

FABÍOLA MAZZARO AKAISHI

**ESTUDO DO EFEITO TÓXICO DO TBT
(Tributil-Estanho) E DO BaP
(Benzopireno) EM RIM DE *Salvelinus
alpinus***

Monografia apresentada ao Departamento de Biologia Celular para a obtenção do título de Bacharel no curso de Graduação de Ciências Biológicas, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Ciro A. de Oliveira Ribeiro

**CURITIBA
2000**

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas	i
Agradecimento	ii
Resumo	iii
1- Introdução	01
1.1 – Bioensaios.....	01
1.2 - Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos.....	02
1.3 - Organoestanho – TBT (tributil-estanho).....	02
1.3.1 – Histórico.....	02
1.3.2 - Aspectos Químicos.....	03
1.3.3 - Ocorrência, Distribuição e destino do TBT nos Ambientes Aquáticos.....	04
1.3.4 - O TBT em Peixes e a Citotoxicidade.....	05
1.4 - Principais alterações celulares.....	06
1.5 - O Órgão analisado.....	06
2 - Objetivo	08
3 - Material e Métodos	09
3.1 - A espécie utilizada.....	09
3.2- Designe experimental.....	09
3.3 - Preparo para análise em microscopia óptica.....	10
3.3.1- Desidratação.....	11
3.3.2- Diafanização.....	11
3.3.3- Inclusão.....	11
3.3.4- Trimagem.....	11
3.3.5- Microtomia.....	11
3.3.6 – Montagem de lâmina permanente.....	11
3.4 – Preparo para microscopia eletrônica de varredura.....	12
4 – Resultados	13
5 – Discussão	17
6 – Conclusões	20
7 - Perspectivas futuras	21
ANEXOS	
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	

LISTA DE ABREVIATURAS

ABREVIATURAS	
BaP	Benzo(a)pireno
C/C	Controle do controle
GST	Glutathiona – S –Transferase
ISMER	Institute des Science de la Mer de Rimouski
M.E.V	Microscopia Eletrônica de Varredura
M.O	Microscopia Óptica
P.A.H	Hidrocarboneto Policíclico Aromático
R.E.L	Retículo Endoplasmático Liso
TBT	Tributil – estanho
TBTOH	Hidróxido de Tributil –estanho
UFPR	Universidade Federal do Paraná

AGRADECIMENTOS

Muitas pessoas participaram e cooperaram para o meu crescimento e formação. A essas pessoas, quero agradecer ao apoio e à força em todos os momentos dessa trajetória. Agradeço:

À Deus, pela vida e por sempre me iluminar nas decisões difíceis.

À minha família, principalmente aos meus pais, Guido e Neusa, e aos meus tios, Irineu e Leonor, pelo apoio em todos os momentos, por sempre me escutarem e me aconselharem.

Ao Ciro, pela orientação, possibilitando os meus primeiros passos no mundo científico, e pela confiança depositada nas minhas capacidades.

Ao Luiz Adolfo, por todo amor, compreensão e apoio dedicado à minha pessoa.

Às minhas queridas amigas, Ana Claudia, Helen e Simone, pelos momentos de estudo na biblioteca, pelas festas, pelo ombro amigo, pelos almoços no RU e por todos bons momentos que estivemos juntas.

Aos meus amigos do curso de Ciências Biológicas, pelos momentos de descontração e alegria que compartilhamos.

Aos colegas de laboratório, pelas trocas de idéias e pelos divertidos dias de trabalho. À Fabíola e ao Yart pelo companheirismo e pela alegria durante esses anos que convivemos juntos no laboratório.

Aos Professores, Luís Fernando Fávaro (Zão) e Marco Randi, por sempre estarem dispostos a ajudar e pelo apoio no desenvolvimento do meu trabalho.

Ao Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR, onde realizei parte do meu trabalho.

RESUMO

O tributil-estanho (TBT) é um composto de origem antropogênica, formado, na maioria das vezes através da biometilação ambiental do metil – estanho. O TBT teve sua aplicação expandida quando utilizado como biocida em tintas nos navios, causando sérios impactos ambientais. O Benzopireno (BaP) faz parte do grupo de compostos denominados Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPA's). Esses produtos são oriundos da combustão incompleta da matéria inorgânica. As principais formas de HPA's depositados no ambiente, são provenientes de rejeitos hídricos industriais e urbanos e de diversos produtos derivados do petróleo. O BaP é conhecido pelo seu potencial carcinogênico. Este trabalho teve como objetivo estudar a nível estrutural, os efeitos tóxicos do TBT (Tributil-estanho) e BaP (benzopireno) em rim de *Salvelinus alpinus*, expostos a concentrações subletais, com o auxílio de bioensaios. O experimento crônico foi realizado no Institute des Science de la Mer de Rimouski – ISMER, Québec – Canadá, onde foram montados cinco aquários de 250 litros. Em cada aquário foram colocados de 50 a 60 exemplares, sendo designados como controle do controle (C/C), controle óleo, contaminados com TBT, BaP e com a composição BaP+TBT. O aquário (C/C) continha exemplares que foram manipulados da mesma maneira que os contaminados, enquanto que o aquário controle óleo, apresentava indivíduos que recebiam injeções com óleo de milho, veículo utilizado para a contaminação. O terceiro aquário possuía indivíduos contaminados com TBT, um outro com BaP e o quinto com a composição BaP+ TBT. Todas as contaminações foram através de injeções intraperitoneais. Os indivíduos foram, pesados e contaminados a cada seis dias com injeções intraperitoneais de TBT, BaP e BaP+TBT, com a concentração de 2µg do contaminante/Kg diluídos em óleo de milho. No oitavo, vigésimo sexto e sexagésimo dia de experimento, 48 horas após a última contaminação foram retiradas amostras do rim anterior e posterior dos exemplares de cada aquário. Este material retirado foi fixado, e transportado para o laboratório de Toxicologia Celular, onde foi processado para análise estrutural. Os resultados demonstraram que ambos compostos apresentam um alto potencial tóxico. O material controle, apresentou as mesmas características descritas na literatura para o rim de teleósteos. A ativação de macrófagos foi uma alteração observada na porção anterior do rim após exposição aos contaminantes. A destruturação da glândula interrenal foi observada na região anterior exposta ao TBT e o aparecimento de células com núcleos picnóticos, característico de células em processo apoptose foi evidenciado após exposição ao BaP. Na região posterior do rim exposta ao BaP e TBT+BaP foi observado o aparecimento de novos néfrons e necrose glomerular e parenquimal. O BaP também causou dilatação dos vasos sanguíneos que compõem o interior dos glomérulos, comprometendo a função desta estrutura. Já na presença do TBT observou-se uma hipertrofia das células que constituem o interior da estrutura glomerular, e como consequência ocorreu uma redução do espaço de Bowman. O BaP demonstrou ser o composto com maior potencial tóxico, se comparado com os efeitos causados pelo TBT e BaP+TBT, mas alguns estudos serão realizados para melhor compreender os efeitos destes compostos nos seres vivos.

1 - INTRODUÇÃO

A utilização dos compostos químicos pelo homem vem ocorrendo desde o início da história da ciência até os dias atuais, e durante esse período alguns estudos tem sido realizados com o objetivo de conhecer o potencial tóxico de alguns destes compostos para os ecossistemas naturais inclusive para o homem. Nas últimas décadas, houve um aumento no interesse em conhecer os efeitos destes xenobiontes em diferentes tipos de organismos, localizados em níveis tróficos inferiores da cadeia alimentar. Esses estudos encontram-se inseridos em uma grande área denominada de Ecotoxicologia, a qual pode ser definida como o estudo dos efeitos tóxicos em organismos vivos com interferência no funcionamento dos ecossistemas naturais. Estes estudos procuraram focalizar a relação entre os efeitos dos contaminantes com organismos e estruturas alvo importantes como células, tecidos e alguns aspectos bioquímicos e genéticos de indivíduos e populações inseridos em um mesmo ambiente, caracterizando um estudo interdisciplinar. Além disso, podem ainda ser considerados aspectos fisico-químicos moleculares, no entendimento dos mecanismos de toxicidade e dos processos ecológicos (Fent, 1995).

1.1 - Bioensaios

Para se estudar os efeitos tóxicos de diferentes compostos são utilizados os bioensaios, onde diferentes organismos são expostos a determinados contaminantes sob condições controladas, contribuindo desta forma com informações do efeito direto sobre o organismo e indireto sobre o sistema ecológico. A utilização de bioensaios é importante para obter respostas mais precisas com relação aos efeitos dos xenobiontes, pelo fato de se tornar possível controlar muitas variáveis ambientais, enquanto que no próprio ambiente, torna-se inviável esse tipo de controle, devido as interferências fisico-químicas próprias de cada ecossistema. Os bioensaios podem ser aplicados com diferentes finalidades, mas em geral é utilizado para determinação dos efeitos tóxicos de contaminantes a uma concentração já estipulada.

1.2 - Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos

O composto BaP (benzo(a)pireno) estudado nesse trabalho, faz parte do grupo de compostos denominados Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPA's). Esses produtos são oriundos da combustão incompleta da matéria inorgânica, e se dispersam no ambiente em forma de partículas. As principais formas de HPA's depositados no ambiente, são provenientes de rejeitos hídricos industriais e urbanos e de diversos produtos derivados do petróleo. Esses compostos químicos se associam rapidamente com materiais particulados em suspensão e no sedimento (Padrós et al, 1997).

A contaminação por BaP (benzo(a)pireno) é considerada um grande problema ambiental, devido as propriedades mutagênicas e/ ou cancerígenas que esse composto apresenta. Dados da literatura comprovam que o composto em estudo neste trabalho apresenta propriedades cancerígenas para o fígado de várias espécies de peixes. A frequência de neoplasias hepáticas em organismos bentônicos está associada aos níveis elevados de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos presentes nos sedimentos (Padrós et al, 1997).

