptachloro	21.7 \pm 3.6	[8.7-48.4]	19.6 \pm 5.5	[6.2-82.0]
aldrin*	12.4 \pm 4.0	[1.0-47.2]	103 \pm 52.4	[nd-564]
dieldrin*	6.3 \pm 2.9	[0.4-37.5]	1.7 \pm 0.5	[nd-6.1]
endrin*	4.1 \pm 1.0	[1.5-14.8]	3.6 \pm 1.0	[0.9-12.7]
endrine aldehyde	9.0 \pm 2.5	[2.9-37.2]	4.6 \pm 0.6	[1.2-9.7]
endrine ketone	2.8 \pm 0.5	[0.7-7.3]	8.5 \pm 5.2	[nd-69.9]
Σ endrin	16.0 \pm 3.9	[6.3-59.3]	16.7 \pm 6.0	[5.5-86.5]
α -endosulfan	9.5 \pm 2.4	[3.5-36.7]	10.0 \pm 2.8	[1.6-26.4]
β -endosulfan	8.8 \pm 1.6	[4.4-26.0]	19.6 \pm 4.4	[2.4-51.5]
endosulfan	21.0 \pm 7.1	[3.6-103]	48.0 \pm 26.0	[nd-347]
Σ endosulfan	39.3 \pm 10.8	[14.9-166]	77.6 \pm 29.8	[13.5-423]
HCB	10.8 \pm 2.0	[2.1-25.7]	11.2 \pm 3.1	[3.1-28.9]
<i>pp'</i> -DDE	13.7 \pm 8.2	[nd-110]	1.2 \pm 0.6	[nd-7.8]
<i>pp'</i> -DDD	29.9 \pm 28.3	[nd-369]	2.4 \pm 2.1	[nd-27.8]
<i>pp'</i> -DDT	61.7 \pm 12.1	[1.3-162]	26.3 \pm 17.4	[nd-181]
Σ DDT	105 \pm 45.6	[2.0-641]	29.9 \pm 19.5	[nd-210]
fipronil	70.2 \pm 42.1	[4.4-551]	12.7 \pm 4.4	[1.3-44.5]
mirex*	5.4 \pm 1.4	[1.3-19.4]	5.7 \pm 1.7	[0.9-21.8]
methoxichloro	22.2 \pm 10.8	[nd-147]	25.3 \pm 22.7	[nd-297]

*Substâncias banidas pela Convenção de Estocolmo.

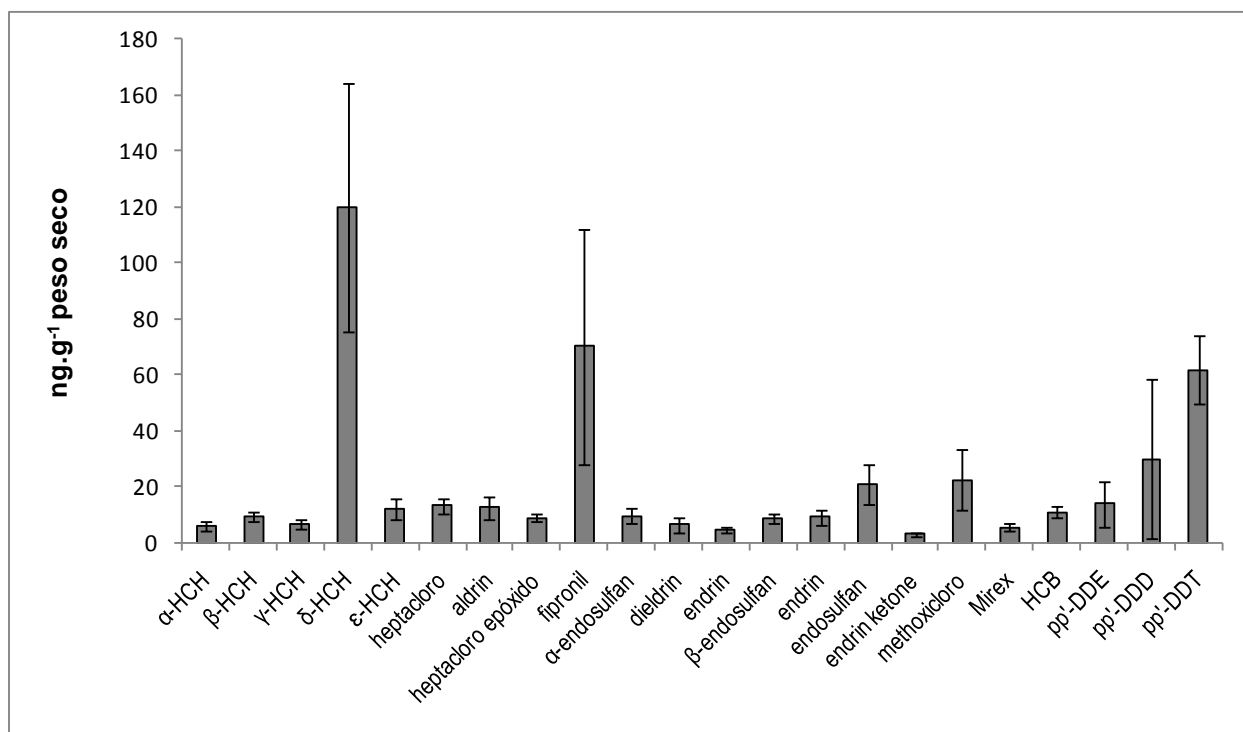


Figura 15: Concentração dos compostos organoclorados em fígado de *H. commersoni*. Média \pm erro padrão da média.

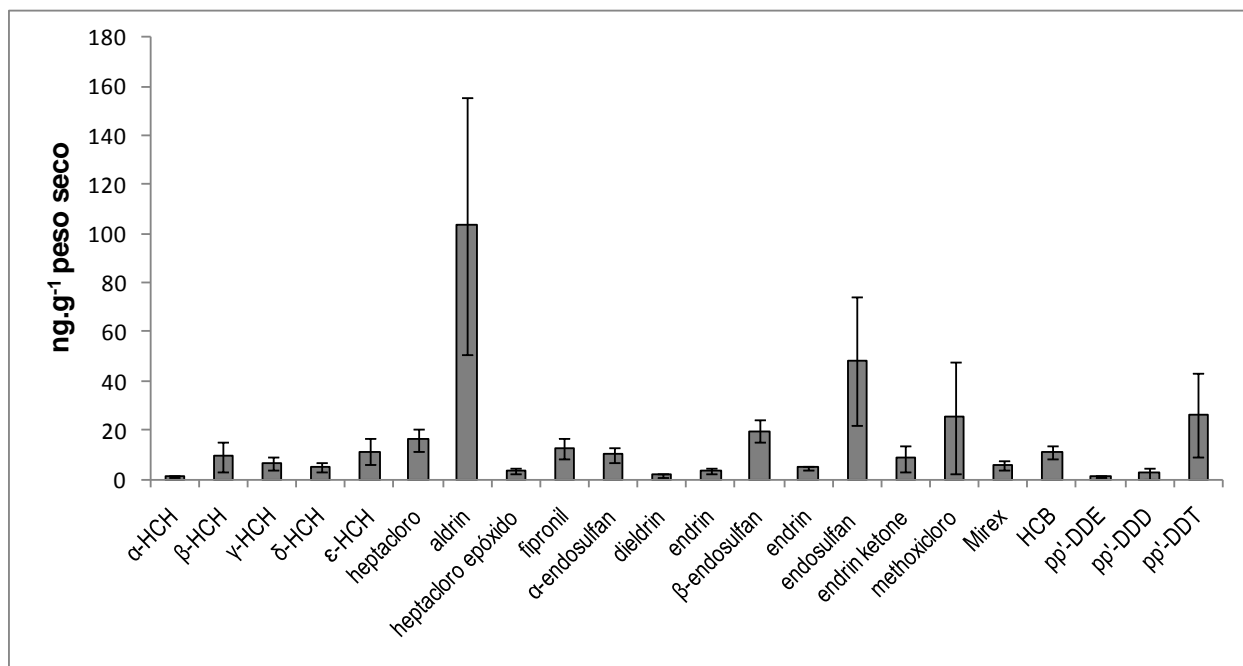


Figura 16: Concentração dos compostos organoclorados em músculo de *H. commersoni*. Média \pm erro padrão da média.

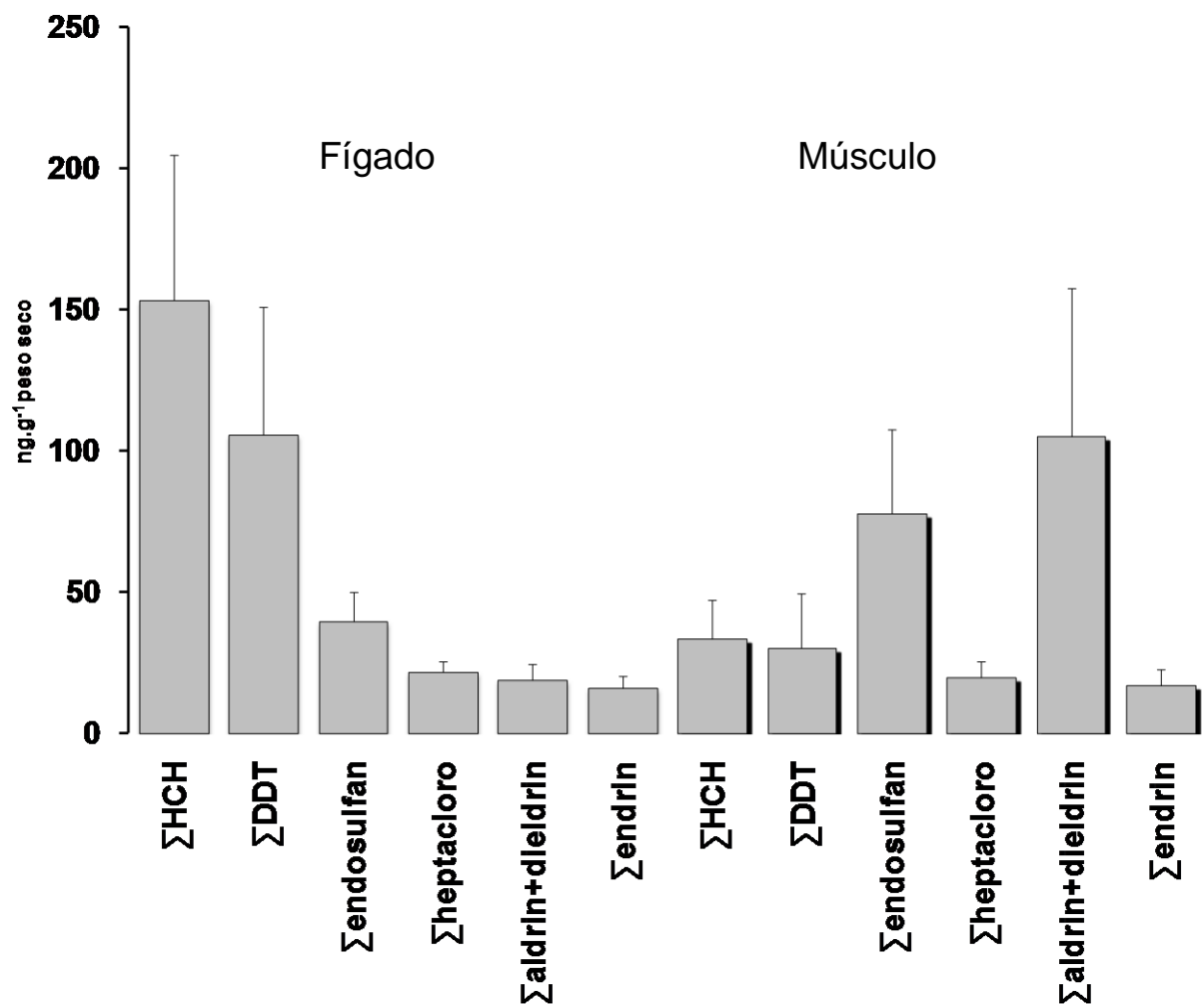


Figura 17: Concentração total de pesticidas organoclorados em fígado e músculo de *Hypostomus commersoni*. Somatórios dos isômeros e metabólitos ativos.

4.2. Análises bioquímicas

Após a utilização de testes de correlação para analisar as interações entre a bioacumulação dos poluentes organopersistentes e a resposta de biomarcadores bioquímicos, verificou-se que apenas alguns destes apresentaram relação direta com o acúmulo de poluentes pelos organismos estudados. A Tabela 3 apresenta os poluentes que relacionaram-se diretamente com um ou mais biomarcadores. O PCB 153 mostrou correlação negativa com a atividade das enzimas GST e G6PDH, ou seja, quanto maior a concentração deste poluente nos peixes, menor foi a atividade destas enzimas. Do mesmo modo, a enzima G6PDH apresentou correlação negativa com o PCB 118 e com o somatório dos PCBs sob a forma de dioxinas. Não foram encontradas relações entre o acúmulo de nenhum dos poluentes com a peroxidação de lipídios ou concentração de GSH. O mesmo ocorreu com a atividade das enzimas SOD, GPx, CAT e colinesterase cerebral. A enzima colinesterase muscular apresentou relação positiva com o somatório do HCH e seus isômeros, somatório do endosulfan e com o somatório do aldrin + dieldrin. Os poluentes que foram detectados nos peixes estudados (DDT, HCBs e outros) mas que não apresentaram correlação direta com os biomarcadores analisados, não foram inseridos na tabela.

Tabela 3

Correlação entre os biomarcadores investigados e a concentração de PCBs e POCs em fígado de *H. commersoni*.

	GST	G6PDH	SOD, GSH, LPO, GPx CAT, ChE(c)	ChE(m)
PCB 153	-0.64*	-0.59*	ns	ns
PCB 118	ns	-0.52*	ns	ns
∑PCB-dl	ns	-0.65*	ns	ns
∑HCH	ns	ns	ns	0.64*
α-HCH	ns	ns	ns	0.72*
δ-HCH	ns	ns	ns	0.61*
γ-HCH	ns	ns	ns	0.67*
∑endosulfan	ns	ns	ns	0.60*
∑aldrin + dieldrin	ns	ns	ns	0.66*

Os números correspondem ao valor fornecido pelo teste *Pearson* de correlação. Valor negativo: correlação negativa. Valor positivo: correlação positiva. ns= correlação não significativa. *p<0,05.

4.3. Análises histopatológicas

Através das análises das amostras coletadas foi possível observar alterações morfológicas tanto na estrutura branquial como no fígado (Figuras 18 e 19). A ocorrência das alterações e seus respectivos graus de severidade (BERNET et al., 1999) mostram que as alterações consideradas de importância patológica moderada (infiltração leucocitária) e as consideradas severas como a necrose, estão presentes nos exemplares analisados. As lesões encontradas no fígado estão relacionadas à exposição crônica a poluentes, devido aos processos de absorção e metabolização ocorridos neste órgão.

No fígado, o índice geral de alterações foi maior em relação às brânquias e foram identificadas necroses severas (Figura 18 B) bem como infiltrações leucocitárias (Figura 18 G) e neoplasias em apenas alguns indivíduos (Tabela 4, Figura 18 D). Outro tipo de lesão encontrada foi a diferenciação tecidual, presente em quase metade (46%) dos organismos estudados (Figuras 18 C, E e F). Não foram observados melano-macrófagos livres assim como centro de melano-macrófagos.

Nas brânquias, o número de alterações encontradas foi menor em relação ao fígado, e estas, também estão relacionadas aos efeitos agudos da exposição aos poluentes. A principal lesão observada na estrutura branquial e que é considerada de importância patológica moderada, foi a neoplasia (Figura 19D). Lesões do tipo aneurismas e hiperplasias, comuns neste tipo de órgão de organismos expostos a poluentes, não foram observadas nos animais deste trabalho.

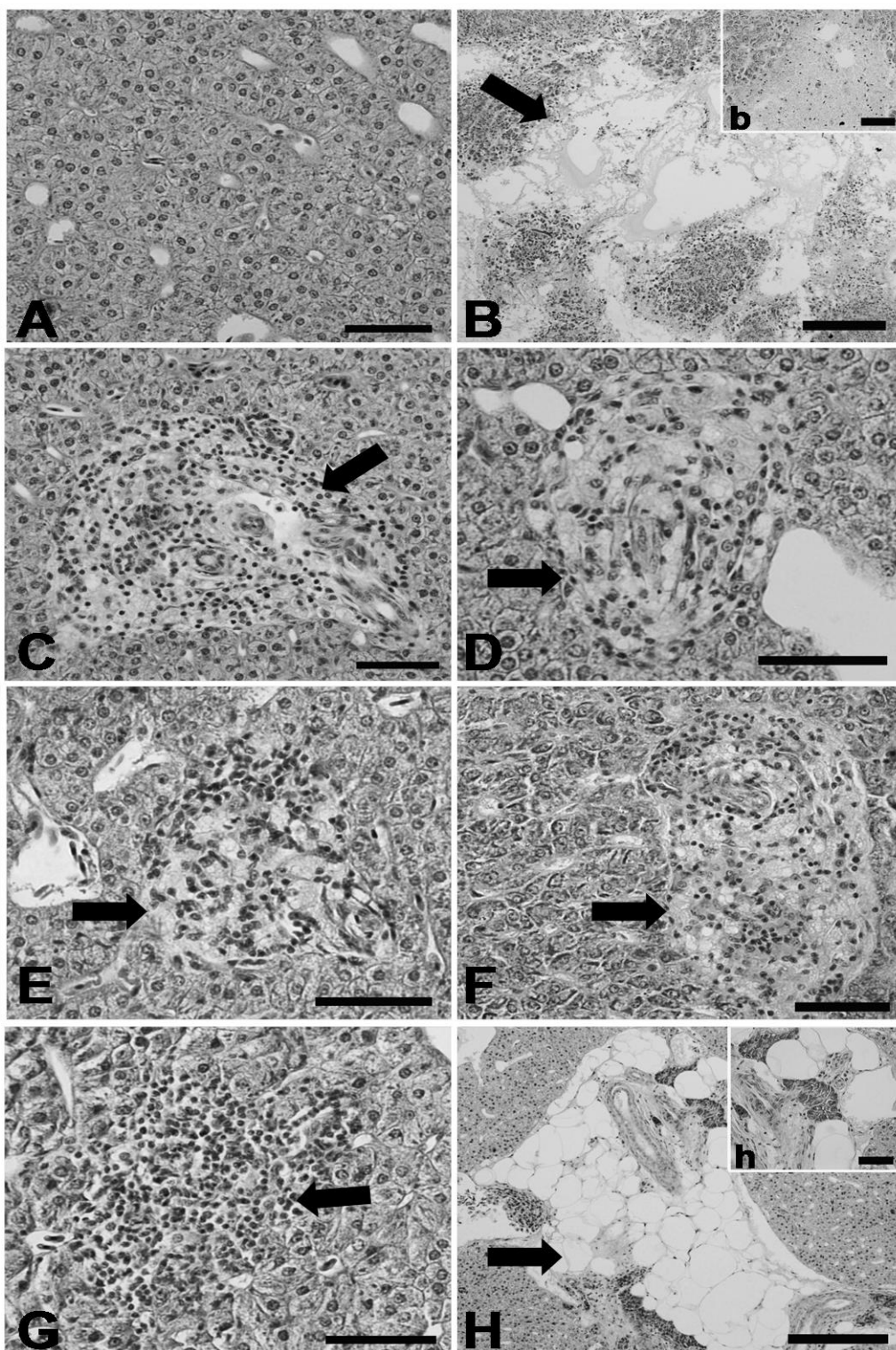


Figura 18: Histopatologia de fígado de *H. commersoni*. A: tecido com aspecto normal, barra = 50 μ m. B: Área de necrose (seta), barra = 400 μ m; b: Área de necrose fibrosa, Barra = 50 μ m. C: Diferenciação tecidual (seta), barra = 50 μ m. D: Neoplasia (seta), barra = 50 μ m. E: Diferenciação tecidual (seta), barra = 50 μ m. F: Diferenciação tecidual (seta), barra = 50 μ m. G: Infiltração leucocitária (seta), barra = 50 μ m. H: Área com adipócitos (seta), barra = 400 μ m; h – Detalhe dos adipócitos, barra = 50 μ m.

