

LÍGIA MARIA SALVO

**ESTUDO DA CITOTOXICIDADE *IN VITRO* DE
CLOROFENOXIACETATO COM CÉLULAS HEPÁTICAS EM
CULTIVO DE *Metynnis roosevelti* (PISCES, CHARACIDAE)
EIGENMANN, 1915**

Dissertação apresentada como requisito à
obtenção do grau de Mestre. Curso de Pós-
Graduação em Ciências Veterinárias, Sub-
área de Fisiopatologia e Comportamento de
Organismos Aquáticos. Setor de Ciências
Agrárias, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Metry Bacila

CURITIBA

1997



PARECER

A Comissão Examinadora da Defesa de Tese do(a) Candidato(a) ao Título de Mestre, ***Bióloga Ligia Maria Salvo*** após a realização desse evento, exarou o seguinte Parecer:

1) A Tese, intitulada “ESTUDO DA CITOTOXICIDADE *IN VITRO* DE CLOROFENOXIACETATO COM CÉLULAS HEPÁTICAS EM CULTIVO DE *Metynnis roosevelti* (PISCES, CHARACIDAE) EIGENMANN, 1915” foi considerada, por todos os Examinadores, como um louvável trabalho, encerrando resultados que representam importante progresso na área de sua pertinência.

2) O(a) Candidato(a) se houve muito bem durante a Defesa de Tese, respondendo a todas as questões que foram colocadas.

Assim, a Comissão Examinadora, ante os méritos demonstrados pelo(a) Candidato(a), atribuiu o grau “ 10 “ com **Distinação e Louvor** concluindo que faz jus ao Título de Mestre do Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Área de Zootecnia de Produtos Aquáticos Renováveis – Sub-área: Fisiopatologia e Comportamento de Organismos Aquáticos.

Curitiba, 28 de novembro de 1997.

Prof. Dr. Metry Bacila
Presidente da Comissão/Orientador

Prof.ª Dr.ª. Maria Ivette Carboni Malucelli
Membro Efetivo

Prof. Dr. Pedro Hélio Lucchiarri
Membro Efetivo

**Dedico esse trabalho
aos meus pais
Emílio e Célia**

**Ao meu Orientador e Mestre
Prof. Dr. Metry Bacila a minha eterna
gradidão por me fazer crescer a
cada dia, transmitindo tão
generosamente seus
inestimáveis conhecimentos nos
caminhos da pesquisa científica
e na vida**

AGRADECIMENTOS

Este trabalho é resultado de um esforço conjunto de Professores, Pesquisadores, Bolsistas e estagiários da Universidade Federal do Paraná, Centro de Diagnóstico Marcos Enrieti e Faculdade de Saúde Pública da USP. Para todas essas pessoas que colaboraram e acreditaram nesse trabalho, minha eterna gratidão.

Gostaria de registrar meus agradecimentos especiais:

A Dra. Rosária Regina de B.T.Richartz, pela paciência, dedicação e carinho com que me auxiliou no desenvolvimento desse trabalho, e sem a qual, ele jamais teria sido realizado.

A Dra. Maria Ivette Carboni Malucelli, pelo apoio, incentivo e ensinamentos tão generosamente transmitidos durante o trabalho.

Aos Professores, Dr. Heitor S.Medina,. Dr.Pedro Hélio Lucchiari e Dr. Edson Rodrigues, pela paciência e clareza com que transmitiram seus conhecimentos.

Ao Diretor do Centro de Diagnóstico Marcos Enrieti, Dr. Francisco Madruga, pela oportunidade concedida para a realização deste trabalho.

As secretárias do Curso de Pós-Graduação de Ciências Veterinárias da UFPR, Tânia Mara Schrank e Deleuse Cherubim, pela amizade, apoio e esclarecimentos fornecidos.

A Coordenadora do Curso de Pós-Graduação Clotilde Germinianni

A Mara Eliza Joineau, pela amizade e colaboração nos trabalhos realizados.

A todo pessoal do Centro de Diagnóstico Marcos Enrieti que de uma forma ou de outra colaboraram para realização deste trabalho, em especial a Dra. Maria Aparecida Carvalho, a Zoraida, ao Djalma e Célio pelos cuidados com meu material de trabalho, ao Dr. Kruger pelas informações fornecidas, a Mariella e Sônia pelo auxílio na bacteriologia, ao Tião, Milton, Márcia e Aracelli por tantas portas abertas.

Aos meus amigos pelo incentivo e apoio, Cleoni Carvalho, Rafael Cartelli, Lion Pliacekos, Nilce Mary Turcatti, Solange M.Ribas, Edilmere Sprada Maia, Regina Camargo, Adilson M. Britto e André Lourenço Eiras.

Ao Fábio Luís Bruch e Maurício Richartz, pelo apoio e auxílio nesse trabalho

As minhas irmãs Lilian e Luciana pelo apoio e incentivo.

Ao GERALDO por todo seu apoio, carinho e dedicação em todos os momentos.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. CULTIVO CELULAR.....	1
1.2. COMPOSTOS CLOROFENOXIACÉTICOS	4
1.2.1. Mecanismo de Ação.....	7
1.2.2. Características do 2,4-D + MCPA - Química dos pesticidas	8
1.3. MÉTODO POLAROGRÁFICO.....	11
2. OBJETIVOS.....	12
2.1. Objetivo Geral.....	12
2.2. Objetivos Específicos.....	12
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	13
3.1. MATERIAL BIOLÓGICO.....	13
3.1.1. Aclimação	13
3.2. CULTIVO CELULAR PRIMÁRIO.....	15
3.2.1. Contagem celular.....	17
3.2.2. Passagem das células	17
3.3. TESTE DE CITOTOXICIDADE “IN VITRO” COM CÉLULAS HEPÁTICAS EM CULTIVO DE PEIXES	18
Índice de Toxicidade do Herbicida 2,4-D+MCPA.....	21
3.4. RESPIROMETRIA DAS CÉLULAS HEPÁTICAS DE <i>Metynnis roosevelti</i>	21
3.4.1. Preparação da suspensão celular	21
3.4.2. Polarógrafo com eletrodo de oxigênio.....	21
3.4.3. Sistemas de reação para ensaios polarográficos.....	24
4. RESULTADOS	26
4.1. CULTIVO CELULAR PRIMÁRIO.....	26
4.1.1. Cálculo da diluição do 2,4-d+MCPA.....	27
4.3. DETERMINAÇÃO DO CONSUMO DE OXIGÊNIO	29
5. DISCUSSÃO.....	44
6. CONCLUSÕES.....	54
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	55

LISTA DE FIGURAS

Figura 01- <i>Metynnis roosevelti</i> , Eigenmann, 1915.....	14
Figura 02- Início da diferenciação celular dos hepatócitos de <i>Metynnis roosevelti</i>	31
Legenda: Observa-se no canto superior direito, fragmento de tecido colocado em soro fetal bovino. Após 10 dias em meio de cultivo, pode-se visualizar os fibroblastos em processo de crescimento.	31
Figura 03- Cultivo celular primário de células hepáticas de <i>Metynnis roosevelti</i>	32
Legenda: Cultivo celular primário com fragmentos de tecidos em soro fetal bovino. Observa-se após 21 dias em meio de cultivo, as células hepáticas diferenciadas em fibroblastos formando uma monocamada com 70% de confluência.	32
Figura 04- Células hepáticas de <i>Metynnis roosevelti</i> dissociadas enzimaticamente.....	33
Legenda: Células hepáticas de <i>Metynnis roosevelti</i> , dissociadas enzimaticamente com tripsina Versene 25%, para cultivo em monocamada. As células encontram-se individualizadas, sem grumos e com a membrana intacta.	33
Figura 05- Monocamada com 90% de confluência, células hepáticas de <i>M. roosevelti</i>	34
Legenda: As células foram dissociadas enzimaticamente com tripsina, e após 15 dias no meio de cultivo, observa-se uma confluência de 90% na monocamada.....	34
Figura 06- Teste de citotoxicidade “in vitro” com células hepáticas de <i>Metynnis roosevelti</i> . (Controle).....	35
Legenda: Células fibroblásticas utilizadas como controle para os testes de citotoxicidade. As células apresentam-se inalteradas morfológicamente e a confluência da monocamada é de 100%.	35
Figura 07- Células hepáticas de <i>Metynnis roosevelti</i> , expostas a concentração de 0,00275g/ml do clorofenoxiacetato 2,4D+MCPA, por 24 horas.....	36
Legenda: Células alteradas morfológicamente apresentando acentuada vacuolização citoplasmática, além da parcial destruição da monocamada.....	36
Figura 08- Células hepáticas de <i>Metynnis roosevelti</i> , expostas a concentração de 0,00275g/ml do clorofenoxiacetato 2,4D+MCPA, por 24 horas.....	37
Legenda: Células alteradas morfológicamente apresentando acentuada vacuolização citoplasmática, além da parcial destruição da monocamada.....	37
Figura 09- Células hepáticas de <i>Metynnis roosevelti</i> , expostas a concentração de 0,0275g/ml do clorofenoxiacetato 2,4D+MCPA, por 24 horas.....	38
Legenda: Após 24 horas de exposição ao 2,4D+MCPA na concentração de 0,0275 g/ml, observa-se a total destruição da monocamada celular.....	38

Figura 10- Representação gráfica dos valores médios de absorbância obtidas em teste de citotoxicidade <i>in vitro</i> de células hepáticas de <i>M. roosevelti</i> em cultivo expostas a diferentes concentrações do herbicida 2,4 -D+MCPA	39
Figura 11- Representação gráfica da percentagem de absorbância obtida em teste de citotoxicidade <i>in vitro</i> de células hepáticas de <i>M. roosevelti</i> em cultivo expostas a diferentes concentrações do herbicida 2,4 - +MCPA.....	40
Figura 12 – Índice respiratório de células hepáticas de <i>Metynnis roosevelti</i> . Sistemas Succinato: 1,8ml de solução tampão de Ringer fosfato pH 7,4, 0,2ml de suspensão celular, 10µl de succinato e 10µl do 2,4-D+MCPA.	41
Figura 13 – Índice respiratório de células hepáticas de <i>Metynnis roosevelti</i> . Sistemas Glicose: 1,8ml de solução tampão de Ringer fosfato pH 7,4, 0,2ml de suspensão celular, 10µl de glicose e 10µl do 2,4-D+MCPA.	41
Figura 14 – Índice respiratório de células hepáticas de <i>Metynnis roosevelti</i> . Sistemas α-cetoglutarato: 1,8ml de solução tampão de Ringer fosfato pH 7,4, 0,2ml de suspensão celular, 10µl de α-cetoglutarato e 10µl do 2,4-D+MCPA.....	42
Figura 15 – Índice respiratório de células hepáticas de <i>Metynnis roosevelti</i> . Sistemas Endógeno: 1,8ml de solução tampão de Ringer fosfato pH 7,4, 0,2ml de suspensão celular, e 10µl do 2,4-D+MCPA.....	42
Figura 16 – Percentagem de inibição na velocidade do consumo de oxigênio nos diferentes sistemas pela adição do 2,4-D+MCPA nas diferentes concentrações.....	43

1. INTRODUÇÃO

1.1. CULTIVO CELULAR

O primeiro relato de cultivo de tecidos de peixes foi realizado em 1914 por OSOWSKI apud WOLF & QUIMBY (1969), o qual manteve embriões extraídos de trutas por 24 horas em solução de Ringer e linfa de anfíbios. Subseqüentemente, em 1935, LEWIS & MACNEAL apud WOLF & QUIMBY (1969) desenvolveram os primeiros trabalhos com teleósteos marinhos enfatizando a importância da isotonicidade para os vários tecidos animais. Mas foi com CAMERON em 1949, apud WOLF & QUIMBY (1969), que surgiu o maior avanço na técnica de cultivo de tecidos animais com a adição de antibióticos no meio de cultura. GRÜTZNER em 1958, apud WOLF & QUIMBY (1969), por sua vez, foi o primeiro a empregar tripsinização de tecidos de peixes, conseguindo assim, pela primeira vez, obter células cultiváveis em monocamada.

Em 1980, WOLF & MANN reuniram informações sobre 61 linhagens de células de peixes representando 17 famílias e 36 espécies de teleósteos. A maioria das linhagens eram de peixes de água doce ou de espécies anádromas e somente 22% de espécies estritamente marinhas. Na grande maioria dos casos, a condição do tecido de partida era normal. Contudo, as linhagens EPC, da carpa (*Cyprinus carpio*), as linhagens RTH e RTN da truta arco-íris (*Salmo gairdneri*), a WC-1 do *Stizostedium vitreum* e a PS-12 do *Esox lucius* foram iniciadas a partir de tecidos neoplásicos. São conhecidas, linhagens das seguintes famílias de teleósteos: Anabaenidae, Carangidae, Cyprinidae, Cichlidae, Clariidae, Esocidae, Ictaluridae,

Percichthyidae, Percidae, Poeciliidae, Pomadasyidae, Salmonidae (18 espécies), Scianidae e Sparidae (WOLF & MANN, 1980; LANNAN et al., 1984).

Cultivos de células e tecidos de peixes tem sido utilizados para diagnósticos e estudos virológicos de vários animais, vertebrados e invertebrados (SHORS & WINSTON, 1989); estudos do mecanismo de termo regulação (CHEN et al., 1988; PAULSON & CLAUDIO, 1990); endocrinológicos (GREEN & BAKER, 1989; CHANG et al., 1990). e mais recentemente utilizados como um modelo apropriado para o estudo do estresse oxidativo das células animais (HIGHTOWER & RENFRO, 1988; BABICH et al., 1993).

Estudos de citotoxicidade *in vitro* utilizando-se culturas de células de peixes, tem sido desenvolvidos para diferentes aplicações (BOLS et al., 1985), inclusive para identificar os efeitos de agressores químicos que causam impacto no meio ambiente (CASTAÑO et al., 1995; CHENG et al., 1993; BABICH et al., 1987; KOCAN et al., 1985).

Em 1968, PILCHER et al., apud WOLF & QUIMBY (1969), realizaram o primeiro estudo comparando o crescimento com a atividade glicolítica de células de salmonídeos em cultivo. Se bem que tenha sido um trabalho preliminar, conseguiram esses autores detectar diferenças na atividade glicolítica de células em cultivo de peixes em comparação com a de outras espécies animais. As células em cultivo de peixes, mantêm seu nível normal de atividade enzimática melhor do que as células de mamíferos . Em conseqüência, possibilitam a determinação da toxicidade de substâncias químicas, com maior sensibilidade, reduzindo o material, tempo e dinheiro gastos (AHNE, 1985; SEGNER et al., 1994).

Testes de toxicidade com animais são freqüentemente utilizados na investigação dos efeitos da contaminação do meio ambiente. Alguns testes são limitados pelo número de animais os quais podem ser economicamente e convenientemente estudados, por problemas em obter animais de linhagens puras e em perfeito estado fisiológico, e a dificuldade de extrapolar resultados de uma espécie para outra. Um meio encontrado para superar essas dificuldades foi a utilização do cultivo de células, que permite a análise de uma grande quantidade de amostras e determina com maior especificidade a atividade do agente tóxico nas células de um único organismo (KOCAN et al., 1985; SAITO & SHIGEOKA, 1994).