O BaP tem seu potencial carcinogênico ativado, após passar pelo fígado. Quando chega nos hepatócitos, este composto ativa o sistema oxidase citocromo-P450. A ativação desse sistema multienzimático pode ocorrer na presença de agentes tóxicos. O citocromo-P450 realiza a biotransformação do BaP como forma de metabolizar e excretar o composto químico, no entanto a formação de subprodutos provenientes destas reações biológicas é que irão atuar como agente carcinogênico. O principal e mais importante subproduto formado nessa biotransformação é o BaP epoxy-diol, o qual é responsável por efeitos citotóxicos e cancerígenos nos organismos. Uma parte desse produto é liberado junto com a bile através da ação da enzima catalisadora glutational-S-transferase (GST) e a outra parte atua sobre a molécula de DNA, fixando-se diretamente sobre ela, e modificando sua estrutura.

1.3 - Organoestanho – TBT (tributil-estanho)

1.3.1 - Histórico

Os compostos conhecidos como organoestanhos, geralmente, são de origem antropogênica. Esses compostos são formados, na maioria das vezes através da biometilação ambiental do metil – estanho. O primeiro registro de um organoestanho

foi em 1936, onde este foi utilizado como estabilizador em polímeros sintéticos (Guard,1981).

A produção de organoestanhos aumentou de 5.000T em 1955 para uma parcela de 35.000T em 1985, representando aproximadamente 7% do total anual de consumo mundial de estanho (Zuckerman,1978 e Blunden,1986). Esses compostos são empregados com pesticidas, estabilizadores de polivinil (PVC), catalisadores e outros. Em 1985, nos países baixos, 4100T de estanho foram utilizados por vários tipos de indústrias de processamento de organoestanho. No Canadá, aproximadamente 290T de metil-estanho e 1.020T de compostos butil-estanho foram usados em 1984. Estimativas mais recentes assumiram que a produção anual de organoestanho pode atingir 50.000T (Mercier,1994). Aproximadamente 23% de todo organoestanho produzido no mundo são usados como agrotóxico e biocida. Esses dois produtos são prováveis responsáveis pela grande proporção de organoestanho encontrada no ambiente, sendo na maioria das vezes introduzidos em solos, ar e água (Fent,1995). O TBT teve sua aplicação expandida como um efeito biocida em tintas nos veleiros e navios de grande porte entre 1970 e 1980, sendo mais tarde responsabilizados por causar sérios impactos ambientais. Esta foi a principal rota de entrada do TBT em ambientes marinhos (Who,1990 e Who,1980). O uso de tintas que contêm TBT foi banido e controlado em alguns países, resultando em uma diminuição da contaminação de TBT em ambientes aquáticos. A França banuiu o uso das tintas em 1982 nos barcos menores que 25 m de comprimento. Os Estados Unidos restringiu o uso de organoestanho em tinturas em 1988. O Canadá regularizou o TBT em 1989 para grandes navios e proibiu o uso em veleiros menores de 25 m de comprimento. No Japão, o uso do TBT nas redes de cultura de peixes foi banido. Como resultado de todas essas medidas, o TBT perdeu um pouco da sua importância, mas os seus efeitos no ambiente aquático ainda é grande, pois ele continua sendo utilizado por grandes navios e existem países que o utiliza sem nenhuma regularização, como no Brasil.

1.3.2 - Aspectos Químicos

Na água do mar, o TBT é predominantemente encontrado na forma cloreto de Tributil-estanho (TBTCI), devido a alta concentração de íons cloreto na água salgada. A interação do TBT com outros compostos ou moléculas nos sedimentos pode ocorrer de diferentes formas, dependendo da especiação do sedimento. Os principais fatores relacionados com o TBT e o sedimento é a salinidade e o pH.

Um processo muito importante nessa interação entre os compostos químicos e o ambiente é a biodisponibilidade. Ela é a chave para determinar a interação dos tóxicos com a biota, e então a bioacumulação e a toxicidade. A biodisponibilidade depende da classe de compostos químicos solúveis e lipossolúveis no ambiente. O pH, a concentração de ácidos húmicos, os compostos orgânicos e a salinidade de um ambiente são os principais fatores que interferem na biodisponibilidade dos compostos químicos (Sunda, 1978 e Morel, 1983). Quando o TBT encontra-se em um ambiente onde o pH é igual a 8, observa-se a forma TBTOH, e isso facilita a sua penetração através das membranas biológicas, resultando em uma alta bioacumulação e toxicidade (Meador, 1991). A influência de ácidos húmicos e compostos orgânicos ainda é pouco entendida, mas em estudos com *Daphnia* sp., a presença de ácidos húmicos na água exposta ao TBT conduziu a redução da concentração relatada. Essa redução da bioacumulação de TBT pode ser explicada pela interação dos ácidos húmicos com o composto, afetando a especiação química do TBT, essas ligações dependem das propriedades químicas e hidrofóbicas dos compostos (Leversee, 1983; McCarthy, 1985 e Day, 1991).

1.3.3 - Ocorrência, Distribuição e destino do TBT nos Ambientes Aquáticos.

O TBT é encontrado em uma concentração significativamente maior em superfícies d' água, baías, e estuários onde comumente valores de 1 a 50 ng/L são observados (Who,1990). Em ambiente marinho, a concentração de TBT é mais alta no verão, mas a variabilidade do TBT, depende do movimento da maré (Seligman,1989). Na camada superficial d'água são usualmente encontradas maiores concentrações de TBT do que na coluna d'água (Maguire, 1982). Em baías há uma maior contaminação, como ocorre no Japão, com 0,1 mg/kg de TBT na baía Isle. Em ambientes de água doce, não se tem muito conhecimento a respeito. Em estudos realizados no Canadá, pôde-se observar uma maior concentração de TBT com relação ao DBT (di-butil-estanho) e MBT (mono-butil-estanho). O TBT chega nesse ambiente através das tinturas de barcos e navios, e também via fungicidas utilizados na agricultura. Recentemente, 16 ng/L foi detectado na água da chuva (Maguire,1982).

1.3.4 - O TBT em Peixes e a Citotoxicidade.

A biotransformação de TBT em peixes juvenis ou adultos ocorre principalmente no fígado, onde estes compostos são transformados e seus metabólitos são transferidos para a bile, onde serão eliminados. Os primeiros efeitos dos compostos tóxicos nos organismos ocorrem a nível celular e molecular. O TBT age nos organismos inibindo o oxigênio dentro de tecidos e da mitocôndria das células, inibindo a síntese de ATP. A inibição da fosforilação oxidativa na mitocôndria representa um dos processos chave e modo básico de ação do TBT, além de induzir a dilatação mitocondrial (Aldridge, 1977). O efeito direto dos organoestanhos sobre a fosforilação oxidativa ocorre por três vias de ação: 1- inibição direta do sistema, através da perda da atividade do complexo ATP sintase (Aldridge, 1964), evitando a passagem do próton. 2- Através da indução da atividade de canais Cl^- / OH^- na membrana mitocondrial, inibindo novamente a passagem do próton (Connerton, 1989). 3- Através da dilatação da mitocôndria, perdendo suas funções energéticas (Aldridge, 1976).

Os organoestanhos interagem não só com as proteínas de membranas, como também com proteínas intracelulares. Estas interações ocorrem na organização das moléculas protéicas entre os compostos organoestanhos e aminoácidos. A histamina, histidina e outros α aminoácidos foram encontrados ligados ao íon TBT através de seus grupos amina (Shoukry, 1993). Outro complexo enzimático intracelular que interage com o TBT é o citocromo P450, sendo que estas possuem um papel muito importante na biotransformação e toxicidade de compostos químicos orgânicos ambientais. Em vertebrados, incluindo peixe, as monoxigenases dependentes do citocromo P450 estão localizadas principalmente no retículo endoplasmático liso (REL) ou mitocôndria do fígado e outros órgãos. Eles compreendem um importante grupo de enzimas que fazem parte da fase I. Nesta fase, ocorrem reações que normalmente transformam xenobiontes lipofílicos em compostos mais solúveis em água, sendo o primeiro passo para a detoxificação e excreção, mas eles podem também produzir intermediários altamente reativos. Este sistema de enzima é de crucial importância para a transformação de xenobiontes ou substâncias exógenas e têm um grande papel no metabolismo de várias substâncias endógenas.

1.4 - Principais alterações celular causadas pelo TBT e BaP

Entre as alterações causadas pelo TBT e pelo BaP as mais observadas são: a apoptose e a necrose.

A apoptose é um processo de morte celular programada, onde o núcleo da célula tem sua cromatina alterada, tornando-se mais densa em algumas regiões próximo ao envoltório nuclear, e posteriormente tanto o núcleo como o restante das organelas citoplasmáticas são empacotadas em vesículas chamadas corpos apoptóticos. Estes corpos apoptóticos são então fagocitados pelos macrófagos não promovendo, desta forma, resposta inflamatória. No macrófago, os corpos apoptóticos serão desmontados via lisossomas e seus constituintes químicos são reutilizados (Alberts *et. al* , 1997).

A necrose é resultado do estresse causado pelo contaminante na estrutura da membrana. Esta alteração se caracteriza pela perda da seletividade da membrana provocando o inchaço das células com posterior rompimento da membrana e extravasamento do conteúdo citosólico no espaço extracelular. Tal situação pode induzir uma resposta inflamatória do organismo (Alberts *et. al* , 1997) .

1.5 - O Órgão analisado

Neste trabalho utilizaremos o rim como biomarcador. O rim, em teleósteos, é dividido em três porções, havendo diferenças morfológicas e funcionais. As três porções foram denominadas de rim anterior, médio e posterior, esses dois últimos apresentam muitas semelhanças tanto morfológica como funcional. O rim anterior é formado por tecido hemopoiético, entremeado por células cromatofílicas, que em situações de stress secretam epinefrina e norepinefrina, causando um aumento no número de açúcares, com aumento também no diâmetro dos vasos sanguíneos (Ellis e de Souza, 1974 e Zapata, 1979). Embora alguns cachos de linfócitos pareçam ocupar áreas definidas no rim de alguns teleósteos (Iwana, 1996), em geral as células linfohemopoiéticas estão dispersas por todo o estroma de células fibroblásticas reticulares e vasos sanguíneos sinusóides, ambos com capacidade fagocítica (Zapata, 1979). O rim médio é o local no qual se encontram os glomérulos, túbulos distais e proximais. O primeiro segmento do néfron é o corpúsculo renal, que é formado pelo glomérulo e cápsula de Bowman. A cápsula de Bowman possui uma camada interna, o folheto visceral que é constituído por podócitos, que são células epiteliais modificadas com prolongamentos, estas células se interdigitam com

pedicelos formando fendas de filtração, e uma camada externa ou folheto parietal da cápsula, que é denominado espaço de Bowman, no qual o filtrado produzido pelo corpúsculo renal é recebido. Há ainda outro grupo de células, que fica situado entre os capilares glomerulares, chegando a ser envoltas pelo seu endotélio, são as células mensagiais que possuem atividade fagocítica e dão suporte estrutural em locais onde não há membrana basal (Ross *et al*, 1993).