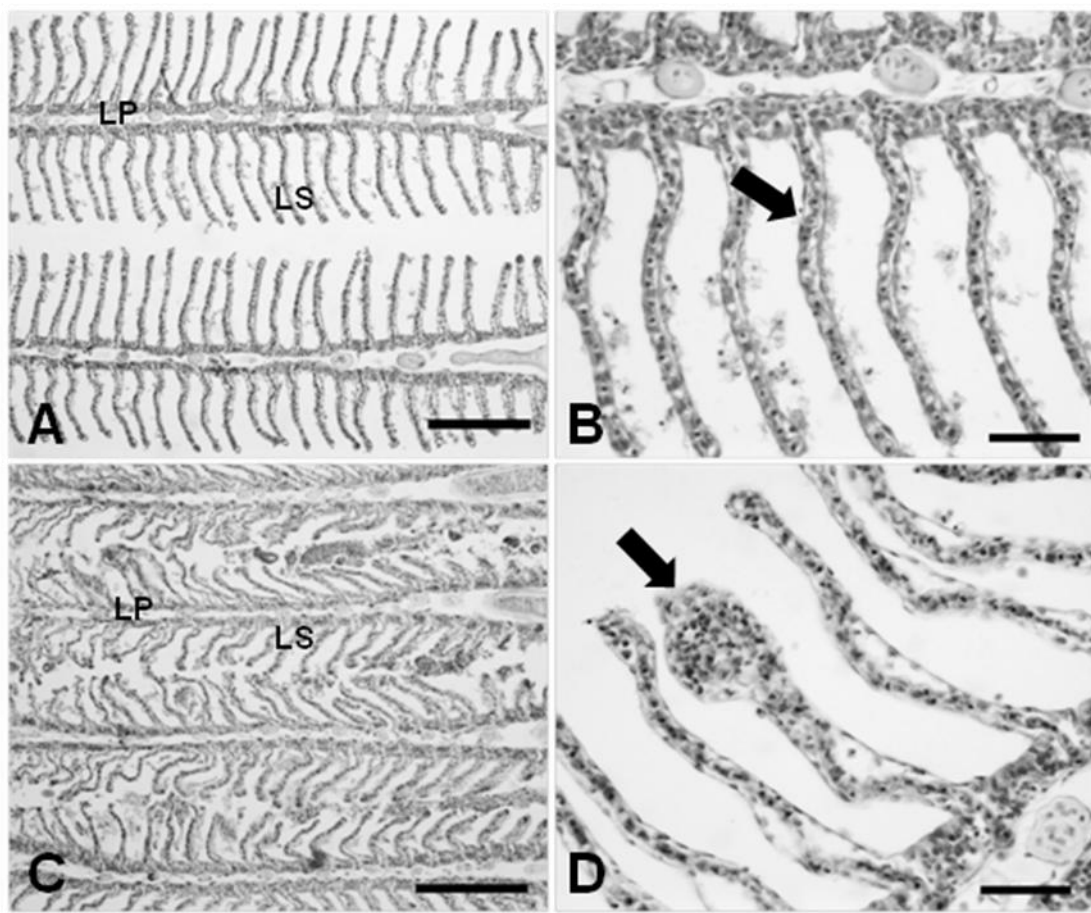


Figura 19: Histopatologia de brânquias de *H. commersoni*. A: Tecido com aspecto normal, sendo LP – lamela primária e LS – lamelas secundárias, barra = 200 μ m. B: Detalhe das lamelas secundárias “normais” (seta), barra = 50 μ m. C: Tecido desorganizado, sendo LP – lamela primária e LS – lamelas secundárias, barra = 200 μ m. D: Neoplasia (seta), barra = 50 μ m.

Tabela 4

Ocorrência de lesões hepáticas e branquiais dos indivíduos coletados na área estudada (n=13).

Alteração Morfológica	Indivíduos com lesões
Fígado	
Necrose	92%
Neoplasia	15%
Infiltração Leucocitária	46%
Diferenciação Tecidual	46%
Brânquias	
Aneurisma	0%
Hiperplasia	0%
Neoplasia	8%

5. DISCUSSÃO

Os resultados obtidos neste capítulo mostraram que a espécie em estudo é capaz de bioacumular os poluentes organopersistentes considerados neste trabalho. Os animais coletados para esta investigação são provenientes de uma área pouco conhecida como impactada até que fossem realizadas as análises químicas e os estudos com biomarcadores.

Compostos organoclorados tais como PCBs e POCs são persistentes, acumulam-se nos compartimentos lipídicos dos animais e assim, bioacumulam-se na cadeia trófica. Estes compostos químicos são comumente encontrados em peixes, (BERG et al., 1997; ROCHE et al., 2000), contribuindo significativamente para a exposição humana através da dieta. Por esta razão, estes compostos têm sido encontrados em tecidos adiposos e fluidos humanos (HERNANDEZ et al., 2002; PITARCH et al., 2003; DE SAEGER et al., 2005; WITHCOMB et al., 2005).

Observou-se neste estudo que os peixes da espécie *H. commersoni* apresentaram significativa bioacumulação de vários PCBs e POCs em diferentes concentrações, sendo que dentre estes, foram encontrados alguns compostos já banidos como o DDT. Estes resultados corroboram os dados encontrados por Miranda et al. (2008) utilizando como modelo a espécie predadora *Hoplias malabaricus*, proveniente do mesmo lago onde os animais do presente trabalho foram coletados. Apesar das similaridades encontradas em ambos os trabalhos, foi possível perceber que o padrão de bioacumulação nas diferentes espécies não foi o mesmo, isto devido a características específicas de cada espécie. Segundo Bruggeman et al. (1984), a internalização de POCs a partir da água ou do alimento varia de acordo com a solubilidade destes compostos em água e de acordo com a posição que o organismo ocupa na cadeia trófica. Com a diminuição da solubilidade do composto químico na água e o aumento da posição trófica, há um acúmulo maior proveniente da alimentação.

PCBs são compostos químicos aromáticos que já se tornaram comuns na biosfera em muitas regiões do mundo. São muito estáveis quimicamente e devido ao seu uso prolongado pela indústria no passado, tornaram-se onipresentes no ambiente, onde ocorrem sob a forma de misturas complexas e congêneres variados. Por este

motivo, os seres vivos nunca estão expostos a um único tipo de PCB (POCAR et al., 2006) e estudos que avaliam os danos causados aos organismos são extremamente necessários além da compreensão do sinergismo destas moléculas. Diante deste problema, este estudo procurou relacionar a presença destes compostos no organismo dos peixes com possíveis danos histopatológicos e atividade de enzimas importantes no metabolismo de defesa contra xenobióticos.

No presente estudo, observou-se que as amostras de tecido hepático e muscular estão significativamente contaminadas por PCBs. O fígado, por ser um órgão rico em lipídios, apresentou uma quantidade maior de PCB em relação ao tecido muscular. A concentração do PCB 52 e outros congêneres indicadores foram predominantes porque estes são PCBs prioritários, ou seja, encontrados em todos os lugares do planeta. Entretanto, grandes valores do PCB 95 foram detectados tanto no fígado quanto no músculo. A toxicidade destes compostos expressa em TEQ² (*toxicity equivalent*) é baixa, embora possa desequilibrar a homeostase dos peixes e oferecer riscos associados ao consumo destes animais pelos seres humanos. É importante destacar que o padrão de acumulação de cada congêneres não é o mesmo, já que suas propriedades químicas e físicas variam, e no presente caso, grande parte do valor de TEQ é devido ao PCB 118. Este último também foi detectado por Miranda et al. (2008) em fígado e músculo de *H. malabaricus*, indicando riscos à exposição humana já que o músculo é o tecido consumido na dieta. Estudos demonstram que o PCB 118, além de ser encontrado em peixes, já foi detectado em tecido adiposo humano, outros mamíferos e aves e seus efeitos estão associados a desequilíbrios endócrinos, hepáticos e na reprodução (ATSDR, 2000). Outro dado importante é que a resposta dos animais mediante exposição aos PCBs e congêneres varia significativamente,

² Fator de equivalência tóxica (TEF, do inglês *Toxic Equivalent Factor*) expressa a toxicidade de dioxinas, furanos e PCBs em termos da maioria das formas tóxicas de dioxina. A toxicidade de cada congêneres pode variar por ordens de magnitude. A partir dos TEFs, a toxicidade de uma mistura de compostos de dioxinas e similares a dioxinas pode ser expressa em um único número - a equivalência tóxica (TEQ, de *toxic equivalent*). O conceito de TEQ tem sido desenvolvido para facilitar a avaliação de riscos e controle regulatório.

refletindo os diferentes mecanismos de ação ou o metabolismo seletivo dos congêneres individualmente (OLIVEIRA RIBEIRO, et al., 2008).

A Agência para Substâncias Tóxicas e Registro de Doenças (ASTDR, 2000) estabelece que a ingestão diária de PCBs via alimentos não deva ultrapassar 0,03 µg/kg/dia - dose mínima que teoricamente não oferece riscos ao organismo. É importante notar, entretanto, que a média do somatório dos PCBs encontrados no tecido muscular dos peixes analisados neste trabalho foi de 0,06 µg e desta forma, o consumo relativamente constante destes animais poderia expor a população humana a doses de PCBs que estão associadas a desequilíbrios fisiológicos no organismo.

O hexaclorociclohexano (HCH) e seus isômeros foram detectados no fígado e músculo dos peixes estudados neste trabalho, no entanto, da mesma forma que outros pesticidas organoclorados, a maior concentração foi detectada no fígado. O HCH é um químico sintético que pode ser encontrado sob a forma de oito isômeros e, embora este composto não seja mais utilizado como inseticida em muitos países, os isômeros α , β , γ , e δ -HCH têm sido encontrados no solo e águas superficiais porque persistem no ambiente. Outro problema associado ao HCH é que esta molécula pode permanecer no ar por longos períodos e se locomover por longas distâncias, dependendo das condições do ambiente (ATSDR, 2003). A população em geral é predominantemente exposta ao HCH pelo consumo de alimentos contaminados e há menor exposição através da ingestão de água e inalação de ar. Segundo Gunderson (1995), a estimativa de ingestão diária pela dieta do HCH e isômeros deve variar entre 0,5 e 1,0 ng/kg/dia para o α e γ -HCH e 0,1 ng/kg/dia para o β -HCH. O HCH está relacionado a danos hepáticos, reprodutivos, imunológicos e nervosos caso internalizado pelo organismo. Os danos relacionados à neurotoxicidade foram evidenciados neste estudo pelas correlações positivas encontradas entre a atividade da colinesterase muscular e os isômeros do HCH. Este efeito é visível mesmo levando-se em consideração a presença dos outros poluentes. A exposição aguda e de duração intermediária de animais a altas doses orais e dermais de γ e β -HCH, afeta o sistema nervoso central causando transtornos de comportamento, convulsões e coma (ATSDR, 2003).

Os pesticidas organoclorados DDT, endosulfan e dieldrin têm sido associados à indução de apoptose e estresse oxidativo desencadeando a via apoptótica mitocondrial nas células de organismos expostos (KAUR et al., 2007; AHMED et al., 2008; SONG et al., 2008). Além disso, é considerado um carcinógeno pela IARC (2002) (*International Agency for Research on Cancer*) podendo também prejudicar o sistema nervoso. De acordo com a ATSDR (2002), a principal forma de exposição humana a este composto, é através da ingestão de alimentos contaminados, como peixes, que são provenientes de áreas onde o DDT ainda é utilizado ou onde seus resíduos ainda estão disponíveis.

Neste trabalho, a concentração de pesticidas organoclorados foi similar no fígado e músculo, conforme evidenciado pelos testes paramétricos comparativos. Dentre os pesticidas de interesse, o DDT foi encontrado no fígado e no músculo, mas a presença concomitante do seu principal metabólito, o pp'-DDE, sugere uso crônico no passado. Os danos hepáticos como necroses e diferenciação tecidual que foram observados nos animais estudados, são considerados danos severos e reforçam a idéia de exposição crônica sofrida pelos peixes neste ambiente. A concentração média e máxima de DDT detectada nestes animais foi de 29 e 210 ng/g (0,0002 mg/g), respectivamente, no tecido muscular que é justamente a porção consumida na dieta. Este dado é preocupante pois de acordo com a WHO 2002, (*World Health Organization*), a dose mínima diária para ingestão do DDT e seus metabólitos é de 0,02 mg/kg. Miranda et al. (2008), encontraram uma concentração média de 133 ng/g de DDT e metabólitos no tecido muscular do peixe predador *Hoplias malabaricus* na mesma área onde o presente estudo foi realizado. Esta concentração é muito superior àquela encontrada no peixe *H. commersoni* (29 ng/g) e comprova o fato de que peixes que estão no topo da cadeia trófica bioacumulam maiores concentrações de poluentes bioacumuláveis no organismo. No entanto, analisando-se o fipronil, um inseticida muito utilizado na medicina veterinária contra pulgas e carrapatos, percebe-se que o mesmo foi encontrado em maior concentração no fígado do peixe *H. commersoni* (70,2 ng/g) contra apenas 9,08 ng/g no mesmo órgão de *H. malabaricus*. Estes dados comprovam que, além da posição ocupada pelos organismos na cadeia trófica, outras

características, que são particulares de cada espécie, também influenciam os padrões de bioacumulação dos poluentes.

Outro dado importante é que os níveis musculares e hepáticos de DDT detectados no peixe *H. commersoni*, são maiores do que os níveis de seus metabólitos DDD e DDE. Deste modo, duas hipóteses foram levantadas para explicar esta situação: (1) Isto pode ser indicativo de exposição crônica ao DDT por fonte de exposição constante, fato curioso já que este pesticida foi banido há muito tempo. (2) A possibilidade de estar ocorrendo pouca metabolização por diminuição da atividade das enzimas relacionadas ao citocromo P450 devido à presença dos outros poluentes. Se considerarmos a segunda hipótese, este pode ser um exemplo de ação antagônica de alguns poluentes diminuindo o efeito tóxico de outro, clássico quando discutimos a exposição a misturas complexas.

Os pesticidas banidos como o aldrin e dieldrin foram encontrados em grandes quantidades no tecido muscular, provavelmente em decorrência do seu uso extensivo na agricultura local. Segundo a ATSDR (2002), estes pesticidas estão relacionados a algumas desordens neurológicas e esta afirmação é corroborada neste trabalho com a correlação encontrada entre o somatório do aldrin e dieldrin e a atividade da colinesterase muscular.

Embora estudos prévios já tenham investigado a concentração de POCs em peixes nativos (TORRES et al., 2002; MIRANDA et al., 2008), este é o primeiro estudo a demonstrar as concentrações de DDT e seus metabólitos na espécie *H. commersoni*, contribuindo com dados inéditos acerca da contaminação ambiental de ecossistemas aquáticos pelos POCs no Brasil.

Embora tenha-se observado lesões importantes no fígado dos animais estudados, torna-se difícil correlacionar os danos com poluentes específicos, já que estes organismos estão sujeitos aos efeitos dos poluentes concomitantemente e todas as suas interações, além da grande diversidade de compostos bioacumulados neste órgão.

A ocorrência de áreas de necroses no fígado foi a lesão mais evidente neste estudo. Considerada irreversível, assemelha-se ao apresentado em vários estudos com

peixes de áreas impactadas por múltiplos contaminantes (JOHNSON et al., 1993; OLIVEIRA RIBEIRO et al.; 2000; MELA, 2004; OLIVEIRA RIBEIRO et al., 2005; RABITTO et al., 2005, MIRANDA et al., 2008). A necrose hepática pode resultar da ação de xenobióticos tendo como consequência um conjunto de distúrbios sobre a inibição enzimática, alteração na estrutura da membrana plasmática, distúrbios na síntese de proteínas e no metabolismo de carboidratos (ROBERTS, 1989; RABITTO et al., 2005).

De acordo com Li et al. (2000) e Avcı et al. (2005), a necrose é fortemente associada ao estresse oxidativo, que é também induzido pelos POPs. Embora a ocorrência de áreas necróticas não tenha correlação específica com um determinado contaminante, a ocorrência de necroses tem sido frequentemente observada em áreas associadas à presença de organoclorados (OLIVEIRA RIBEIRO et al., 2005; MIRANDA et al., 2008).

Infiltrações leucocitárias no fígado que foram encontradas em boa parte das amostras indicam estresse e alterações fisiológicas do animal, sendo a elevação no número de leucócitos sinalizadora da presença de infecções (WEDEMWYER et al., 1990). A infiltração leucocitária também está frequentemente associada a outras alterações, sendo difícil considerá-la como um único padrão de reação, porém, de uma forma geral, suas funções estão relacionadas a neutralizar e destruir a fonte agressora, realizando a limpeza do tecido, retirando o agente agressor e células mortas, além de induzir a recuperação do tecido lesado (BERNET et al., 1999).

A ausência de melano-macrófagos sugere uma imunossupressão nos indivíduos estudados neste trabalho por exposição aos poluentes organopersistentes. Este fato foi também observado por MIRANDA et al. (2008) em *Hoplias malabaricus*. Em relação à histopatologia das brânquias foi observado na espécie que a principal lesão foi a ocorrência de neoplasias. A presença de neoplasias em brânquias é descrita por Ali e Sreekrishnan (2001) e Shailaja e D`Silva (2003), como causa de uma disfunção celular proveniente de uma hiperplasia em situação de exposição crônica a certos poluentes e pesticidas clorados, corroborando os dados apresentados neste estudo.

O sistema de defesa antioxidante está sendo cada vez mais estudado devido ao seu potencial em fornecer biomarcadores em baixos níveis de organização biológica que podem ser utilizados em programas de monitoramento ambiental (WINSTON e DI GIULIO, 1991; ORUÇ et al., 2004). Já que os peixes respondem à exposição a poluentes alterando ou adaptando suas funções metabólicas (BEBE e PANEMANGALORE, 2003), neste estudo, também foram investigados parâmetros relacionados ao estresse oxidativo como biomarcadores da exposição a misturas complexas.

