

ANNA LÚCIA COSTA DE MIRANDA

**BIOACUMULAÇÃO DE POLUENTES ORGANOPERSISTENTES  
(POPs) EM TRAÍRA (*Hoplias malabaricus*) E SEUS EFEITOS *IN  
VITRO* EM CÉLULAS DO SISTEMA IMUNE DE CARPA (*Cyprinus  
carpio*)**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de mestre em Biologia Celular e Molecular, do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, Departamento de Biologia Celular, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

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

Colaboradores:  
Prof. Dr. Manoel Lima de Menezes (Unesp-Baurú)  
Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Hélène Roche (Université Paris Sud XI - França)  
Prof. Dr. Stéphane Betoulle (Université de Reims - França)

Curitiba  
2006

## **AGRADECIMENTOS**

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus, que nas horas mais difíceis esteve sempre por perto.

Agradeço enormemente aos meus pais, que se não fossem eles nunca teria tido coragem e a oportunidade de poder realizar este sonho.

Agradeço a minha filha Fernanda, que soube compreender, mesmo com tão pouca idade, a falta da mãe nos momentos mais importantes da vida dela.

Agradeço Universidade Federal do Paraná e ao CNPq que possibilitaram o desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Ciro Alberto Oliveira Ribeiro, por ter me dado um voto de confiança e por ter agüentado todas as vezes que chorei no seu escritório.

Agradeço ao Prof. Msc. Marco Randi, pela paciência e a dedicação com meus dados estatísticos.

É com muita alegria que agradeço aos professores que foram meus colaboradores e que fizeram com que este trabalho fosse realizado:

Prof. Dr. Roberto Artoni, pelo apoio logístico para as coletas. Ao colega e companheiro de coleta Marcelo Vicari e ao técnico do laboratório Miguel.

Prof. Dr. Manoel Lima de Menezes por me acolher em seu laboratório e em sua casa e me ajudar a fazer o preparo das minhas amostras.

Prof. Dra. Hélène Roche por abrir as portas do seu laboratório na Universidade de Paris XI, por me proporcionar à chance de realizar parte do meu mestrado fora do país e pela confiança que me depositou.

Prof. Dr. Stéphane Betoulle, o qual além de me orientar, foi um grande amigo e com quem eu pude contar até nas horas mais difíceis, quando estava longe de casa.

Agradeço aos meus colegas de laboratório, Francisco (Chico) e Fabíola por terem dedicado parte do tempo pra me ensinar quase tudo, Daniel pela colaboração, Grazyelle pelo apoio moral e por agüentar o meu mau humor. E também a todos os outros colegas.

Gostaria de agradecer aos membros do Rotary Club de Orsay e de Reims, por terem me acolhido em suas casas, por terem me proporcionado uma estadia maravilhosa na França e que se não fosse à ajuda deles este trabalho não teria se realizado.

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	1
1.1.	COMPOSTOS ORGANOCLORADOS.....	2
1.2.	PESTICIDAS ORGANOCLORADOS, HCB E BIFENIS POLI CLORADOS..	3
1.3.	BIOMONITORAMENTO DE POPs NO BRASIL E NO MUNDO.....	6
1.4.	SISTEMA IMUNE DOS PEIXES.....	8
1.4.1	Macrófagos e fagocitose .....	8
1.5.	IMUNOTOXICOLOGIA.....	9
<b>2.</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	12
2.1.	OBJETIVO GERAL.....	12
2.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	12
<b>3.</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	13
3.1.	MODELO EXPERIMENTAL E ÁREA DE ESTUDO.....	13
3.2.	EXTRAÇÃO DE POLUENTES ORGANOPERSISTENTES E METABÓLITOS.....	15
3.3.	LIPÍDIOS TOTAIS, PROTEÍNAS E GLICOGÊNIO.....	17
3.4.	PROCEDIMENTO PARA MICROSCOPIA DE LUZ.....	17
3.5.	MODELO EXPERIMENTAL PARA ANÁLISES IMUNOLÓGICAS.....	18
3.6.	ISOLAMENTO DAS CÉLULAS DO SISTEMA IMUNE.....	18
3.6.1.	Macrófagos de rim anterior de <i>Cyprinus carpio</i> .....	18
3.7.	TESTE DO NBT (NITRO BLUE TETRAZOLIUM).....	19
3.8.	MEDIDA DA ATIVIDADE FAGOCÍTICA ATRAVÉS DE ESFERAS FLUORESCENTES.....	20
3.8.1.	Isolamento das células fagocíticas do sangue periférico de carpa ( <i>Cyprinus carpio</i> ).....	20
3.8.2.	Isolamento das células fagocíticas do rim anterior de carpa ( <i>Cyprinus carpio</i> ).....	21
3.8.3.	Incubação das células com as esferas fluorescentes.....	21
3.9.	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	22