Não encontramos registros de estudos relatando o efeito do TBT, BaP e da união dos dois compostos, em peixes tropicais. Esses efeitos já foram relatados para espécies nórdicas, e torna-se interessante comparar o efeito tóxico desses compostos entre espécies nórdicas e tropicais. Essa comparação nos dois ecossistemas é importante para o desenvolvimento de modelos que possibilitem uma melhor compreensão da interferência destes compostos nos níveis de absorção, distribuição, bioacumulação e eliminação em peixes e no próprio ambiente.

2 - OBJETIVO

Este trabalho teve como objetivo estudar a nível estrutural, os efeitos tóxicos do TBT (Tributil-estanho) e BaP (benzopireno) em rim de *Salvelinus alpinus*, expostos a concentrações subletais, com o auxílio de bioensaios.

3 - MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - A ESPÉCIE UTILIZADA

A espécie utilizada foi *Salvelinus alpinus*, conhecida popularmente como truta. Esta espécie vive em ambientes de água doce, como rios e lagos, mas pode ser encontrada em regiões próximas ao litoral. Apresenta hábito carnívoro e suporta temperaturas em torno de 4°C, sendo assim melhor distribuída no Hemisfério Norte. Os estudos com a espécie nórdica foi realizado para posterior comparação com espécies tropicais.

3.2- DESIGNE EXPERIMENTAL

Foi realizado um experimento crônico no Institute des Science de la Mer de Rimouski – ISMER, Québec – Canadá, através de um convênio entre o Laboratório de Toxicologia Celular e Reprodução de Peixes do Departamento de Biologia Celular e o Departamento de Toxicologia Marinha (ISMER).

Neste experimento, foram montados cinco aquários de 250 litros, sendo mantido um sistema de circulação contínua de água nos aquários. Em cada aquário foram colocados de 50 a 60 exemplares, sendo designados como controle do controle (C/C), controle óleo, contaminados com TBT, BaP e com a composição BaP+TBT. O aquário controle do controle (C/C) continha exemplares que foram manipulados da mesma maneira que os contaminados. O que foi utilizado como controle óleo, apresentava indivíduos que recebiam injeções com óleo de milho, veículo utilizado para a contaminação. O terceiro aquário possuía indivíduos contaminados com TBT, um outro com BaP e o quinto com a composição BaP+TBT, sendo que todas as contaminações foram através de injeções intraperitoneais.

Os indivíduos foram anestesiados com MS 222 – 0,025%, pesados e contaminados a cada seis dias com injeções intraperitoneais de TBT com a concentração de 0,3mg/Kg, BaP 3mg/Kg e BaP+TBT, com a mesma concentração dos contaminantes quando aplicados individualmente diluídos em óleo de milho. Os exemplares foram alimentados 48 horas antes e 48 horas depois de cada contaminação.

No oitavo, vigésimo sexto e sexagésimo dia de experimento, 48 horas após a última contaminação foi retirada uma amostra do rim anterior e posterior de um exemplar do controle do controle (C/C), de dois do controle/ óleo e de três exemplares dos aquários contaminados com o TBT, BaP e BaP+TBT. O órgão retirado foi fixado em Bouin (Anexo 1) por 12 horas, e transportado para o laboratório de Toxicologia Celular, onde foi processado para análise estrutural.

3.3 - PREPARO PARA ANÁLISE EM MICROSCOPIA ÓPTICA

3.3.1- Desidratação

O material passou por uma desidratação, através de banhos em álcool 70%, 80% e 90% por um período de 1:30 h cada, após os banhos o material foi mantido em álcool 95% em overnight. No dia seguinte, continuou o processamento através de quatro passagens por álcool absoluto (100%) por duas (2) horas cada, e por álcool + xilol (1:1) por duas (2) horas.

3.3.2- Diafanização

Essa etapa consiste na substituição do álcool pelo xilol, já que o álcool não é miscível com a resina de inclusão (Paraplast, Sigma Co.). O material passou por três banhos de xilol, sendo que o primeiro durou 1:30 horas, o segundo 1 hora e o terceiro 20 minutos.

3.3.3- Inclusão

Esta fase teve como objetivo impregnar o material com Paraplast para possibilitar os cortes. O material passou por dois banhos de duas horas em Paraplast Plus em estufa à 58°C, seguidos da emblocagem.

3.3.4- Trimagem

A trimagem foi uma fase, onde ocorreu a retirada do excesso de Paraplast em torno do material. Os blocos de Paraplast Plus contendo o material foi aparado lateralmente, facilitando o corte e evitando a retração dos mesmos. Para realização dessa moldagem foram utilizadas uma lamparina e espátulas. Os blocos foram presos em suportes de madeira.

3.3.5- Microtomia

A microtomia foi realizada para obtenção dos cortes, para isso foi utilizado o micrótomo do Laboratório Biologia do Desenvolvimento do Departamento de Biologia Celular. Para que o Paraplast continuasse polimerizado, os blocos foram mantidos em freezer, isto foi importante para obtenção dos cortes na microtomia. A espessura dos cortes foram de 5µm. Esses cortes foram colocados sobre uma solução de albumina diluída em lâminas de vidro e foram distendidos com o auxílio de uma placa aquecedora. A albumina auxiliou na adesão dos cortes nas lâminas. Após a distensão, as lâminas foram levadas para uma estufa a 40°C por 15 minutos, para completar a adesão dos cortes na superfície das lâminas.

3.3.6 – Montagem de lâmina permanente

A montagem das lâminas permanentes foi realizada obedecendo ao seguinte protocolo de rotina do laboratório:

Desparafinização: Através de 2 banhos sucessivo de xilol, o Paraplast foi clarificado, para que o material pudesse ser corado e observado.

Hidratação: Como o material estava completamente desidratado, foi necessário hidratá-lo com uma série decrescente de álcool, isto porque os corantes geralmente são hidrossolúveis.

Coloração: Depois de hidratado o material foi corado com Hematoxilina e Eosina.

Desidratação: Após corado. O material foi desidratado em uma série crescente de álcool, para a montagem propriamente dita. Depois dos banhos de álcool, o material passa pelo xilol, pois o mesmo é miscível com a resina utilizada para montagem da lâmina e lamínula.

O protocolo que descreve com maior detalhe a técnica encontra-se no Anexo

3.4 – PREPARO PARA MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Para a análise em Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), foi realizada uma técnica recente no laboratório, a qual possibilitou a visualização tridimensional do material. Possibilitando a análise das mesmas regiões observadas em microscopia óptica. Esse material já havia sido cortado para MO e estava emblocado. Para iniciar o preparo desse material, houve a desparafinização, onde o material foi colocado juntamente com o xilol em estufa a 58°C. Após a desparafinização o material foi mantido em álcool 70% e passou por vários banhos crescentes de álcool, iniciando pelo álcool 95% por 10 minutos e álcool 100% (dois banhos) de 15 minutos. Depois desses banhos de álcool o material foi mantido no álcool 100% e levado para o Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR, onde foi realizado o ponto crítico do material, e o mesmo foi colado em suportes próprios para ser analisado e metalizados através de um banho de ouro, para posterior análise em Microscópio Eletrônico de Varredura Philips SEM – 550.

4 - RESULTADOS

Através dos resultados obtidos com este trabalho foi observado que o TBT e o BaP quando aplicados isoladamente e em associação, mostraram-se potencialmente tóxicos para o rim de *Salvelinus alpinus*.

Caracterização tecidual do material controle

A organização tecidual do rim do grupo de indivíduos controle estudados apresenta uma organização semelhante à descrita na literatura para outras espécies de teleósteos de água doce.

No rim anterior, o tecido é formado principalmente por células hematocitopoiéticas. Estas células são caracterizadas por serem, geralmente, originadas na medula e transportadas até o tecido através do sangue. Além disso, estas células possuem vida curta, sendo constantemente renovadas pela proliferação mitótica. As células hematocitopoiéticas podem se diferenciar no tecido renal, originando diferentes tipos celulares, como macrófagos e linfócitos. O macrófago é uma célula que apresenta função fagocítica com digestão de substâncias estranhas ao organismo, essa atividade pode ser observada através da forma irregular apresentada por essas células principalmente quando ativadas (Figura 1A e B). Os linfócitos foram caracterizados pela sua cromatina mais compacta, nucléolos menos visíveis e um menor volume citoplasmático (Figura 1A e B). Na região anterior do rim, pode ser identificada em algumas espécies, a glândula interrenal, a qual é caracterizada por um grupo de células de citoplasma claro, destacando-se do restante do tecido. Esta glândula possui células arredondadas, com um citoplasma pouco condensado e o núcleo geralmente acompanhando a forma da célula, apresenta pouca heterocromatina e um ou mais nucléolos distintos. A glândula interrenal, ocorre geralmente próxima a vasos sanguíneos, e tem função endogêna (Figura 2A). De acordo com Takashima *et.al* (1995) esta glândula secreta corticóides, sendo o cortisol o principal corticóide produzido pelos teleósteos.

A região caudal do rim em *Salvelinus alpinus*, assim como em outros teleósteos, apresenta características morfológicas típicas para peixes de água doce. Esta região do rim apresenta uma grande quantidade de néfrons, constituído por glomérulos e túbulos. O glomérulo é um enovelado de capilares envolvidos pela

cápsula de Bowman (Figura 3A e B), esta cápsula possui dois folhetos, um interno próximo aos capilares, e outro externo delimitando o glomérulo das células hematocitopoiéticas. Entre os dois folhetos da cápsula de Bowman existe o espaço capsular ou espaço de Bowman, o qual recebe o filtrado glomerular originado da parede dos capilares (Figura 3A e B). Os túbulos são formados por epitélio cúbico simples como pode ser observado na Figura 3A. Os glomérulos e os túbulos são responsáveis pela filtração, coleta e formação da urina.