Alterações encontradas na atividade de enzimas antioxidantes por exposição a poluentes sugerem que mudanças observadas podem ser uma resposta adaptativa às espécies reativas do oxigênio. Além disso, a atividade destas enzimas pode ser estimulada ou inibida sob a ação de estresse químico dependendo da intensidade e duração do estresse aplicado bem como da susceptibilidade da espécie exposta. (BALLESTEROS et al., 2009). De acordo com Cheung et al. (2001), um aumento na concentração do xenobiótico e conseqüente indução de atividade antioxidante não é uma regra geral. No presente trabalho, procurou-se estabelecer correlação entre a bioacumulação dos PCBs e POCs e a atividade de enzimas e moléculas antioxidantes, níveis de peroxidação de lipídios e atividade das enzimas colinesterases muscular e cerebral.

As enzimas CAT e GPx possuem funções complementares na detoxificação do peróxido de hidrogênio mas estão localizadas em diferentes compartimentos celulares, a primeira nos peroxissomos e a segunda no citosol (BARATA et al., 2005). No presente trabalho, a atividade destas enzimas não apresentou correlação com a concentração dos POPs detectados, no entanto, alguns trabalhos descrevem aumento da atividade da CAT em diferentes espécies de peixes expostos a PCBs (RUDNEVA-TITOVA e ZHERKO, 1994; SCHLEZINGER e STEGEMAN, 2001). A diminuição na atividade da GPx mediante exposição a organoclorados foi descrita por Videla et al. (1990) e, segundo Bainy et al. (1996), isto pode ocorrer devido a inibição da síntese da enzima pelos pesticidas. A menor atividade da GPx em peixes pode comprometer a proteção das membranas celulares, já que esta enzima é reconhecida por exercer

importante papel na proteção de membranas contra os danos causados pela peroxidação lipídica (VAN DER OOST et al., 2003).

As isoformas de GST estão envolvidas com o metabolismo dos POCs (FITZPATRICK et al., 1997) e catalizam a conjugação de vários compostos com a GSH. Sob condições de estresse oxidativo, a indução destas enzimas é uma importante resposta ao estresse derivado de poluentes (SOLE, 2000). Neste estudo, foi encontrada correlação negativa entre a atividade da GST e concentração do PCB 153, indicando uma possível modulação deste composto na atividade desta enzima.

A G6PDH é uma enzima produtora de NADPH, reguladora na biotransformação de xenobióticos e atuante na defesa contra o estresse oxidativo. (SPOLARICS, 1998; BIAGIOTTI et al., 2000). Neste estudo, foi possível perceber que, dentre os poluentes correlacionados, a atividade desta enzima apresentou maior sensibilidade aos PCBs, isto é, ao PCB 153, 118 e ao somatório dos PCBs sob a forma de dioxinas.

Como esta enzima também é importante para a manutenção dos níveis de GSH, protegendo as células dos danos em lipídios e morte celular (FILIPAK NETO et al., 2008), os peixes que apresentam a atividade desta enzima alterada podem ser mais susceptíveis aos danos oxidativos. Outros estudos demonstram efeitos de poluentes orgânicos na atividade da G6PDH: Após tilápias terem sido expostas a PCBs por longos períodos, Bainy et al. (1996), observaram indução na atividade desta enzima. De acordo com Winzer et al. (2002), a resposta de hepatócitos a estressores oxidativos é a inativação da G6PDH, que pode causar maior susceptibilidade à toxicidade de xenobióticos.

Vários estudos têm detectado aumento da peroxidação lipídica em organismos aquáticos expostos a altas concentrações de xenobióticos na água (GABRYELACK e KLEKOT, 1985; WENNING e DI GIULIO, 1988; BANO e HASAN, 1989; RIBERA et al., 1991; THOMAS e WOFFORD, 1993). Neste trabalho, os níveis de peroxidação de lipídios foram baixos, comparados aos dados obtidos *in vitro* com a mesma espécie e com outros estudos envolvendo quantificação dos níveis de LPO em peixes expostos a misturas complexas de poluentes (FERREIRA et al., 2010; RICHARDSON et al., 2008).

A extensão dos danos biológicos causados pela geração de oxirradicais pode ser minimizada pelas defesas antioxidantes, ou seja, a LPO é normalmente observada na ausência de defesas antioxidantes eficientes. Assim, parece provável que enzimas antioxidantes como a SOD, CAT e GPx tenham promovido defesas contra a peroxidação de lipídios nos peixes estudados neste trabalho, já que a atividade das mesmas pode não ter sido alterada pela bioacumulação dos POPs.

A enzima superóxido dismutase também tem sua importância reconhecida como antioxidante sendo responsável por catalisar a conversão de ânions superóxidos reativos em oxigênio e peróxido de hidrogênio, uma espécie reativa menos tóxica. Sob condições naturais (organismos não expostos a agentes tóxicos ou estressores), a SOD e GPx estão entre as defesas antioxidantes mais importantes (JANSSENS et al., 2000; LUSHCHAK et al., 2001). Entretanto, sob condições de estresse causado por xenobióticos tais como os PCBs, provavelmente a SOD é compensada em importância por outras defesas antioxidantes como a catalase (VEGA LOPEZ, 2007).

Os parâmetros relacionados ao estresse oxidativo e ao equilíbrio do ambiente intracelular redox aqui analisados, indicam que a espécie *H. commersoni*, pode não ser tão sensível à bioacumulação dos poluentes ou que as concentrações detectadas não estão associadas à desequilíbrios no ambiente redox dos hepatócitos. Esta observação corrobora os resultados obtidos no segundo capítulo e reforça a hipótese de maior resistência desta espécie em relação a outras. Além disso, é muito importante considerar que estes animais estão expostos naturalmente a vários tipos de poluentes concomitantemente, por isso, torna-se difícil estabelecer relações diretas entre a bioacumulação de um poluente específico e alteração de alguma enzima ou molécula antioxidante. Além disso, diferentes padrões de bioacumulação dos POPs foram observados nos indivíduos estudados neste trabalho e este fato também pode influenciar algumas respostas.

6. CONCLUSÕES

Os resultados demonstram que exemplares da espécie *H. commersoni* expostos naturalmente a poluentes organopersistentes, independente de sua posição na cadeia trófica, bioacumulam estes compostos e atuam como fonte de risco para a população humana.

Os dados provenientes das análises químicas demonstram que poluentes que já tiveram seu uso banido ainda persistem no ambiente e são facilmente internalizados pelos organismos expostos.

As análises histopatológicas do fígado demonstram que a integridade deste órgão está afetada pela exposição aos POPs, no entanto, não é possível relacionar as lesões a um tipo específico de poluente.

A atividade da enzima colinesterase muscular foi o parâmetro bioquímico que mais apresentou correlações com a bioacumulação dos pesticidas no músculo e no fígado.

Não foi possível estabelecer correlações suficientes entre a bioacumulação dos POPs e os parâmetros relacionados ao ambiente redox que indicassem a ocorrência de estresse oxidativo nos organismos estudados.

CAPÍTULO IV

TOXICOCINÉTICA DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA EM *Salvelinus alpinus*

Co-orientação:

Prof. Dr. Emilien Pelletier

*Institut des Sciences de la Mer - Université du
Québec à Rimouski - Quebec - Canadá.*

RESUMO

As nanotecnologias são uma das mais inovadoras e crescentes áreas da ciência e economia na atualidade. No entanto, os riscos ao ambiente e à saúde humana devido à liberação das nanopartículas industriais no ambiente aquático são pouco conhecidos. Uma vez em contato com os organismos aquáticos eucariotos, estas partículas podem ser internalizadas pelas suas células através das rotas endocíticas, o que pode, potencialmente, implicar em prejuízos para o funcionamento das células. Diante do exposto, o presente trabalho teve como principal objetivo estudar a absorção, acumulação, cinética de depuração e localização intracelular de nanopartículas de prata (^{110}Ag) radio-marcadas e sem marcação na espécie de peixe *Salvelinus alpinus*, através de exposição hídrica e trófica. Para conhecer a cinética de absorção e eliminação das nanopartículas, 8 animais foram expostos por via hídrica a uma concentração de aproximadamente 650 ng/L e, através da técnica de autoradiografia (WBARG - *whole-body autoradiography*), foi possível perceber que todos os animais absorveram rapidamente - em 6 horas - as nanopartículas, e ao longo de 11 dias, foram capazes de eliminá-las em quantidades consideráveis. Os peixes foram sacrificados ao longo deste período de 11 dias e foi constatado que as nanopartículas acumularam-se em regiões variadas como brânquias, olhos e principalmente no fígado. Outros dois experimentos foram realizados utilizando-se nanopartículas sem marcação para investigar a localização intracelular das mesmas através de exposição hídrica e trófica. No primeiro experimento, os animais foram expostos a uma concentração de 9,464 ng/mL de ^{110}Ag durante 24 horas e amostras de fígado e brânquias foram recolhidas para análise através de microscopia eletrônica de transmissão. Para o experimento de exposição trófica, as nanopartículas foram adicionadas à ração e cada peixe recebeu aproximadamente 160 ng das mesmas. Amostras de fígado, estômago e intestinos foram também preparadas para análise através da microscopia eletrônica e desta forma foi possível conhecer a localização intracelular das nanopartículas, que variaram sua distribuição e estado dependendo do indivíduo e tecido analisado. Os resultados permitiram concluir que a espécie estudada apresenta rápida absorção e eliminação das nanopartículas, porém novos estudos são necessários para conhecer a biodisponibilidade e toxicidade das nanopartículas nesta, e em outras espécies.

Palavras-chave: nanopartículas, autoradiografia, *Salvelinus alpinus*.

1. INTRODUÇÃO

As nanotecnologias compõe um novo ramo da ciência que reúne diversas áreas do conhecimento e tem desenvolvido uma série de materiais e aplicações que melhoram a vida do homem. Há algum tempo, nanotecnologias têm utilizado materiais a partir de ferro ou sílica em escalas extremamente pequenas devido ao reconhecimento de propriedades especiais ligadas ao tamanho destas moléculas (reatividade, condutibilidade e sensibilidade óptica). A partir disto, nanopartículas têm sido utilizadas em diversas tecnologias, de equipamentos eletrônicos a pesquisas com o câncer (RENAULT, 2008).

Apesar das nanotecnologias serem uma das mais inovadoras e crescentes áreas da economia e da ciência, seus produtos podem apresentar uma grande variedade de riscos ao ambiente e à saúde humana. As propriedades específicas e o pequeno tamanho das nanopartículas e nanotubos (~1 a 100 nm) possibilitam a estas moléculas ligarem-se e transportarem poluentes químicos tóxicos, além da possibilidade de serem tóxicas gerando radicais livres. Existem várias evidências que apontam efeitos danosos da combustão derivada de nanopartículas, que, quando inaladas podem causar um grande número de patologias pulmonares em humanos e outros mamíferos. Outro grave problema é a liberação de nanopartículas industriais em ambientes aquáticos, uma área pouco conhecida e carente de estudos (MOORE, 2006).

Pelo fato deste tipo de tecnologia ser relativamente recente, muito pouco tem sido feito para estudar e avaliar seus riscos em sistemas biológicos. Além disso, a preocupação em relação ao uso dos produtos nanotecnológicos tem sido crescente entre o público e a mídia (COLVIN, 2004; DOWLING, 2004; HOWARD, 2004). Nanopartículas inorgânicas têm sido encontradas em tecido de rins e fígado humano (GATTI e RIVASI, 2002). Estes autores cunharam o termo “nanopatologia” e acreditam que estas partículas, que têm origens exógenas, podem estar relacionadas à granulomas nos tecidos estudados.

O tamanho das partículas, em si, pode ser determinante na toxicidade direta e em patologias e a biodegradabilidade pode ser mais um fator que influencia diretamente efeitos biológicos perigosos. (BROWN et al., 2001; HOET et al., 2004;

HOWARD, 2004). O conhecimento sobre os efeitos tóxicos das nanopartículas é muito limitado e quase inexistente em animais aquáticos. Além disso, pouco se sabe sobre a absorção de nanopartículas pelos sistemas biológicos que são facilitados pelas vias caveolares e endocíticas nas células (PANYAM et al., 2003; PELKMANS e REIMAN et al., 2004).

Nanopartículas, exceto aquelas provenientes de fontes naturais, como sal marinho, poeira vulcânica e combustão de alguns produtos, só ocorreram em quantidades significativas após a revolução industrial (COLVIN, 2004; HOWARD, 2004). Deste modo, uma preocupação corrente entre toxicologistas ambientais e patologistas é que as nanopartículas industriais podem representar, de maneira única, um novo desafio aos organismos, já que tais materiais não eram habitualmente encontrados por estes organismos durante o curso da evolução biológica (DOWLING, 2004; COLVIN, 2004; HOWARD, 2004; WARHEIT, 2004). Consequentemente, haverá pouca ou nenhuma pressão seletiva por sistemas defensivos e protetores que venham de encontro a quaisquer propriedades adversas que tais partículas possam apresentar, além daquelas já conhecidas por produtos de combustão, cinza vulcânica, metais tóxicos e xenobióticos orgânicos.

A absorção de nanopartículas pela inalação ou ingestão parece ser a principal via de entrada destas moléculas em organismos terrestres (BRIGGER et al., 2002; DOWLING, 2004; COLVIN, 2003; HOWARD, 2004; WARHEIT, 2004). Entretanto, para os animais aquáticos, parecem existir outras rotas de entrada como absorção direta pelas brânquias e pela superfície epitelial. A nível celular, a maior parte da internalização ocorre via endocitose ou através da superfície celular envolvendo os “*lipid rafts*” associados às caveolas que evitam a degradação do material internalizado pelo sistema endossoma/lisossoma (NA et al., 2003; PANYAM et al., 2003). Esta via tardia é uma rota utilizada por muitos patógenos virais; e na nanotecnologia médica muitas das nanopartículas são direcionadas a entrar em células-alvo através destas vias (NA et al., 2003; PANYAM et al., 2003).

As nanopartículas têm uma área de superfície proporcionalmente grande e esta superfície pode apresentar grande afinidade por metais e por compostos químicos

orgânicos como hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAH's), aumentando a toxicidade destas partículas (CHENG et al., 2004). Esta área de superfície pode resultar na formação direta de radicais reativos do oxigênio, que podem prejudicar estruturas como as moléculas de DNA, proteínas e membranas celulares (BROWN et al., 2001). Além disso, a facilidade das partículas em penetrar nas células, fornece rotas potenciais para a entrada de nanopartículas associadas a poluentes em locais onde eles normalmente não chegariam (BERRY et al., 2004; LACAVA et al., 2003; NA et al., 2003; PANYAM et al., 2003; PELKMANS e HELENIUS, 2002). Por isso, os estudos de risco envolvendo nanopartículas não devem se focar unicamente na toxicidade inerente às NPs, mas também considerar as possíveis interações das mesmas com poluentes já existentes no ambiente (BAUN et. al., 2008).

Rejeitos industriais tendem a atingir facilmente os corpos d'água e como as atividades industriais envolvendo as nanotecnologias apresentam um crescimento acelerado, é inevitável que rejeitos nanotecnológicos também alcancem com facilidade o ambiente aquático (HOWARD, 2004; ROYAL SOCIETY e ROYAL ACADEMY OF ENGINEERING, 2004). Procariontes como bactérias podem estar mais bem protegidos contra a entrada de vários tipos de nanomateriais por não possuírem mecanismos para o transporte supra-molecular e coloidal de um grande volume de partículas através da parede celular. Entretanto, para os organismos eucarióticos a situação é muito diferente, já que possuem processos celulares altamente especializados de internalização de partículas em nanoescala (100 nm ou menos) e micro-escala (100 nm – 100,000 nm) através de endocitose e fagocitose, respectivamente (NA et al., 2003; PANYAM et al., 2003; PELKMANS e HELENIUS, 2002).

Dentre os diversos tipos de nanopartículas já desenvolvidos pela ciência, destacam-se as nanopartículas de prata, que, devido às suas notáveis propriedades antimicrobianas, estão sendo utilizadas em vários produtos. As aplicações típicas deste tipo de nanopartículas incluem o revestimento de roupas e tecidos, dispositivos médicos, armazenamento de alimentos, cosméticos, protetores solares, máquinas de lavar roupas (JUNG et al., 2007), curativos e ataduras (ARORA et al., 2008), filtros para

tratamento d'água (LI et al., 2008), sensores (SCHRAND et al., 2008) e produtos farmacêuticos (CHEN e SCHLUESENER, 2008; SUN et al., 2008).

Da mesma forma que outras nanopartículas, alguns estudos sugerem que as nanopartículas de prata não possuem apenas ações antimicrobianas, mas apresentam propriedades citotóxicas (BRAYDICH-STOLLE et al., 2005) e induzem a formação de EROs no interior das células (HUSSAIN et al., 2005). Produtos consumíveis que contém nanopartículas, como máquinas de lavar, roupas e produtos de higiene e cuidado pessoal, provocam a liberação de nanopartículas diretamente nos esgotos das fábricas onde são produzidos, e, futuramente, promovem a liberação das mesmas nos ecossistemas aquáticos, contaminando os organismos que vivem nestes locais.

Nos últimos anos, as nanopartículas de prata tornaram-se assunto de grande preocupação no que se refere à nanotoxicologia aquática (FARRÉ et al., 2009) pois é uma tarefa difícil monitorar estas partículas no ambiente aquático e ter acesso aos seus efeitos em organismos que vivem nestes locais (DOMINGOS et al., 2009). O destino das nanopartículas no ambiente aquático, suas interações com os componentes bióticos e abióticos e seu potencial em causar danos são pouco entendidos e estas incertezas estão gerando preocupações em relação aos riscos que estas moléculas impõe à saúde humana e ao ambiente (SCOWN et al., 2010).

Concentrações ambientais de nanopartículas de prata não têm sido determinadas, mas estimadas na água em ambientes naturais, e encontram-se entre 0.03 e 500 ng/L (LUOMA, 2008). O emprego de nanopartículas de prata na composição de meias com função bactericida é provavelmente a principal fonte de nanopartículas de prata no ambiente aquático. BENN e WESTERHOFF (2008) demonstraram que a lavagem de meias impregnadas com nanopartículas de prata resulta na liberação de mais de 1300 µg de prata/L, sendo que boa parte desta encontra-se na forma nanoparticulada.

Muitos fatores influenciam na toxicidade que atinge os organismos expostos em ambientes naturais através de efeitos provenientes do comportamento de agregação e biodisponibilidade das nanopartículas, incluindo o pH, concentrações iônicas e interações entre as nanopartículas e materiais orgânicos e colóides naturais

(BAALOUSHA et al., 2008; HANDY et al., 2008). A solubilidade é também um importante fator a ser considerado na toxicidade de NPs de prata e, fatores que afetam a solubilidade, como a presença de algas (NAVARRO et al., 2008), podem também influenciá-la. Outros estudos têm demonstrado que o tamanho das nanopartículas é crucial para sua internalização (LIMBACH et al., 2005) e deste modo, a toxicidade também está relacionada a esta característica (FUJIWARA et al., 2008; CARLSON et al., 2008).

Nanopartículas de prata têm sido reconhecidas por causar toxicidade em linhagens celulares de vertebrados gerando espécies reativas de oxigênio (HUSSAIN et al., 2005; SCHRAND et al., 2008), apoptose (PARK et al., 2007), aumento de peroxidação de lipídios (ARORA et al., 2008) e redução da função mitocondrial (SCHRAND et al., 2008). Além disso, um estudo recente realizado por LARESE et al. (2009) demonstrou absorção de nanopartículas de prata na superfície da epiderme de pele humana tanto intacta quanto danificada.