A sensibilidade aguda dos animais a diferentes compostos tóxicos varia muito de espécie para espécie, e mesmo quando uma espécie adequada é escolhida como bioindicadora, suas respostas agudas ou crônicas a diferentes compostos tóxicos variam de acordo com outros fatores, como a resistência individual, a predisposição genética do organismo, além das condições físico-químicas do ambiente e da ocorrência ou não de relacionamentos sinérgicos entre os compostos químicos presentes no local (HAWKINS et al., 1987; HAKANSSON et al. 1991). Conseqüentemente, a utilização apropriada do sistema celular, mostra a possibilidade em separar as várias alterações físicas e químicas que interagem com os organismos prejudicando as reações. Por meio disso, permite o estudo de ações específicas no interior das células sem a interferência dos efeitos de outros sistemas (DIPPLE et al., 1983).

Na década de sessenta, os pesquisadores já utilizavam testes de citotoxicidade *in vitro* com células em cultivo de peixes para detectar os efeitos causados por agentes tóxicos em organismos aquáticos. Em 1965, PICKERING &

VIGOR apud RACLHIN & PERLMUTER, 1968, determinaram a toxicidade de metais pesados na embriogênese de salmonídeos; RACLHIN & PERLMUTER, 1968, verificaram uma redução na replicação celular de uma cultura de células de peixes da família dos salmonídeos, expostas ao zinco por 96 horas.

Com o aumento na utilização de agentes tóxicos de ordem natural ou antropogênica e conseqüente degradação ambiental (KOCAN et al., 1984), são inúmeros os trabalhos realizados que utilizam células de peixes em cultivo como instrumento de estudo para avaliação da contaminação do ambiente aquático (PARKINSON & AGIUS, 1988; BABICH & BORENFREUND, 1987a; SAITO et al., 1991).

O relatório do Controle de Substâncias Tóxicas de 1976 inclui aproximadamente 42.000 substâncias químicas produzidas em quantidade significativa nos Estados Unidos, não incluindo pesticidas, aditivos alimentares, radionucleotídeos e substâncias farmacêuticas (BABICH. & BORENFREUND, 1987b).

1.2. COMPOSTOS CLOROFENOXIACÉTICOS

Nos anos anteriores a II Guerra Mundial, substâncias como boro, sulfamato de amônia, os tiocianetos, e os nitrofenóis seletivos e não seletivos, foram desenvolvidos para o controle de várias espécies de ervas daninhas. Todos esses herbicidas continuam sendo utilizados com o mesmo propósito até o presente momento. Durante a II Guerra Mundial, com a descoberta do 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) foi que houve um significativo aumento na utilização de

herbicidas na agricultura. Suas propriedades fito-hormônicas foram descobertas em 1942, sendo verificado, posteriormente, tratar-se de um bom herbicida (CORBBET, 1974; METCALF, 1979).

O 2,4-D foi obtido pela primeira vez em 1941 por Pokorny, através da reação do 2,4-diclorofenol com o ácido monocloroacético, na presença de soda e em meio aquoso. Atualmente, esse composto é encontrado análogo ao MCPA (ácido 4-cloro-2-metil-fenoxiacético) desenvolvido também na II Guerra Mundial por militares como uma poderosa arma na guerra biológica para destruição de colheitas. Imediatamente após a guerra, essas substâncias químicas voltaram a ser utilizados na agricultura, pois mostraram ser capazes de matar muitas espécies de ervas daninhas com baixas doses, serem altamente tolerantes para a maior parte da produção, principalmente cereais e milho (METCALF, 1979).

Os compostos fenoxiacéticos incluem a maior parte dos herbicidas formulados atualmente. Os dois mais utilizados pertencentes a esse grupo são o 2,4-D e o MCPA. Outras formas do mesmo grupo, também são comercializadas e incluem 2,4,5-T; 2,4,5-TP; 2,4-DB; MCPB, 2,4-DP; 2,4-DES e 3,4-DA (FURTICK, 1977).

A base original de todos esses químicos, é estabelecida pela substituição do cloro ou grupos metila, variando a estrutura do anel aromático. Esses compostos, também tem sido modificados pela variação do comprimento da cadeia lateral entre os ácidos acético, butírico e propiônico. Devido a alta solubilidade, esses compostos são facilmente absorvidos pelas folhagens e translocados em associação com carboidratos para outras partes da planta (FURTICK, 1977).

Em sua forma ácida o 2,4-D apresenta-se como pó branco mas pouco solúvel em água. Por isso, as formas mais utilizadas são as salinas aminadas e esterificadas, as quais apresentam maior solubilidade sendo portanto as formas fenoxiacéticas mais usadas comercialmente

Recentemente, longas cadeias aminicas tem sido formuladas. Esses compostos são solúveis em água e insolúveis em solventes orgânicos. As amins geralmente empregadas são dietanolamina, trietanolamina, e dimetil, trimetil, ou trietilamina. Todos esses sais ionizados na água produzem o ânion clorofenoxiacético e o cation apropriado. Os ésteres dos ácidos clorofenoxiacéticos são insolúveis em água, mas solúveis em solventes orgânicos que rapidamente se emulsificam em água. Os ésteres mais utilizados nos herbicidas são: metil éster; isopropil éster; butil éster e octil éster (FURTICK, 1977). Devido as propriedades localizadas na superfície dos ésteres, os ácidos clorofenoxiacéticos são geralmente os mais ativos herbicidas. Eles umidecem a cutícula da planta, auxiliando a penetração através dos estômatos e suas moléculas liposolúveis permitem sua penetração na cutícula cerosa de algumas espécies (METCALF, 1979).

O ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), é um dos herbicidas mais utilizados no mundo inteiro, inclusive no Brasil. A literatura científica documenta que este herbicida é biodegradado, tanto em solos quanto na água, de maneira toxicologicamente aceitável (CASTRO & MACEDO, 1986).

1.2.1. Mecanismo de Ação

O 2,4-D relacionado aos ácidos fenoxi, são classificados como herbicidas hormonais, que causam reações de crescimento similar as auxinas naturais como o ácido indolil. A introdução de níveis de saturação de algumas auxinas sintéticas causam profundas alterações no equilibrado balanço hormonal de crescimento possuindo propriedades únicas de translocação nas plantas (METCALF, 1979). As auxinas, especialmente o ácido 2,4-diclorofenoxiacético, causam acentuadas variações no amadurecimento de certos grãos como a soja. Além disso, um grande número de experimentos tem relatado os efeitos desse herbicida no aumento da síntese do RNAm (GIORGINI & KEY, 1983).

Um dos efeitos, seria o pouco ou nenhum alongamento da raiz e um crescimento anormal da membrana basal, fazendo com que haja uma alta deficiência na produção de clorofila. Conseqüentemente, as funções fisiológicas de condução dos sais minerais e água através da raiz, e a redução na fotossíntese contribuem para a morte da planta. O 2,4-D+MCPA age por ação sistêmica afetando o crescimento de ervas daninhas, podendo com tudo, ser considerado atóxico pelos animais. Os ácidos clorofenois e clorobenzeno possuem uma moderada ou baixa toxicidade aguda para mamíferos (ALMEIDA et al, 1962)

O metabolismo de excreção dos ácidos clorofenoxiacéticos em animais, não tem sido devidamente estudado. Alguns trabalhos sugerem, que o 2,4-D, quando empregado em condições laboratoriais nas espécies animais, atinge o pico de concentração plasmática no fígado e rins, em poucas horas: aves em 2 horas, e mamíferos entre 4 e 7 horas (ERNE, 1966). BERNDT, 1973, apud MUNHOZ, 1993

observou que o 2,4-D pode se acumular nos rins de animais tratados através de mecanismos de transporte ativo não detalhados.

Dois desastres ecológicos, causados pela utilização de defensivos químicos foram identificados e estudados pelo Laboratório de Piscicultura da Universidade Federal do Paraná em conjunto com a SUREHMA – Superintendência dos Recursos Hídricos e do Meio Ambiente do Estado do Paraná. Um deles ocorreu em 1985 no Rio Betione, um afluente do Rio Paraguai no Estado do Mato Grosso do Sul, com a morte de mais de um milhão de peixes. O outro ocorreu em 1988, na Baía de Guaraqueçaba localizada nos limites da Baía de Paranaguá, litoral do estado do Paraná. Em ambos os casos, foi detectada a presença de clorofenoxiacetatos cujos princípios ativos eram o 2,4-D adicionados de Picloram. Como resultado desses estudos, foi verificado que os herbicidas clorofenoxiacéticos, alteraram a morfologia dos hepatócitos e causaram descolamento e necrose do epitélio tubular em várias espécies animais (MEDINA et al., 1994).

1.2.2. Características do 2,4-D + MCPA - Química dos pesticidas

Nome comercial: 2,4-D

Nome químico: ácido 2,4 diclorofenoxiacético

Peso molecular: 220,9

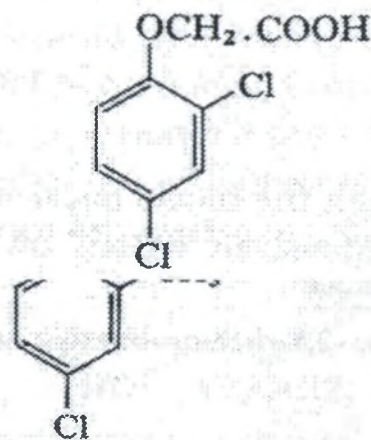
% em cloro: 32,0%

Fórmula bruta: $C_8 H_6 O_3 Cl_2$

Fórmula estrutural:

2,4-D

(2,4-dichlorophenoxyacetic acid)



Propriedades:

- pó branco de odor levemente fenólico;
- quase insolúvel em água, dissolvendo-se porém, nos solventes orgânicos e nas soluções alcalinas;
- apresenta um ponto de fusão de 138°C;
- é estável e não higroscópico.

Classificação Toxicológica (Decreto Federal nº 98.816 de 11/01/90; Anexo I da portaria nº 04 DISAD): é a identificação do risco oferecido pela utilização de uma substância ou composto químico.

Classe Toxicológica

- Classe I - é aquela onde se encontram as substâncias ou compostos químicos considerados como extremamente tóxicos para o ser humano.
- Classe II - é aquela onde se encontram as substâncias ou compostos químicos considerados como altamente tóxicos para o ser humano
- Classe III – é aquela onde se encontram as substâncias ou compostos químicos considerados como medianamente tóxicos para o ser humano
- Classe IV - é aquela onde se encontram as substâncias ou compostos químicos considerados como pouco tóxico para o ser humano.

Os produtos comerciais cujos princípios ativos são o 2,4-D+MCPA como por exemplo, os herbicidas Bi-Hedonal da Bayer do Brasil S.A e o U 46 Combi Fluid da BASF Brasileira S.A. Ind.Químicas, estão classificados de acordo com a classe toxicológica II, ou seja, são considerados altamente tóxicos para o ser humano. No caso de intoxicação com essas substâncias, os sintomas são: mal-estar, vômitos, enfraquecimento muscular, dificuldade respiratória, bradicardia, suor excessivo e oligúria. O tratamento é sintomático, pois não há antídoto específico (SKALISZ & POLACK, 1991).

A nível molecular, o herbicida 2,4-D causa um aumento no índice de produção do RNA , que pode resultar no desequilíbrio das auxinas, induzindo o crescimento com anormal divisão celular. Alguns autores sugerem, as interações entre o limite do protoplasma coloidal da célula, onde a permeabilidade e o fluxo de metabólitos essenciais e a atividade coenzimática no metabolismo dos ácidos nucleicos aumentam. (METCALF, 1979; ROBERTSON, 1970).

ROBERTSON et al, 1970, abordam o envolvimento do 2,4-D como um agente desacoplador ou inibidor da fosforilação oxidativa com enzimas localizadas na membrana mitocondrial externa, corroborando com os dados de ERNE, 1966 e METCALF, 1979 que citam a translocação dos compostos clorofenoxiacetatos nas organelas subcelulares. O mesmo autor propõe, que o 2,4-D pode se ligar fisicamente a proteína enzimática, de tal modo que, em baixas concentrações, aumenta a atividade catalítica das enzimas e em altas concentrações diminui a atividade das mesmas.

1.3. MÉTODO POLAROGRÁFICO

O método polarográfico para determinação da concentração de oxigênio, consiste na medida da corrente elétrica que circula entre dois eletrodos, quando submetidos a uma diferença de potencial (.HAHN et al., 1975). Por ser de rápida execução e muito preciso, esse método tem sido amplamente utilizado em diferentes situações experimentais (COBBOLD, 1974; LUCCHIARI & HOSHINO, 1980; NIERO & MALUCELLI, 1995; BAUMBERGER, 1979)

São muitos os procedimentos utilizando o polarógrafo para determinação do consumo de oxigênio em sistemas biológicos, tais como o índice de respiração e fosforilação oxidativa de mamíferos (PARCKER & BACILA, 1958; CAMPELLO et al., 1964; NICOLAU & BACILA, 1970; AGUIAR & BACILA, 1976); invertebrados (ROSA et al., 1977; DUARTE & BACILA, 1959; OCAMPOS et al., 1977; VOSS & BACILA, 1961; CRIVELLARO et al., 1976); metabolismo de microrganismos (BACILA et al., 1956; BACILA, 1959; BACILA & HIGUCHI, 1967) ; respiração de leveduras (JULIANI et al., 1973; BACILA et al., 1978) e ainda a respiração de sistemas biológicos *in vivo*

(LUCCHIARI et al., 1984; LUCCHIARI et al., 1985; BACILA et al. 1989; FANTA et al., 1990).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar a citotoxicidade *in vitro* com agentes químicos que causam impacto no meio aquático, com células de peixes em cultivo .

2.2. Objetivos Específicos

- Estabelecer técnicas de cultivo celular adequadas às células hepáticas do peixe subtropical da família Characidae (*Metynnis roosevelti*)
- Padronizar o número de células para o estudo da atividade respiratória em polarógrafo com eletrodo de oxigênio
- Determinar a concentração letal (CL_{50}) do herbicida diclorofenoxiacético 2,4-D+MCPA
- Avaliar a atividade respiratória das células hepáticas de *Metynnis roosevelti* em seu estado normal, com os substratos succinato, glicose e α -cetoglutarato e sob o efeito do diclorofenoxiacetato (2,4-D+MCPA) em várias concentrações

- Realizar testes de citotoxicidade “in vitro” com diclorofenoxiacetato em níveis subletais com células hepáticas de *Metynnis roosevelti* em cultivo.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. MATERIAL BIOLÓGICO

Metynnis roosevelti Eigenmann, 1915

Classe Osteichthyes

Sub-classe Actinopterygii

Ordem Cypriniformes

Sub-Ordem Cyprinoidea

Família Characidae

A família Characidae apresenta cerca de 1.350 espécies ocorrendo na América do Sul, América Central até Texas (EUA). Algumas espécies são encontradas na África Central. O pacu é uma espécie de peixe nativa, amplamente empregada em piscicultura nas regiões sudeste e sul do Brasil onde é endêmica, tendo sido introduzido sob condições de cultivo na região nordeste (GÉRY, 1977).

3.1.1. Aclimação

Os exemplares de ***Metynnis roosevelti*** obtidos em estações de piscicultura do Estado de São Paulo, foram transportados até o Laboratório de Piscicultura na Universidade Federal do Paraná, onde permaneceram por um

período de aclimação de duas semanas (WATANABE et al., 1987; KLAUNING, et al., 1984).

Os peixes em idade juvenil, possuíam o comprimento padrão de aproximadamente 5 cm cada. Os animais, divididos em 3 grupos de 100 indivíduos, foram mantidos em aquários de 140 litros sob aeração constante, fotoperíodo de 12 horas dia/12 horas noite e temperatura mantida a 29^o C através de um termostato eletrônico. A alimentação sob forma de ração Alcon, foi fornecida uma vez ao dia.