Exposição ao TBT

Analisando a porção anterior do rim, após oito (8) dias de exposição, foi observado o aparecimento de macrófagos ativados, os quais apresentam o núcleo com forma bastante irregular (Figura 1C). No material contaminado foi encontrado células atípicas aparentemente originadas da fusão de dois ou mais macrófagos. A porção anterior do rim, após sessenta (60) dias de exposição ao TBT, apresentou alterações na estrutura da glândula interrenal. Isto pode ser observado através da desorganização da estrutura da glândula com uma diminuição nítida da quantidade de células que compõem o tecido glandular, e pela invasão de células sangüíneas preenchendo quase que toda a região deste tipo de tecido (Figura 2B).

Na região posterior do rim após sessenta (60) dias de exposição, observa-se uma hipertrofia das células que constituem o interior da estrutura glomerular, e como conseqüência ocorre uma redução do espaço de Bowman (Figuras 4A e B), alterando a função normal desta estrutura.

Exposição ao BaP

Algumas das alterações na porção anterior do rim observadas no material quando exposto ao BaP por oito (8) dias foram similares às alterações nesta mesma região do rim após oito (8) dias de exposição ao TBT. No entanto, o BaP também mostrou ser um potente agente tóxico para este órgão, uma vez que sérias alterações foram identificadas nos indivíduos expostos ao contaminante. A ativação de macrófagos foi uma alteração observada tanto no material exposto ao TBT quanto ao BaP (Figura 1B). Outra evidência do efeito tóxico do BaP na região anterior do rim, foi o aparecimento de células com núcleos picnóticos, característico

de células em processo de morte celular programada. Isto pode ser observado através da Figura 1B, onde as células apresentam núcleos com cromatina mais densa localizadas próximas, ao envoltório celular. Na região anterior do rim após sessenta (60) dias de exposição não foi observada maiores alterações, além da ativação de macrófagos.

Foi observado o aparecimento de novos néfrons na região posterior do rim após oito (8) dias de exposição ao BaP. Estas estruturas são néfrons imaturos que surgem quando o rim sofre algum tipo de stress, auxiliando na recuperação da função do órgão. A presença dos novos néfrons caracteriza o efeito tóxico deste composto para o rim. Embora não tenham sido quantificados, os novos néfrons aparecem também no material controle, mas em menor incidência, enquanto nos contaminados essa incidência foi bem maior. Através da Figura 5B pode-se observar os novos néfrons, como um tufo de células acidófilas, as quais deverão originar uma nova unidade funcional do rim.

Foi observado na região posterior do rim, após sessenta (60) dias de exposição, alterações na estrutura glomerular. Os vasos sanguíneos presentes no interior do glomérulo encontram-se mais dilatados, levando a uma conseqüente diminuição do espaço capsular, podendo ocasionar um comprometimento da função desta estrutura (Figuras 3C e D). Além disso, o surgimento de novos néfron, a presença de necrose no parênquima renal e nos glomérulos, evidenciam o potencial tóxico do BaP em *Salvelinus alpinus*. Com a necrose glomerular, observou-se uma desestruturação das células que compõem os vasos sanguíneos do interior do glomérulo (Figura 3E), destruindo completamente a estrutura em um grau mais avançado. A necrose do parênquima renal pode ser evidenciada nas Figuras 5D e E, onde observa-se a desorganização e a destruição das células parenquimais encontradas numa região próxima ao glomérulo.

Exposição a composição BaP + TBT

Analisando a composição BaP+TBT, pôde-se observar que a associação entre os dois contaminantes não provocou alterações mais sérias na região anterior do rim após oito (8) dias de exposição. A composição BaP+TBT foi responsável apenas pela ativação de macrófagos como observado também na porção anterior do rim após oito (8) dias de exposição ao TBT. Como registrado anteriormente, o surgimento de novos néfrons na região posterior do rim após oito (8) dias em

exposição ao BaP+TBT, foi também observado (Figura 6A). Na região posterior do rim após sessenta (60) dias de exposição foi evidenciada hipertrofia das células glomerulares, diminuindo o espaço de Bowman (Figuras 4C e D). Outra alteração foi o aparecimento de regiões parenquimais necrosadas (Figura 6B).

A composição BaP+TBT não apresentou o mesmo potencial tóxico descrito anteriormente para o TBT e o BaP quando aplicados isoladamente. Essa composição demonstrou diminuir os efeitos tóxicos do BaP, o qual demonstrou ser mais tóxico para o rim de *Salvelinus alpinus*, e isto pode ser observado pelas alterações encontradas no material submetido a exposição à composição BaP+TBT.

Observando todas as alterações encontradas no rim exposto ao BaP, podemos considerar que este composto apresentou o maior potencial tóxico se comparado com os efeitos do TBT e da composição BaP+TBT. Com o BaP, verificamos que este composto apresenta alterações mais drásticas e severas à estrutura do rim de *Salvelinus alpinus*.

FIGURA 1- Porção anterior do rim de *Salvelinus alpinus*, corado com Hematoxilina e Eosina, Aumento de 400X.

A-Material controle (60 dias) – Observe a presença de macrófagos ativados, com núcleo bem irregular (setas pretas), linfócitos (ponta das setas) e hemácias (* branco). **B-** Material exposto ao BaP (8 dias) apresenta células cromatofílicas, típicas do tecido renal (ponta de seta), macrófagos ativados (seta preta maior) e células com núcleo picnótico (setas pretas menores). **C-** Tecido renal após 8 dias de exposição ao TBT –Observe macrófagos ativados (seta verde).

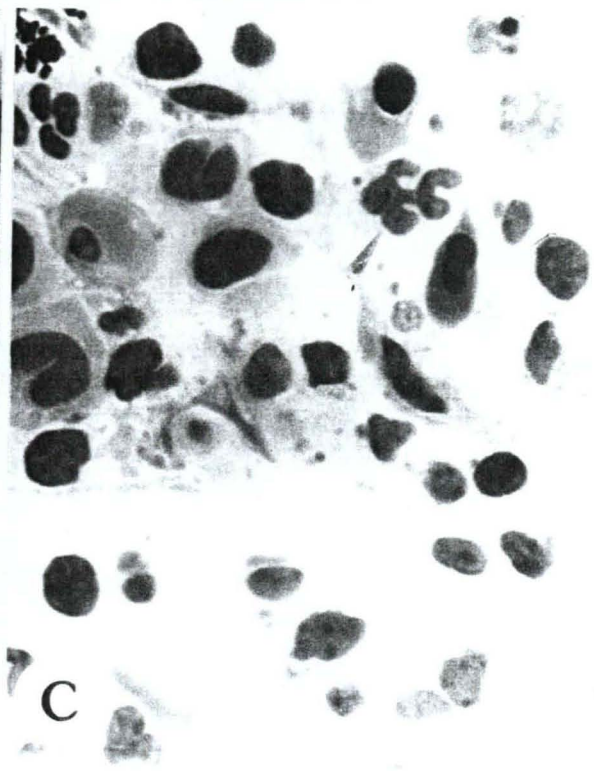
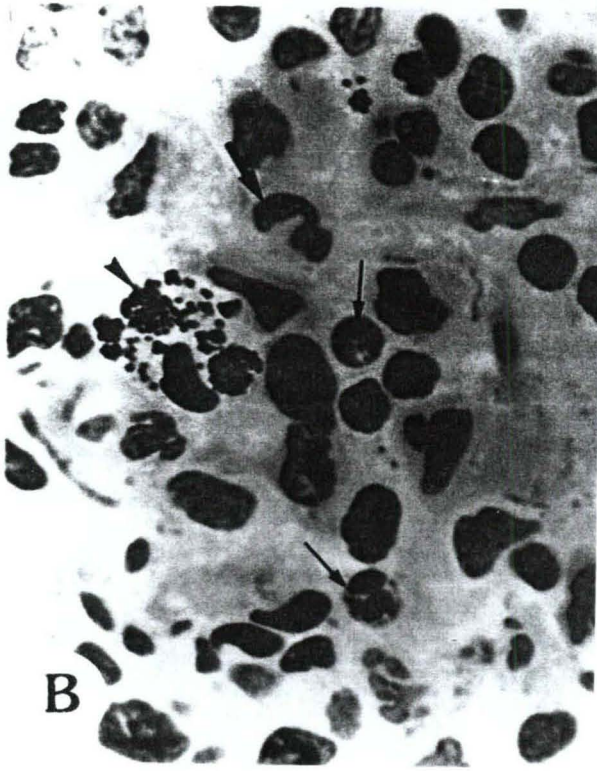
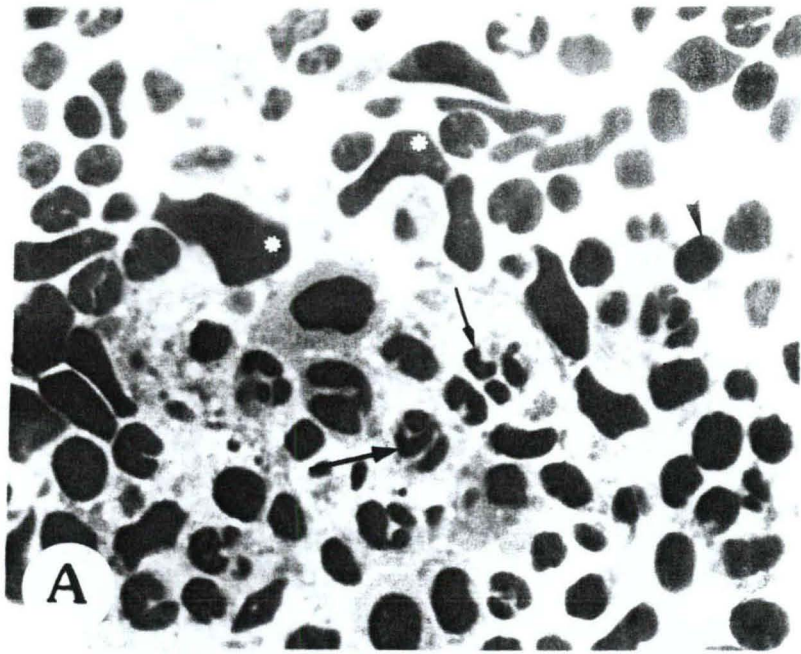


FIGURA 2- Porção anterior do rim de *Salvelinus alpinus*, corado com Hematoxilina e Eosina, Aumento 400X.