É importante destacar que existem diferenças entre a prata em sua forma iônica e agregada formando nanopartículas, principalmente no que diz respeito à toxicidade, disponibilidade aos organismos e comportamento no ambiente. Segundo WALKER et al. (2008), uma maior toxicidade da prata nanoparticulada, comparada aos íons de prata, pode ser resultado da sua forma e/ou tamanho, da liberação dos íons de prata ou à combinação de ambos.

Já que o mecanismo de toxicidade das nanopartículas de prata em peixes ainda não é totalmente conhecido (SCOWN et al., 2010), no presente capítulo buscou-se investigar a absorção, dinâmica e possíveis efeitos tóxicos destas nanopartículas em peixes da espécie *Salvelinus alpinus*.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Estudar a absorção, acumulação, depuração cinética e localização intracelular e tecidual de nanopartículas de prata em *Salvelinus alpinus*.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Analisar a distribuição das nanopartículas em todos os tecidos da espécie estudada utilizando técnicas de autoradiografia;

Analisar a taxa de eliminação das nanopartículas pelos peixes expostos;

Avaliar através da microscopia eletrônica de transmissão, a localização das nanopartículas de prata no interior das células de tecidos alvo, bem como possíveis efeitos citotóxicos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais e nanopartículas utilizadas

Em todos os experimentos foram utilizados exemplares de peixes da espécie *Salvelinus alpinus* (Figura 20), um tipo de truta que habita algumas áreas da Europa desde o Atlântico norte até o sul da Noruega ao norte do Reino Unido, Escandinávia, Finlândia, nos Alpes e também na América do norte em Quebec (Canadá) e em Maine e New Hampshire (EUA). Apresenta hábito bentopelágico e é uma espécie anádroma que alimenta-se de crustáceos planctônicos, moluscos, insetos e pequenos peixes. É uma espécie extremamente sensível a poluição aquática e oscilações no nível de oxigênio na água (FISHBASE, 2010). Foram utilizados animais juvenis com idade de 9 meses, 8 a 14 cm, aclimatados e mantidos em laboratório em tanques de 70 litros, com água doce em sistema de fluxo contínuo. A temperatura da água oscilou entre 8 e 12 °C durante o período dos experimentos.

Os experimentos descritos a seguir foram realizados nas dependências do *Institut des Sciences de La Mer, Université du Québec à Rimouski*, no Canadá e as nanopartículas utilizadas neste estudo ($^{110}\text{AgNP} \leq 60 \text{ nm}$) (Figura 21) foram produzidas e caracterizadas pelo próprio laboratório onde os experimentos aconteceram.



Figura 20: Exemplar da espécie *Salvelinus alpinus*

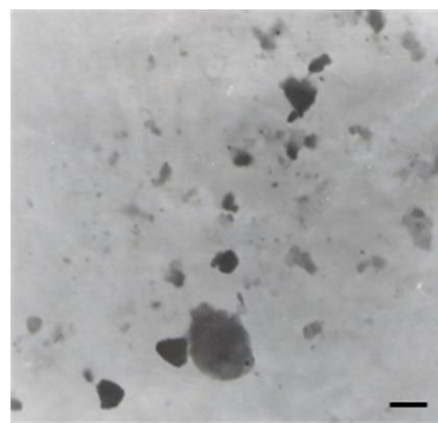


Figura 21: Nanopartículas de prata observadas através de microscopia eletrônica de transmissão. Barra = 500 nm.

3.2. Experimento de exposição hídrica às nanopartículas (NPs) radiomarcadas

Após a realização de testes prévios para padronização, 16 exemplares de *Salvelinus alpinus* foram separados em dois grupos e dois aquários com oxigenação constante mas sem fluxo contínuo de água contendo 8 animais cada. O primeiro grupo foi exposto à nanopartículas de prata ($^{110}\text{Ag} \leq 60 \text{ nm}$) numa concentração de 656,28 ng/L e o segundo grupo foi exposto a íons de prata (Ag) dissolvida, cuja concentração era de 2,51 ng/L. Este segundo grupo foi utilizado para estabelecer um parâmetro de comparação e para se conhecer a dinâmica dos íons de prata dissolvidos em água, que também podem estar presentes ou serem formados no ambiente onde as nanopartículas de prata estão presentes. Tanto as NPs quanto a prata na forma iônica foram adicionadas na água dos aquários onde os peixes estavam presentes. Os animais ficaram expostos às NPs e à prata dissolvida durante 6 horas. Durante este período, a radioatividade emitida pela água era medida constantemente em leitor específico para acompanhar a absorção dos radioisótopos pelos peixes. Após o período de exposição, os peixes foram mantidos em sistema de fluxo contínuo de água e 2 exemplares foram sendo sacrificados e analisados através da técnica de autoradiografia após 0, 1, 5 e 11 dias de depuração para conhecer a localização e distribuição das NPs e íons de prata ao longo do organismo.

3.3. Detecção da atividade emitida pela prata radiomarcada - “*in vivo* gamma counting” (IVGC)

Para monitorar a absorção e eliminação da prata ($^{110\text{m}}\text{Ag}$), os peixes expostos foram anestesiados (MS222 0,1g/L) e a radiação emitida pela prata radiomarcada foi monitorada utilizando-se um sistema de contagem de raios gama *in vivo* em Detector Gama de 76 mm NaI (TI) (Canberra-Packard, Meriden, CT), encaixado num cilindro de chumbo de 2 cm de espessura contendo um revestimento interno de cobre. A detecção foi realizada pelo aparato a uma distância de 8 cm acima do peixe. A emissão de raios 573 keV emitidos pela $^{110\text{m}}\text{Ag}$ nos peixes foi monitorada durante 6 a 7 minutos após as 6 horas de exposição à prata radioativa e após 1, 5 e 11 dias, correspondentes aos períodos de depuração. Os peixes não demonstraram qualquer alteração proveniente da manipulação que é exigida por esta técnica, já que

alimentaram-se e comportaram-se normalmente e seu aspecto físico não sofreu alterações. A atividade da ^{110m}Ag foi quantificada com o programa *Genie-PC Gamma Analysis software* (Canberra-Packard). Após ajustes, a atividade foi calibrada com padrões de ^{110m}Ag com a mesma geometria que foi utilizada para a quantificação das amostras.

3.4. Autoradiografia (WBARG – “Whole-body Autoradiography”)

Após anestesia letal (MS222 0,1g/L), os peixes foram incluídos em gel de carboximetilcelulose e congelados em nitrogênio líquido. Foram obtidos cortes congelados (20 μm) de diferentes partes do corpo à -25°C , em micrótomo LEICA CM3600, que foram coletados em fita adesiva e desidratados no interior do micrótomo. Os cortes foram colocados em contato com telas de fósforo (*Cyclone Storage Phosphor Screen, Canberra-Packard*) protegidos da luz e da radiação cósmica. Após o período de sensibilização das telas de fósforo (3 dias), os cortes foram removidos, as telas escaneadas e a distribuição da radioatividade visualizada.

3.5. Experimento de exposição hídrica às NPs sem marcação

Para analisar a localização intracelular das NPs através da microscopia eletrônica de transmissão (MET), 8 animais foram expostos a uma concentração de 9,464 ng/mL de nanopartículas ^{110m}Ag pelo período de 24 horas em um único aquário com oxigenação e sem fluxo contínuo de água. Ao mesmo tempo e nas mesmas condições, 4 animais foram utilizados para compor o grupo controle em outro aquário. Logo após o período de exposição, 2 peixes de cada grupo foram sacrificados e os demais foram colocados em tanques com água em fluxo contínuo para depuração pelos períodos de 1, 5 e 8 dias. Amostras das brânquias, fígado, rins e músculo foram coletadas e processadas para análise através de MET.

3.6. Experimento de exposição trófica às NPs sem marcação

Com o mesmo intuito de conhecer a localização intracelular das NPs, porém via exposição trófica, 8 animais foram expostos às NPs através de alimentação forçada.

Os peixes foram previamente anestesiados (MS222 0,1g/L) e um *pellet* de ração contaminada com aproximadamente 160 ng de NPs foi delicadamente introduzido no estômago dos animais utilizando-se um bastão de vidro delgado. Logo após a introdução do *pellet*, os animais foram colocados em aquários individuais e monitorados por um período de 4 horas para garantir que não regurgitassem o alimento recebido. Após este período, considerou-se tempo zero e 2 animais foram amostrados. Os demais peixes permaneceram em tanques com oxigenação e fluxo contínuo de água pelos períodos de 1, 5 e 8 dias. Amostras de brânquias, fígado, estômago, rins e intestinos foram coletadas e processadas para análise através de MET e ML.

3.7. Microscopia eletrônica de transmissão

Os tecidos foram fixados em solução de *Karnovsky* modificado (glutaraldeído a 2,5%, paraformaldeído a 1%, CaCl_2 a 5 mM, NaCl a 20 mM, cacodilato de sódio 100 mM, pH 7,2-7,4) por 2 horas, pós-fixados em tetróxido de ósmio (2%) por 1 h, desidratados em série crescente de etanol (50, 70, 80, 90, 100, 100%) e óxido de propileno por 2-5 min e embebidos com resina PoliEmbed 812 DER736 (Polysciences), conforme procedimento rotineiro. Após polimerização por três dias a 60°C, cortes ultrafinos (70nm) foram obtidos no ultramicrotomo *Leica Ultracut*, contrastados com acetato de uranila a 5% por 20 min e citrato de chumbo alcalino por 5 min e analisados sob o microscópio eletrônico de transmissão JEOL – 1200 EXII.

3.8. Microscopia de luz

As amostras de fígado, brânquias, estômago, rins e intestinos foram preservadas em solução fixadora de Alfac durante 16 horas, em seguida, passaram por uma bateria crescente de etanol para desidratação (70% a 100%) e foram emblocadas em resina Paraplast Plus (Sigma®). Cortes de 5µm de espessura foram obtidos e montados em lâmina com albumina 1% e posteriormente corados com Hematoxilina e Eosina.

4. RESULTADOS

4.1. Absorção e eliminação das NPs

Através das análises, foi possível perceber que houve absorção das nanopartículas pelos peixes expostos e que, ao longo do tempo, os indivíduos foram capazes de eliminá-las em quantidades consideráveis. Por meio da radiomarcagem das nanopartículas, foi possível determinar a radiação emitida pelas mesmas ao longo do período destinado à eliminação. Os resultados apresentados pela figura 22 demonstram que todos os animais, em diferentes intensidades, internalizaram as NPs no tempo zero, ou seja, logo após as seis horas de exposição. Observando-se os dados, pode-se perceber que houve considerável capacidade de eliminação das NPs pelos peixes 24 horas após a exposição. Um padrão semelhante de eliminação também foi observado 5 dias após a exposição. Passados onze dias do período de eliminação, analisou-se novamente a radiação emitida pelos peixes e observou-se novamente capacidade de eliminação das NPs em relação ao 5º dia.

4.2. Absorção e eliminação da Ag dissolvida

Os animais expostos aos íons de prata também acumularam quantidades significativas do metal ao longo do período de exposição. De forma semelhante ao observado para as NPs, os peixes deste grupo também foram capazes de eliminar os íons de prata principalmente após 24 horas a partir do início do período destinado à eliminação. No entanto, não foram observados níveis significativos de eliminação após 5 e 11 dias já que os níveis de radiação emitidos permaneceram próximos daqueles detectados após 24 horas (figura 22).

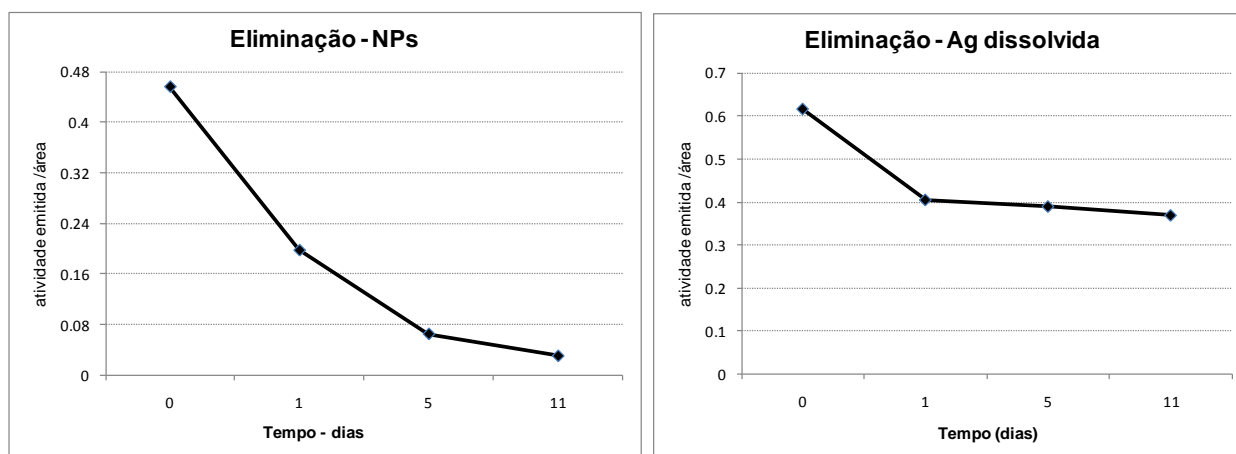


Figura 22: Índices de absorção e eliminação das NPs e de prata radiomarcadas em peixes *Salvelinus alpinus* desde o final da exposição até o 11^o dia de depuração. Os dados representam a média da radiação emitida pelos animais individualmente.

4.3. Autoradiografia: Distribuição tecidual das NPs e Ag dissolvida

As análises provenientes da autoradiografia corroboraram os resultados provenientes das análises de absorção e eliminação das NPs e íons de prata. A partir destes resultados, foi possível observar a distribuição da prata radiomarcada ao longo do organismo dos animais estudados e verificar a presença da mesma em regiões do sistema digestório, músculos e até mesmo em alguns ossos.

De acordo com a Figura 23 A, é possível perceber intensa marcação na região próxima à nadadeira dorsal, região correspondente ao local onde uma pequena agulha foi introduzida para fixar a etiqueta de identificação dos peixes durante o experimento. É bastante provável que as NPs tenham penetrado na região deste pequeno ferimento.

A Figura 23 E apresenta a imagem de um animal analisado logo após o término do período de exposição onde verifica-se acúmulo de NPs na estrutura branquial. Peixes expostos à prata dissolvida também possuem marcação nas brânquias (Figura 23 F). Acumulação de prata, tanto na forma dissolvida quanto particulada, foi encontrada no fígado 5 dias após a exposição, indicando que há mobilidade das NPs ao longo do organismo destes peixes (Figuras 23 B, C, D). Apesar da exposição ter sido realizada pela via hídrica, alguns animais que foram expostos à prata dissolvida, apresentaram este metal acumulado em regiões finais dos intestinos (Figura 23 C).

É interessante notar que os dois animais expostos às NPs que tiveram um tempo maior para depuração, apresentaram após este período, marcações na região dos ossos da cabeça. Isto indica que, de alguma forma, as nanopartículas que não foram eliminadas pelos peixes, moveram-se pelos órgãos e tecidos e depositaram-se nesta região (Figura 23 B e D).

4.4. Análises histológicas - Microscopia de Luz

As análises histológicas das brânquias através da microscopia de luz não evidenciaram danos significativos ou alterações nas lamelas branquiais após exposição às NPs de prata em nenhum dos peixes expostos. Da mesma forma, não houve evidências de danos no tecido hepático em nenhum dos animais expostos comparados aos controles (dados não apresentados).

4.5. Análises histológicas - Microscopia eletrônica de transmissão

As micrografias do fígado obtidas através da microscopia eletrônica de transmissão demonstraram áreas eletrodensas que correspondem aos agregados de nanopartículas concentrados no interior dos hepatócitos (Figura 24). As nanopartículas estão visivelmente aglomeradas no citoplasma das células sendo que em alguns casos, danos parecem estar relacionados à presença das nanopartículas (Figuras 24 E e F). A deposição das NPs no fígado dos animais expostos tanto por via hídrica quanto trófica ocorreu de forma semelhante. Isto é, não foi observado aumento na deposição ou diferenças no modo de distribuição e estado das NPs no fígado dos animais, independente do método de exposição.

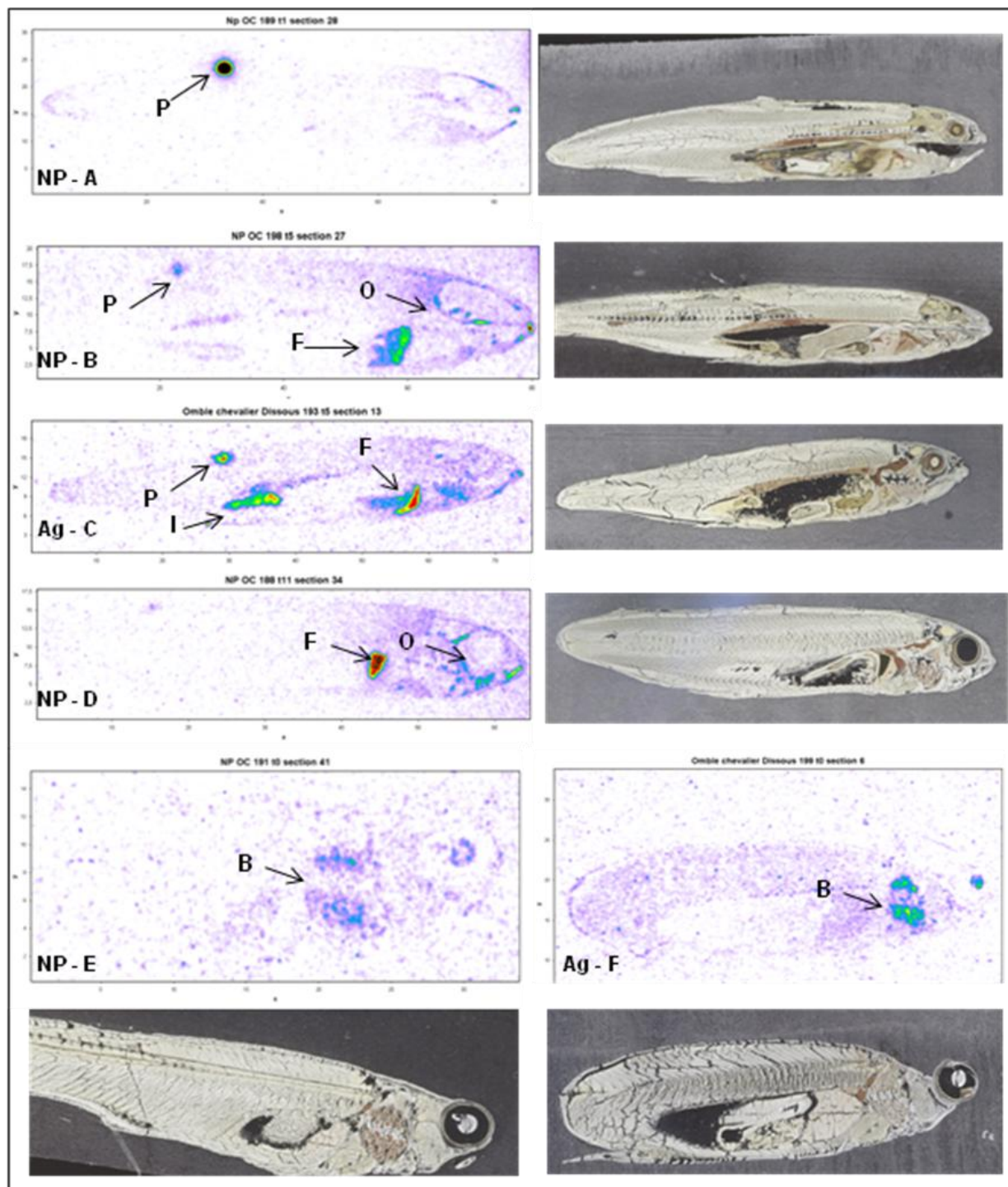


Figura 23: Autoradiogramas de *Salvelinus alpinus* após 6 horas de exposição à prata dissolvida e nanoparticulada. As áreas com maior intensidade de coloração indicam maior concentração de prata radiomarcada. A figura apresenta os autoradiogramas e ao lado, a secção correspondente do organismo. NP= nanopartículas, Ag= prata dissolvida; F= fígado, P=Local perfurado para identificação, B= brânquias, I=intestinos, O=ossos.