<b>4.</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	23
4.1.	ANÁLISES QUÍMICAS.....	23
4.2.	RESULTADOS DAS DOSAGENS DE PROTEÍNAS, GLICOGÊNIO E LIPÍDIOS TOTAIS.....	30
4.3.	RESULTADOS DAS AVALIAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS DE FÍGADO DE <i>Hoplias malabaricus</i> .....	31
4.4.	TESTES DA PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DO OXIGÊNIO PELO MÉTODO DO NBT.....	34
4.5.	TESTE DA ATIVIDADE FAGOCÍTICA PELO ENSAIO DE FLUORESCÊNCIA.....	36
<b>5.</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	37
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	48
<b>7.</b>	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	49

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 -	FOTO DE <i>Hoplias malabaricus</i> .....	13
FIGURA 2 -	FOTO DO MAPA DA REGIÃO E DA LAGOA DE COLETA.....	15
FIGURA 3 -	FOTO DA SERINGA DE AÇO INOX.....	16
FIGURA 4 -	GRÁFICO DA CONCENTRAÇÃO DE ORGANOCLOREDOS EM FÍGADO DE <i>Hoplias malabaricus</i> .....	27
FIGURA 5 -	GRÁFICO DA CONCENTRAÇÃO DE ORGANOCLOREDOS EM MÚSCULO DE <i>Hoplias malabaricus</i> .....	28
FIGURA 6 -	GRÁFICO DA CONCENTRAÇÃO DE HCB, PCBs E DDT EM FÍGADO DE <i>Hoplias malabaricus</i> .....	29
FIGURA 7 -	GRÁFICO DA CONCENTRAÇÃO DE HCB, PCBs E DDT EM MÚSCULO DE <i>Hoplias malabaricus</i> .....	29
FIGURA 8 -	GRÁFICO DA DISTRIBUIÇÃO DE PROTEÍNA, GLICOGÊNIO E LIPÍDIOS TOTAIS EM FÍGADO DE <i>Hoplias malabaricus</i> .....	30
FIGURA 9 -	GRÁFICO DA DISTRIBUIÇÃO DE PROTEÍNA, GLICOGÊNIO E LIPÍDIOS TOTAIS EM MÚSCULO DE <i>Hoplias malabaricus</i>	30
FIGURA 10 -	CORTE HISTOLÓGICO DE FÍGADO DE <i>Hoplias malabaricus</i>	32
FIGURA 11 -	CORTE HISTOLÓGICO DE FÍGADO DE <i>Hoplias malabaricus</i>	33
FIGURA 12 -	GRÁFICO DA AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DAS ESPÉCIES REATIVAS DO OXIGÊNIO ATRAVÉS DO TESTE DE NBT.....	35
FIGURA 13 -	GRÁFICO DA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE FAGOCÍTICA ATRAVÉS DO ENSAIO DE FLUORESCÊNCIA.....	36

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 -	CONCENTRAÇÕES INDIVIDUAIS DE ORGANOCLOREDOS	24
TABELA 2 -	PERFIL DE CONTAMINAÇÃO POR PCBs.....	25
TABELA 3 -	BIOACUMULAÇÃO DE HCB, DDT E SEUS METABÓLITOS..	26

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

PCBs – bifenis policlorados  
MMC – centro de melanomacrófagos  
MM – melanomacrófagos  
DDT – 2,2 – bis (p- clorofenil) – 1,1, - dicloroetano  
pH – potencial hidrogeniônico  
O<sub>2</sub> - oxigênio  
CO<sub>2</sub> – gás carbônico  
PAHs – hidrocarbonetos policíclicos aromáticos  
PCDDs – dibenzodioxinas policloradas  
PCDFs – dibenzofuranos policlorados  
POPs – poluentes organopersistentes  
HCB – hexacloro benzeno  
OCs- compostos organoclorados – pesticidas organoclorados  
TNF- $\alpha$  - Fator de necrose tumoral alfa  
O<sub>2</sub><sup>•-</sup> - ânion superóxido  
NOS – óxido nítrico sintase  
NADPH oxidase - Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase  
NO – óxido nítrico  
OH<sup>•</sup> – radical hidroxila  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – peróxido de hidrogênio  
<sup>1</sup>O<sub>2</sub> – oxigênio singlete  
NBT – nitro blue tetrazolium  
v/v – volume/volume  
g – gramas  
ml – mililitros  
 $\mu$ m – micrômetro  
°C – graus Celsius  
SPE – solid phase extraction  
EPA – Environmental Protection Agency  
MgO<sub>3</sub>Si – silicato de magnésio – FLORISIL