A- Material controle (8 dias) – Observe a glândula interrenal, formada por células com citoplasma pouco condensado e núcleos com um ou mais nucléolos (setas pretas), além disso, esta glândula encontra-se próxima a um vaso sanguíneo (pontas de setas). **B-** Material contaminado com TBT (60 dias). Observe a desorganização do tecido glandular (seta preta), acompanhado de uma invasão de células sanguíneas (ponta de seta) no tecido renal após 60 dias de exposição ao TBT.

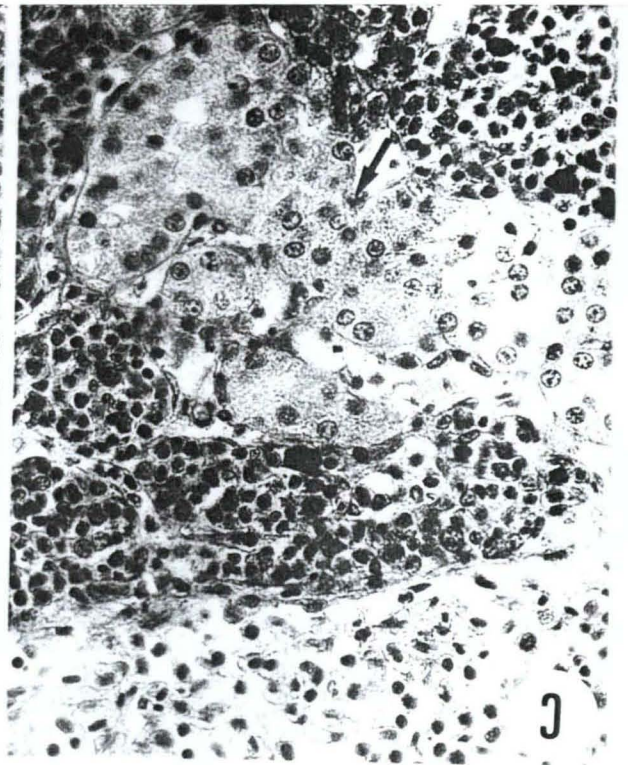
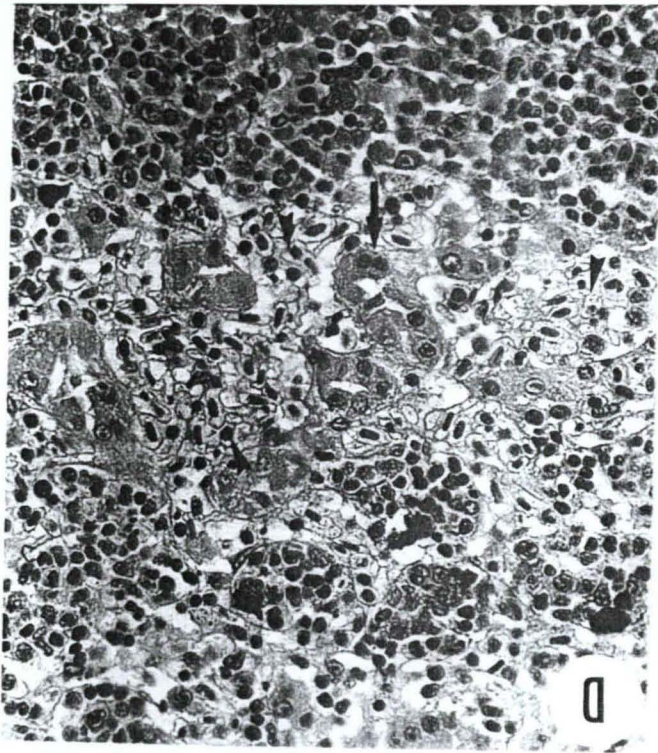


FIGURA 3- Porção posterior do rim de *Salvelinus alpinus*.

A- Material controle (8 dias), corado com Hematoxilina e Eosina, aum: 400X – Observe os túbulos renais, formado por epitélio cúbico simples (setas pretas), e a estrutura glomerular (G), apresentando o espaço glomerular bem definido (ponta de seta). **B-** Eletromicrografia de varredura do material controle (60 dias). Vista mais detalhada do glomérulo (G), mostrando o enovelado de vasos sanguíneos no seu interior e o espaço capsular bem definido (★ branca). Tarja branca= 0,1 mm. **C-** Eletromicrografia de varredura do material contaminado com BaP (60 dias). Observe o glomérulo, apresentado os vasos sanguíneos dilatados (G) e o espaço capsular alterado (★ branca). Tarja branca= 10µm. **D-** Material contaminado com BaP (60 dias) corado com hematoxilina e eosina, aum: 400X. Observe a dilatação dos vasos sanguíneos no interior do glomérulo (G) e a conseqüente alteração do espaço capsular (ponta de seta). **E-** Material contaminado com BaP (60 dias), corado com hematoxilina e eosina, Aum: 400X, mostrando a necrose glomerular (GN).

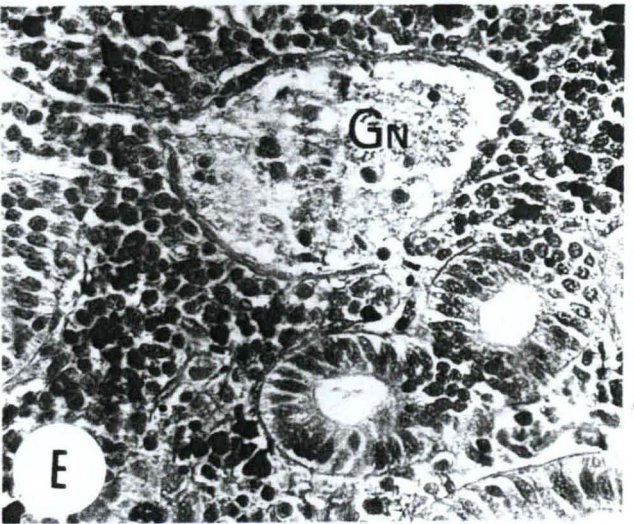
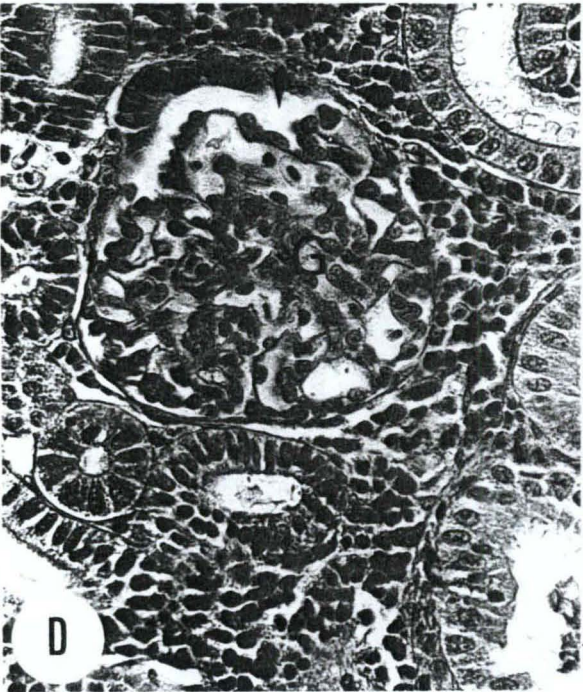
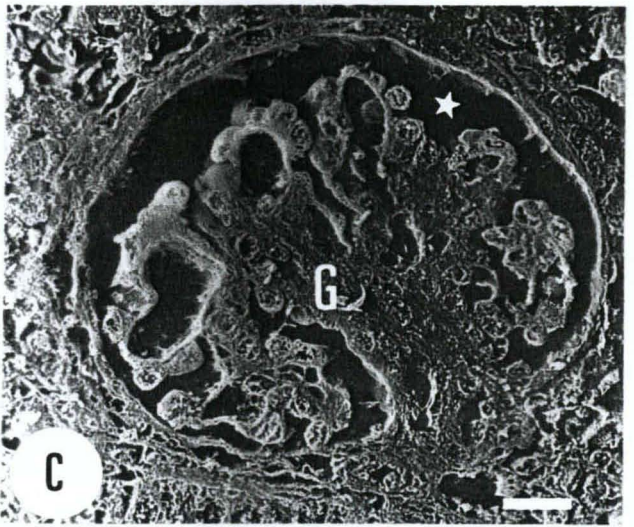
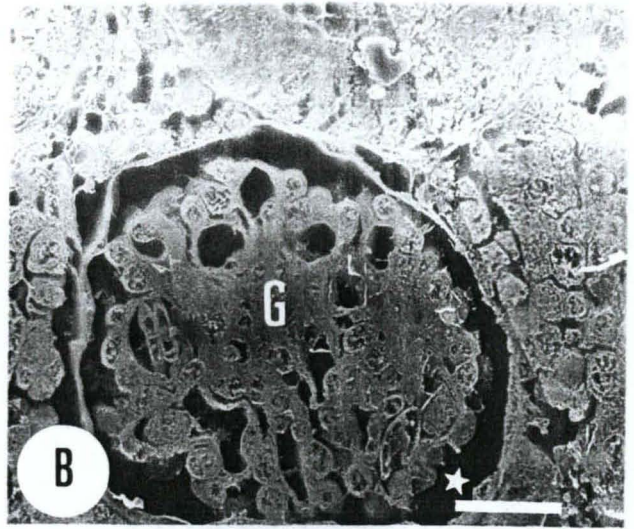
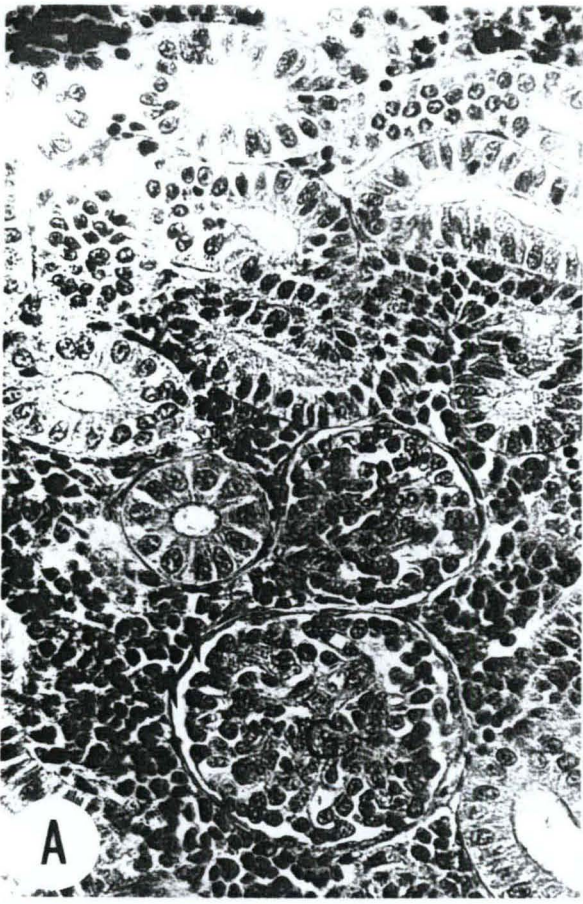


FIGURA 4- Porção posterior do rim de *Salvelinus alpinus*.