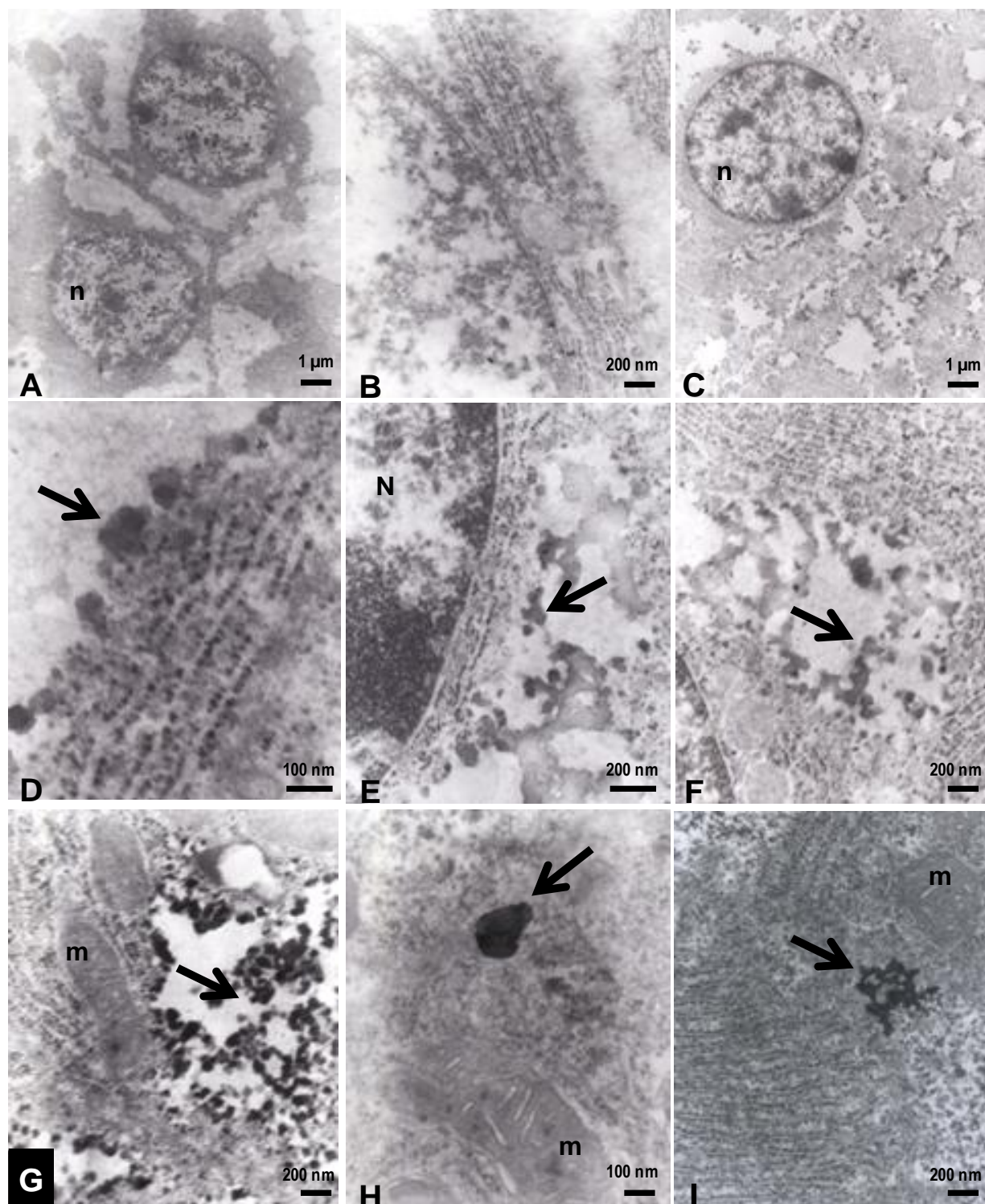


Figura 24: Eletromicrografias de fígado de *Salvelinus alpinus* após exposição hídrica (figuras G, H, e I) e trófica (figuras C, D, E e F) a nanopartículas de prata. As figuras A e B são provenientes de animais controle. As nanopartículas estão distribuídas pelo citoplasma das células formando agregados indicados pelas setas. Núcleo (n) e mitocôndrias (m) são visíveis nas imagens.

5. DISCUSSÃO

O desenvolvimento constante da nanotecnologia e suas aplicações nas mais diversas áreas tem aumentado a liberação de nanoresíduos no ambiente e, por isso, informações relacionadas aos efeitos nocivos e potencial tóxico destas moléculas são necessários e urgentes. Este contexto pode ser exemplificado pelo emprego extensivo de nanopartículas de prata em produtos como detergentes, tecidos e curativos devido às suas propriedades bactericidas e pelo fato de que estas moléculas atingem o ambiente com facilidade durante os processos de fabricação, utilização e descarte destes produtos.

Poucos estudos *in vivo* têm demonstrado evidências da toxicidade de NPs em organismos aquáticos como peixes. Até o presente momento, estes estudos têm sido focados em embriões de *zebrafish* nos quais mortalidade e anormalidades cardíacas já foram descritos (ASHARANI et al., 2008; LEE et al., 2007; YEO e KANG, 2008). Estes autores demonstraram mortalidade dependente da concentração e efeitos no desenvolvimento, incluindo deformidades na medula espinal e arritmia cardíaca em embriões de *zebrafish* (*Danio rerio*) expostos à NPs de prata (5 - 20 nm) em concentração de 50 µg/ml (ASHARANI et al., 2008; YEO e KANG, 2008).

De forma semelhante, existem poucos dados disponíveis na literatura sobre a internalização e biodistribuição de NPs de prata nos órgãos internos ou do potencial de toxicidade das mesmas em peixes provenientes de ambientes naturais (SCOWN et al., 2010). Deste modo, para contribuir com o conhecimento à respeito da dinâmica das nanopartículas quando internalizadas pelos organismos expostos, o presente trabalho identificou os órgãos-alvo do peixe *Salvelinus alpinus* expostos por via hídrica à NPs de prata.

Os resultados provenientes do experimento que analisou a cinética de absorção e eliminação das NPs evidenciaram que este metal sob a forma nanoparticulada é absorvido com rapidez pelos peixes, já que após 6 horas de exposição, observou-se atividade correspondente à prata radioativa em todos os animais expostos, comprovando a acumulação das NPs. Do mesmo modo, as análises realizadas em detector gama revelaram que estes animais foram capazes de eliminar as NPs ao longo de 11 dias, quando foram mantidos em água limpa em sistema de fluxo contínuo.

É interessante notar que a capacidade de eliminação das NPs foi maior nas primeiras 24 horas e após este período, não houve eliminação em taxas consideráveis ao longo do tempo.

Os autoradiogramas dos peixes expostos indicaram a presença das NPs nas brânquias e principalmente no fígado após 5 dias da exposição. Estes resultados indicam que a absorção possa ter ocorrido pela via branquial ou até mesmo pela ingestão de água. A segunda hipótese parece ser a mais provável já que não foram observados danos nas brânquias destes animais a partir de análises histopatológicas neste tecido. Outra hipótese é que as NPs fiquem somente aderidas às brânquias e não tenham sua internalização facilitada. Estes resultados são semelhantes aos obtidos por SCOWN et al., (2010) em trutas arco-íris expostas a NPs de prata de diferentes tamanhos, o que sugere um comportamento semelhante da prata quando internalizada pelos peixes.

A ausência de danos aparentes nas brânquias, entretanto, pode ser explicada pelo curto período de exposição ou mecanismos eficientes de defesa e reparo presentes nestes tecidos, além do processo de internalização que pode ter ocorrido por endocitose ou transcitose, não causando desta forma, danos às membranas das células envolvidas.

SCOWN et al., (2010) demonstraram que os níveis de prata presentes no fígado de peixes expostos a NPs foram aproximadamente duas vezes a concentração observada nas brânquias por grama de tecido. Os autores sugerem que o transporte da prata tenha ocorrido através do sangue a partir das vias de entrada. Ao contrário da observação realizada nas brânquias, as NPs que foram empregadas no experimento acumularam-se em maiores quantidades no tecido hepático (SCOWN et al., 2010).

Evidências indicam que a entrada das NPs não ocorre principalmente pelas brânquias mas sim via intestinos como resultado da alimentação e ingestão de água. A alimentação de materiais agregados que acumulam-se no fundo do tanque em exposições hídricas para outros nanomateriais já foi descrita por Johnston et al. (2010). Além disso, segundo Moore (2006), em peixes, o fígado é um provável receptor de NPs após transporte via endocitose realizado pelo epitélio intestinal.

O mecanismo pelo qual eletrólitos, íons metálicos e moléculas orgânicas são internalizados através das barreiras de células epiteliais é descrito por (HANDY e EDDY, 2004). *In vivo*, tanto as superfícies branquiais quanto intestinais são rodeadas por meio aquoso, o que contribui para a manutenção de uma camada de água sobre o epitélio. Esta camada pode promover interações entre íons e eletrólitos e a camada de muco que reveste o epitélio, introduzindo as moléculas na superfície apical do mesmo, permitindo, desta forma, a internalização. Não se sabe ao certo, entretanto, quão bem este modelo pode ser aplicado às NPs e sua entrada ou como as características físico-químicas das partículas tais como tamanho, forma e carga superficial e a interação das partículas com o meio aquoso afetam a internalização. Além disso, não se sabe como isso pode influenciar a liberação de íons de prata de tais partículas.

Estes fatos sugerem, entretanto, que diferenças podem existir entre a interação de partículas de prata de variados tamanhos com diferentes superfícies epiteliais, por exemplo, o intestino e brânquias. Em seu trabalho, Navarro et. al. (2008) demonstraram que interações entre partículas e membranas biológicas aumentaram a liberação de prata dissolvida das partículas em *C. reinhardti*, entretanto, ainda não se sabe se este fenômeno também é observado ou não em interações entre partículas de prata e membranas epiteliais de peixes (SCOWN et. al., 2010).

Tem sido sugerido que a camada de muco que envolve o epitélio das brânquias pode agir como uma barreira, impedindo a entrada das NPs pelas brânquias (HANDY et al., 2008). Um estudo realizado por Smith et al. (2007) demonstrou que nanotubos de carbono rapidamente associam-se e ficam presos ao muco na superfície das brânquias. Se as NPs de prata associaram-se ao muco das brânquias na exposição via hídrica realizada neste trabalho, reduzindo/impedindo a penetração pelo epitélio branquial, isto poderia explicar a ausência de lesões nas brânquias dos animais expostos.

Morgan et al., (1997) demonstraram que íons de prata podem ser tóxicos para peixes por inibirem a atividade da anidrase carbônica causando uma perda de Na^+ e Cl^{2+} através das brânquias e inibindo a atividade da Na^+/K^+ ATPase. Segundo Wood et al., (1996), os efeitos tóxicos dos íons de prata são causados pela sua interação com a

superfície branquial e não como resultado da acumulação interna da prata. Além disso, não se sabe em qual forma a prata se associa às brânquias ou é transportada pelo fígado.

No presente trabalho, íons de prata também foram utilizados e sua cinética nos peixes foi mensurada da mesma forma que as NPs, no entanto, danos relacionados a prata na forma iônica não foram investigados. Um fato curioso observado nos autoradiogramas foi a presença da prata nos ossos do crânio dos peixes expostos às NPs e isto pode ser explicado pela dissociação ou liberação dos íons a partir das nanopartículas.

O fígado foi um dos órgãos que mais concentrou as NPs segundo os autoradiogramas e as análises provenientes da microscopia eletrônica de transmissão revelaram que as NPs estão dispostas pelo citoplasma dos hepatócitos formando agregados. Em algumas regiões, é possível observar danos celulares onde as NPs estão presentes, no entanto, não é possível afirmar se estes danos estão relacionados à presença das NPs em si, ou se os mesmos são provenientes dos íons de prata liberados destes aglomerados de nanopartículas.

Segundo Navarro et al. (2008), a toxicidade das NPs de prata é mediada pela Ag^+ , já que as NPs funcionam como uma fonte de Ag^+ , sendo esta última a responsável pela toxicidade. De acordo com esta afirmação, NPs de prata, que são facilmente internalizadas pelas células (HSIN et al. 2008), podem liberar uma grande quantidade de íons no interior das células. Desta forma, podem causar maior toxicidade quando comparadas aos íons de prata, que podem, em altas concentrações terem sua internalização limitada pelos canais iônicos (BURY e WOOD, 1999). É consenso que NPs de prata, caso não internalizadas, podem também mediar toxicidade por aderirem-se à superfície celular liberando Ag^+ nesta região, fornecendo uma grande quantidade de Ag^+ sem limites de difusão. Almofti et al. (2003) observaram que a toxicidade da prata em mitocôndrias de fígado de rato ocorreu por um aumento da permeabilidade da membrana mitocondrial seguida pela liberação do citocromo c, gerada pela interação de Ag^+ e grupos sulfidríla de proteínas da membrana mitocondrial. NPs de prata também foram associadas à danos mitocondriais em células

hepáticas de rato, principalmente por alterar a permeabilidade da membrana mitocondrial (PALMEIRA, 2008).

Farkas et al. (2010), observaram que NPs de prata em baixas concentrações foram extremamente citotóxicas para hepatócitos de truta arco-íris em cultura como consequência de redução da atividade metabólica e integridade da membrana. De forma semelhante, Chae et al. (2009), observaram danos celulares e genéticos, bem como estresse oxidativo e indução de genes relacionados ao metabolismo de detoxificação de metais em peixes expostos à nanopartículas de prata.

Em *zebrafish* adultos expostos a NPs de prata (20-30nm), a toxicidade foi maior quando comparada à prata dissolvida (GRIFFITT et al., 2009). Estes autores demonstraram que uma maior quantidade de prata associou-se às brânquias em exposições à NPs em relação a peixes expostos à prata em sua forma iônica. Outra observação importante foi o fato de haver considerável espessamento dos filamentos branquiais nos peixes expostos às NPs em relação aos controles.

O mecanismo de toxicidade das nanopartículas de prata em peixes não está totalmente elucidado. Uma maior toxicidade da prata nanoparticulada em relação aos íons de prata pode ser resultado da forma das NPs, de seu tamanho, da liberação dos íons de prata ou da combinação de ambos. (MAYER et al., 2003; WALKER et al., 2008; WOOD et al., 1996). Deste modo, a interpretação de dados provenientes de estudos que visam avaliar a citotoxicidade de Ag-NPs deve ser cautelosa, já que nem sempre é possível controlar a dissociação dos íons de prata a partir das NPs utilizadas. Além disso, a dinâmica das NPs no interior das células ainda é pouco conhecida.

6. CONCLUSÕES

As nanopartículas de prata utilizadas foram rapidamente absorvidas e bioacumuladas pelos peixes expostos.

Os resultados obtidos neste estudo demonstram que peixes da espécie *Salvelinus alpinus* expostos à NPs de prata acumularam este metal nas brânquias e principalmente no fígado, após exposição hídrica.

A bioacumulação de prata nos ossos e em outras regiões do organismo pode estar relacionada à dissociação da prata em sua forma iônica a partir das nanopartículas.

Os resultados permitiram concluir que a espécie estudada apresenta rápida absorção e eliminação das nanopartículas, porém novos estudos são necessários para conhecer a biodisponibilidade e a toxicidade das nanopartículas nesta, e em outras espécies.

A técnica de microscopia eletrônica de transmissão mostrou-se eficiente na identificação intracelular das nanopartículas de prata, favorecendo a discussão quanto à citotoxicidade destes agregados.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os estudos que contemplam diferentes abordagens para avaliar os efeitos de poluentes ambientais em espécies de peixes de diferentes níveis tróficos são extremamente relevantes no contexto atual. Os ecossistemas aquáticos são frequentemente impactados pelos mais diversos tipos de poluentes e os efeitos tóxicos destas moléculas em diferentes espécies precisam ser bem conhecidos para que se compreenda como evitar este impacto ou minimizá-lo, protegendo a vida e a saúde dos ecossistemas.

Os resultados obtidos no presente trabalho contribuem com dados inéditos a respeito dos efeitos de diferentes poluentes aquáticos na espécie *H. commersoni*, uma espécie bem conhecida, muito consumida pela população, mas pouco estudada. A padronização do cultivo primário de hepatócitos desta espécie, descrita no primeiro capítulo, demonstrou que esta metodologia pôde ser aplicada com sucesso para avaliar os efeitos do MeHg e do DDT nestas células e poderá ser utilizada em estudos futuros envolvendo outros biomarcadores e diferentes xenobióticos, como demonstrado no segundo capítulo.

Através da padronização do cultivo dos hepatócitos, foi possível conhecer pela primeira vez os efeitos de concentrações realísticas de poluentes ambientais de extrema relevância como o MeHg e DDT no mecanismo de resposta das células de *H. commersoni*. Os dados permitiram concluir que esta espécie pode ser mais resistente para sobreviver em ambientes impactados, contribuindo com a entrada e bioacumulação de poluentes tóxicos na cadeia trófica. Além disso, os biomarcadores utilizados para a geração destes resultados foram empregados em um modelo *in vitro* pouco explorado no Brasil.

Os dados provenientes do terceiro capítulo são um alerta para o risco de exposição humana a múltiplos poluentes já que a espécie estudada, mesmo não ocupando níveis superiores na cadeia trófica, apresentou bioacumulação de diversos poluentes orgânicos, alguns já banidos há muito tempo devido ao seu potencial tóxico. Embora a interpretação de respostas obtidas em estudo de campo representa um

desafio porque são induzidas por muitos contaminantes, as análises bioquímicas e histopatológicas indicaram que os poluentes interferem com o metabolismo destes animais, causando efeitos sinérgicos ou antagônicos. O estudo em campo possibilitou ainda, estabelecer relação entre as respostas obtidas *in vitro* no segundo capítulo, sustentando a idéia de maior resistência do peixe *H. commersoni* em relação a outras espécies. Esta hipótese pôde ser mais uma vez evidenciada pela correlação entre os biomarcadores bioquímicos e a bioacumulação dos poluentes organopersistentes. É importante ainda destacar que, apesar das dificuldades relacionadas à interpretação dos resultados, estudos como este realizado no terceiro capítulo são extremamente relevantes para que se conheça o estado de saúde dos organismos expostos e conseqüentemente os riscos para a população humana que utiliza estes peixes como componente da dieta.