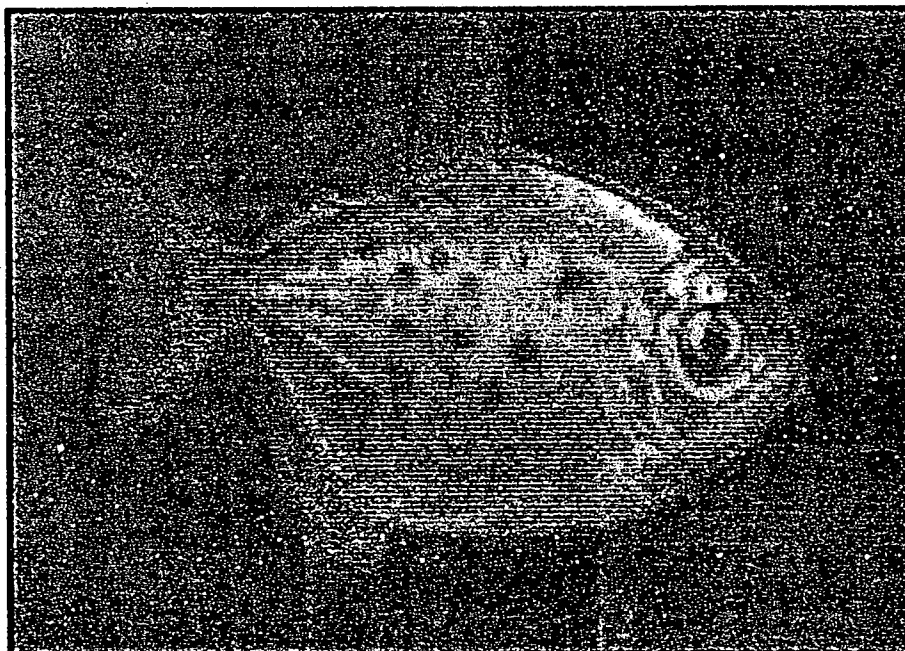


Figura 01- Metynnis roosevelti, Eigenmann, 1915.

3.2. CULTIVO CELULAR PRIMÁRIO

Para desinfecção, os peixes foram mantidos em solução salina a 0,01% por 30 minutos em uma solução de etanol a 70% por 2 minutos (WOLF & DUNBAR, 1977). A seguir os peixes foram levados à câmara de fluxo laminar e sacrificados após secção medular. Seus órgãos, rins e fígado foram retirados e colocados em solução de Hank por 30 minutos, contendo 100 UI de penicilina, 20 µg/ml de estreptomicina, 10µg/ml de enrofloxacina e 25 µg/ml de anfotericina B (WOLF & QUIMBY, 1976; LYPSKY, et al., 1986). A solução de Hank, acrescida de antibióticos, foi trocada 5 vezes no decorrer desse período.

Para obtenção das células foram utilizadas três metodologias :

I- Para a dissociação celular enzimática, os órgãos foram seccionados em pequenos fragmentos de aproximadamente 1mm, e colocados em um erlenmeyer com 2,5 ml de solução de tripsina versene 0,25% e com o agitador magnético a 1000 rpm procedeu-se a tripsinização por 10 minutos à temperatura ambiente. Para inativação da tripsina foi adicionado 5,0 ml de meio F10-199 com 10% de soro fetal bovino (SFB). O material foi centrifugado por 2 minutos a 1000 rpm, o sobrenadante descartado e o pelete ressuspenso em 5,0 ml de meio F10-199 com antibióticos (100 UI/ml de penicilina, 200 µg/ml de estreptomicina e 250 µg/ml de Fungizon). A suspensão celular obtida foi então filtrada em gaze estéril, e semeada em frascos de poliestireno Corning com 25cm² e em microplacas Falcon para cultivo em monocamada.

II- Os órgãos foram seccionados em pequenos fragmentos e colocados em placas para cultivo, previamente esterilizadas, com 1 ml de soro fetal bovino. As placas com os fragmentos de tecido e o soro fetal bovino foram acondicionadas por aproximadamente 3 horas, na câmara de CO₂ a 5% e temperatura de 30⁰C. Após esse período, foi acrescentado 2,0 ml de meio F10-199 por poço.

III- Para obtenção de soro do material biológico, foi feita uma punção através da veia caudal com a utilização de Vacuntainer em peixes adultos da mesma espécie.

Os órgãos foram seccionados em pequenos fragmentos e colocados em placas previamente esterilizadas, para cultivo, com 1 ml de soro do material biológico. As placas com os pedaços de tecido e o soro do peixe foram acondicionadas por aproximadamente 3 horas, na câmara de CO₂ a 5% e temperatura de 30⁰C. Após esse período, foi acrescentado 2,0 ml de meio F10-199 por poço.

Além de antibióticos, o meio F10-199 foi modificado pela adição de L-glutamina 2 mM (FLOURIOT et al., 1993; CHENG et al., 1993; KOCAL et al., 1987), insulina 10 µg/ml (HAYASHI & OOSHIRO, 1986; HIGHTOWER & RENFRO, 1988; WATANABE et al., 1986; LIPSKI et al., 1986) e 50µg/ml de fibronectina (Gibco BRL, Bovine Plasma Fibronectin) (CHENG et al., 1993; HIRATA, et al., 1993). Tanto as garrafas quanto as microplacas foram previamente tratadas com soro albumina bovina (SAB) 10% (CHENG et al., 1993) e acondicionadas em estufa de CO₂ a 5% e temperatura constante de 30⁰C.

Para a quantificação e determinação da viabilidade celular, procedeu-se à contagem do número de células na câmara de Fuchs-Rosenthal com a utilização do corante azul de tripan (KLAUNING et al., 1984; LIPSKI et al., 1986).

3.21. Contagem celular

- A 100 μ l da suspensão celular acrescentou-se 50 μ l de azul de tripan;
- Com uma micropipeta de 10 μ l colocou-se essa solução na câmara de Fuchs-Rosenthal e procedeu-se a contagem das células no Microscópio Invertido IM;
- Contou-se o número de células contidos nos quatro cantos da câmara, fazendo-se uma média (X) e utilizando-se os dados na seguinte fórmula:

$$X \times 1,5 \times 5\,000 = n^{\circ} \text{ células/ml}$$

- Para os testes de citotoxicidade em microplacas foram semeadas células na densidade de células com 3×10^4 / ml; para a determinação do consumo de oxigênio foram utilizadas 4×10^6 células por ml.

3.2.2. Passagem das células

As células em monocamada foram lavadas com solução tampão fosfato (PBS) para retirar as proteínas do soro fetal bovino. Em seguida foi adicionado 1,5 ml de tripsina versene 0,05% para dissociação celular enzimática. Posteriormente, foi adicionado meio F10-199 em quantidade igual a 50% de tripsina, em seguida procedeu-se à centrifugação a 1000 rpm por 1 minuto, o sobrenadante foi desprezado e o pelete ressuspenso em 5 ml de meio F10-199. A suspensão celular foi colocada em garrafas e microplacas previamente tratadas com uma solução 10%

de água com soro albumina bovina (SIGMA) e acondicionadas em estufa de CO₂ a 5% e temperatura constante de 30⁰C.

Com a obtenção das células hepáticas em monocamada de *Metynnis roosevelti*, nas microplacas de poliestireno Falcon, foram realizados os testes de citotoxicidade *in vitro* de acordo com a metodologia de BABICH & BORENFREUND, (1987 a.,b,c,d,e,f).

3.3. TESTE DE CITOTOXICIDADE “IN VITRO” COM CÉLULAS HEPÁTICAS EM CULTIVO DE PEIXES

- Células hepáticas de peixes da família Characidae foram semeadas em microplacas com 0,2 ml de meio F10-199 contendo 3×10^4 de células e incubadas em câmara de CO₂ a 5% e temperatura constante de 30⁰ C por 24 horas;
- Posteriormente, o meio foi trocado e as células, por um período de 24 horas, colocadas em contato com o agente a ser testado (2,4-D+MCPA) em várias diluições (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6}) para determinação do CL₅₀; (Tabela I)
- Após esse período, o meio com o agente a ser testado foi removido e substituído pelo meio F10-199 contendo 50 µg/ml de vermelho neutro;
- As microplacas então, foram incubadas por 3 horas para permitir a entrada do corante dentro dos lisosomas das células viáveis, que não foram prejudicadas pelo agente a ser testado, no caso o herbicida diclorofenoxiacético (2,4-D+MCPA);

- Posteriormente, o meio com “neutral red” foi removido, e as células foram rapidamente enxaguadas com fixador (formaldeído 4% e CaCl_2 1%) e então 0,2 ml da mistura de ácido acético 1% com etanol 50% foi adicionado em cada poço para a extração do corante;
- Depois de um tempo adicional de 20 minutos à temperatura ambiente e uma rápida agitação, a placa foi transferida para o equipamento de leitura com filtro de 492 nm para medir a absorbância;
- Após a adição do vermelho neutro, a população celular submetida ao estresse pelo agente a ser testado, foi observada em microscópio invertido.

Tabela 1 - Total de semeaduras nas microplacas :

2,4-D+MCPA						
CONTROLE	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}
480	288	288	288	288	288	288

Índice de Toxicidade do Herbicida 2,4-D+MCPA

Para determinação da diluição do herbicida diclorofenoxiacético, para o estudo de seu efeito tóxico (CL_{50}), foi utilizada a fórmula de Spearman Karber (BERQUÓ, 1981).

Cálculo da Diluição do Herbicida diclorofenoxiacético (2,4-D+MCPA)

$$\Sigma T_{50} = t' + \Delta t$$

t^* = maior diluição do herbicida diclorofenoxiacético que causou efeito tóxico nos oito (100%) dos pocinhos da microplaca;

Δt = número de pocinhos afetados em t^* e em diluições maiores dividido por oito menos 4/8 (50%);

Tabela 2 - Diluições do diclorofenoxiacético (2,4-D+MCPA) na microplaca

Diluição	controle	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}
Efeito tóxico	6/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6

t^* : No exemplo, 10^{-1} , foi a maior diluição do herbicida que causou efeito tóxico nos seis (100%) pocinhos e t^* corresponderá a 1.0

Δt : No mesmo exemplo, o número de pocinhos alterados em t^* foi oito, não havendo nenhuma alteração nos pocinhos subsequentes nas próximas diluições, dividindo-se pelo número de pocinhos inoculados com cada diluição menos 4/8 (50%).

$$\Delta t = (8+0)/8 - 4/8 = 4/8$$

$$\Delta t = 0,5$$

$$\Sigma T_{50} = t^* + \Delta t$$

$$\Sigma T_{50} = 10^{-1,5}$$

Calculando-se o anti-logaritmo, têm-se a diluição do herbicida que quando utilizada causará efeito tóxico em 50% dos pocinhos

$$\text{anti-log } 1,5 = 1:31,62$$

Índice de Toxicidade do 2,4-D+MCPA 50%

$$\text{IT } 50\% = 0,3162$$

3.4. RESPIROMETRIA DAS CÉLULAS HEPÁTICAS DE *Metynnis roosevelti*

3.4.1. Preparação da suspensão celular

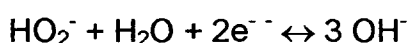
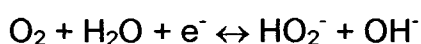
A suspensão celular obtida e quantificada anteriormente, 8×10^3 células / ml, foi dividida em pequenas alíquotas de 1 ml, e centrifugadas a 2000 rpm por 30 segundos em centrífuga Eppendorf e em seguida acondicionados a temperatura de 4 °C .

Para a medida da atividade respiratória, os tubos de ensaio centrifugados anteriormente, tiveram o sobrenadante descartado e o pelete ressuspense em 200 µl de solução Ringer fosfato pH 7,4.

3.4.2. Polarógrafo com eletrodo de oxigênio

Para determinação do consumo de oxigênio das células hepáticas de *Metynnis roosevelti*, foi utilizado o polarógrafo com eletródio de oxigênio e sensor de temperatura ((FATT, 1976; BACILA et al., 1989; LUCCHIARI et al., 1989; MALUCELLI et al., 1995; SUGIZAKI et al., 1997).

O princípio do método da medida polarográfica do consumo de oxigênio, consiste na medida da intensidade da corrente elétrica que circula entre dois eletrodos, sendo um de platina (cátodo) e outro de referência (ânodo), quando submetidos a uma diferença de potencial. O eletrodo de platina estando a um potencial negativo, fornece elétrons que participam das reações na sua superfície. O oxigênio na superfície da platina é reduzido segundo as equações:

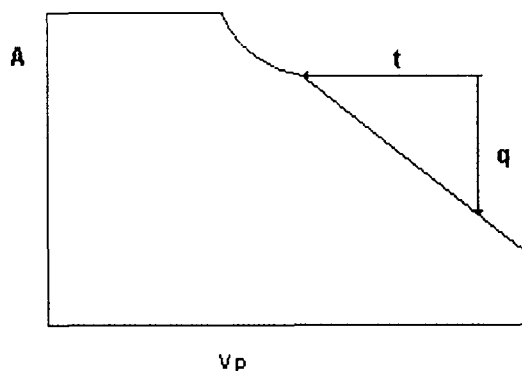


As reações mostram que na superfície da platina há um consumo de oxigênio diretamente proporcional ao número de elétrons fornecidos (HANN et al., 1975).

Determinação do consumo de oxigênio

Para o cálculo da velocidade do consumo de oxigênio, e quociente respiratório foram utilizados os seguintes parâmetros:

$$\text{Velocidade de consumo do O}_2 = \frac{\text{SO}_2 \times V_f \times q}{V_p \times A \times t}$$



Esquema da localização dos parâmetros a serem analisados, para determinação da velocidade do consumo de oxigênio .

SO_2 = solubilidade de O_2 na temperatura estabelecida ($30^{\circ}C = 275 \mu MO_2/l$)

V_f = volume de meio tamponado (Ringer fosfato, pH 7,4) na câmara de reação

q = distância no eixo de O_2 disponível em centímetro

V_p = velocidade do papel registro

t = distância no eixo da velocidade do papel, em centímetro

A = amplitude do O_2 disponível, em centímetro

A contagem celular foi feita em câmara Fuchs-Rosenthal, e os cálculos realizados, descritos anteriormente.

3.4.3. Sistemas de reação para ensaios polarográficos

Foram montados três sistemas, um para cada tipo de substrato utilizado (glicose 0,5 M, succinato 0,5 M e α -cetogluturato 0,5M) para a determinação do consumo de oxigênio das células hepáticas de *Metynnis roosevelti*, em diferentes situações experimentais. Para cada um dos sistemas, foram realizadas três repetições com diferentes concentrações do herbicida diclorofenoxiacético, a saber: 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} . Um sistema de respiração endógena contendo apenas Ringer fosfato e suspensão celular, precedeu todas as repetições acima descritas.

Na tabela 3 encontra-se discriminadas e quantificadas todas as substâncias utilizadas nos sistemas de reação.

Tabela 3 - Sistemas utilizados para determinação do consumo de oxigênio das células hepáticas de *Metynnis roosevelti*, em diferentes situações experimentais. Todas as determinações foram realizadas a temperatura de 30°C.