A -Material contaminado com TBT (60 dias), corado com hematoxilina e eosina, Aum: 400X, mostrando a hipertrofia glomerular (G). **B**- Eletromicrografia de varredura do material contaminado com TBT (60 dias). Observe a hipertrofia glomerular (G). Tarja branca= 10 μ m. **C**- Material contaminado com BaP+TBT (60 dias), corado com hematoxilina e eosina, Aum: 400X. Observe as células glomerulares hipertrofiadas (G) e a diminuição do espaço capsular (ponta de seta). **D**- Eletromicrografia de varredura do material contaminado com BaP+TBT. Observe em maior detalhe as células glomerulares hipertrofiadas (G) com a diminuição do espaço glomerular (seta preta). Tarja branca= 10 μ m.

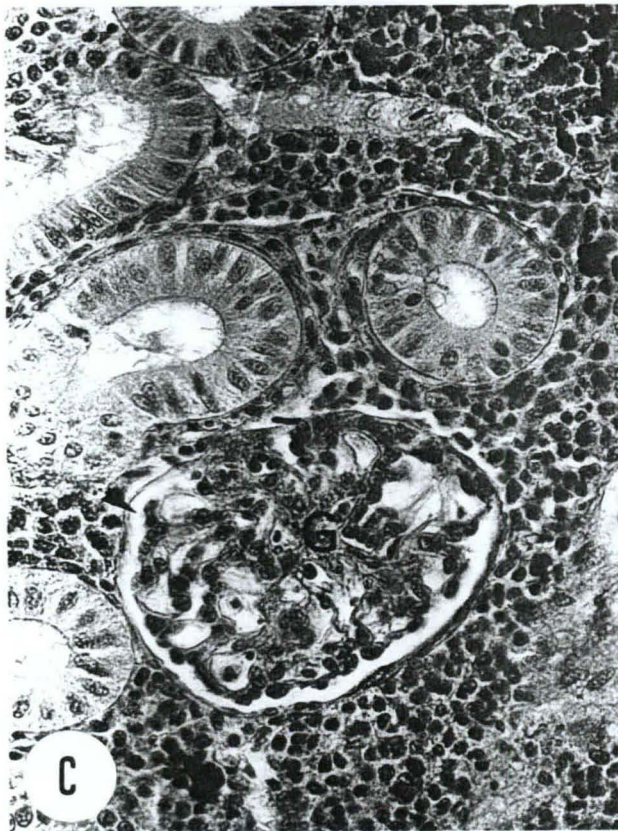
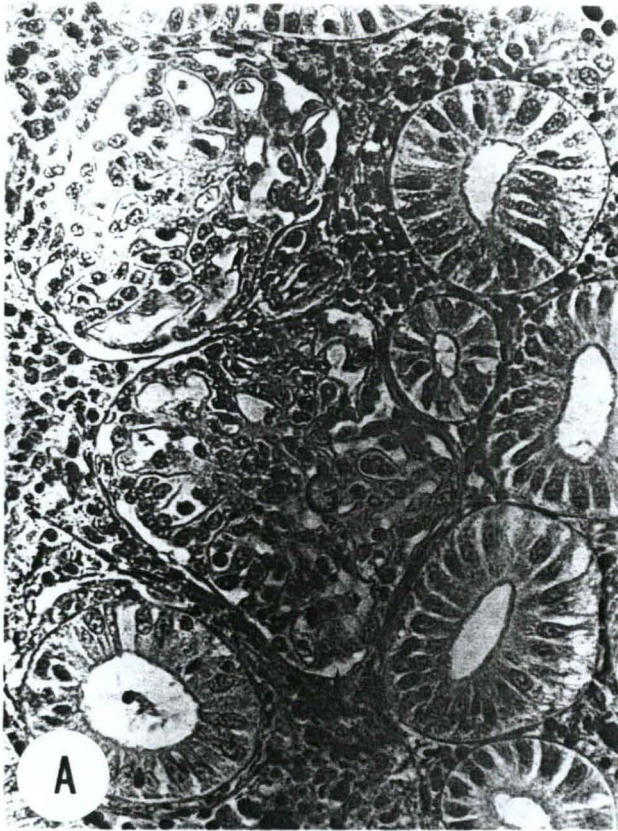


FIGURA 5- Porção posterior do rim de *Salvelinus alpinus* contaminado com BaP.

A- Eletromicrografia de varredura do material contaminado (60 dias). Observe novos néfrons (seta preta) e túbulos renais (setas pequenas). Tarja branca= 10 μ m.
B- Material contaminado (8 dias), corado com hematoxilina e eosina, Aum:400X. Observe os novos néfrons (setas pretas).
C- Material contaminado (60 dias), corado com hematoxilina e eosina, Aum:400X. Observe os túbulos renais (ponta de seta) e novos néfrons (seta preta).
D- Material contaminado (60 dias). corado com hematoxilina e eosina, Aum:400X. Observe a hipertrofia glomerular (G), com diminuição do espaço glomerular (seta preta) e necrose no tecido parenquimal (N).
E- Eletromicrografia de varredura do material contaminado (60 dias), mostrando em maior detalhe a região de hipertrofia glomerular (G) e a diminuição do espaço de Bowman (★ branca). Além disso, pode-se observar o tecido parenquimal necrosado (N). Tarja branca= 10 μ m