## RESUMO

Nas últimas décadas, PCBs e compostos organoclorados foram produzidos e usados em todo o mundo. Devido a algumas características como persistência no ambiente, lipossolubilidade, bioacumulação, biomagnificação e efeitos adversos em animais selvagens e em populações humanas, estes produtos químicos foram proibidos nos anos 70 em países desenvolvidos e na década de 80 no Brasil. Para avaliar o impacto de PCBs e de compostos organoclorados em peixes da espécie *Hoplias malabaricus* (traíra) do lago de Ponta Grossa, sul do Brasil, este trabalho investigou a presença destes produtos químicos acumulados no tecido gorduroso de fígado e músculo, as reservas energéticas (lipídeos totais, proteínas, glicogênio) nos mesmos órgãos, a histopatologia do fígado e alguns aspectos imunológicos *in vitro*. Vinte e seis moléculas de compostos organoclorados foram investigadas em 10 indivíduos, bem como os congêneres de PCBs no fígado e no músculo de traíra. Os indivíduos apresentaram alterações fisiológicas, lesões do fígado como fibroses tissulares, infiltração de leucócitos e necroses, não houve ocorrência de MMC (centro dos melanomacrófagos) e MM (melanomacrófagos). A ausência dos melanomacrófagos nestes indivíduos pode estar relacionada com as concentrações elevadas de compostos organoclorados neste órgão tais como: dicloroanilina, simazina, alaclor, diuron e aldrin. Estes achados confirmam os efeitos imunossupressores de compostos organoclorados. A análise química em órgãos-alvo dos indivíduos expostos cronicamente nas áreas afetadas por poluentes, ajuda e valida a compreensão sobre os efeitos mensurados, constituindo a informação essencial para relacionar os danos com a presença dos poluentes. Com a análise *in vitro* pôde-se comprovar os efeitos destes compostos organoclorados acumulados na gordura sobre as células do sistema imune de peixes quando disponibilizados fisiologicamente. Os extratos contendo as 26 moléculas de organoclorados em diferentes concentrações foram testados sobre as células do sistema imune de *Cyprinus carpio* (carpa) com a intenção de verificar possíveis modulações ocasionadas por estas misturas complexas. Os resultados demonstraram que estas moléculas possuem uma atividade imunomodulatória sobre a atividade lítica dos macrófagos. No entanto, estudos mais detalhados destes compostos devem ser realizados, para que se entenda melhor sua atuação sinérgica ou antagônica nos processos celulares imunológicos. Este trabalho mostrou também a necessidade em realizar este tipo de estudo nos corpos d'água no Brasil, onde os estudos são escassos e muito pouco se conhece quanto ao potencial tóxico para as espécies nativas ou para a população humana

## ABSTRACT

In the last decades PCBs and organochlorine compounds were produced and largely used in almost all countries. Due to their persistence, bioaccumulation, and adverse effects on wildlife and human population, both the production and use of these chemicals were banned in the early 1970s in developed countries and in 1980s in Brazil. In order to assess the impact of PCBs and Organochlorine compounds in fish *Hoplias malabaricus* (trahira) from Ponta Grossa lake, South of Brazil, the present work was focused on chemical analyzes, energetic budget (lipid, proteins, glycogen), histopathological and *in vitro* immunological analyzes. Twenty six molecules of organochlorine compounds plus isomers and metabolites were investigated in 10 individuals, both in liver and muscle of trahira. Individuals presented physiological alterations, liver lesions like fibrosis tissular, necrosis and leukocytes infiltration without occurrence of MMC (melanomacrophages center) and MM (melanomacrophages). The absence of melanomacrophages in these individuals may be related with the high concentrations of organochlorine compounds in this organ such as: dichloroaniline, simazine, alachlor, diuron and aldrin. These findings confirm the reported immunosuppression role of organochlorine compounds. According to the present work these compounds present in Ponta Grossa Lake are bioavailable, cause damages in target organs and disturbs in the immune system of trahira. The chemical analysis in target organs of individuals exposed chronically in areas affected by pollutants, help and validate the understanding about the measured effects, constituting essential information to relate the damages with the presence of pollutants. The extracts contend 26 molecules of organochlorine compounds in different concentrations had been tested on the cells of the immune system of *Cyprinus carpio*. The aim was to verify the possible modulation role due to the complex mixtures exposure. The results had demonstrated that this molecules pool play an immunomodulatory activity on the macrophage lytic activity. However other studies considering also other contaminants must be done, to observe the synergic or antagonistic performance. This work also showed the needs do develop this kind of investigation in freshwater ecosystems in Brazil, where related data are scarce. In addition few information is available concerning to the toxic potential of these compounds for the native species or human population.