SUBSTÂNCIAS	SISTEMAS								
	GLICOSE			SUCCINATO			α -CETOGLUTARATO		
	I	II	III	I	II	III	I	II	III
Ringer fosfato (ml)	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8
Suspensão celular (ml)	0,2	0,2	0,20	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Glicose (μ l)	10	10	10						
Succinato (μ l)				10	10	10			
α -cetogluturato (μ l)							10	10	10
2,4-D+MCPA 10^{-1} (μ l)	10			10			10		
2,4-D+MCPA 10^{-2} (μ l)		10			10			10	
2,4-D+MCPA 10^{-3} (μ l)			10			10			10

Os experimentos no polarógrafo com eletrodo de oxigênio foram realizados à temperatura de 30^o, que foi mantida constante através de um banho termostático que promovia a circulação de água pré-aquecida na cubeta de reação durante todo experimento. Estando a temperatura adequada, seguiu-se a metodologia abaixo:

- A membrana de diálise, utilizada para envolver o eletrodo, foi trocada ao final da determinação do consumo de oxigênio com cada sistema;
- O polarógrafo com eletrodo de oxigênio e sensor de temperatura, foi calibrado com uma solução de sulfito de sódio a 1M e temperatura de 30^o,
- Foi adicionado na cubeta de reação 1,8 ml de solução Ringer fosfato pH 7,4 e esperou-se aproximadamente 5 minutos até que o sistema entrasse em equilíbrio;
- Posteriormente foi colocou-se 0,2 ml de suspensão celular obtida através da metodologia descrita anteriormente para determinação da respiração endógena;
- Determinada essa etapa, foi adicionado 10 μ l de substrato (glicose, succinato ou α -cetoglutarato);
- Depois de verificar que as células estavam consumindo o oxigênio de forma satisfatória, foi adicionado 10 μ l do herbicida diclorofenoxiacético 2,4-D + MCPA em várias concentrações (0,0275 g/ml; 0,00275 g/ml e 0,000275 g/ml)
- Os sistemas para determinação da respiração, foram montados de forma que cada substrato e cada diluição diferente do diclorofenoxiacético fossem testados um de cada vez, discriminados na tabela.2.

4. RESULTADOS

4.1. CULTIVO CELULAR PRIMÁRIO

Com a finalidade de verificar qual a melhor técnica para o desenvolvimento do cultivo celular primário de células hepáticas de *Metynnis roosevelti*, foram utilizadas três metodologias distintas.

Na dissociação celular enzimática, com a utilização da tripsina (Figs.4 e 5), as células hepáticas de *Metynnis roosevelti* iniciaram seu processo de diferenciação celular em fibroblásticas, a partir do 4º dia, e a confluência de 90% da monocamada obtida no 15º dia (Fig.1). Na primeira passagem, as células foram tripsinizadas em agitador magnético a 1000 rpm por 15 minutos à temperatura ambiente, e a tripsina, utilizada a 0,25%. A maioria das células aderiram após a primeira passagem, ocasionando uma confluência de 90% após o 5º dia .

Com soro fetal bovino (SFB), sem a utilização de enzimas proteolíticas as células iniciaram seu processo de diferenciação em fibroblásticas a partir do 7º dia e a confluência de 70% da monocamada foi obtida no 21º dia (Fig.2). Na primeira passagem, as células foram tripsinizadas em agitador magnético a 1000 rpm por 10 minutos e temperatura ambiente, a tripsina estava diluída em solução de tampão fosfato (PBS) na proporção de 1:5. Poucas células aderiram após a primeira passagem, ocasionando uma baixa confluência da monocamada.

Com o soro do próprio material biológico, as células iniciaram seu processo de adesão e diferenciação muito lentamente, aproximadamente 10 dias, mas não se desenvolveram o suficiente para formar uma monocamada confluenta e permitir a subcultura das células (Fig.3)

Foram observadas alterações significativas na morfologia das células expostas ao 2,4-D+MCPA em diferentes concentrações em comparação as células utilizadas como controle. Nas células utilizadas como controle os fibroblastos apresentam-se inalterados morfologicamente e a monocamada celular apresenta-se com uma confluência de 100% (Fig.6). Nas células expostas ao 2,4-D+MCPA na concentração de 0,00275 g/ml, a monocamada celular apresenta-se parcialmente destruída e as células com acentuada vacuolização (Figs. 7 e 8). Nas células expostas ao 2,4-D+MCPA na concentração de 0,0275 g/ml, a monocamada celular apresenta-se totalmente destruída (Fig.9).

Índice de Toxicidade do 2,4-D+MCPA

Com o herbicida 2,4-D+MCPA, inoculado nas células hepáticas em diferentes concentrações, foi feita após 24 horas, a contagem dos pocinhos afetados (Tabela 1) através do Microscópio Invertido IM. Esses resultados estão expressos nos cálculos abaixo (Figs.10 e 11).

4.1.1. Cálculo da diluição do 2,4-d+MCPA

Determinação da CL_{50} :

$$\Sigma T_{50} = t^* + \Delta t$$

$$t^* = 1.0$$

$$\Delta t = (6+0)/6 - 3/6 = 3/6$$

$$\Delta t = 0,5$$

$$\Sigma T_{50} = t^* + \Delta t$$

$$\Sigma T_{50} = 10^{-1,5}$$

$$\text{anti-log } 1,5 = 1:31,62$$

Índice de Toxicidade do 2,4-D+MCPA 50%

$$\text{IT } 50\% = 0,03162 \text{ g/ml}$$

Tabela 4- Valores de absorvância obtidos em teste de citotoxicidade *in vitro* de células hepáticas de *M. roosevelti* em cultivo expostas a diferentes concentrações do herbicida 2,4 D+MCPA.

VALORES DE ABSORBÂNCIA EM NANÔMETROS			
Controle	2,4 D + MCPA		
	0,0275 g/ml	0,00275g/ml	0,00275g/ml
0,782	0,374	0,442	0,584
0,748	0,371	0,444	0,609
0,783	0,381	0,427	0,557
0,664	0,382	0,493	0,634
0,729	0,321	0,464	0,533
0,679	0,373	0,462	0,509
0,604	0,364	0,497	0,553
0,721	0,388	0,409	0,591
0,685	0,337	0,476	0,594
0,674	0,364	0,423	0,617
0,784	0,382	0,427	0,541
0,631	0,396	0,487	0,584
Média	0,707	0,36941667	0,45425
			0,5755

Esses valores obtidos na tabela acima, demonstram que em células afetadas a absorvência do vermelho neutro diminui em comparação com a das células controle. Os lisosomas das células viáveis irão absorver o vermelho neutro, portanto com a adição do etanol 50% mais o ácido acético para a extração do corante, a solução se tornará mais corada, sendo proporcional ao número de células viáveis, ou seja, que não foram afetadas pelo 2,4-D+MCPA (Figuras 10 e 11).

4.3. DETERMINAÇÃO DO CONSUMO DE OXIGÊNIO

Para o cálculo da velocidade do consumo de oxigênio, e quociente respiratório foram utilizados os seguintes parâmetros :

$$\text{Velocidade de consumo do O}_2 = \frac{\text{SO}_2 \times V_f \times q}{V_p \times A \times t}$$

$$\text{SO}_2 = 275 \mu\text{MO}_2/\text{l}$$

$$V_f = 2,0 \text{ ml}$$

q = distância no eixo de O₂ disponível em centímetro

$$V_p = 20 \text{ cm/s}$$

t = distância no eixo da velocidade do papel, em centímetro

$$A = 10,6 \text{ cm}$$

Tabela 5 - Valores da respiração endógena e da respiração frente aos substratos glicose, succinato e α -cetogluturato
Velocidade de Consumo de Oxigênio($\mu\text{MO}_2/\text{s}$)

	Endógena	Substrato
Sist. Glicose	0,115	0,134
Sist. II Succinato	0,11	0,125
Sist III α-cetogluturato	0,13	0,16

Os resultados obtidos através das determinações na velocidade de consumo de oxigênio das células hepáticas de *Metynnis roosevelti*, diretamente com o endógeno e com os diferentes substratos (glicose 0,5M, succinato 0,5M e α -cetogluturato 0,5M), nas seguintes concentrações do herbicida 2,4-D+MCPA: 0,0275g/l, 0,00275 g/l e 0,000275 g/l, estão expressos nas Figuras 12, 13, 14, 15 e 16.

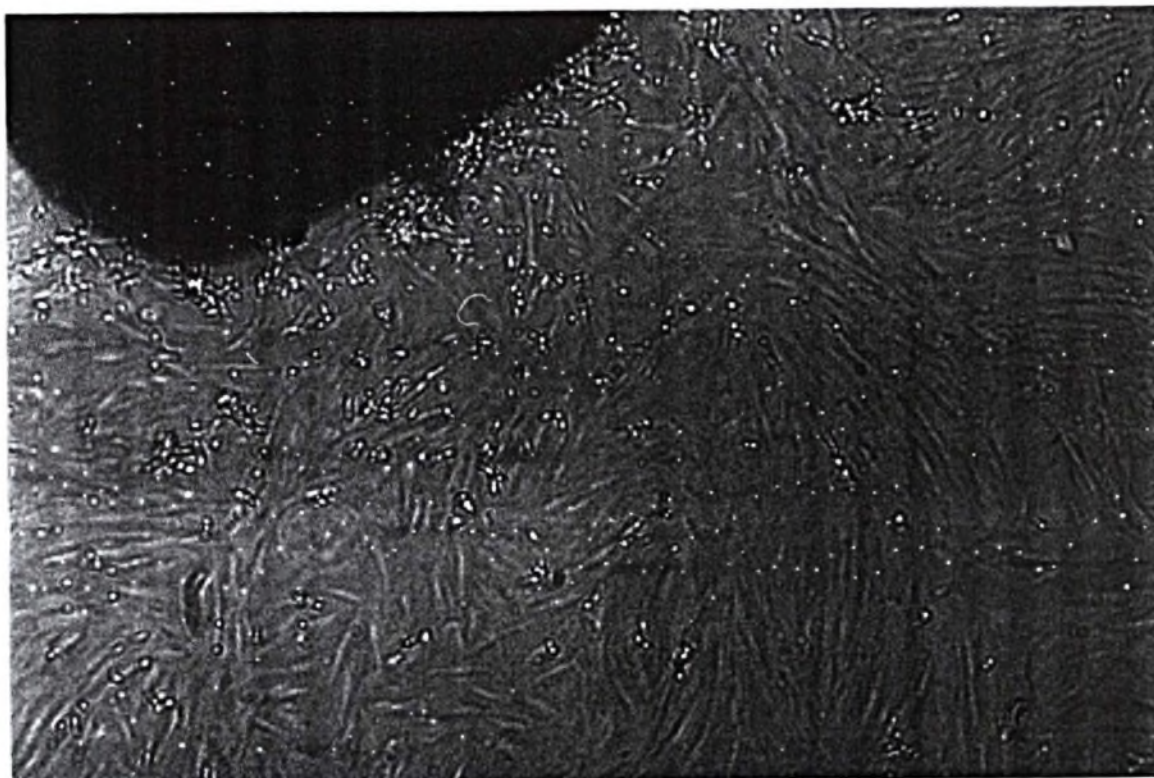


Figura 02- Início da diferenciação celular dos hepatócitos de *Metynnis roosevelti*.

Legenda: Observa-se no canto superior direito, fragmento de tecido colocado em soro fetal bovino. Após 10 dias em meio de cultivo, pode-se visualizar os fibroblastos em processo de crescimento.



Figura 03- Cultivo celular primário de células hepáticas de *Metynnix roosevelti*.

Legenda: Cultivo celular primário com fragmentos de tecidos em soro fetal bovino. Observa-se após 21 dias em meio de cultivo, as células hepáticas diferenciadas em fibroblastos formando uma monocamada com 70% de confluência.

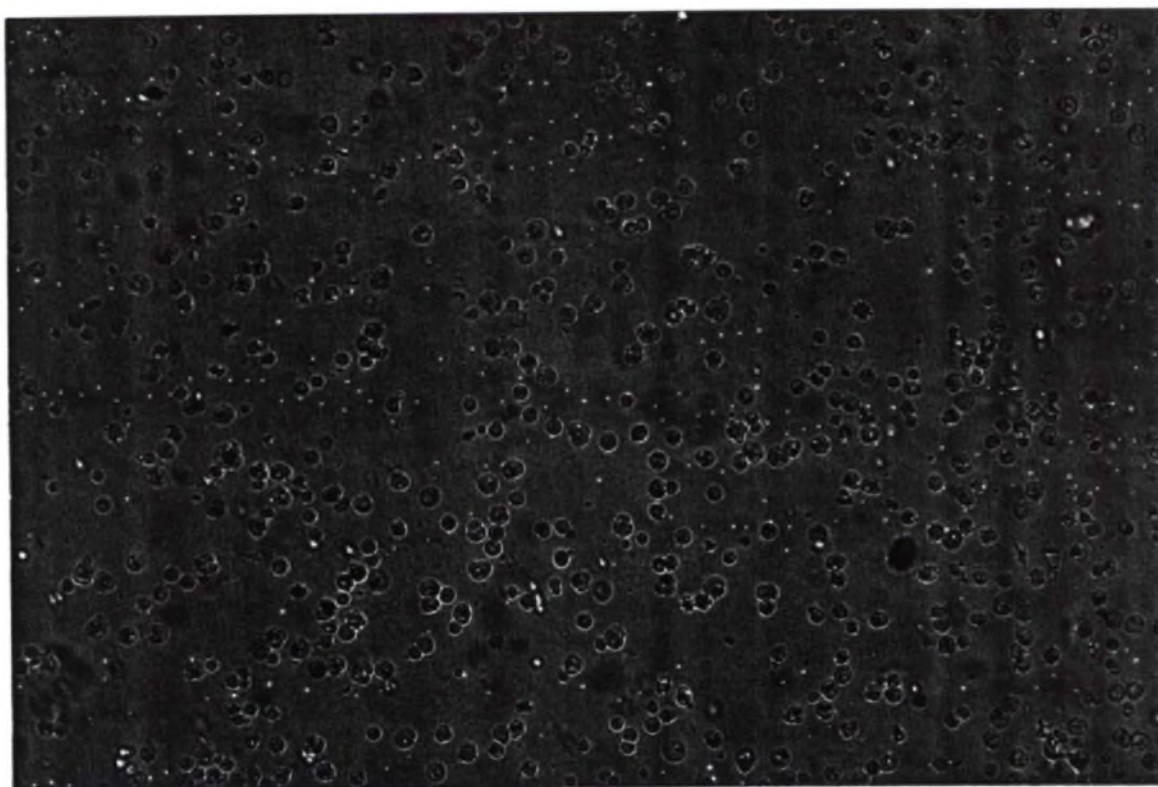


Figura 04- Células hepáticas de *Metynnis roosevelti* dissociadas enzimaticamente.

Legenda: Células hepáticas de *Metynnis roosevelti*, dissociadas enzimaticamente com tripsina Versene 25%, para cultivo em monocamada. As células encontram-se individualizadas, sem grumos e com a membrana intacta.



Figura 05- Monocamada com 90% de confluência, células hepáticas de *Metynnis roosevelti*.

Legenda: As células foram dissociadas enzimaticamente com tripsina, e após 15 dias no meio de cultivo, observa-se uma confluência de 90% na monocamada.