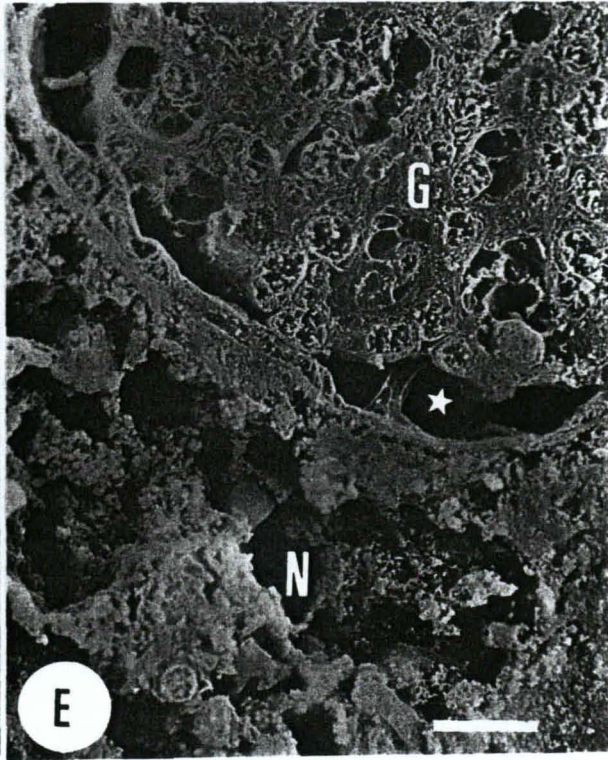
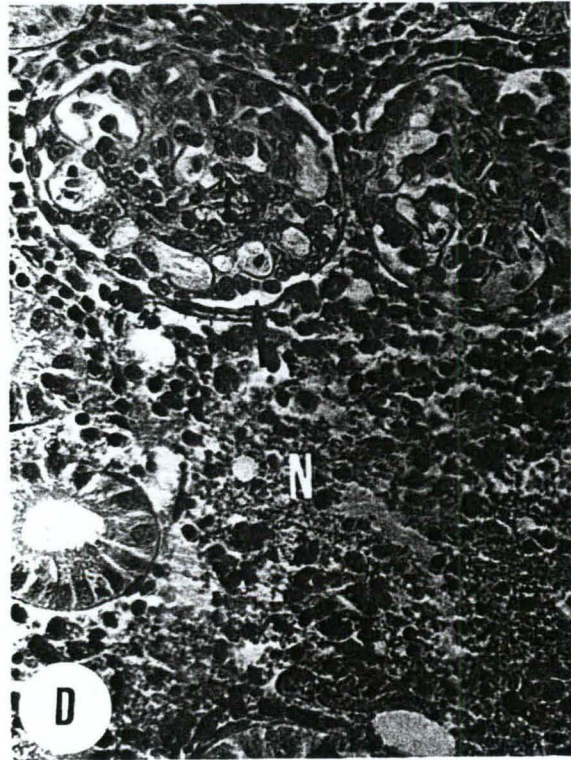
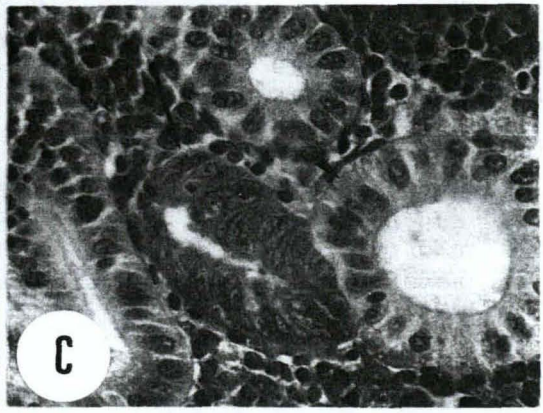
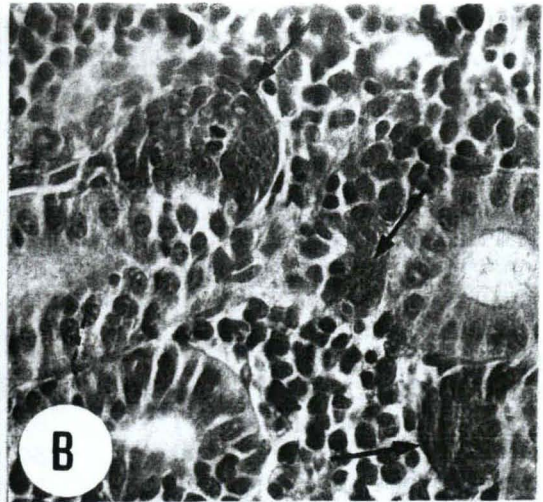
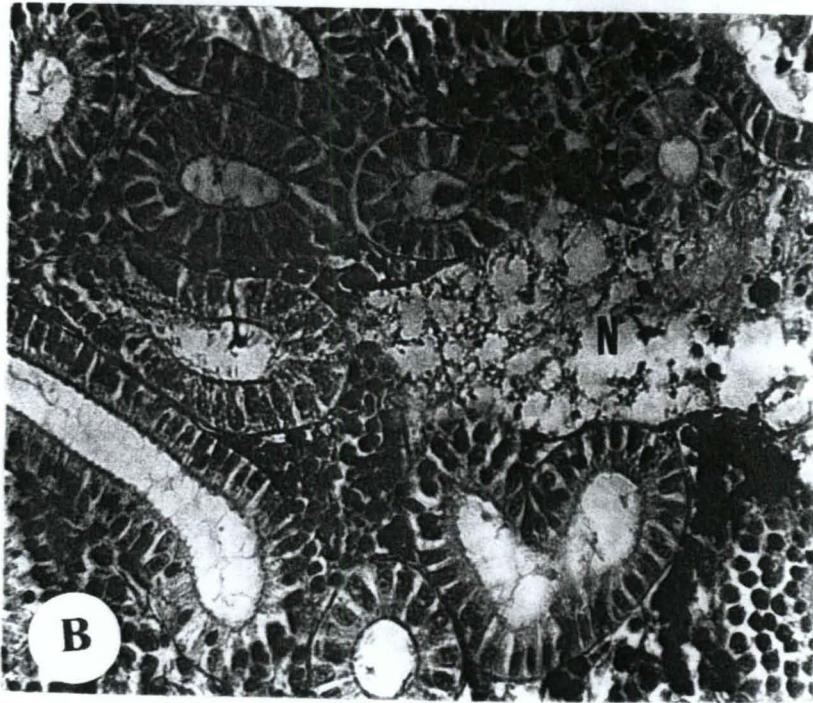
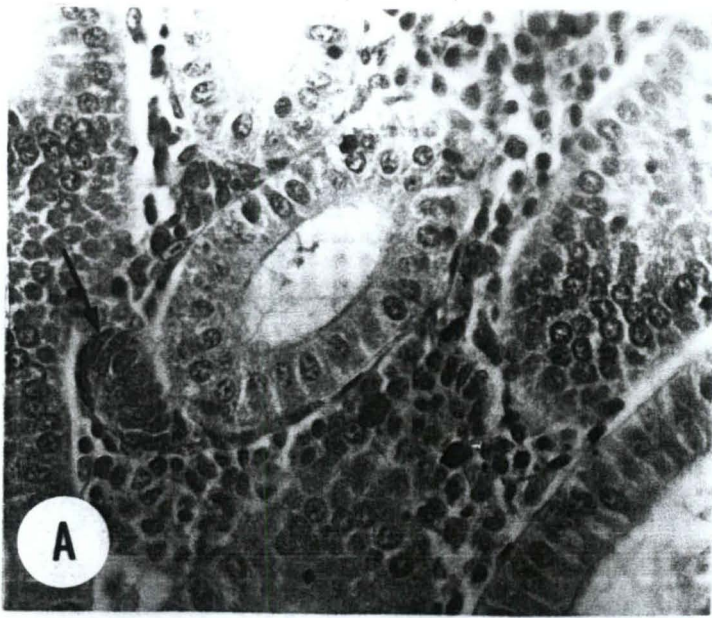


FIGURA 6 – Região posterior do rim de *Salvelinus alpinus* após exposição ao BaP+TBT, corado com hematoxilina e eosina, aumento de 400X.

A- Material contaminado (8 dias). Observe a presença de novos néfrons (seta preta). **B-** Material contaminado (60 dias) mostrando regiões necrosadas (N).



5 - DISCUSSÃO

Este trabalho foi realizado através de bioensaios, e isto foi importante para que pudéssemos nos certificar de que as alterações observadas seriam devido somente a exposição ao TBT, BaP isoladamente e à associação BaP+TBT, uma vez que os parâmetros que pudessem interferir nos resultados foram controlados. Através da utilização de bioensaios, é possível obter respostas mais precisas com relação aos efeitos dos compostos tóxicos, enquanto que no ambiente natural, torna-se inviável esse tipo de controle, devido as interferências físico-químicas próprias de cada ecossistema (Ditoro, 1991).

Não foram observadas mortalidade no experimento, mas a concentração de 2µg/Kg utilizada nas contaminações foi suficiente para causar algumas alterações, na estrutura do rim de *Salvelinus alpinus*.

Este experimento, utilizando a espécie *Salvelinus alpinus* como modelo biológico foi possível, devido ao convênio existente entre o Departamento de Biologia Celular (laboratório de Toxicologia Celular e Reprodução de Peixes) e o Instituto de Ciências do Mar (ISMER) (Laboratório de Toxicologia Marinha) de Rimouski (Québec-Canadá). Este convênio tem como seu principal objetivo realizar um estudo comparativo do efeito tóxico de metais pesados entre espécies aquáticas tropicais e nórdicas.

O mecanismo de ação tóxica do TBT e do BaP no rim de *Salvelinus alpinus* pode ser amplificado, uma vez que ambos são biotransformados no complexo citocromo P450. Este complexo enzimático existente no fígado de teleósteos o qual pode ser parcialmente inibido na presença de TBT, alterando assim o seu próprio metabolismo e o de outros contaminantes, como demonstrado para o BaP (Fent e Stegeman, 1993 e Fent,1994) neste trabalho. Isto permite que tais compostos circulem por mais tempo no organismo favorecendo o aparecimento de subprodutos, aumentando o potencial tóxico para outros tecidos.

A presença de macrófagos no material controle é justificada pela atividade fagocítica da porção anterior do tecido renal, mas o aumento dessas células no material contaminado deve-se ao stress causado pelos contaminantes. Os linfócitos observados no material controle fazem parte da constituição do tecido renal, mas segundo Iwama (1996) esses linfócitos ocupam áreas definidas no tecido renal de

alguns teleósteos e não necessariamente encontram-se espalhados pelo tecido do órgão.

As alterações observadas na estrutura da glândula interrenal pode significar um comprometimento da produção de cortisol na espécie estudada. Este corticóide é importante para adaptação dos teleósteos à água do mar, e na manutenção do seu equilíbrio na coluna d'água. Além disso as alterações na expressão do cortisol pode também ser considerada como um indicador molecular de resposta ao stress químico (Takashima *et al.*, 1995). Sendo assim, pode-se considerar que o TBT estaria interferindo com as respostas adaptativas de algumas espécies de teleósteos, podendo comprometer a permanência destas espécies nos ambientes contaminados por este tipo de contaminante.

A hipertrofia das células que compõem o interior da estrutura glomerular observada no rim exposto ao TBT e a composição BaP+TBT, assim como a dilatação dos vasos sanguíneos que compõem a mesma estrutura na porção posterior do rim exposto ao BaP, pode implicar em um comprometimento da função renal. Estas alterações no glomérulo estaria dificultando o processo de filtração do sangue e o escoamento do filtrado em direção aos próximos segmentos do néfron.

O aparecimento de novos néfrons com maior incidência no rim contaminado com BaP e a composição BaP+TBT, confirma o efeito tóxico destes contaminantes para o tecido renal. A presença destas estruturas caracterizam uma resposta do tecido na tentativa de estabelecer um equilíbrio na função do órgão.

As células com núcleos picnóticos observados no rim contaminado com BaP, é uma evidência de que estaria ocorrendo morte celular por apoptose. No entanto, não é possível afirmar a ocorrência de células apoptóticas, no rim de *Salvelinus alpinus*, uma vez que não foi realizado nenhum teste mais específico, para afirmar a ocorrência desse fenômeno. A necrose descrita no parênquima e no glomérulo, principalmente no material contaminado com BaP e na composição BaP+TBT, demonstra mais uma vez o potencial tóxico destes compostos. A necrose é uma resposta do stress causado pelo contaminante e esta alteração se caracteriza por alterações na membrana e perda da função da mesma, ocorrendo o inchaço das células com o posterior extravasamento do conteúdo citosólico no espaço extracelular, induzindo uma resposta inflamatória do organismo (Alberts *et. al.*, 1997).

O material contaminado com a composição BaP+TBT apresentou menos alterações que o material contaminado com o BaP e o TBT, quando aplicados isoladamente. Através dos estudos mostrando a interação entre o BaP e o TBT,

Padrós *et al.*(2000) sugerem que o TBT antagoniza o metabolismo e a bioativação do BaP pela inibição do citocromo P450. Os mesmos autores chegaram a essa conclusão após estudarem a atividade de algumas enzimas que fazem parte do complexo P450, com a quantificação dos metabólitos derivados da biotransformação do TBT e do BaP. Acredita-se que o TBT inibe a bioativação do BaP, uma vez que este composto é metabolizado no complexo P450, e parte dos seus metabólitos é excretado via bile. Um dos metabólitos formado pela biotransformação do BaP é o Bap-epoxy-diol que apresenta um potencial tóxico maior que o do próprio BaP. Padrós *et al* (2000) também concluiu em seu trabalho, que a presença do BaP estimulou o metabolismo do TBT, e isto foi evidenciado pelos altos níveis do metabólito DBT (di-butil-estanho) na bile. É hipotetizado neste trabalho que o BaP poderia estar induzindo o complexo P450 envolvido no metabolismo do TBT, mas esta hipótese não pôde ser comprovada.