O quarto e último capítulo desta tese contemplou experimentos de bioensaios para conhecer a dinâmica de nanopartículas de prata em organismos aquáticos, já que as mesmas representam uma nova problemática relacionada aos impactos ambientais gerados pelas novas tecnologias. As nanotecnologias são um novo campo da ciência, que, apesar de promissor, pode estar relacionado a uma série de efeitos tóxicos em organismos expostos. Neste sentido, os resultados obtidos neste capítulo comprovam que peixes expostos internalizam as NPs com facilidade em um curto espaço de tempo e acumulam as mesmas em diferentes compartimentos do organismo. Por este motivo, as nanopartículas permanecem aglomeradas ou dissociadas no interior das células e efeitos deletérios podem estar relacionados à presença das nanopartículas em si, bem como ao componente metálico em sua forma iônica.

Diante deste quadro, faz-se urgente a necessidade de criação de uma legislação específica para a poluição gerada pelas nanopartículas já que as mesmas apresentam comportamento e toxicidade diferentes de outros compostos. Até o presente momento, poucos são os trabalhos envolvidos em quantificar as concentrações de diferentes nanopartículas no ambiente sendo que esta também é uma necessidade. Outros estudos devem ser financiados para que se conheça melhor o potencial tóxico das nanopartículas em diferentes espécies, isto porque os investimentos na área de

toxicologia ainda são limitados, ao contrário dos crescentes investimentos relacionados à produção e utilização destes elementos.

REFERÊNCIAS

- ABDOLLAHI, M.; RANJBAR, A.; SHADNIA, S.; NIKFAR, S.; REZAIE, A. Pesticides and oxidative stress: a review. **Medical Science Monitor**, v.10, p.141–147, 2004.
- AEBI, H.. Catalase in vitro. **Academic Press**, v.105, p.121-126, 1984.
- AHMED, T., TRIPATHI, A.K., AHMED, R.S., DAS, S., SUKE, S.G., PATHAK, R., CHAKRABOTI, A. Endosulfan-induced apoptosis and glutathione depletion in human peripheral blood mononuclear cells: attenuation by *N*-acetylcysteine. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, v.22, p.299–304, 2008.
- ALI, M., SREEKRISHNAN, T.R. Aquatic toxicity from pulp and paper mill effluents: a review. **Advances in Environmental Research**. V.5, p.175-196. 2001.
- ALMAZAN, G.; LIU, H. N.; KHORCHID, A. Exposure of developing oligodendrocytes to cadmium causes HSP72 induction, free radical generation, reduction in glutathione levels, and cell death. **Free Radical Biol. Med.** v.29, p.858– 869, 2000.
- ALMOFTI, M.R., ICHIKAWA, T., YAMASHITA, K., TERADA, H., SHINOHARA, Y. Silver ion induces a cyclosporine a-sensitive permeability transition in rat liver mitochondria and release of apoptogenic cytochrome c. **J. Biochem.** v.134, p.43-49, 2003.
- 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.
- ARORA, S., JAIN, J., RAJWADE, J.M., AND PAKNIKAR, K. M. Cellular responses induced by silver nanoparticles: in vitro studies. **Toxicol. Lett.** v.179, p.93–100, 2008.
- ASHARANI, P. V., WU, Y. L., GONG, Z., AND VALIYAVEETIL, S. Toxicity of silver nanoparticles in zebrafish models. **Nanotechnology**, v.19, p.2255102 - 2255107, 2008.
- ATSDR. **Toxicological Profile for PCBs**. U. S. Department of Health and Human Services, Atlanta, USA, 2000.
- ATSDR. **Toxicological profile for DDT, DDE and DDD**. U. S. Department of Health and Human Services, Atlanta, USA, 2002.
- ATSDR. **Draft Toxicological profile for alpha, beta, gama and delta-hexachlorocyclohexane**. U. S. Department of Health and Human Services, Atlanta, USA, 2003.

AVCI A., KAÀMAZ M., DURAK I. Peroxidation in muscle and liver tissues from fish in a contaminated river due to a petroleum refinery industry. **Ecotoxicol Environ Saf.** 460:101–5. 2005.

BAALOUSHA, M., MANCIULEA, A., CUMBERLAND, S., KENDALL, K., AND LEAD, J. R. Aggregation and surface properties of iron oxide nanoparticles: influence of pH and natural organic matter. **Environ. Toxicol. Chem.** v.27, p.1875–1882, 2008.

BAGCHI, D., M. BAGCHI, E.A. HASSOUN, S.J. STOHS. In vitro and in vivo generation of reactive oxygen species, DNA damage and lactate dehydrogenase leakage by selected pesticides. **Toxicology**, v.104, p.129–140, 1995.

BAINY, A.C.D., SAITO, E., CARVALHO, P.S.M., JUNQUEIRA, V.B.C. Oxidative stress in gill, erythrocytes, liver and kidney of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) from a polluted site. **Aquatic Toxicology**, v.34, p.151–162, 1996.

BAKSI, S. M. e FRAZIER, J. M. Isolated fish hepatocytes – model systems for toxicology research: review. **Aquatic Toxicology**, v.16, p.229-256, 1990.

BALDWIN, L. A.; CALABRESE, E. J. Gap junction-mediated intercellular communication in primary cultures of rainbow trout hepatocytes. **Ecotoxicol. Environ Saf.** v. 28, 201-207, 1994.

BALLESTEROS, M. L.; WUNDERLIN, D. A., BISTONI, M. A. Oxidative stress responses in different organs of *Jenynsia multidentata* exposed to endosulfan. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.72, p.199–205, 2009.

BANERJEE, B. D., SETH, V., AHMED, R. F. Pesticide-induced oxidative stress: perspectives and trends. **Rev. Environ. Health.** v.16, p.1–40, 2001.

BANO, Y., HASAN, M. Mercury induced time-dependent alterations in lipid profiles and lipid peroxidation in different body organs of cat-fish *Heteropneustes fossilis*. **Journal of Environmental Science and Health.**, v.24, p.145–166, 1989.

BARATA, C., VARO, I., NAVARRO, J. C., ARUN, S., PORTE, C. Antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in the freshwater cladoceran *Daphnia magna* exposed to redox cycling compounds. **Comp. Biochem. Physiol.** v.140, p.175–186, 2005.

BAUN, A.; SORENSEN, S. N.; RASMUSSEN, R. F. ; HARTMANN, N. B.; KOCH, C. B. Toxicity and bioaccumulation of xenobiotic organic compounds in the presence of aqueous suspensions of aggregates of nano-C60. **Aquat. Toxicology**, v. 86, p.379-387, 2008.

BEBE, F.N., PANEMANGALORE, M. Exposure to low doses of endosulfan and chlorpyrifos modifies endogenous antioxidants in tissue of rats. **J. Environ. Sci. Health**, v.38, p.349–363, 2003.

BELLETTI, S.; ORLANDINI, G.; VETTORI, M. V. 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.
- BENZIE, I.F.F. Lipid peroxidation: a review of causes, consequences, measurements and dietary influences. **Int. J. Food Sci. Nut.**, v.47, p.233-261, 1996.
- BENN, T. M., WESTERHOFF, P. Nanoparticle silver released into water from commercially available sock fabrics. **Environ. Sci. Technol.** v.42, p.4133–4139, 2008.
- BERG, V., UGLAND, K. I., HAREIDE, N.R., ASPHOLM, P.E., POLDER, A., SKAARE, J.U. Organochlorine contamination in deep-sea fish from the Davis Strait. **Mar. Environ. Res.** v.44, p.135–148, 1997.
- BERNET, D., SCHMIDT, H., MEIER, W., BURKHARDT-HOLM, P., WAHLI, T. Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. **Journal of Fish Diseases**, v.22, p. 25-34, 1999.
- BERRY C.C, WELLS S., CHARLES S., AITCHISON G., CURTIS A.S.G. Cell response to dextran-derivatised iron oxide nanoparticles post internalization. **Biomaterials**, v.25, p.5405–13, 2004.
- 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.
- BIAGIOTTI, E., BOSCH, K.S., NINFALI, P., FREDERIKS, W.M., VAN NOORDEN, C.J.F. Posttranslational regulation of glucose glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in tongue epithelium. **J. Histochem. Cytochem.** v.48, p.971–977, 2000.
- BIRNBAUM, M. J.; SCHULTZ J.; FAIN, J. N.; Hormone-stimulated glycogenolysis in isolated goldfish hepatocytes. **Am J Physiol.** v.231, p.191–197, 1976.
- BISHAYI, B.; SENGUPTA, M. Intracellular survival of *Staphylococcus aureus* due to alteration of cellular activity in arsenic and lead intoxicated mature Swiss albino mice. **Toxicology.** v.184, p. 31-39, 2003.
- BLAAUBOER, B.J.; BOOBIS, A.R.; CASTELL, J.V.; COEKE, S.; GROOTHUS, G.M.M.; GUILLOZO, A.; HALL, T.J.; HAWSWORTH, G.M.; LORENZON, G.; MILTENBURGER, H.G.; ROGIERS, V.; SKETT, P.; VILLA, P.; WIEBEL, F.J. The practical applicability of hepatocytes cultures in routine testing. **ECVAM workshop report 1.** ATLA 22, 231–241, 1994.
- BLAIR, J. B.; MILLER, M. R.; PACK, D.; BARNES, R.; TEH, S. J.; HINTON, D. E. Isolated trout liver cells: establishing short-term primary cultures exhibiting cell-to-cell interactions. **In Vitro Cell Dev Biol**, v. 26, p.237-49, 1990.
- BOON J. P., LEWIS W. E., TJOEN-A-CHOY M. R., ALLCHIN C. R., LAW R. J., DE BOER J., et al. Levels of polybrominated diphenyl ether (PBDE) flame retardants in animals representing different trophic levels of the North Sea food web. **Environ Sci Technol**, v.36, p. 4025– 32, 2002.

BOUCHE, G.; GAS, G. N.; PARIS, H. Isolation of carp hepatocytes by centrifugation on a discontinuous Ficoll gradient. A biochemical and ultrastructural study. **Biol. Cell**, v. 36, p. 17–29, 1979.

BOLIS, C. L.; PICCOLELLA, M., DALLA VALLE, A. Z.; RANKIN, J. C. Fish as model in pharmacological and biological research . **Pharmacological Research**. v.44, p.265-280, 2001.

BRAUNBECK , T.; STORCH, V. Senescence of hepatocytes isolated from rainbow trout in primary culture. An structural study. **Protoplasma**. v.170, p. 138-159, 1992.

BRAUNBECK, T.; SEGNER, H. Isolation and cultivation of teleost hepatocytes. In: BERRY M. N.; EDWARDS, A. M. (eds) *The hepatocytes review*. Kluwer Academic Publishers, Amsterdam, p, 49–71, 2000.

BRAYDICH-STOLLE, L., HUSSAIN, S., SCHLAGER, J. J., AND HOFMANN, M.C.. In vitro cytotoxicity of nanoparticles in mammalian germline stem cells. **Toxicol. Sci**. v.88, p.412–419, 2005.

BRIDGES, C. C., ZALUPS R. K. Molecular and ionic mimicry and the transport of toxic metals. **Toxicology and Applied Pharmacology**. v.204, p.274– 308, 2005.

BRIGGER I, DUBERNET C, COUVREUR P. Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. **Adv Drug Deliv Rev**, v.54, p.631–51, 2002.

BROWN D. M., WILSON M. R, MACNEE W, STONE V, DONALDSON K. Size-dependent proinflammatory effects of ultrafine polystyrene particles: a role for surface area and oxidative stress in the enhanced activity of ultrafines. **Toxicol Appl Pharmacol**, v.175, p.191–9, 2001.

BRUSLE, J. The eel (*Anguilla* sp.) and organic chemical pollutants. **Sci. Tot. Environ**. 102, 119, 1991.

BURY, N. R., WOOD, C.M. Mechanism of branchial apical silver uptake by rainbow trout is via the proton-coupled Na⁺ channel. **Am. J. Physiol-Reg. Integr. Comp. Physiol**. v.277, p.1385-1391, 1999.

BUSH, A. I. Metals and neuroscience. **Curr. Opin. Chem. Biol**. v.4, p.184– 191, 2000.

CAMPBELL, J. W.; ASTER, P. L.; CASEY, C. A. Preparation and use of fish hepatocytes. In: Harris RA, Cornell NW (eds) *Oxidative stress: oxidants and antioxidants*. Elsevier, New York, p. 31–40, 1983.

CARACENI, P., DE MARIA, N., R.Y.U, H.S., COLANTONI, A., ROBERTS, L., MAIDT, M.L., PYE, Q., BERNARDI, M., VAN THIEL, D.H., FLOYD, R.A., Proteins but not nucleic acids are molecular targets for the free radical attack during reoxygenation of rat hepatocytes. **Free Radical Biology & Medicine**, v.23, p. 339–344, 1997.

CARLSON, C., HUSSAIN, S. M., SCHRAND, A.M., BRAYDICH-STOLLE, L.K., HESS, K.L., JONES, R.L., SCHLAGER, J.J. Unique cellular interaction of silver nanoparticles: Size-

dependent generation of reactive oxygen species. **J. Phys. Chem. B.** v.112, p.13608-13619, 2008.

CARNEVALI, S., PETRUZZELLI, S., LONGONI, B., VANACORE, R., BARALE, R., CIPOLLINI, M., SCATENA, F., PAGGIARO, P., CELI, A., GIUNTIN, C. Cigarette smoke extract induces oxidative stress and apoptosis in human lung fibroblasts. **Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.** v.284, p.955–963, 2003.

CASTANO, A.; BOLLS, N.; BRAUNBECK, T.; DIERICKX, P.; HALDER, M. B.; KAWAHARA, K.; LEE, L. E. J.; MOTHERSILL, C.; PART, P.; REPETTO, G.; SINTES, J. R.; RUFLI, H.; SMITH, R.; WOOD, C.; SEGNER, H. The use of fish cells in ecotoxicology. **ATLA**, v.31, p. 317–351, 2003.

CASTOLDI, A. F.; COCCINI, T.; CECCATELLI, S.; MANZO, L.. Neurotoxicity and molecular effects of methylmercury. **Brain Res. Bull.** v.55, p.197– 203, 2001.

CHAE, Y. J.; PHAMA, C. H.; LEEB, J.; BAEC, E. YIC, J. GU, M. B. Evaluation of the toxic impact of silver nanoparticles on *Japanese medaka (Oryzias latipes)*. **Aquatic Toxicology**, v.94, p.320–327, 2009.

CHEN, Y.C.J., YU, M.L.M., ROGAN, W.J., GLADEN, B.C., HSU, C.C. A6-year followup of behavior and activity disorders in Taiwan Yu- heng children. **Am. J. Public Health**, v.84, p.415–422, 1994.

CHEN, J. J.; CHEN, G. S.; BUNCE, N.; J. Inhibition of CYP 1A2- dependent MROD activity in rat liver microsomes: An explanation of the hepatic sequestration of a limited subset of halogenated aromatic hydrocarbons. **Environ. Toxicol.** v.2, p. 115–119, 2003.

CHEN, X., SCHLUESENER, H. J. Nanosilver: a nanoparticle in medical application. **Toxicol. Lett.** v.176, p.1–12, 2008.

CHENG X.K, KAN A.T, Tomsom MB. Naphthalene adsorption and desorption from aqueous C-60 fullerene. **J Chem Eng Data**, v.49, p.675–83, 2004.

CHEUNG, C. C. C., ZHENG, G. J., LI, A. M. Y., RICHARDSON, B. J., LAM, P. K. S. Relationships between tissue concentrations of polycyclic aromatic hydrocarbons and antioxidative responses of marine mussels, *Perna viridis*. **Aquat.Toxicol.**v.52, p.189–203, 2001.

CHIARAMONTE, R., BARTOLINI, E., RISO, P., CALZAVARA, E., ERBA, D., TESTOLIN, G., COMI, P., SHERBET, G.V. Oxidative stress signalling in the apoptosis of Jurkat T-lymphocytes. **J. Cell. Biochem.** v.82, p.437–444, 2001.

CLAYTON, D. F.; HARRELSON, A. L.; DARNELL, J. E. Dependence of liver specific transcription on tissue organization. **Mol Biol Cell**, v. 5, p. 2623–32, 1985.

CNUBBEN, N.H.P., RIETJENS, I.M.C.M., WORTELBOER, H., VAN ZANDEN, J., VAN BLADEREN, P.J., The interplay of glutathione-related processes in antioxidant defense. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v.10, p.141–152, 2001.

COGLIANO, V.C., Assessing the cancer risk from environmental PCBs. **Environ. Health Perspect.** v.106, p.317–323, 1998.

COLVIN, V. L. Sustainability for nanotechnology. **The Scientist**,v.16, p.26–7., 2004.

CONNELL, D. W.; MILLER, G. J.; MORTIMER, M. R.; SHAW, G. R. ANDERSON, S. M. **Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.** v. 29, 47 – 62, 1999.

CROUCH, R.K.; GANDY, S.C.; KIMSEY, G. The inhibition of islet superoxide dismutase by diabetogenic drugs. **Diabetes**, v.30, p.235-241, 1981.

D'AMATO, C.; TORRES, J. P. M.; MALM, O. DDT (Dicloro difenil tricloroetano): toxicidade e contaminação ambiental – uma revisão. **Quim. Nova.** v.25, n.6, p.955-1002, 2002.

DARÉ, E.; LI, W.; ZHIVOTOVSKY, B.; YUAN, X.; CECCATELLI, S. Methylmercury and H₂O₂ provoke lysosomal damage in human astrocytoma d384 cells followed by apoptosis. **Free Radical Biology & Medicine.** vol. 30, n.12, p.1347–1356, 2001.

DE SAEGER, S., SERGEANT, H., PIETTE, M., BRUNEEL, N., VAN DE VOORDE, W., VAN PETEGHEM, C. Monitoring of polychlorinated biphenyls in Belgian human adipose tissue samples. **Chemosphere**, v.58, p.953–960, 2005.

DOMINGOS, R.F. BAALOUSHA, M. JU-NAM, Y. REID, M.M., TUFENSKJI, N. LEAD J.R. AND K.J. WILKINSON. Characterizing manufactured nanoparticles in the environment: multimethod determination of particles sizes. **Environmental Technology and Chemistry**, v.43, p. 7277-7284, 2009.

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.

DOWLING, A. Development of nanotechnologies. **Mater Today** 07(Suppl. 1):30–5, 2004.

DUAN C.; HANZAWA N.; TAKEUCHI Y.; HAMADA E.; MIYACHI S.; HIRANO T. Use of primary cultures of salmon hepatocytes for the study of hormonal regulation of insulin-like growth factor I expression in vitro. **Zool Sci.** v.10, p. 473-480, 1993.

ELLMAN, G. L., COURTNEY, D., ANDRES J.R, V., FEATHRSTONE, R. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochem. Pharmacol.** v.7, p.88–95, 1961.