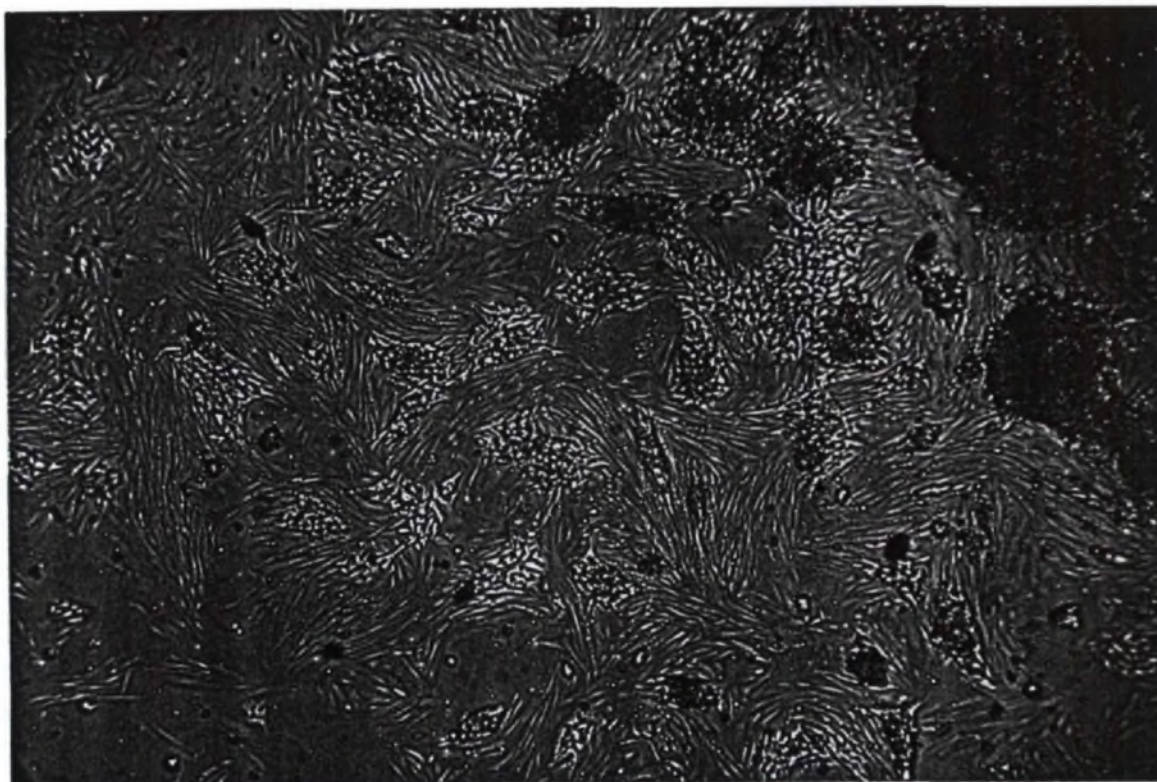


Figura 06- Teste de citotoxicidade “in vitro” com células hepáticas de *Metynnis roosevelti*. (Controle)

Legenda: Células fibroblásticas utilizadas como controle para os testes de citotoxicidade. As células apresentam-se inalteradas morfológicamente e a confluência da monocamada é de 100%.



Figura 07- Células hepáticas de *Metynnis roosevelti*, expostas a concentração de 0,00275g/ml do clorofenoxiacetato 2,4D+MCPA, por 24 horas.

Legenda: Legenda: Células alteradas morfológicamente apresentando acentuada vacuolização citoplasmática, além da parcial destruição da monocamada.

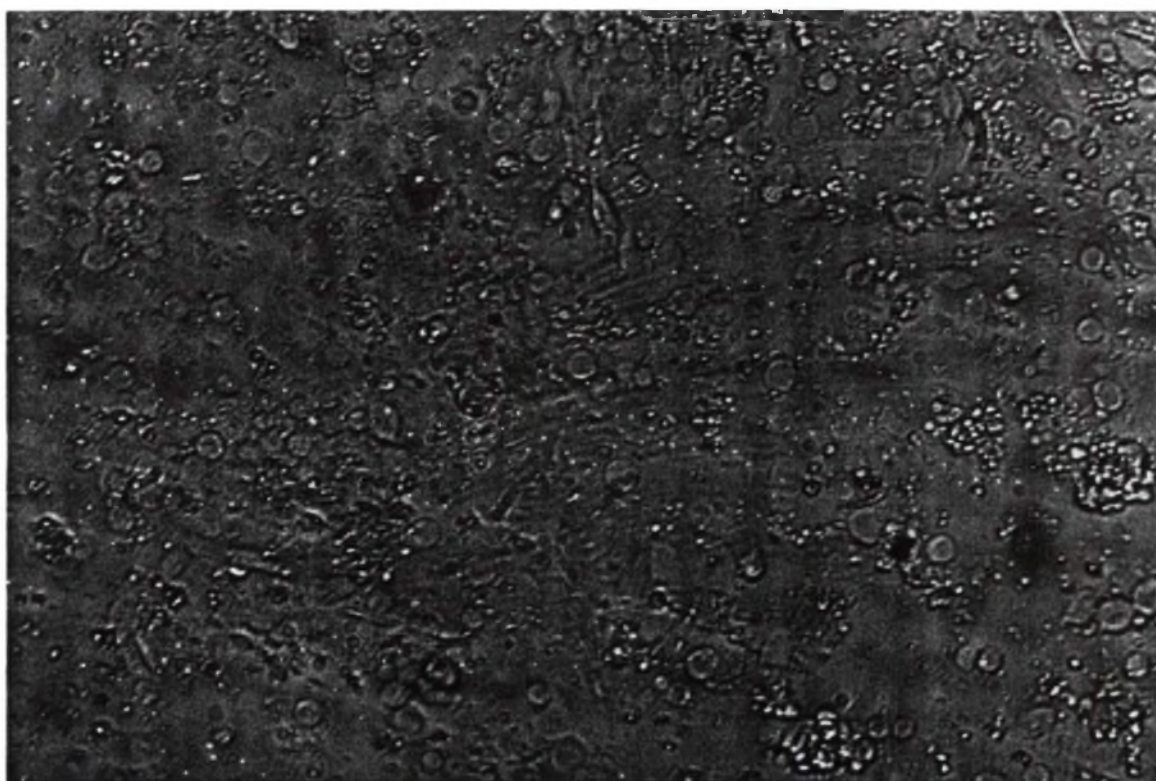


Figura 08- Células hepáticas de *Metynnis roosevelti*, expostas a concentração de 0,00275g/ml do clorofenoxiacetato 2,4D+MCPA, por 24 horas.

Legenda: Legenda: Células alteradas morfológicamente apresentando acentuada vacuolização citoplasmática, além da parcial destruição da monocamada.

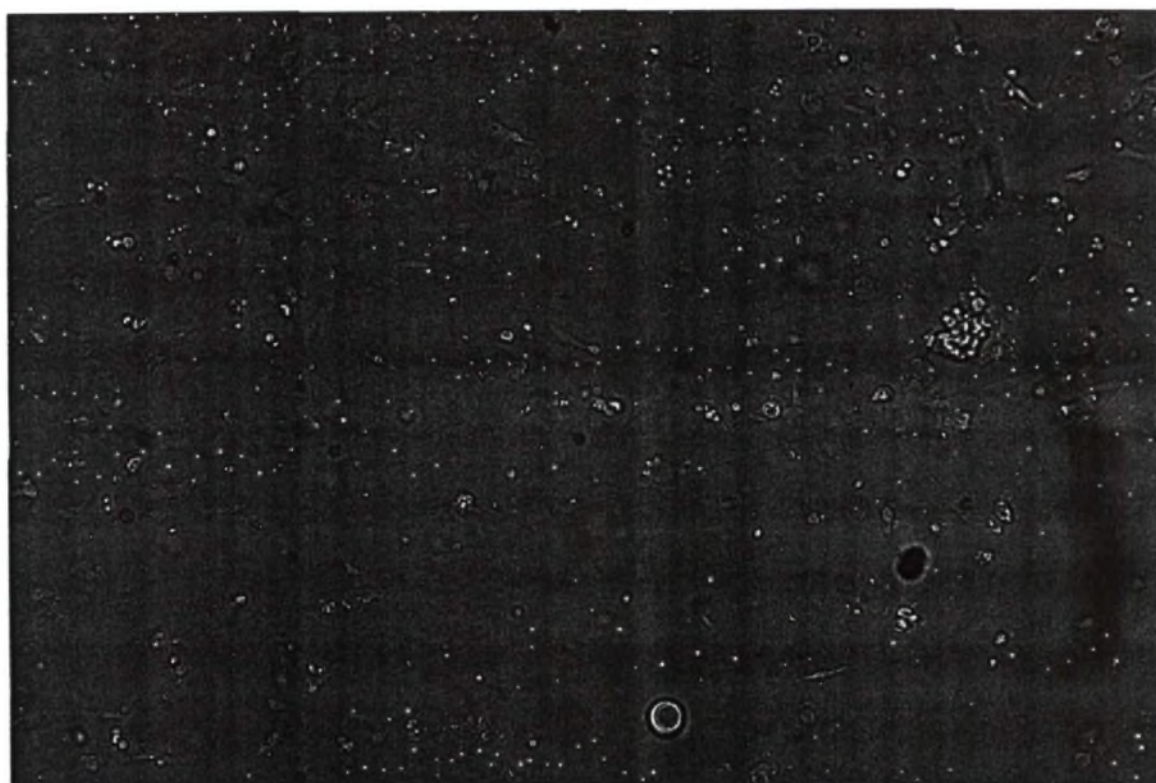


Figura 09- Células hepáticas de *Metynnis roosevelti*, expostas a concentração de 0,0275g/ml do clorofenoxiacetato 2,4D+MCPA, por 24 horas.

Legenda: Após 24 horas de exposição ao 2,4D+MCPA na concentração de 0,0275 g/ml, observa-se a total destruição da monocamada celular.

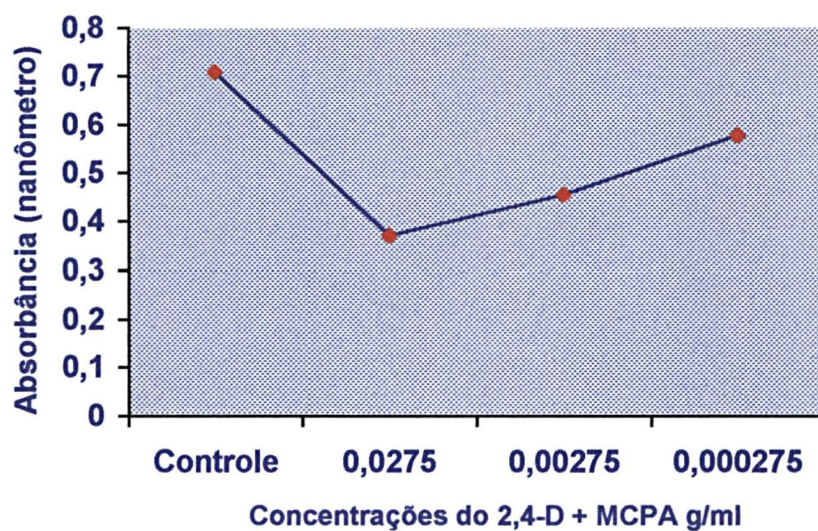


Figura 10 – Representação gráfica dos valores médios de absorbância obtidas em teste de citotoxicidade *in vitro* de células hepáticas de *M. roosevelti* em cultivo expostas a diferentes concentrações do herbicida 2,4 - D+MCPA.

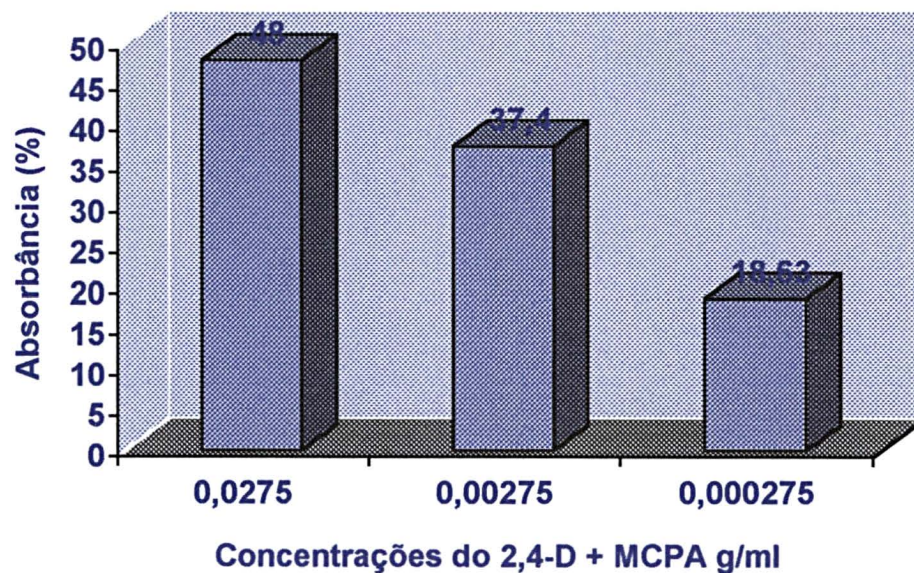


Figura 11 – Representação gráfica da percentagem de absorbância obtida em teste de citotoxicidade *in vitro* de células hepáticas de *M. roosevelti* em cultivo expostas a diferentes concentrações do herbicida 2,4 - D+MCPA.

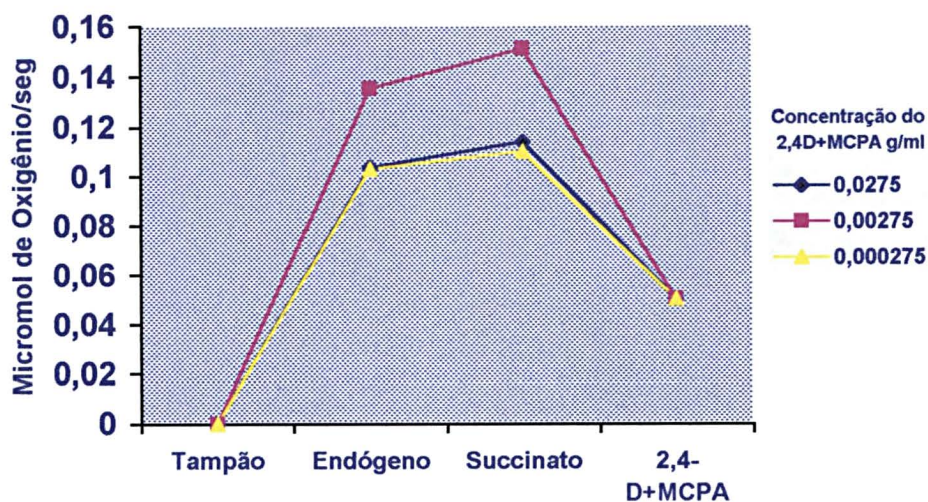


Figura 12 – Índice respiratório de células hepáticas de *Metynnis roosevelti*. Sistemas Succinato: 1,8ml de solução tampão de Ringer fosfato pH 7,4, 0,2ml de suspensão celular, 10 μ l de succinato e 10 μ l do 2,4-D+MCPA. Cada sistema corresponde a uma concentração diferente do herbicida: 0,0275g/ml; 0,00275 g/ml e 0,000275g/ml