Alguns estudos relacionados com os efeitos causados pelo BaP e pelo TBT já foram realizados, mas ainda existem muitos passos desconhecidos no mecanismo tóxico destes compostos que precisam ser melhor elucidados. Este trabalho lança uma nova questão aos estudos de toxicologia: - uma vez que no ambiente existem vários compostos atuando em conjunto, não seria o momento de serem realizados estudos em laboratório, que permitissem entender os efeitos sinérgicos ou antagônicos de diferentes contaminantes sobre a estrutura celular?

6 - CONCLUSÕES

- Neste trabalho foi evidenciado o potencial tóxico do TBT e do BaP na estrutura do rim de *Salvelinus alpinus* comprometendo suas funções vitais.
- A concentração de 2 μ g/Kg de cada contaminante utilizada no experimento foi o suficiente para causar diversas alterações, possibilitando a observação do potencial tóxico dos mesmos.
- O rim demonstrou ser um importante órgão alvo à ação tóxica do TBT e do BaP, devido as diversas alterações encontradas neste órgão.
- O TBT na concentração testada, é altamente tóxico para a espécie estudada.
- Dentre os contaminantes estudados, o BaP quando aplicado isoladamente, foi o composto que mais causou alterações na estrutura do rim de *Salvelinus alpinus*.
- As poucas alterações evidenciadas no material exposto pela composição BaP+TBT nos levou a concluir que o TBT inibe a ação tóxica do BaP pela inativação do citocromo P450.

7 - PERSPECTIVAS FUTURAS

Além das conclusões obtidas, este trabalho levantou algumas questões que merecem uma investigação. A inibição do potencial tóxico do BaP e do TBT quando aplicados conjuntamente é uma questão que foi primeiramente discutida neste trabalho, mas que ainda necessita avançar com o intuito de obter mais dados que possam dar suporte a uma afirmativa mais precisa. A ação destes compostos em peixes nórdicos abre uma questão relacionada à ação do BaP e do TBT e outros contaminantes em peixes tropicais. Os estudos comparativos destes contaminantes em laboratório podem auxiliar o entendimento dos mecanismos tóxicos destes compostos nos ambientes naturais.

ANEXO – MICROSCOPIA ÓPTICA

ANEXO 1

- Preparo de fixador – Bouin

Para 100mL de Bouin: 75 mL de solução saturada de Ácido pícrico.

25 mL de formol.

5 ml de Ácido acético (adicionar apenas momentos antes da utilização).

ANEXO 2

- Coloração – Hematoxilina e Eosina

Diapfanização

Xilol 1 – 5 min

Xilol 2 – 5 min

Hidratação

Álcool 100% - 5 min

Álcool 90% - 5 min

Álcool 70% - 5 min

Água destilada – lavar

Coloração

Hematoxilina – 1min 30 Seg

Água corrente – 5min

Eosina – 4 min e 30 Seg

Água lavar

Desidratação

Álcool 70% - lavar

Álcool 90% - 1 min

Álcool 100% - 5 min

Álcool 100% - 5 min

Montagem

Xilol 1 – 5 min

Xilol 2 – 5min

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERTS, B., BRAY, D., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., WATSON, J. (1997). **Biologia Molecular da Célula**. 3^a ed. Porto Alegre.
- ALDRIDGE, W. N. (1976). **The influence of organotin compounds on mitochondrial function**, *Adv. Chem. Ser.*, 157, 186.
- ALDRIDGE, W. N. and STREET, B. W. (1964). **Oxidative phosphorylation: biochemical effects and properties of trialkyltins**, *Biochem. J.*, 91, 287.
- ALDRIDGE, W. N., CASIDA, J. E., FISH, R. H. KIMMEL, E. C., and STREET, B. W. (1977). **Action on mitochondrial and toxicity of metabolites of tri-n-butyltin derivatives**, *Biochem. Pharmacol.*, 26, 1997.
- BLUNDEN, S. J. and CHAPMAN, A. (1986). **Organotin compounds in the Environment**, in **Organometallic Compounds in the Environment – Principles and Reactions**, Craig, P. J., Ed., Longman, London, 111.
- CORNNETON, I. F. and GRIFFITH, D. E. (1989). **Organotin compounds as energy-potentiaded uncouplers of rat liver mitochondria**, *Appl. Organomet. Chem.*, 3, 545.
- DAY, K. E. (1991). **Effects of dissolved organic carbon on accumulation and acute toxicity of fenvalerate, deltamethrin and cyhalothrin to *Daphnia magna* (Straus)**, *Environ. Toxicol. Chem.*, 10, 91.
- DITORO, D. M., ZARBA, C. S., HANSEN, D. J., BERRY, W. J., SWATZ, R. C., COWAN, C. E., PAVLON, S. P., ALLEN, H. E., THOMAS, N. A. AND PAQUIN, P. R. (1991). **Technical basis for establishing sediment**

quality criteria for organic chemicals using equilibrium partitioning.
Environ. Toxicol. Chem. 10:1541.

- ELLIS, A. E., e de SOUZA, M. (1974). **Phylogeny of the Linfoid System. I. A study of the fate of circulating lymphocytes in place.** *Eur. J. Immunol.* 4, 338-343.
- FENT, F.; **Organotins in municipal wastewater and sewage sludge, in Organotins: Fate and Effect in the Environment**, Champ, M. A. and Seligman, P. F.; Eds., Chapman and Hall, London 1995.
- FENT, K. & BUCHELI, D. (1994). **Inhibition of hepatic microsomal monooxygenase system by organotins in vitro in fish.** *Aquat Toxicol.* 28: 107-126.
- FENT, K. & STEGMAN, J.J. (1993). **Effects of tributyltin in vivo on hepatic cytochrome P450 forms in marine fish.** *Aquat Toxicol.* 24: 219-240.
- GUARD, H.E., COBET, A.B., and COLEMAN, W. M., III. (1981) **Methylation of trimethyltin compounds by estuarine sediments**, *Science*, 213, 770.
- IWAMA, G. and NAKANISHI, T (1996). **Cells and tissues of the immune system of fish. In: The Fish Immune System: Organism, Pathogen and Environment.** San Diego. Academic Press.
- LAUGHLIN, R.B., FRENCH, W., GUARD, H., and BRINKMAN, F.E. (1985). **Structure – activity relationships for organotin compounds**, *Environ. Toxicol. Chem.*, 4, 343.
- LEVERSEE, G. J., LANDRUM, P. F., GIESY, J. P., and FANNIN, T. (1983). **Humic acids reduce bioaccumulation of some polycyclic aromatic hydrocarbons**, *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 40 (suppl. 2), 63.

- MAGUIRE, R. J., CHAU, Y. K., BENGERT, G. A., HALE, E. J., WONG, P. T. S., and KRAMAR, O. (1982). **Occurrence of organotin compounds in Ontario lakes and rivers**, *Environ. Sci. Technol.*, 16,698.

- MCCARTHY, J. F., JIMENEZ, B. D., and BARBEE, T. (1985).**Effect of dissolved humic material on accumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons: structure-activity relationships**, *Aquat. Toxicol.*, 7, 15.

- MEADOR, J. P. (1991). **The interaction of pH, dissolved organic carbon and total copper in the determination of ionic copper and toxicity**, *Aquat. Toxicol.*, 19, 13.

- MERCIER, A., PELLETIER, E., and HAMEL, J. F. (1994). **Metabolism and subtle toxic effects of butyltin compounds in starfish**, *Aquat. Toxicol.*, 28, 259.

- MOREL, F. M. M. and MOREL –LAURENS, N. M. L. (1983). **Trace metals and plankton in the oceans; facts and speculation**, in *Trace Metals in Sea Water*, Wong, C. S., Boyle, E., Bruland, K. W., Burton, J. D., and Goldberg, E. D., Eds., Plenum Press, New York, 841.

- PADRÓS, J.(1997). **Mécanismes biochimiques et effets des interactions benzo(a)pyrène – tributylétain chez le poisson**. Québec, Rimousky,.1, 2, 3.

- PADRÓS, J., PELLETIER, E., READER, S. AND DENIZEAU, F. (2000). **Mutual in vivo interactions between benzo(a)pyrene and tributyltin in brook trout (*Salvelinus fontinalis*)**. *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol 19, N° 4, pp 1019-1027.

- ROSS, M. H., REITH, E.J., ROMRELL, L. J., (1993). **Histologia: texto e atlas**. São Paulo: Panamericano.

- SELIGMAN, P. F., GROVHOUG, J. G., VALKIRS, A. O., STANG, P. M., FRANSHAM, R., STALLARD, M. O., DAVIDSON, B., AND LEE, R. F.

- (1989). **Distribution and fate of tributyltin in the United States marine environment**, *Appl. Organomet. Chem.*, 3, 31.
- SHOUKRY, M. M. (1993). **Equilibrium study of tributyltin (IV) complexes with amino acids and related compounds**, *Bull. Soc. Chim. Fr.*, 130, 117.
 - SUNDA, W. G., ENGEL, D. W., and THUOTTE, R. M. (1978). **Effect of chemical speciation on toxicity of cadmium to grass shrimp *Palaemonetes pugio*: importance of free cadmium ion**, *Environ. Sci. Technol.*, 12, 409.
 - TAKASHIMA, F., HIBUJA, T. (1995). **An Atlas of Fish Histology – Normal and Patological Features**. 2^a ed., Tokio.
 - ZAPATA, A.G. (1981). **Lymphoid organs of teleost fish II. Ultrastructure of renal lymphoid tissue of *Rutilus rutilus* and *Gobio gobio***. *Dev. Comp. Immunol.* 5, 685-690.
 - ZUCKERMAN, J.J., REISDORF, R. R., ELLIS, H. V., and WILKINSON, R. R. (1978). **Organotins in biology and the environment, in Organometals and Organometalloids, Occurrence and Fate in the Environment**, Brinckman, F. E. and Bellama, J. M., Eds., American Chemical Society, Washington, D. C., 388.
 - WHO, **Tributyltin Compounds**, World Health Organization, Geneva, 1990, 273.
 - WHO. (1980). **Tin and Organotin Compounds**, World Health Organization, Geneva. 1980, 109.