## 1. INTRODUÇÃO

A necessidade em conservar os ecossistemas naturais e o seu manejo baseado em estudos de biomonitoramento favoreceu o surgimento de novas áreas de atuação como um seguimento da ecologia clássica. Esta se baseia na detecção precoce dos riscos para o ambiente e para a saúde humana, resultado das atividades antropogênicas, auxiliando tomadas de decisões que vão desde a proteção destes ecossistemas até medidas visando à qualidade de vida de populações humanas. Surge então uma nova ciência conhecida como Ecotoxicologia, a qual visa o estudo dos efeitos que os poluentes químicos tóxicos podem ocasionar ao ambiente, e da mesma forma avaliar o impacto destas substâncias sobre as populações em diferentes níveis de organização biológica (estudos *in vitro*, bioensaios e em campo) (BOLS et al., 2001).

Sendo assim a avaliação dos efeitos de contaminantes nos ecossistemas aquáticos vem sendo alvo de várias pesquisas na área da ecotoxicologia. Os peixes estão representados por mais de 21.000 espécies entre as espécies de água doce e marinha, e estão presentes em quase todos os ecossistemas aquáticos incluindo os mais poluídos. Devido a sua capacidade de adaptação às variações ambientais, os peixes são considerados modelos interessantes para estudos em ecotoxicologia. Em áreas poluídas os peixes encontram-se submetidos ao estresse químico que pode ocasionar alterações em órgãos alvos afetando diferentes sistemas, dentre eles o sistema imune (BETOULLE, 1998).

O interesse em avaliar a contaminação de organismos aquáticos tem também por objetivo a vigilância da qualidade ambiental. Uma forma eficaz de realizar esta avaliação é o uso de biomarcadores de contaminação ambiental, os quais têm por finalidade verificar de forma preditiva alterações induzidas pelos poluentes em processos celulares e bioquímicos. A seleção apropriada destes biomarcadores se faz baseada no mecanismo que conduz a um estado patológico induzido por determinados agentes químicos tóxicos (TRAVIS,1993). A caracterização destes biomarcadores

permite colocar em evidência precocemente o risco da poluição antes do surgimento de alterações irreversíveis na fisiologia dos organismos, sobretudo antes que as populações e comunidades, e até mesmo todo o ecossistema, sejam afetados ou encontrem-se comprometidos.

### 1.1. COMPOSTOS ORGANOCLORADOS

O uso de pesticidas organopersistentes na agricultura nos últimos 60 anos garantiu neste período um aumento na produtividade, possibilitando o atendimento da demanda alimentícia na maioria dos países (BRANCO,1988). Apesar dos benefícios trazidos pelo uso dos pesticidas, o problema associado à poluição de mananciais e a contaminação de organismos não alvos incluindo o homem continuam sendo objeto de grandes preocupações, especialmente pelo fato de que essas intoxicações acontecem pela ingestão gradativa destes produtos que contaminam a água, o solo e uma variedade de alimentos (RAND et al., 1985). Por volta dos anos 60, a comunidade científica começou a acumular provas de que os efeitos tóxicos dos pesticidas organoclorados, como o DDT por exemplo, estariam ocasionando problemas aos organismos considerados não alvos (CARSON, 1962)

Durante o século XX, vários poluentes orgânicos como os bifenis policlorados (PCBs), os pesticidas organoclorados, os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAHs), os hexaclorobenzenos (HCB), diclorodifeniltricloroetano (DDT), os dibenzofuranos policlorados (PCDFs) e as dibenzodioxinas policloradas (PCDDs) foram produzidos e grande parte deles liberada no ambiente. Sendo assim, o emprego de poluentes organopersistentes (POPs), nas últimas décadas, tem promovido o acúmulo de resíduos tóxicos em vários ecossistemas em todo mundo. A concentração destes compostos tem alcançado níveis tóxicos em vários organismos terrestres, como pássaros e mamíferos, assim como em organismos aquáticos. Em geral, o receptáculo final da maioria destas moléculas se encontra, de forma evidente, nos meios aquáticos por aporte direto e indireto via processos atmosféricos e hidrológicos.