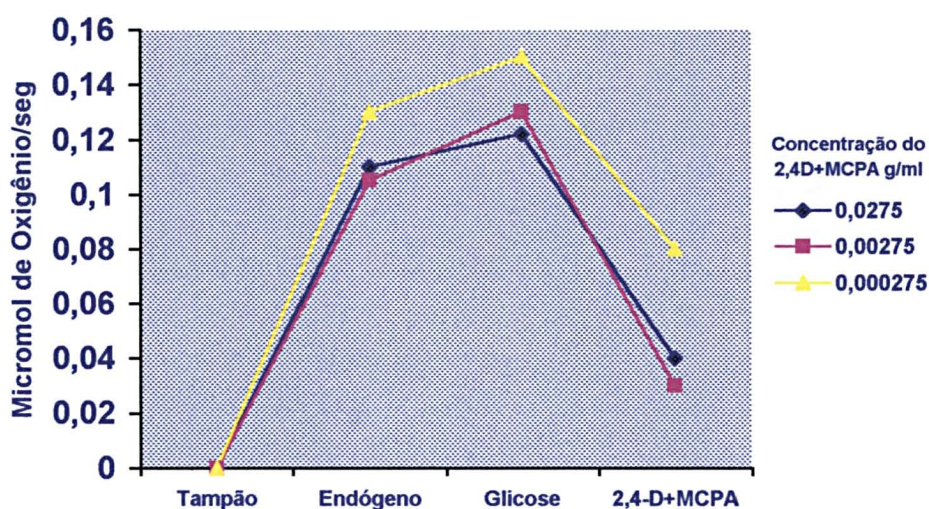


Figura 13 – Índice respiratório de células hepáticas de *Metynnis roosevelti*. Sistemas Glicose: 1,8ml de solução tampão de Ringer fosfato pH 7,4, 0,2ml de suspensão celular, 10 μ l de Glicose e 10 μ l do 2,4-D+MCPA. Cada sistema corresponde a uma concentração diferente do herbicida: 0,0275g/ml; 0,00275 g/ml e 0,000275g/ml

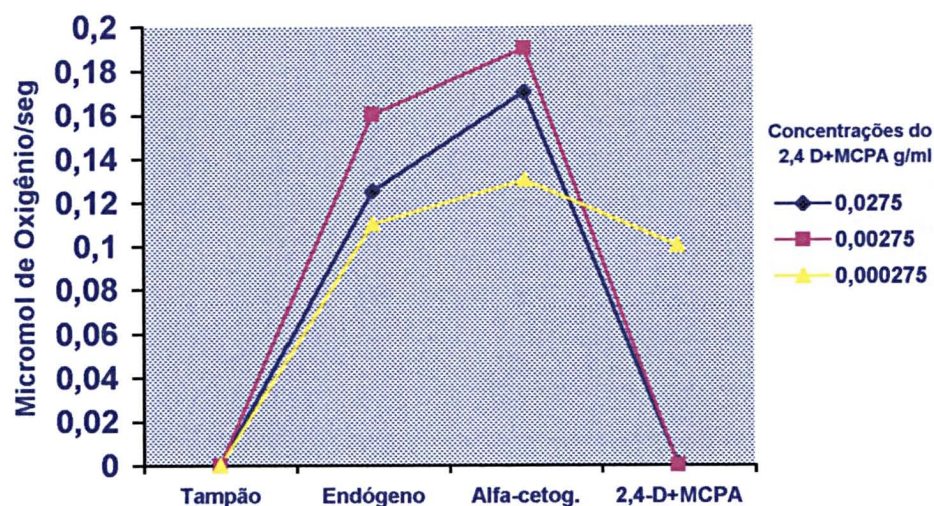


Figura 14 – Índice respiratório de células hepáticas de *Metynnis roosevelti*. Sistemas α -cetoglutarato: 1,8ml de solução tampão de Ringer fosfato pH 7,4, 0,2ml de suspensão celular, 10 μ l de α -cetoglutarato (0,5 M) e 10 μ l do 2,4-D+MCPA. Cada sistema corresponde a uma concentração diferente do herbicida: 0,0275g/ml; 0,00275 g/ml e 0,000275g/ml

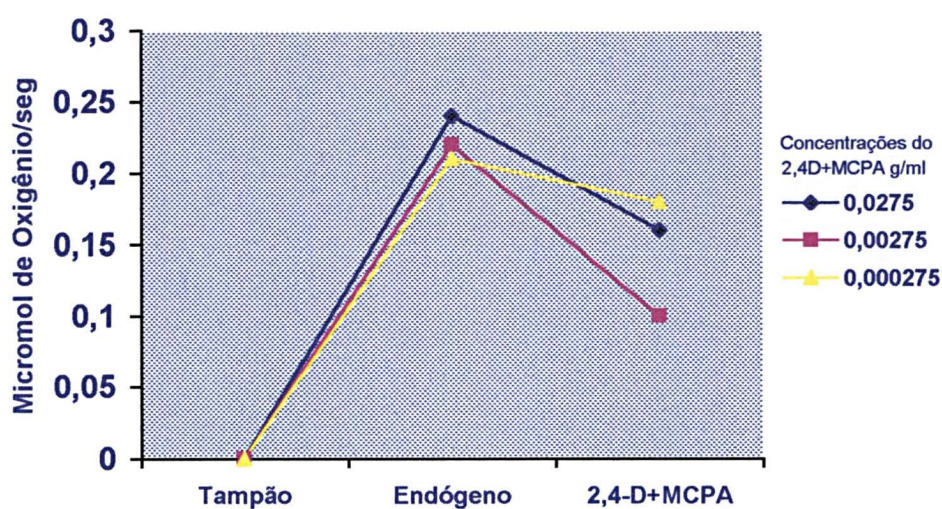


Figura 15 – Índice respiratório de células hepáticas de *Metynnis roosevelti*. Sistemas endógeno: 1,8ml de solução tampão de Ringer fosfato pH 7,4, 0,2ml de suspensão celular, e 10 μ l do 2,4-D+MCPA. Cada sistema corresponde a uma concentração diferente do herbicida: 0,0275g/ml; 0,00275 g/ml e 0,000275g/ml

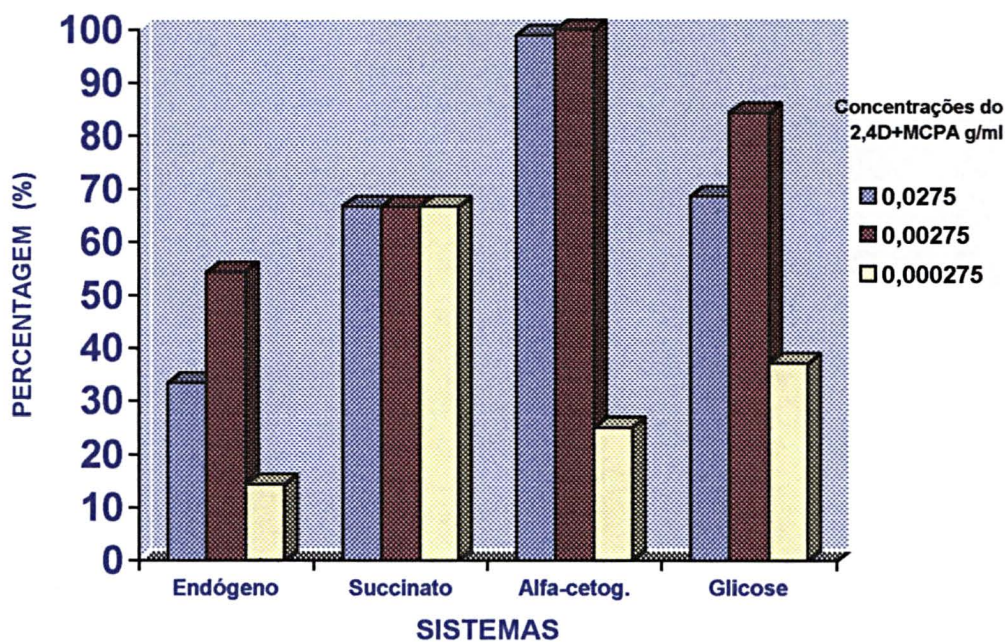


Figura 16 – Percentagem de inibição na velocidade do consumo do Oxigênio em diferentes sistemas pela adição do 2,4-D+MCPA nas diferentes concentrações.

5. DISCUSSÃO

Estudos de citotoxicidade "in vitro" utilizando-se culturas de células de peixes, tem sido desenvolvidos para diferentes aplicações (BOLS et al., 1985), inclusive para identificar os efeitos de agressores químicos que causam impacto no meio ambiente (CASTAÑO et al., 1995; CHENG et al., 1993; BABICH et al., 1987; KOGAN et al., 1985). O cultivo de células utilizado como material biológico, permite a análise de uma grande quantidade de amostras e determina com maior especificidade a atividade do agente tóxico nas células de um único organismo (KOCAN et al., 1985; SAITO & SHIGEOKA, 1994).

A sensibilidade aguda dos animais a diferentes compostos tóxicos varia muito de espécie para espécie, e mesmo quando uma espécie adequada é escolhida como bioindicadora, suas respostas agudas ou crônicas a diferentes compostos tóxicos variam de acordo com outros fatores, como a resistência individual, a predisposição genética do organismo além das condições físico-químicas do ambiente e da ocorrência ou não de relacionamentos sinérgicos entre os compostos químicos presentes no local (HAWKINS et al., 1987). Conseqüentemente, a utilização apropriada do sistema celular, mostra a possibilidade em separar as várias alterações físicas e químicas que interagem com os organismos prejudicando as reações. Por meio disso, permite o estudo de ações específicas no interior das células sem a interferência dos efeitos de outros sistemas (DIPPLE et al., 1983).

No presente trabalho, foram utilizadas células do peixe *Metynnis roosevelti* obtidas a partir de cultivo primário. Para estudos bioquímicos, as células primárias são mais utilizadas do que as células de linhagem já estabelecida. As células primárias são consideradas mais eficazes, por refletirem melhor suas funções e atividades que desempenham em seu ambiente natural.

Muitas linhas celulares tem sido cultivadas durante um período superior a dez anos, a biomassa de algumas delas na atualidade, é muitas vezes maior do que o organismo do que procedem. Essas células, podem apresentar diferenças significativas tanto em relação ao cultivo original como entre diferentes cultivos das mesmas células em laboratórios diferentes. Esta divergência de fenótipos pode ocasionar problemas na interpretação e comparação de resultados. Uma dessas alterações, seria na taxa de crescimento das células de linhagem, que aumenta proporcionalmente ao período de cultivo. Essa aparente adaptação ao crescimento "in vitro" pode ser acompanhada das perdas das características associadas a amostra original, e mudanças progressivas no número de cromossomos (MORGAN & DARLING, 1993).

No cultivo celular primário de células hepáticas de *Metynnis roosevelti*, os órgãos foram colocados em solução de Hank, acrescida de antibióticos de amplo espectro. Os peixes possuem uma flora bacteriana muito diversificada. No caso dos pacus, foram encontrados cocos e bacilos resistentes aos antibióticos utilizados rotineiramente em procedimentos de cultivo celular primário. Com a adição de 10 µl/ml de enrofloxacin (Baytril), houve uma diminuição de 80%, no índice de contaminação bacteriana nos meios de cultura. A enrofloxacin combinada com a

estreptomomicina possui grande atividade sinérgica contra algumas espécies bacterianas (FERREIRA, 1997).

Quanto aos procedimentos de cultivo celular primário, para obtenção das células em monocamada, foram utilizadas três metodologias distintas. Na primeira, os órgãos foram seccionados em pequenos pedaços e colocados em contato com soro fetal bovino; na segunda, o mesmo procedimento foi realizado, só que ao invés de utilizar o soro fetal bovino foi utilizado o soro do material biológico; na terceira, foi feita a dissociação celular enzimática com a solução de tripsina versene a 0,25%.

Com os resultados obtidos, foi verificado que com a utilização da tripsina, enzima que cliva a maioria das ligações peptídicas que se segue a radicais de Argenina e Isoleucina (STRYER, 1992), as células hepáticas iniciaram o seu processo de diferenciação em fibroblastos após quatro dias. Além disso, houve 90% de confluência da monocamada em 15 dias.

Esses resultados, refutam as afirmações de BERRY & FRIEND (1969) e SEGLEN (1973) apud FLOURIOT, (1993), que verificaram, que a dissociação enzimática dos tecidos, destroem as interações intercelulares, inviabilizando as funções e diferenciação das células.

Com a utilização do soro fetal bovino, isto só ocorreu após 21 dias no meio de cultivo; com uma confluência de 60% da monocamada (CHEN et al., 1988).

Com o soro do próprio material biológico, as células iniciaram seu processo de adesão e diferenciação muito lentamente, aproximadamente 10 dias, mas não se desenvolveram o suficiente para formar uma monocamada.

Em trabalhos realizados, para o estabelecimento de técnicas de cultivo primário de elasmobrânquios, relatam que o soro do próprio tubarão ou raia, foi

tóxico para o cultivo primário em monocamada, não permitindo, a adesão adequada e posterior crescimento da célula (HARTMANN et al., 1992). Por outro lado, Kocal et al., 1987, observou em estudos realizados com trutas, que o soro do próprio material biológico em pequena quantidade, 1,25%, proporcionou melhor adesão e propagação dos hepatócitos no meio de cultura. No mesmo trabalho, outros autores citados na discussão por KOCAL, 1987, verificaram que a utilização do soro do peixe, limitou a eficiência da adesão celular em comparação com o soro fetal bovino; MAITRE et al., 1986, comenta que o soro da truta, não alterou significativamente na adesão celular em meio de cultura, corroborando com as afirmações de HARTMANN et al., 1992, citado anteriormente e os resultados encontrados do presente estudo.

O meio de cultura F10-199, foi modificado pela adição dos fatores de crescimento epidermal L-Glutamina 2 mM (CHENG et al., 1993; KOCAL et al., 1987), insulina 10 µg/ml (HAYASHI & OOSHIRO, 1986; HIGHTOWER, & RENFRO, 1988; LIPSKI, et al., 1986) e 50µg/ml de fibronectina (CHENG et al., 1993; HIRATA et al., 1983).

A insulina, tem um papel efetivo na mitose e na síntese de DNA nas células hepáticas de peixes (WATANABE, 1986). Além disso, promove o aumento da concentração de glicose e de aminoácidos no meio intracelular (CHEN et al., 1993); O meio deficiente em insulina, afeta notavelmente a morfologia de células hepáticas (HAYASHI & OOSHIRO, 1986)

A fibronectina sendo um importante componente da matriz extracelular, possibilitou uma melhor adesão e diferenciação das células, regulando a organização das proteínas do citoesqueleto, A fibronectina a nível de plasma é uma protease resistente classificada em duas categorias de acordo com sua atividade

funcional. Uma categoria, inclui proteínas que contém sítios de ligação específicos para moléculas e macromoléculas incluindo colágeno, proteoglicanas, fibrina, gelatina, heparina e actina. A outra categoria, pode ser reconhecida por células ou bactérias específicas.

A região da fibronectina que se liga à célula está localizada na área da molécula que possui 250-310 pares de bases de amonoácidos amino terminais, da seguinte sequência de aminoácido Arg-Gly-Asp-Ser (PIERSCHBACHER et al., 1983).

CHEN et al., 1993, afirmou que com o meio modificado pela adição de fibronectina, houve uma eficiência de 90% na confluência da monocamada, no cultivo primário de hepatócitos de truta, em comparação com outros substratos.

Em células malignas ou transformadas, a fibronectina é geralmente muito reduzida ou ausente. Mas, em células fibroblásticas normais, sua quantidade na superfície glicoproteica é muito grande, tendo sido indicada para um aumento na confluência de fibroblastos diplóides, e para manter as características morfológicas e atividade enzimática dos hepatócitos durante o cultivo. Nesse mesmo trabalho, HIRATA et al., 1983, verificaram que a fibronectina, pode promover a conexão entre as células de hepatócitos fetais, e prolongar seu crescimento e habilidade para produção de albumina alfa-fetoproteína (AFP).

Testes de imunofluorescência para albumina em preparação de hepatócitos, mostraram uma porcentagem de albumina-positiva, em mais de 90% das células provenientes de fígado de adultos e 80% das células de fígado de fetos e neonatos. CHENG et al., 1993. e FLOURIOT, et al., 1993 verificaram que em culturas de

hepatócitos de peixes, o nível de RNAm actina é um pouco elevado e o de RNAm albumina mais baixo do que *in vivo*.