ERDOGRUL, O., COVACI, A., SCHEPENS, T. Levels of organochlorine pesticides, polychlorinated biphenyls and polybrominated diphenyl ethers in fish species from Kahramanmaras, Turkey. **Environment International**, v.31, p.703– 711, 2005.

ESPANDIARI, P., GLAUERT, H. P., LEHMLER, H. J., LEE, E. Y., SRINIVASAN, C., ROBERTSON, L. W. Polychlorinated biphenyls as initiators in liver carcinogenesis: resistant hepatocyte model. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.186, p.55–62, 2003.

FARKAS, J.; CHRISTIAN, P.; URREA J. A. G.; ROOS, N.; HASSELLOV, M., TOLLEFSEN, K. E.; THOMAS, K. V. Effects of Silver and Gold Nanoparticles on Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Hepatocytes. *Aquatic Toxicology*, v.96, 44-52, 2010.

FARRÉ, M., K. GAJDA-SCHRANTZ, L. KANTIANI AND D. BARCELÓ Ecotoxicity and analysis of nanomaterials in the aquatic environment. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v.393, p.81-95, 2009.

FERRARIS, M.; SONIA, R. P. C.; FRANCOLINI, M.; MARABINI, L.; CHIESARA, E. Early oxidative damage in primary cultured trout hepatocytes: a time course study. **Aquat Toxicol.** v. 59, p. 283–296, 2002.

FERREIRA, A. N.; CAETANO, M.; ANTUNES, P.; COSTA, J.; GIL, O.; BANDARRA N.; FERREIRA, P. P.; VALE, C.; ARMANDA, M. REIS, H. Assessment of contaminant sand biomarkers of exposure in wild and farmed sea bass. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.73, p.579–588, 2010.

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). **Journal of Fish Biology**, v.69, 1524–1532, 2006.

FILIPAK NETO, F.; S. M. ZANATA, H.C. SILVA DE ASSIS, L. S. NAKAO, M. A. F. RANDI, C. A. OLIVEIRA RIBEIRO. Toxic effects of DDT and methyl mercury on the hepatocytes from *Hoplias malabaricus*. **Toxicology in Vitro**, v. 22, p. 1705–1713, 2008.

FITZPATRICK, P.J., O'HALLORAN, J., SHEEHAN, D., WALSH, A.R. Assessment of glutathione S-transferase and related proteins in the gill and digestive gland of *Mytilus edulis* (L.), as potential organic pollution biomarkers. **Biomarkers**, v.2, p.51–56, 1997.

FISHBASE, 2010. Disponível em: <<http://www.fishbase.org>>. Acesso em: outubro de 2010.

FISK A. T.; HOBSON K. A.; NORSTROM R. J. Influence of chemical and biological factors on trophic transfer of persistent organic pollutants in the Northwater Polynya marine food web. **Environ Sci Technol**, v.35, p. 732–8, 2001.

FLOURIOT, G.; VAILLANT C.; SALBERT G.; PELISSERO C.; GUIRAUD J. M.; VALOTAIRE Y. Monolayer and aggregate cultures of rainbow trout hepatocytes: long term and stable liver-specific expression in aggregates. **J. Cell Sci.** v.105, p.407-416, 1993.

FORD, W. M.; HILL, E. P. Organochlorine pesticides in soil sediments and aquatic animals in the Upper Steele Bayou of Mississippi. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v.20, p. 161 - 167, 1991.

FRANCO, R.; SÁNCHEZ-OLEA, R.; REYES-REYES, E.M.; PANAYIOTIDIS, M.I. Environmental toxicity, oxidative stress and apoptosis: Ménage à Trois. **Mutation Research**, v.674, p.3–22, 2009.

FUJIWARA, K., SUEMATSU, H., KIYOMIYA, E., AOKI, M., SATO, M., MORITOKI, N., 2008. Size-dependent toxicity of silica nano-particles to *Chlorella kessleri*. **J. Environ. Sci. Health**, v.43, p.1167-1173, 2008.

GABRYELACK, T., KLEKOT, J.. The effects of paraquat on the peroxide metabolism in erythrocytes of freshwater fish species. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.81, p.415–418, 1985.

GATTI A. M.; RIVASI, F. Biocompatibility of micro and nanoparticles: **Part I. In liver and kidney. Biomaterials**, v.23, p.2381–7, 2002.

GATTI, R., BELLETTI, S., UGGERI, J., VETTORI, M.V., MUTTI, A., SCANDROGLIO, R., ORLANDINI, G. Methylmercury cytotoxicity in PC12 cells is mediated by primary glutathione depletion independent of excess reactive oxygen species generation. **Toxicology**, v.204, p.175–185, 2004.

GASSO, S.; CRISTOFOL, R. M.; SELEMA, G. Antioxidant compounds and Ca²⁺ pathway blockers differentially protect against methylmercury and mercuric chloride neurotoxicity. **J. Neurosci. Res.** v.66, p.135–145, 2001.

GEORGE, S.G., Enzymology and molecular biology of phase II xenobiotic-conjugating enzymes in fish. In: Malins, D.C., Ostrander, G.K. (Eds.), *Aquatic Toxicology; Molecular, Biochemical and Cellular perspectives*. **Lewis Publishers, CRC press**, p. 37 - 85, 1994.

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. 1010–18, 1988.

GJOEN T.; BERG, T. Interaction of low density lipoproteins with liver cells in rainbow trout. **Fish Physiol Biochem.** v.10, p. 465-473, 1993.

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.

GRIFFITT, R. J., HYNDMAN, K., DENSLOW, N.D., BARBER, D. S., Comparison of Molecular and Histological Changes in Zebrafish Gills Exposed to Metallic Nanoparticles. **Toxicol. Sci.** v.107, p.404-415, 2009.

GUGUEN-GUILLOUZO, C.; GUILLOUZO, A. Modulation of functional activities in cultured rat hepatocytes. **Mol Cell Biochem**, v. 53, p. 35–56, 1983.

GUILLOUZO, A.; MOREL, F.; LANGOUET, S.; MAHEO, K.; RISSEL, M. Use of hepatocyte cultures for the study of hepatotoxic compounds. **Journal of hepatology.** v.26, 73-80, 1997.

GUNDERSON E. L. Dietary intakes of pesticides, selected elements, and other chemicals: FDA total diet study, June 1984-April 1986. *J AOAC Int* 78(4):910-921, 1995.

H. A. YASHI S.; OOSHIRO, Z. Primary culture of freshly isolated liver cell of the eel. **Bull Jpn Soc Sci Fish**, v. 51, p. 765–771, 1985.

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.

HANDY, R. D.; EDDY, F. B. Transport of solutes across biological membranes in eukaryotes: an environmental perspective. In: *Physicochemical kinetics and transport at chemical-biological interfaces*, pp. 337–356. Wiley, Chichester, UK, 2004.

HANDY, R. D., OWEN, R., AND VALSAMI-JONES, E.. The ecotoxicology of nanoparticles and nanomaterials: current status, knowledge gaps, challenges, and future needs. **Ecotoxicology**, v.17, p.315–325, 2008.

HARMAN, D. Aging and oxidative stress. **Jl.FCC**, v.10, p. 24–47, 1999.

HASCHEMEYER, A. E. V.; MATHEWS, R. W. Temperature dependency of protein synthesis in isolated hepatocytes of antarctic fish. **Physiol Zool**, v. 56, p. 78–87, 1983.

HAUGLAND, R.P. **Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals**, Molecular Probes, Leiden, 1996.

HAYES, J. D., PULFORD, D. J., The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprevention and drug resistance. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v.30, p.445–600, 1995.

HERNANDEZ, F., PITARCH, E., SERRANO, R., GUERRERO,C. Determination of organochlorine compounds in human adipose tissue using automated liquid chromatographic clean up and gas chromatography–tandem mass spectrometry. **Chromatographia**, v.55, p.715–722, 2002.

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.

HINTON, D.E., BAUMANN, P.C., GARDNER, G.C., HAWKINS, W.E., HENDRICKS, J.D., MURCHELANO, R.A., OKIHIRO, M.S. Histopathologic biomarkers. In: Huggett, R.J., Kimerly, R.A., Mehrle, P.M., Jr, Bergman, H.L. (Eds.), *Biomarkers: Biochemical, Physiological and Histological Markers of Anthropogenic Stress*. Lewis Publishers, Chelsea, MI, USA, p. 155 - 210, 1992.

HOET P. H. M, BRÜSKE-HOHLFELD I, SALATA O. V. Nanoparticles - known and unknown health risks. **J Nanobiotechnol**, v.2, p.12, 2004.

HOWARD C. V. Small particles - big problems. **Int Lab News**, v.2, p. 28–9, 2004.

HSIN, Y.-H., CHEN, C.-F., HUANG, S., SHIH, T.-S., LAI, P.-S., AND CHUEH, P. J. The apoptotic effect of nanosilver is mediated by a ROS- and JNK dependent mechanism involving the mitochondrial pathway in NIH3T3 cells. **Toxicol. Lett.**, v.179, p.130–139, 2008.

HUBER, P. C.; ALMEIDA, W. P.; DE FÁTIMA, A. Glutathione e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. **Química Nova**, v. 31, p. 1170-1179, 2008.

HUSSAIN, S. M., HESS, K. L., GEARHART, J. M., GEISS, K. T., AND SCHLAGER, J. J. In vitro toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells. **Toxicol. In Vitro**. v.19, p.975–983, 2005.

HYLLNER, S. J.; ANDERSON T. B.; HAUX C. OLSSON P. E. Cortisol induction of metallothionein in primary culture of rainbow trout hepatocytes. v.139, p. 124-139, 1989.

IARC. DDT and associated compounds (Group 2B). International Agency for Research on Cancer. <http://193.51.164.11/htdocs/Monographs/Vol53/04-DDT.HTM>. Janeiro, 2002.

JANSSENS, B., CHILDRESS, J. J., BAGUET, F., REES, J, F. Reduced enzymatic antioxidative defense in deep-sea fish. **J. Exp. Biol**. v.203, p.3717–3725, 2000.

JENSEN, E. G.; THAULAND, R.; SOLI, N. E. Measurement of xenobiotic metabolising enzyme activities in primary monolayer cultures of immature rainbow trout hepatocytes at two acclimation temperatures. **ATLA**. v.24, p. 727-740, 1996.

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.

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. **Analytical Biochemistry**, v.202, n.2, p.384-389, 1992.

JOBLING, S.; SUMPTER J. P.; Detergent compounds in sewage effluent are weakly oestrogenic to fish: an in vitro study using rainbow trout hepatocytes. **Aquat Toxicol**. v. 27, p.361-372, 1993.

JOHNSON, L.L., STEHR, A.M., OLSON, O.P., MYERS, M.S., PIERCE, S.M., WIGREN, C.A., McCAIN, B.B., VARANASI, U. Chemical contaminants and hepatic lesions in winter flounder (*Pleuronectes americanus*) from the northeast coast of the United States. **Environmental science of technology**, v.27, p.2759-2771, 1993.

JOHNSTON, B. D., SCOWN, T. M., MOGER, J., CUMBERLAND, S., BAALOUSHA, M., LINGE, K., VAN AERLE, R., JARVIS, K., LEAD, J. R., TYLER, C. R. Bioavailability of nanoscale metal oxides, TiO₂, CeO₂, and ZnO to fish. **Environ. Sci. Technol**. v.44, p.1144–1151, 2010.

JUNG, W. K., KIM, S. H., KOO, H. C., SHIN, S., KIM, J. M., PARK, Y. K., HWANG, S. Y., YANG, H., AND PARK, Y. H. Antifungal activity of the silver ion against contaminated fabric. **Mycoses**, v.50, p.265–269, 2007.

KAUR, P., RADOTRA, B., MINZ, R.W., GILL, K. D. Impaired mitochondrial energy metabolism and neuronal apoptotic cell death after chronic dichlorvos (OP) exposure in rat brain. **Neurotoxicology**, v.28, p.1208–1219, 2007.

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.

KENNEDY, C. J.; GILL K. A.; WALSH P. C. Temperature acclimatization of xenobiotic metabolizing enzymes in cultured hepatocytes and whole liver of the gulf toadfish. **Can J. Fish Aquat Sci.** v.48, p1212-1229, 1991.

KELLY, S. A.; HAVRILLA, C. M.; BRADY, T. C.; ABRAMO, K. H.; LEVIN, E. D. Oxidative stress in toxicology: established mammals emerging piscine model systems. **Environ. Health Perspectives**, v.106, p.375–384, 1998.

KLAUNIG, J. E. Establishment of fish hepatocyte cultures for use in vitro carcinogenicity studies. **Natl Cancer Inst Monogr.** v.65, p. 163–173, 1984.

KLEIN, C. B.; FRENKEL, K.; COSTA, M. The role of oxidative processes in metal carcinogenesis. **Chem. Res. Toxicol.** v. 4 p.592–604, 1991.

KONER, B. C., BANERJEE, B. D., RAY, A., Organochlorine pesticideinduced oxidative stress and immune suppression in rats. **Indian J. Exp. Biol.** v.36, p.395–398, 1998.

LACAVA L.M., GARCIA V.A.P, KUCKELHAUS S., AZEVEDO R.B., SADEGHIANI N., BUSKE N., et al. Long-term retention of dextran-coated magnetite nanoparticles in the liver and spleen. **J. Magn. Mater.**, v.276, p.2434–5, 2003.

LARESE, F. F., D'AGOSTIN, F., CROSER, M., ADAMI, G., RENZI, N., BOVENZI, M., AND MAINA, G. Human skin penetration of silver nanoparticles through intact and damaged skin. **Toxicology**, v.255, 33–37, 2009.

LEE, K. J., NALLATHAMBY, P. D., BROWNING, L. M., OSGOOD, C. J., AND XU, X.-H. N. In vivo imaging of transport and biocompatibility of single silver nanoparticles in early development of zebrafish embryos. **ACS Nano** v.1, p.133–143, 2007.

LEE, Y. W.; HA, M. S.; KIM, Y. K. Role of reactive oxygen species and glutathione in inorganic mercury-induced injury in human glioma cells. **Neurochem. Res.** v.26, p.1187–1193, 2001.

LI, Q. L., MAHENDRA, S., LYON, D. Y., BRUNET, L., LIGA, M. V., LI, D., AND ALVAREZ, P. J. J. Antimicrobial nanomaterials for water disinfection and microbial control: potential applications and implications. **Water Res.** v.42, p.4591–4602, 2008.

LI Q., YEO M.H., TAN B.K. Lipid peroxidation in small and large phospholipids unilamellar vesicles induced by water-soluble free radical sources. **Biochem Biophys Res Commun**, 273:72–6, 2000.

LIMA, E. S.; ABDALLA, D. S. P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 37, 293-303, 2001.

LIMBACH, K.L., LI, Y., GRASS, R.N., BRUNNER, T.J., HINTERMANN, M.A., MULLER, M., GUNTHER, D., STARK, W.J. Oxide nanoparticle uptake in human lung fibroblast: effects of particle size, agglomeration, and diffusion at low concentrations. **Environ. Sci. Technol.** v.39, p.9370-9376, 2005.

LITTAUER, A.; DE GROOT, H. Release of reactive oxygen by hepatocytes on reoxygenation: three phases and role of mitochondria. **American Journal of Physiology**, v.262, p.1015–1020, 1992.

LUOMA, S. N. Silver nanotechnologies and the environment: old problems or new challenges? Woodrow Wilson International Centre for Scholars: Project on Emerging Nanotechnologies, Washington, DC, 2008.

LUSHCHAK, V., LUSHCHAK, L.P., MOTA, A., HERMES-LIMA, M. Oxidative stress and antioxidant defenses in goldfish *Carassius auratus* during anoxia and reoxygenation. **Am. J. Physiol., Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v. 280, p.100-107, 2001.

MAGOS, L, *IN*: A. SIGEL, H. SIGEL. Metal Ions in Biological Systems, Mercury and Its Effects on Environment and Biology, **Marcel Dekker Inc.**, New York 34, 321–370, 1998.

MATES, J. M.; PEREZ-GOMEZ, C. NUNEZ DE CASTRO, I. Antioxidant enzymes and human diseases. **Clin. Biochem.** v.32, p.595–603, 1999.

MAYER, G. D., LEACH, A., KLING, P., OLSSON, P.-E., HOGSTRAND, C. Activation of the rainbow trout metallothionein—a promoter by silver and zinc. **Comp. Biochem. Physiol. Part B Biochem. Mol. Biol.** v.134, p.181–188, 2003.

MAYNE, S. T. Antioxidant nutrients and chronic disease: use of biomarkers of exposure and oxidative stress status in epidemiologic research. **J. Nutr.** v.133, p.33–940, 2003.

MELA, M. Uso de Biomarcadores na Avaliação dos Efeitos do Metilmercúrio em *Hoplias malabaricus* (BLOCK, 1794) (Traíra). Curitiba, 2004. 138p. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular). Universidade Federal do Paraná, 2004.

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*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.68, p.426-435, 2007.

MIRANDA, A. L.; ROCHE, H.; RANDI, M.A.F.; MENEZES, M.L.; OLIVEIRA RIBEIRO, C.A. Bioaccumulation of chlorinated pesticides and PCBs in the tropical freshwater fish *Hoplias malabaricus*: Histopathological, physiological, and immunological findings. **Environment International**, v.34, p.939–949, 2008.

MOMMSEN T. P.; LAZIER C. B. Stimulation of strogen receptor accumulation by estradiol in primary cultures of salmon hepatocytes. **FEBS Lett.** v.195, p.269-271, 1986.

MOMMSEN, T. P.; MOON, T. W.; WALSH, P. J. Hepatocytes: isolation, maintenance and utilization. *In*: Hochachka P W, Mommsen T P, editors. **Biochemistry and Molecular Biology of Fishes, Analytical Techniques**, vol. 3. Amsterdam: Elsevier, 355-72, 1994.

MONOD, G.; DEVAUX, A.; VALOTAIRE, Y.; CRAVEDI, J. P. Primary cell cultures from fish in ecotoxicology. *In*: Braunbeck T, Hinton DE, Streit B (eds) **Fish ecotoxicology**. Birkhauser, Basel, p.39–60, 1998.

MOON, T. W.; WALSH, P. J.; MOMMSEN, T. P. Fish hepatocytes: a model metabolic system. **Can J Fish Aquat Sci.** v.42, p. 1772–1782, 1965.

MOORE, M.N. Do nanoparticles present ecotoxicological risks for the health of the aquatic environment? **Environment International**, v. 32, p. 967-976, 2006.

MOREL, F.M.M.; KRAEPIEL, A. M. L.; AMYOT, M. The chemical cycle and bioaccumulation of mercury. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 29, 543–566, 1998.

MORGAN, I. J., HENRY, R. P., WOOD, C. M. The mechanism of acute silver nitrate toxicity in freshwater rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) is inhibition of gill Na⁺ and Cl⁻ transport. **Aquat. Toxicol.** v.38, p.145–163, 1997.

MILLER M. R.; SAITO N.; BLAIR, J. B.; HINTON D. E. Acetaminophen toxicity in culture trout liver cells. Maintenance of cytochrome P450 1A1. **Exp. Mol. Pathol.** v.58-p.127-138, 1993.

NA K, LEE TB, PARK K-H, SHIN E-K, LEE Y-B, CHOI H-K. Self-assembled nanoparticles of hydrophobically modified polysaccharide bearing vitamin H as a targeted anti-cancer drug delivery system. **Eur J Pharm Sci.**, v.18, p.165–73, 2002.