Foram realizados os testes de citotoxicidade *in vitro* com células hepáticas de *Metynnis roosevelti* em cultivo, para determinação da concentração letal, capaz de provocar a morte de 50% das células após a inoculação do herbicida 2,4-D+MCPA, num período de 24 horas. Para os cálculos da concentração letal do herbicida, foi utilizada a fórmula de Sperman Kaerber, e com os resultados obtidos, foi verificado que a concentração letal para essa espécie de peixe foi entre 0,0275 e 0,03162 g/l.

Em trabalhos realizados com o mesmo princípio ativo 2,4-D+MCPA, MUNHOZ, 1993, encontrou valores semelhantes com a espécie de peixe nativo *Prochilodus scrofa*, Curimatá. A concentração letal do herbicida determinada para essa espécie através de bioensaios realizados *in vivo* foi de 0,0331 g/l.

A concentração do 2,4-D em águas de utilização pública, segundo a recomendação da FEDERAL WATER POLLUTION CONTROL ADMINISTRATION, 1972, é de no máximo 0,02 mg/l.

Apesar da concentração letal ter sido especificada em 0,03162 g/l, a concentração mais baixa do herbicida, 0,0275 g/ml causou acentuados danos nas células hepáticas, observadas ao microscópio invertido IM, logo após 30 minutos da inoculação do 2,4-D+MCPA

A monocamada celular nas microplacas, com 100% de confluência, foi parcialmente destruída e as células afetadas, logo após a inoculação do herbicida, ficaram com o citoplasma altamente vacuolizados. Esses resultados corroboram com os trabalhos de JOINEAU et al., 1997, onde foi utilizado a mesma metodologia dos

testes de citotoxicidade e a mesma concentração do herbicida, com células de linhagem de suínos PK₁₅. Após poucos minutos de inoculação do herbicida, observou-se os mesmos resultados do presente trabalho; ERNE, 1966, comprovou que o 2,4-D quando empregado em condições laboratoriais, em algumas espécies animais, atinge o pico de concentração plasmática no fígado e rins, em poucas horas: aves em 2 horas, e mamíferos entre 4 e 7 horas. BERNDT et al., 1973, observou que o 2,4-D pode se acumular nos rins de animais tratados através de mecanismos de transporte ativo não detalhados. Pois o 2,4-D, possui propriedades de translocação nos organismos, tanto vegetais quanto animais, que ainda são desconhecidas.

Desse modo, as afirmações de ALMEIDA et al., 1962, que o 2,4-D+MCPA age por ação sistêmica afetando o crescimento de ervas daninhas, podendo com tudo, ser considerado atóxico pelos animais terá de ser melhor analisada. ROBERTSON, 1970, sugere que os ácidos clorofenois e clorobenzeno possuem uma moderada ou baixa toxicidade aguda para mamíferos, mas que o metabolismo de excreção dos ácidos clorofenoxiacéticos em animais, não tem sido devidamente estudados.

Apesar de ambos os testes de citotoxicidade, terem se complementado, recomenda-se, que para o teste da absorvância, segundo a metodologia descrita anteriormente, seja utilizada células de linhagem já estabelecida, pois foi verificado uma pequena variância, nas leituras de absorvância dos pocinhos da microplaca. A hipótese, é de que o cultivo celular primário não apresenta uma uniformidade na densidade da monocamada, como as células de linhagem já estabelecida, além

disso, a atividade enzimática dessas células, por não serem genotipicamente iguais, varia muito de lote para lote.

Para determinação da concentração de oxigênio nas células hepáticas de *Metynnis roosevelti*, submetidas a várias concentrações do herbicida diclorofenóxiacético 2,4-D+MCPA, foi utilizado, o polarógrafo com eletródio de oxigênio e sensor de temperatura. Por ser de rápida execução e muito preciso, esse método tem sido amplamente utilizado em diferentes situações experimentais (LUCCHIARI & HOSHINO, 1980; NIERO & MALUCELLI, 1995)

Nos experimentos realizados, foi verificada a necessidade de trocar a membrana de celulose, que envolve o eletrodo de platina, em cada nova determinação na velocidade de consumo de oxigênio. Quando, em nova determinação do consumo de oxigênio, utilizava-se a mesma membrana de celulose, o eletrodo não correspondia ao consumo de oxigênio na superfície da câmara de reação, verificando o estado metabólico normal das células utilizadas, chegou-se a conclusão, que o problema estava diretamente relacionado a membrana do eletrodo, quando utilizado o 2,4-D+MCPA, nas condições experimentais do presente trabalho. Uma explicação, para tal fato é a de que, sendo o 2,4-D+MCPA, um herbicida que possui propriedades de rápida translocação através de membranas celulares, tanto de animais e como em plantas, ele se ligaria a membrana de diálise utilizada em torno do eletrodo, constituída inclusive de celulose, interrompendo o fluxo de elétrons e a subsequente reação, a qual determina o consumo de oxigênio pela célula.

Nas determinações feitas em polarógrafo, foi observado que não ocorreu sensível incremento no consumo de oxigênio em comparação com a respiração

endógena, quando na presença de substratos como a glicose 0,5M, o succinato 0,5M ou o α -cetogluturato 0,5M. O meio de cultivo, onde as células foram mantidas durante o experimento era muito rico em aminoácidos, vitaminas e sais minerais. Talvez, esse seja um dos motivos, da respiração endógena das células, ser tão alta em relação aos substratos utilizados. Ainda, a respeito da respiração endógena, ela se mostrou uniforme em todas as determinações feitas para a mensuração do consumo de oxigênio das células hepáticas de *Metynnis roosevelti*

Utilizando-se, apenas os dados da respiração endógena, foi observado uma inibição na velocidade de consumo de oxigênio de 54,4%, na concentração média do herbicida (0,00275 g/ml), 33,4% na concentração mais alta (0,0275 g/ml) e 14,4% na concentração mais baixa (0,000275 g/ml). O mesmo, ocorre quando adicionamos glicose 0,5M como substrato, na concentração média a velocidade de consumo de oxigênio foi inibida em 84,26%, na concentração mais alta em 68,6% e na mais baixa 37,1%. Com o α -cetogluturato 0,5M, a concentração média também inibiu em maior índice a velocidade no consumo de oxigênio, 99,9%, apesar da diferença entre a inibição da concentração alta, não ser muito diferente 98,9% e a mais baixa em 25%. Com os resultados obtidos, pode-se sugerir que a concentração média do 2,4-D+MCPA, é a ideal no caso dos substratos citados anteriormente, para que ocorra uma inibição na fosforilação oxidativa, preenchendo os sítios ativos das enzimas de uma forma mais complexa. ROBERTSON et al., 1970, aborda o envolvimento do 2,4-D como um agente desacoplador ou inibidor da fosforilação oxidativa com enzimas localizadas na membrana mitocondrial externa. ERNE, 1966, e METCALF, 1979, propõe que o 2,4-D pode se ligar fisicamente a proteína

enzimática, de tal modo que, em baixas concentrações, aumente a atividade catalítica das enzimas e em altas concentrações diminua a atividade das mesmas.

Verificou-se, que utilizando o succinato como substrato, há uma inibição de 66,7% nas três concentrações do 2,4-D+MCPA, citadas anteriormente. Com o succinato utilizado como substrato, a concentração mais baixa do herbicida foi o suficiente para inibir a respiração celular nas mesma proporção que nas outras concentrações. MUNHOZ, 1993, em seus experimentos realizados no respirômetro de Warburg, observou que suspensões mitocondriais hepáticas preparadas a partir de animais expostos ao herbicida, na diluição de 0,1 ml/l, comprometeu em 90% sua capacidade normal em oxidar o succinato.

6. CONCLUSÕES

- As células hepáticas de *Metynnis roosevelti* mostrou ser um excelente material biológico para cultivo celular primário;
- processo de obtenção das células, no caso a dissociação celular enzimática através da tripsinização, para o estabelecimento de técnicas para o cultivo primário, influenciou diretamente na confluência da monocamada;
- A utilização de L-Glutamina, fibronectina e insulina, mostrou ser imprescindível para o desenvolvimento do cultivo primário de células hepáticas de *Metynnis roosevelti*;
- A concentração letal média das células hepáticas de *Metynnis roosevelti* em cultivo primário expostas ao herbicida por 24 horas, foi estabelecida entre 0,0265 g/ml e 0,03162 g/ml em ambos os testes de citotoxicidade;
- material biológico utilizado, mostrou ser suscetível ao 2,4-D+MCPA, em todas as concentrações utilizadas em ambos os experimentos de citotoxicidade;
- Na determinação do consumo de oxigênio pelas células hepáticas de *Metynnis roosevelti* com a utilização do endógeno, glicose 0,5M e α -cetogluturato 0,5M, a concentração do 2,4-D que causou maior inibição do consumo de oxigênio foi de 0,00275g/ml;
- A velocidade no consumo de oxigênio quando utilizado o succinato 0,5M como substrato, foi inibida em 66,7% em todas as concentrações do herbicida, respectivamente: 0,0275g/ml; 0,00275 g/ml e 0,000275g/ml.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIAR, M. E.; BACILA, M. Efeito do Be^{2+} sobre a atividade das hexoquinase do músculo cardíaco de rato. **Ciência e Cultura** 28(7):448, 1976
- AHNE, W. Studies on the of fish tissue cultures for toxicity tests in order to reduced and replaced the fish tests. **Zbl Bakt Hyg, I Abt Orig B.** 180: 480-504, 1985..
- ALMEIDA, N. F.; PIEDADE, J. R.; SOUZA, D. A. **Química dos Pesticidas** Ed. Fund. Pesq, Inst. Biol. São Paulo, 1962.
- AMARAL, D. & BACILA, M. Determinação da Galactose Oxidase pelo Eletródio de Oxigênio. **ARQ. BIOL. TECNOL.**, 12: 179-186, 1967.
- BABICH, H. & BORENFREUND, E. Fathead minnow FHM Cells for Use in *in Vitro* Cytotoxicity Assays of Aquatic Pollutants. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 14, p. 78-87, 1987.a
- BABICH, H. & BORENFREUND, E. *In Vitro* Cytotoxicity of Organic Polluants to Bluegill Sunfish (BF-2) Cells. **Environmental Research**, 42, p. 229-237, 1987.b
- BABICH, H. & BORENFREUND, E.. Aquatic Pollutants Tested *In Vitro* With Early Passage Fish Cells. **ATLA**, 15, 116 -122, 1987.c
- BABICH, H. & BORENFREUND, E.. Cytotoxicity and Genotoxicity Assays with Cultured Fish Cells: a Review. **Toxic. in Vitro**, 5: 1, 91 - 100, 1991.d
- BABICH, H. & BORENFREUND, E.. Fathead Minnow FHM Cells for Use in *in Vitro* Cytotoxicity Assays of Aquatic Pollutants. **Ecotoxicol. and Environ. Safety**, 14, 78 - 87, 1987.e

- BABICH, H. & BORENFREUND, E.. *In Vitro* Cytotoxicity of Organic Pollutants to Bluegill Sunfish (BF-2) Cells. **Environ. Research**, 42, 229 - 237, 1987f
- BABICH, H.; PALACE, M.R. & STERN, A.. Oxidative Stress in Fish Cells: *In Vitro* Studies. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.**, 24, 173 - 178, 1993.
- BACILA, M. & VOSS, D. Subcellular Components of Rat Cerebrum. **An. Acad. Bras. Cienc.**, 39, 1: 169-173, 1967.
- BACILA, M. O eletródio de oxigênio no estudo do metabolismo de microorganismos. **Ver. Bras. Microb.** 1:117, 1959.
- BACILA, M.; AMARAL, D.; MEDINA, H. Estudos sobre o metabolismo de fungos parasitas. II. Vias de oxidação da glicose e de acetato pelo *Sporotrichum schenckii*. **Ciência e Cultura**, 8:162, 1956.
- BACILA, M.; HIGUCHI, T. Oxidação de NADH por levedura de panificação. I. Preparação e atividade oxidativa de subpartículas celulares. **Ver. Vet. Univ. São Paulo**, 7:511, 1967.
- BACILA, M.; ROSA, R.; RODRIGUES, E.; LUCCHIARI, P.H.; ROSA, C.D. Tissue Metabolism of the Icefish *Chaenocephalus aceratus* Loenberg. **Comp. Biochem. Physiol.**, 92 B, 2: 313-318, 1989.
- BACILA, M.; XAVIER, A. W.; HORII, J. Glucose metabolism in respiratory deficient mutants from *Saccharomyces cerevisiae* induced by denaturing agents. In: BACILA, M.; HORECKER, B. L.; STOPPANI, A. O. (EDS) **Biochemistry and Genetics of Yeasts**. New York : Academic Press, 1978.
- BAUMBERGER, J.P. The Relation between the "Oxidation - Redution Potential" and the Oxygen Consumption Rate of Yeast Cell Suspensions. **Cold. Spr. Harb. Symp. Quant. Biol.**, 7: 195-215, 1939.

- BERQUÓ, E.S. PACHECO DE SOUZA, J. M.;GOTLIEB, S.L.D.; Bioestatística 1 ed. rev **São Paulo**, Editora Pedagógica e Universitária Ltda, 1981,.p. 350
- BOLS, N.C., BOLISKA, S.^a, DIXON, D.G., HODSON, P.V. & KAISER, K.L.E.. The Use of Cell Cultures as na Indicator of Contaminant Toxicity to Fish. **Aquatic Toxicol.** 6: 147-1155., 1985.
- CAMPELLO, A. P.; VOSS, D. O., FREIRE, S. A.; BACILA, M. The effect of citrate on the respiratory control of isolated rat heart sarcosomes. Congresso da Associação Latino-Americana de Ciências Fisiológicas (VI : 1964 : Vina Del Mar) **Proceeding...** Vina Del Mar, 1964.
- CASTAÑO, A.; VEGA, M.M. & TARAZONA, J.V.. Acute Toxicity of Selected Metals and Phenols on RTG - 2 and CHSE - 214 Fish Cell Lines. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.** 55, 222 - 229, 1995.
- CASTRO, N; MACEDO, R. M. Biodegradabilidade de dispersantes químicos para petróleo: teste de triagem com base na análise de DQQ em meio de água doce. **Ciência e Cultura**, 38(7) 727, 1986.
- CHANG, J.P.; YU, K.L.; WONG, A O., PETER, R.E..Differential actions of dopamine receptor subtypes on gonadotropin and growth hormone release in vitro in goldfish. **Neuroendocrinology.** 51(6): 664-674, 1990.
- CHEN, J.D.; YEW, F.H. & LI, C.G.. Thermal adaptation and heat shoock response of Tilapia ovary cells.**Journ.Cell Phhyiol.** 134(2): 99-189, 1988.
- CHENG, L.L.; BOWSER, P.R. & SPITSBERGEN, M.. Develpment of Cell Cultures Derived from Lake Trout Liver and Kidney in a Hormone-Supplemented, Serum-Reduced Medium. **Journ. of Aquatic Animal Health**, 5, 119 - 126, 1993.

- CRIVELLARO, O.; OCAMPOS, D.; ROSA, R.; BACILA, M. Ação de inibidores da respiração e de fosforilação oxidativa sobre a respiração endógena do espermatozóide de ouriço do mar *Lytechinus variegatus*. **Ciência e Cultura**, 28 (7): 449, 1976.
- COBBOLD, R.S.C.. The Oxygen Electrode. In Transducers for Biomedical Measurements: Principles and Applications. Toronto, **John Wiley & Sons**. Inc. pag.380, 1974.
- CORBETT, J. R. **The Biochemical Mode of Action of Pesticides**. New York : Academic Press, 1974. p. 204-205.
- DIPPLE, A. & BIGGER, CAH., Metabolic Properties of "in vitro" Systems.. In: Cellular Systems for Toxicity Testing. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**; 407; 26-33, 1983.
- DUARTE, J. H.; BACILA, M. Tirosinase e Dopaoxidase em Planorbídeos Negros e Albinos. **Ciênc. Cult.**, 11., 1959.
- ERNE, K. Distribution and Elimination of Chlorinated Phenoxyacetic Acids in Animals. **Acta.Vet.Scand.** 7; 240-256, 1966.
- FANTA, E.; LUCCHIARI, P.H. & BACILA, M..Circadian Rhythm of Oxygen Consumption and Oxygen Levels in the Muscle of *Notothenia neglecta* (Pisces, Teleostei). **Comp. Biochem. Physiol.**,96: 1, 151-155, 1990.
- FATT, I. **Polarographic Oxygen Sensor**. Cleveland : CRC Press, 1976 p. 63-119.
- FEDERAL WATER POLLUTION CONTROL ADMINISTRATION, Water Quality Criteria – Guidelines, Washington, 1972.

- FERREIRA, F. M. **Antibioticoterapia em Pequenos Animais**. São Paulo : Ícone, 1997. p. 63-65.
- 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. **Journ. of Cell Science**, 105, 407 - 416, 1993.
- FURTICK, W. R. The Role of Herbicides in Crop Production. In: WHITE-STEVENSON, R. **Pesticides in the Environment**, v. 3, New York : Marcel Dekker , 1977, p. 83.
- GAGNÉ, È.; MARION, M. & DENIZEAU, F.. Metal Homeostasis and Metallothionein Induction in Rainbow Trout Hepatocytes Exposed to Cadmium. **Fundamental and Applied Toxic.**, 14, 429 - 437, 1990.
- GÉRY, J. The Characids of the World. New Jersey, Tropical Fish Hobbyist. Neptune City, 251 - 277, 1977.
- GIORGINI, J. F.; KEY, J. L. Effect of 2,4 Dichlorophenoxy acetic acid (Auxin) on the Phosphorylation of soybean hypocotyl ribosomal proteins. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. 16(2)97-103, 1983.
- GREEN, J. & BAKER, B.I., Melanin concentrating hormone. Influence of nerves and hormones on the control of trout melanophores, **Life Sci**. 45(13): 1127-1132., 1989.
- HAHN, C. E. W.; DAVIES, A. H.; ALBERY, W. J. Eletrochemical improvement of the performance of PO₂ electrodes. **Respir. Physiol**, 25: 109-135, 1975.
- HAKANSSON, H.; SUNDIN, P.; ANDERSSON, T.; BRUNSTROM, L.; DENCKER, L.; ENGWALL, M.; EWALD, G.; GILEK, M.; HOLM, G.; HONKASALO, S.; IDESTAM-ALMIQUIST, J.; JONSSON, P.; KAUTSKY, N.; LUNDBERG, G.;

LUND-KVERNHEIM, A.; MARTINSEN, K.; NORRGREN, L.; PERSONEN, M.; RUNDGREN, M.; STALBERG, M.; TARKPEA, M. & WESEN, C.. *In Vivo* and *in Vitro* Toxicity of Fractionated Fish Lipids, with Particular Regard to their Content of Chlorinated Organic Compounds. **Pharmacol. & Toxicol.**, 69, 459 - 471, 1991.

HARTMANN, J.X.. Routine Establishment of Primary Elasmobranch Cell Cultures. ***In Vitro Cell. Dev. Biol.***, 28 A, 77 - 79, 1992.

HAWKINS, W. E. Carcinogenetic tests with small fish species. **Aquat. Toxicol.**; v.11; 00-00 , 1987.

HAYASHI S. & OOSHIRO, Z. Primary Culture of The Eel Hepathocytes in the Serum-free Medium. **Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries**, v. 52, n. 9, p. 1641-1651, 1986.

HIGHTOWER, L.E. & RENFRO, J.L.. Recent Applications of Fish Cell Culture to Biomedical Research. **The Journ. of Exp. Zool.**, 248, 290 - 302, 1988.

HIRATA, K.; YOSHIDA, Y.; SHIRAMATSU, K.; FREEMAN, A. E.; HAYASAKA, H. Effects of Laminin, Fibronectin and Type IV Collagen on Liver Cell Cultures. **Expl Cell Biol.**, 51, p 121-129, 1993.

JOINEAU, M. E.; SALVO, L. M.; RICHARTZ, R. R. T. B.; BACILA, M. Citotoxicidade *in vitro* de clorofenoxiacetato com células da linhagem PK₁₅ (Porcine kidney clone 15). In: Simpósio de Ciências Médicas e Biológicas (4 : 1997: Curitiba). **Resumo...Curitiba** : CPGCV, 1997. p.51.

JULIANI, M. H.; COSTA, S. O. P.; BACILA, M. Non-chromosomal respiratory deficient mutants iduced by guanidine hydrochloride in *Sacharomyces cerevisiae*. **Biocem. Biopys. Res. Commun.**, 533 : 531-539, 1973.

- KLAUNIG, J. E.; RUCH, R. J.; GOLDBLATT, P. J. Trout Hepatocyte Culture: Isolation and Primary Culture. **In Vitro Cellular & Developmental Biology**, 21 (4) 221-228, 1984.
- KOBAYASHI, K.; ARITAKE, H.; MANABE, K. Relation between Toxicity and Accumulation of Various Chlorophenols in Goldfish. **Bulletin of The Japanese Society Fisheries**, v. 45, n. 2, p. 173-175, 1979.
- KOCAL, T.; QUINN, B. A.; SMITH, J. R.; FERGUSON, H. W.; HAYES, M. A. Use of Trout Serum to Prepare Primary Attached Monolayer Cultures of Hepatocytes from Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*) **In Vitro Cellular & Developmental Biology**, v. 24, n. 4, p. 304-308, 1987.
- KOCAN, R.M.; SABO, K.M. & LANDOLT, M.L.. Cytotoxicity / Genotoxicity: the Application of Cell Culture Techniques to the Measurement of Marine Sediment Pollution. **Aquatic Toxicol.**, 6, 165 -177, 1985.
- LANNAN, C. N.; WINTON, J. R.; FRYER, J. L. Fish Cell Lines: Establishment and Characterization of Nine Cell Lines from Salmonids. **In Vitro**, v. 20, n. 9, Sept, 1984.
- LIPSKY, M. M.; SHERIDAN, T. R.; BENNETT, R. O.; MAY, E. B. Comparison of Trout Hepatocyte Culture on Different Substrates. **In Vitro Cellular & Developmental Biology**, v. 22, n. 6, 360-362, Jun, 1986.
- LORENZEN, A. & OKEY, A.B.. Detection and Characterization of [³H] 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzeno-p-dioxin Binding to Ah Receptor in a Rainbow Trout Hepatoma Cell Line. **Toxic. and Applied Pharm.**, 106, 53 - 62, 1990.
- LUCCHIARI, P. H.; FEOFILOFF, E. F.; BOSCARDIN, A. T.; BACILA, M. A Technique for the determination of the available oxygen in living carp (*Cyprinus carpio*) muscle. **Comp. Biochem. Physiol.** 78A: 675-679, 1984.

- LUCCHIARI, P. H.; FEOFILOFF, E. F.; BOSCARDIN, A. T.; BACILA, M. Effect of temperature on the levels of oxygen in the muscle and oxygen consumption of some Antarctic Notothenidae. **Fish. Intern. Symp. On Antarctic Aquatic Biol.** Rio de Janeiro, 1985.
- LUCCHIARI, P.H. & HOSHINO, K.. Inovação de Circuito Polarográfico para a Determinação de Variações dos Níveis de Oxigênio em Meios Biológicos. **Rev.Cienc. Bioméd.**, São Paulo, 1: 51-62, 1980.
- LUCCHIARI, P.H.; FANTA, E.; BACILA, M.. The Effect of Temperature on the Muscle Oxygen Levels in Antarctic Fish. **Proc NIPR Symp. Polar Biol.**, 2: 117-122, 1989.
- LUCCHIARI, P.H.; FEOFILOFF, E.F.; BOSCARDIM, A.T.; BACILA, M.. A Technique for the Determination of the Available Oxygen in Living Carp (*Cyprinus carpio*) Muscle. **Com. Biochem.Physiol.**, 78A: 675-679, 1984.
- MAITRE, J.L.; VALOTAIRE, Y. & GUGUEN, C.G. Estradiol 17 β stimulation of vitellogenin synthesis in primary culture of male trout hepatocytes. **In Vitro.** 22; 337-343, 1986
- MALUCELLI, M.I.C.; NIERO, R.; LUCCHIARI, P.H. & BACILA, M.. Evaluation of the Polarographic Technique for Assay of Viability of Freeze - dried BCG Vaccine: I. The Polarographic Technique. **Vaccine**, 13: 3, 268 -272, 1995.
- MEDINA, H.; LOPATA, M. E.; BACILA, M. The response of sea urchin embryogenesis towards the effect of some pesticides. **Arq. Biol. Technol.** 37 (4):895-906, 1994.
- MELTCALF, R. L. The Chemistry and Biology of Pesticides. In: WHITE-STEVENS, R. **Pesticides in the Environment**, v 1, New York, Marcel Dekker, 1979, p. 34 – 66.

- MILLER, M.R.; SAITO, N.; BLAIR, J.B. & HINTON, D.H.. Acetaminophen Toxicity in Cultured Trout Liver Cells . **Experiment. and Molec. Pathology** 58, 127 - 138, 1993.
- MONTE, D.; SANDY, M. S.; EKSTRÖM, G.; SMITH, M. T. Comparative Studies on The Mechanisms of Paraquat and 1- Methyl-4-Phenylpyridine (MPP) Cytotoxicity. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 137, n. 1, p. 303-309, May, 1986.
- MORGAN, S. J.; DARLING, D. C. **Cultivo de Celulas Animales**. Zaragoza : Acríbia, 1995. p. 51-69.
- MUNHOZ, E. M. B. **Comprometimento Morfológico e Metabólico do Tecido Hepático de *Prochilodus scropha* (PISCES, PROCHILONDONTIDAE) exposto subletalmente ao Bi-hedonal**. Curitiba, 1993. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Paraná.
- NICOLAU, J.; BACILA, M. The effect of N-acylsarcosine derivatives on the isolated rat heart sarcosomes. **Na. Acad. Brasil. Ciênc.** 42(1) : 137-140, 1970.
- NIERO, R. & MALUCELLI, M.I.C.. Feasibility of the Polarographic Method for the Evaluation of the *Mycobacterium fortuitum* Growth in Different Culture Media. **Rev. Ciênc. Farm.**, 16, 147 -154, 1995.
- OCAMPOS, D.; CRIVELLARO, O.; ROSA, R.; BACILA, M. Effect of sulfhydryl group reagents on the endogenous respiration of the sea-urchin *Lytechinus variegatus* spermatozoa. **Comp. Biochem. Physiol.** 58C:33-36, 1977.
- PARCKER, L.; BACILA, M. Influence of steroid hormones on the respiratory system of mammalian mitochondria. **Acta Physiol. Latinoam.** 8:230, 1958.

- PAULSON, H. & CLAUDIO, T. Temperature-sensitive expression of all-Torpedo and-rat hybrid in mammalian muscle cells. **Journ.Cell.Biol.** 110(5):1705-1717, 1990.
- PARKINSON, C. & AGIUS, C.. Acute Toxicity of DDT to Tilapia (*Oreochromis Spirulus Gunther*) *In Vivo* and *In Vitro*. **ATLA**, 15, 298 - 302, 1988.
- PIERSHBACHER, M.D., & RUOSLLATHI. Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule. **Nature** 309; 30-33, 1983.
- RACHLIN, J. W. & PERLMUTTER, A. Fish Cells in Culture for Study of Aquatic Toxicants. **Water Research Pergamon Press**, v. 2, p 409-414, 1968.
- ROSA, R.; OCAMPOS, D. CRIVELLARO, O.; BACILA, M. Effect of inhibitors of the respiratory chain and oxidative phosphorylation on the endogenous respiration of the sea urchin *Lytechinus variegatus* spermatozoa. **Comp. Biochem. Physiol.** 58B: 13-16, 1977.
- ROBERTSON, M.M. The Mode of Action of Folliage-Applied Translocate Herbicides With Particular Reference to the Phenoxyacetic Compounds. **Werd. Res.**10: 94-120, 1970.
- SAITO, H. & SHIGEOKA, T.. Comparative Cytotoxicity of Clorophenols to Cultured Fish Cells. **Environ. Toxicology and Chem.**, 13, 10: 1649 - 1650, 1994.
- SAITO, H.; SUDO, M.; SHIGEOKA, T. & YAMAUCHI, F.. *In Vitro* Cytotoxicity of Chlorophenols to Goldfish GF - Scale (GFS) Cells and Quantitative Structure - Activity Relationships. **Environ. Toxicol. and Chem.**, 10, 235 - 241, 1991.
- SEGLIN, P.. Preparation of Rat Liver Cells. III. Enzymatic Requeriments for tissue deispertion. **Expl.Cell Res.** 82:391-398, 1973.

- SEGNER, H.; LENZ, D.; HANKE, W. & SCHUURMANN, G..Citotoxicity of Metals Toward Rainbow Trout R1 Cell Line. **Environ. Toxicol. and Water Quality: An International Journ.**, 9, 273 - 279, 1994.
- SHORS, S.T. & WINSTON, V.. Detection of infectious hematopoietic necrosis virus in na invertebrate. **Am Journ.Vet.Res.** 50:8; 1307-1309, 1989.
- SKALISZ, R.& POLACK, S.W. Agrotóxicos: Sintomas e Tratamento. p.
- STRYER, L. **Bioquímica.** 3 ed., Rio de Janeiro : Guanabara Koogan S. A., p.191-211. 1992.
- SUGIZAKI, M.; LUCCHIARI, P.H.; MALUCELLI, M.I.C. & BACILA, M.. Respiration and Oxidative Phosphorylation of Mitochondria from Tissues and Organs of Antarctic Fish. **Proc NIPR Symp. Polar Biol.**, 10: 145 - 152, 1997.
- VOSS, D. O.; BACILA, M. Estudos sobre a cadeia respiratória de planorbídeos. Simpósio sobre Bioquímica de Planorbídeos (I : Curitiba : 1961).
- WATANABE, T.; NAKANO, M.; ASAKAWA, H. & MORITOMO, T.Cell Culture of Rainbow Trout Liver **Nippon Suisan Gakkaishi**, 53, 4: 537-542, 1987.
- WOLF, K & MANN, J.^a,Poikilothermic vertebrate cell lines and virouses: a current listing for fishes,.**In vitro.** 16, 168-179.
- WOLF, K. & QUIMBY, M.C.. Fish Cell and Tissue Culture. In: Hoar, W.S.; Randall, D.J., eds. **Fish Physiology**, 3, 253 - 305, 1969.
- WOLF, K. & DUNBAR, C.E.. Cultivation of Adult Teleost Tissues *In Vitro*.**Proc. Soc. Exptl Biol Med.** 95 ,455-458, 1977.

WOLF, K. & QUIMBY, M. C. Procedures for Subculturing Fish Cells and Propagating Fish Cell Lines. **TCA Manual**, v 2, n. 4, p. 471-474, 1976.