NAVARRO, E., PICCAPIETRA, F., WAGNER, B., MARCONI, F., KAEGI, R., ODZAK, N., SIGG, L., BEHRA, R. Toxicity of silver nanoparticles to *Chlamydomonas reinhardtii*. **Environ. Sci. Technol.** v.42, p.8959–8964, 2008.

NUNEZ, M. A.; ESTRADA, I.; CALDERON-ARANDA, E. S. DDT inhibits the functional activation of murine macrophages and decreases resistance to infection by *Mycobacterium microti*. **Toxicology**, v.174, p.201–210, 2002.

OLIVEIRA RIBEIRO, C. A., PELLETIER, E., PFEIFFER, W. C., ROULEAU, C. Comparative uptake, bioaccumulation, and gill damages of inorganic mercury in tropical and nordic freshwater fish. **Environmental Research Section A.** v.83, p.286-292. 2000.

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.

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. **Environmental Research**, v.101, p.74-80, 2006.

OLIVEIRA RIBEIRO, C. A., VOLLAIRE, Y., COULET, E., ROCHE, H. Bioaccumulation of polychlorinated biphenyls in the eel (*Anguilla anguilla*) at the Camargue Nature Reserve - France. **Environmental Pollution**, v.153, p.424-431, 2008.

ORUÇ, E. O., SEVGILER, Y., UNER, N. Tissue-specific oxidative stress responses in fish exposed to 2,4-Dandazinphosmethyl. **Comp. Biochem. Physiol.** v.137, p.43–51, 2004.

PALMEIRA, C. M. In vitro assessment of silver nanoparticles toxicity in hepatic mitochondrial function. EOARD Grand FA8655-07-3047. **Final Report. IMAR-Mitochondrial Research Group.** Coimbra, Portugal, 2008.

PANYAM J, SAHOO S K, PRABHA S, BARGAR T, LABHASETWAR V. Fluorescence and electron microscopy probes for cellular and tissue uptake of poly (D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticle. **Int J Pharm**, v.262, p.1–11, 2003.

PARRAN, D.K.; BARONE JR.; S., MUNDY, W. R. Methylmercury decreases NGF-induced TrkA autophosphorylation and neurite outgrowth in PC12 cells. **Brain Res. Dev. Brain Res.** v.141, p.71– 81, 2003.

PAUMGARTTEN, F. J. R.; CRUZ, C. M.; CHAHOUD, I.; PALAVINSKAS, R.; MATHAR W. PCDDs, PCDFs, PCBs, and other organochlorine compounds in human milk from Rio de Janeiro, Brazil. **Environ Res**, v.83, p. 293–7, 2000.

PARK, S. T.; LIM, K. T.; CHUNG, Y. T. Methylmercury-induced neurotoxicity in cerebral neuron culture is blocked by antioxidants and NMDA receptor antagonists. **Neurotoxicology**. v.17, p.37– 46, 1996.

PARK, S., LEE, Y. K., JUNG, M., KIM, K. H., CHUNG, N., AHN, E.-K., LIM, Y., AND LEE, K.-H. Cellular toxicity of various inhalable metal nanoparticiles on human alveolar epithelial cells. **Inhal. Toxicol.** v.19, p.59–65, 2007.

PELKMANS L, HELENIUS A. Endocytosis via caveolae. **Traffic**, v.3, p.311–20, 2002.

PESONEN, M.; ANDERSSON, T. Characterization and induction of xenobiotic metabolizing enzyme activities in a primary culture of rainbow trout hepatocytes. **Xenobiotica** v.21, p. 263–271, 1991.

PESONEN, M.; ANDERSSON, T. B. Fish primary hepatocyte culture, an important model for xenobiotic metabolism and toxicity studies. **Aquatic Toxicology**. v.37, p. 253-267, 1997.

PEREZ-MALDONADO, I. N.; HERRERA, C.; BATRES, L. E.; GONZALEZ-AMARO, R.; DIAZ-BARRIGA, F.; YANEZ, L. DDT-induced oxidative damage in human blood mononuclear cells. **Environmental Research**. v.98, p.177–184, 2005.

PITARCH, E., SERRANO, R., LOPEZ, F. J., HERNANDEZ, F. Rapid multiresidue determination of organochlorine and organophosphorus compounds in human serum by solid phase extraction and gas chromatography coupled to tandem mass spectrometry. **Anal. Bioanal. Chem.** v.376, p.189–197, 2003.

POCAR, P.; BREVINI, T.A.L.; ANTONINI, S.; GANDOLFI, F. Cellular and molecular mechanisms mediating the effect of polychlorinated biphenyls on oocyte in vitro maturation. **Reproductive Toxicology**, v.22, p.242–249, 2006.

PONG, K. Oxidative stress in neurodegenerative diseases: therapeutic Implications for superoxide dismutase mimetics. **Expert Opin. Biol. Ther.** v.3, p.127–139, 2003.

PRETEL, G. E.; GARCÍA, M. P. L. An experimental design for the controlled modulation of intracellular GSH levels in cultured hepatocytes. **Free rad. Biology and Medicine**, v. 41, p. 610-619, 2006.

RABERGH, C. M. I.; KANE, A. S.; REIMSCHUESSEL, R.; LIPSKY, M. M. Viability and induction of tyrosine aminotransferase in rainbow trout hepatocytes cultured on laminin and polylysine in a serum-free medium. **Meth Cell Sci**, v.17, p. 207–215, 1995.

RABITTO, I.S., ALVES COSTA, J.R.M., SILVA DE ASSIS, H.C., PELLETIER, F.M., 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. **Ecotoxicology and environmental safety**. v.60. p. 147-156, 2005.

RENAULT, S. M. BAUDRIMONT, N. MESMER- DUDONS, P. GONZALEZ, S. MORNET A. BRISSON. Impacts of gold nanoparticle exposure on two freshwater species: a phytoplanktonic alga (*Scenedesmus subspicatus*) and a benthic bivalve (*Corbicula fluminea*). **Gold Bulletin**, 2008.

RIBERA, D., NARBONNE, J.F., MICHEL, X., LIVINGSTONE, D.R., O'HARA, S. Responses of antioxidants and lipid peroxidation in mussels to oxidative damage exposure. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.100, p.178–181, 1991.

RICHARDSON, B. J.; MAK, E.; DE LUCA-ABBOTT, H. B.; MARTIN, M.; MCCLELLAN, K. ; LAM, P. K. S. Antioxidant responses to polycyclic aromatic hydrocarbons and organochlorine pesticides in green-lipped mussels (*Perna viridis*): Do mussels “integrate” biomarker responses? **Marine Pollution Bulletin**, v.57, p. 503–514, 2008.

RIOL, M. J. M.; VALINAS, M. C. N.; FERNANDEZ, M. A. G.; LOPEZ, M. P. Glutathione S-transferases from rainbow trout liver and freshly isolated hepatocytes: purification and characterization. **Comp Biochem Physiol**. v.2, p. 227–235, 2001.

ROBERTS, R. J. **Fish pathology**. 2ed. Baillière Tindall, 1989, 467p.

ROBERTSON, J. D., ORRENIUS, S. Molecular mechanisms of apoptosis induced by cytotoxic chemicals. **Critical Reviews in Toxicology**, v.30, p.609–627, 2000.

ROCHE, H., BUET, A., JONOT, O., RAMADE, F., Organochlorine residues in European eel (*Anguilla anguilla*), crucian carp (*Carassius carassius*) and catfish (*Ictalurus nebulosus*) from Vaccares lagoon (French National Nature Reserve of Camargue) - effects on some physiological parameters. **Aquat. Toxicol**. v.48, p.443–459, 2000.

ROGAN, W. J.; GLADEN, B.C. Neurotoxicology of PCBs and related compounds. **Neurol. Toxicol**. v.13, p.27–36, 1992.

ROGIERS, V.; BLAAUBOER, B.J.; MAUREL, P.; PHILIPPS, I.; SHEPHARD, E. Hepatocyte-based in vitro models and their application in pharmacotoxicology. **Toxicology in vitro**, v. 9, p.685–694, 1995.

ROYAL SOCIETY AND ROYAL ACADEMY OF ENGINEERING. Nanoscience and nanotechnologies: opportunities and uncertainties. RS policy document 19/04. **London: The Royal Society**; p. 113, 2004.

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.

RUDNEVA-TITOVA, I.I., ZHERKO, N.V. Effects of polychlorinated biphenyls on the activity of antioxidant enzymes and lipid peroxidation in muscle and liver of two Black Sea fish species. **Biochemistry**, v.59, p.25–31, 1994.

SAFE, S. Polychlorinated biphenyls (PCBs): environmental impact, biochemical and toxic responses, and implications for risk assessment. **CRC Crit. Rev. Toxicol.**, v. 24, p.87–149, 1994.

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.

SARCINELLI, P. N.; PEREIRA, A.C.S.; MESQUITA, S.A.; OLIVEIRA-SILVA, J.J; MEYER, A.; MENEZES, M.A.C. Dietary and reproductive determinants of plasma organochlorine levels in pregnant women in Rio de Janeiro. **Environ Res**, v.91, p. 143–50, 2003.

SASSA, S. Delta-aminolevulinic acid dehydratase assay. **Enzyme**, v.28, p.133-145, 1982.

SEDLAK, J. e LINDSAY, R. H. Estimation of total protein bound and nonprotein sulphhydryl groups in tissues with Ellman's reagent. **Analytical Biochemistry**, v.25, p.192-205, 1988.

SEGNER, H. Isolation and primary culture of teleost hepatocytes. **Comparative Biochemistry and Physiology**. v. 120, p. 71-81, 1998.

SEGNER, H.; SCHOLZ, S.; BOHM R. Carp (*Cyprinus carpio*) Hepatocytes in primary culture: morphology and metabolism. **Actes du Colloque** (Editions de I. IFREMER) v.18, p. 77–82, 1995.

SCHLEZINGER, J.J., STEGEMAN, J.J. Induction and suppression of cytochrome P450 1A by 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl and its relationship to oxidative stress in the marine fish scup (*Stenotomus chrysops*). **Aquat. Toxicol.** v.52, p.101–115, 2001.

SCHRAND, A. M., BRAYDICH-STOLLE, L. K., SCHLAGER, J. J., DAI, L., AND HUSSAIN, S. M. Can silver nanoparticles be useful as potential biological labels? **Nanotechnology**, v.19, p.104-135, 2008.

SCHREER, A.; TINSON, C.; SHERRY, J. P.; SCHIRMER, K. Application of Alamar blue/5-carboxyfluorescein diacetate acetoxymethyl ester as a noninvasive cell viability assay in primary hepatocytes from rainbow trout. **Anal Biochem** v.1, p. 76–85, 2005.

SCOWN, T. M.; SANTOS, E. M.; JOHNSTON, B. D.; GAISER, B.; BAALOUSHA, M.; MITOV, S.; LEAD, J. R.; STONE, V.; FERNANDES, T. F.; JEPSON, M.; VAN AERLE, R.; TYLER, C. R.

Effects of aqueous exposure to silver nanoparticles of different sizes in rainbow trout. **Toxicological Sciences**, v.115, p. 521-534, 2010.

SHAFER, T. J.; MEACHAM, C. A.; BARONE JR.; S. Effects of prolonged exposure to nanomolar concentrations of methylmercury on voltagesensitive sodium and calcium currents in PC12 cells. **Brain Res. Dev. Brain Res.** v.136, p.151–164, 2002.

SHAILAJA, M. S., D'SILVA, C. Evaluation of impact of PAH on a tropical fish *Oreochromis mossambicus* using multiple biomarkers. **Chemosphere**. v.3, p.835-841.2003.

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. **Molecular Brain Research**. v. 137, p.11 – 22, 2005.

SIJM, D.T.H.M.; OPPERHUIZEN, A. Biotransformation of organic chemicals by fish: Enzyme activities and reactions. In: Hutzinger, O. (Ed.), **Handbook of Environmental Chemistry Reactions and Processes**, vol. 2E. Springer, Berlin, p.163 - 235, 1989.

SILKWORTH, J.B., ANTRIM, L., KAMINSKY, L.S. Correlations between polychlorinated biphenyl immunotoxicity, the aromatic hydrocarbon locus, and liver microsomal enzyme induction in C57BL/6 and DBA/2 mice. **Toxicol. Appl. Pharmacol.** v.75, p.156–165, 1984.

SILVA DE ASSIS, H.C., Der Einsatz von Biomarkern zur summarischen erfassung von Gewässerverschmutzungen. Thesis presented at technical University of Berlin, Germany, p. 99, 1998.

SMITH, C. J., SHAW, B. J., ANDHANDY, R. D. Toxicity of single walled carbon nanotubes on rainbow trout, (*Oncorhynchus mykiss*): respiratory toxicity, organ pathologies, and other physiological effects. **Aquat. Toxicol.** v.82, p.93–109, 2007.

SOLE, M. Assessment of the results of chemical analyses combined with the biological effects of organic pollution on mussels. **Trends in Analytical Chemistry**, v.19, p.1–9, 2000.

SONG, Y., LIANG, X., HU, Y., WANG, Y., YU, H., YANG, K. p,p-DDE induces mitochondria mediated apoptosis of cultured rat Sertoli cells. **Toxicology**, v.253, p.53–61, 2008.

SPOLARICS, Z. Endotoxemia, pentose cycle, and the oxidant/antioxidant balance in the hepatic sinusoid. **J. Leukoc. Biol.** v.63, p.534–541, 1998.

SUN, L., SINGH, A. K., VIG, K., PILLAI, S. R., SINGH, S. R. Silver nanoparticles inhibit replication of respiratory syncytial virus. **J. Biomed. Nanotechnol.** v.4, p.149–158, 2008.

TAVARES T. M.; BERETTA, M.; COSTA, M. C. Ratio of DDT/DDE in the all saints bay, Brazil and its use in environmental management. **Chemosphere**, v.38, p.1445–52, 1999.

TEW, K. D. Glutathione-associated enzymes in anticancer drug resistance. **Cancer Research**, v.54, p.4313–4320, 1994.

THOMAS, P., WOFFORD, H.W. Effects of cadmium and Aroclor 1254 on lipid peroxidation, glutathione peroxidase activity, and selected antioxidants in *Atlantic croacker* tissues. **Aquatic Toxicology**, v.27, p.159–178, 1993.

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. **Environmental Research**, v.88, p.134–139, 2002.

VAN DER OOST, R., BEYER, J., VERMEULEN, N. P. E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environmental Toxicology and Pharmacology** v.13, p.57-149, 2003.

VASSEUR, P.; COSSU-LEGUILLE, C. Linking molecular interactions to consequent effects of persistent organic pollutants (POPs) upon populations. **Chemosphere**. v. 62, p.1033-1042, 2006.

VEGA-LÓPEZ, A., GALAR-MARTÍNEZ, M., JIMÉNEZ-OROZCO, F. A., GARCÍA-LATORRE, E., DOMÍNGUEZ-LÓPEZ, M. L. Gender related differences in the oxidative stress response to PCB exposure in an endangered goodeid fish (*Girardinichthys viviparus*). **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part A, v.146, p. 672–678, 2007.

VIDELA, L.A., BARROS, S.B., JUNQUERIA, V.B.C. Lindane-induced liver oxidative stress. **Free Radicals in Biology and Medicines**, v.9, p.169–179, 1990

VIEIRA, E. D. R.; TORRES, J. P. M.; MALM, O. DDT environmental persistence from its use in a vector control program: a case study. **Environ Res**, v.86, p.174–82, 2001.

VOGT, G.; SEGNER, H. Spontaneous formation of intercellular bile canaliculi and hybrid biliary-pancreatic canaliculi in co-culture of hepatocytes and exocrine pancreas cells from carp. **Cell Tissue Res**, v.4 p. 289-191, 1997.

WALKER, P. A., KILLE, P., HURLEY, A., BURY, N. R., AND HOGSTRAND, C. An in vitro method to assess toxicity of waterborne metals to fish. **Toxicol. Appl. Pharmacol.** v.230, p.67–77, 2008.

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.

WARHEIT D B. Nanoparticles: health impacts? **Mater Today**, v.7, p. 32–5, 2004.

WEDEMWYER, G.A, BARTON, B.A., McLEAY, D.J. Stress and acclimation. In methods for fish biology (SCHRECK, C.B and MOYLE, P.B eds). **American fisheries society**, p. 451-489, 1990.

WENNING, R.J., DI GIULIO, R.T., GALLAGHER, E.P. Oxidant-mediated biochemical effects of paraquat in the ribbed mussel, *Guekensia demissa*. **Aquatic Toxicology**, v.12, p.157–170, 1988.

WINSTON, G. W., DI GIULIO, R. T. Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. **Aquat. Toxicol.** v.19, p.137–161, 1991.

WINZER, K., VAN NOORDEN, C. J. F., KOHLER, A. Glucose-6-phosphate dehydrogenase: the key to sex-related xenobiotic toxicity in hepatocytes of European flounder (*Platichthys flesus* L.) **Aquatic Toxicology**, v.56, p. 275–288, 2002.

WITHCOMB, B.W., SCHISTERMAN, E.F., BUCK, G.M., WEINER, J.M., GREICERSTEIN, H., KOSTINIAK, P.J. Relative concentrations of organochlorines in adipose tissue and serum among reproductive age women. **Environ. Toxicol. Pharmacol.** v.19, p.203–213, 2005.

WHO, World Health Organization. Guidelines for drinking water. DDT. http://www.who.int/water_sanitation_health/GDWQ/Chemicals/ddsum..htm. January 02, 2002.

WOOD, C. M., HOGSTRAND, C., GALVEZ, F., MUNGER, R. S. The physiology of waterborne silver toxicity in freshwater rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). The effects of ionic Ag⁺. **Aquat. Toxicol.** v.35, p.93–109, 1996.

YILMAZ, B., SANDAL, S., CHENB, C., CARPENTER, D. O. Effects of PCB 52 and PCB 77 on cell viability, [Ca²⁺]_i levels and membrane fluidity in mouse thymocytes. **Toxicology**, v.217, p.184–193, 2006.

YEO, M. K.; KANG, M. Effects of nanometer sized silver materials on biological toxicity during zebrafish embryogenesis. **Bull. Korean Chem. Soc.** v.29, p.1179–1184, 2008

ZAMOCKY, M.; KOLLER, F. Understanding the structure and function of catalases: clues from molecular evolution and in vitro mutagenesis. **Progress in Biophysics & Molecular Biology.** v.72, p. 19-66, 1999.

ZAR, H.A., TANIGAWA, K., KIM, Y., LANCASTER, J.R., 1998. Rat liver postischemic lipid peroxidation and vasoconstriction depend on ischemia time. **Free Radical Biology & Medicine**, v.3, p.255–264, 1998.

ZULUETA, J.J., SAWHNEY, R., YU, F.S., COTE, C.C., HASSON, P.M. Intracellular generation of reactive oxygen species in endothelial cells exposed to anoxia-reoxygenation. **American Journal of Physiology**, v.272, p.897–902, 1997.

ZWART, L. L.; MEERMAN, J.H.N.; COMMANDEUR, J.N.M.; VERMEULEN, N.P.E. Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and in humans. **Free Radical Biology & Medicine**, v.26, p.202–226, 1999.