Está comprovado pelo seu potencial tóxico que os POPs ameaçam o equilíbrio ecológico da biosfera e a saúde humana, por serem onipresentes, fracamente biodegradáveis e apresentarem efeito tóxico mesmo em pequenas doses. Além disso, podem se acumular tanto nos organismos vivos (bioacumulação) quanto ao longo da cadeia alimentar (biomagnificação). Concentrações elevadas de compostos organoclorados são pouco freqüentes no meio natural, mas a sua retenção nos sedimentos causam uma contaminação a longo prazo dos ambientes aquáticos com conseqüências diretas e indiretas sobre os organismos encontrados nestes ecossistemas (BROWN et al., 2000; FLEEGER et al., 2003).

## 1.2. PESTICIDAS ORGANOCLORADOS E BIFENIS POLI CLORADOS (PCBs)

No que se diz respeito aos pesticidas organoclorados como o DDT, o dieldrin, o heptacloro, o HCB, o lindano, o aldrin e o clordano entre outros, estes são derivados clorados de hidrocarbonetos alifáticos, aromáticos ou heterocíclicos. As principais características físico-químicas destas moléculas são primeiramente a sua grande estabilidade frente aos agentes e fatores de degradação físico-químicos e biológicos. Esta estabilidade lhes confere certa persistência nos ambientes naturais onde eles são absolutamente onipresentes, pois se propagam pelo ar, água e pelas espécies migratórias (PERSIC, 2004). O HCB (hexaclorobenzeno) é um fungicida que foi muito utilizado na década de 40 com o cultivo de cereais na proteção de sementes, particularmente na produção de trigo, no entanto sua exposição está associada a danos no fígado e no sistema nervoso de organismos não alvos. Este composto é considerado carcinogênico e mostra possuir efeitos tóxicos sobre a reprodução e o desenvolvimento animal. Em 1972 seu uso na agricultura foi proibido na França e em outros países desenvolvidos (PERSIC, 2004).

Em maio de 2001 a Convenção de Estocolmo foi assinada e prevê que inicialmente doze POPs seriam banidos ou teria seu uso restrito, dentre eles estão o DDT, aldrin, dieldrin, clordano, endrin, heptacloro, mirex, toxafeno, o HCB e seus

isômeros, os PCBs e ainda dois subprodutos não intencionais gerados da combustão de matéria orgânica entre eles as dioxinas e os furanos.

Os PCBs fazem parte de uma família de compostos clorados aromáticos que possuem uma larga escala de aplicações industriais. Estes produtos foram sintetizados e fabricados em escala industrial depois de 1929 e durante mais de 50 anos foram explorados em quase todos os países do mundo (NOBBS E CHIPMAN, 2003). Os PCBs possuem diferentes níveis de presença de átomos de cloro, que podem variar 1 a 10 átomos. Existem mais de 209 congêneres sendo que destes apenas 50 são comercializados. Graças à sua característica físico-química de alta resistência térmica, fraca condutibilidade elétrica e alta estabilidade química, os PCBs foram utilizados como fluídos dielétricos em sistemas de transformadores e condensadores, em sistemas de transferência de calor, em sistemas hidráulicos e como solventes de tintas (PERSIC, 2004).

Os PCBs e os pesticidas organoclorados (OCs) são substâncias altamente lipofílicas que têm tendência a se acumular nos tecidos adiposos dos organismos, onde suas concentrações ultrapassam as concentrações encontradas no ambiente devido ao fenômeno de bioacumulação. Estes compostos podem ser transportados por via trófica ao longo da cadeia alimentar e atingir níveis consideráveis (até mesmo tóxicos) nos tecidos dos predadores situados no topo da cadeia alimentar (incluindo os humanos) durante o fenômeno de biomagnificação.

Os efeitos indiretos de tal contaminação caracterizam-se por mudanças comportamentais, fisiológicas e nas interações competitivas e/ou relações predador/presa. Estes efeitos podem induzir distúrbios na composição das populações e comunidades, podendo intensificar, mascarar ou revelar efeitos tóxicos diretos (FLEEGER et al., 2003). Os efeitos tóxicos diretos variam com a intensidade da impregnação tissular nos organismos, sendo esta determinada pelas propriedades da molécula do contaminante e pelas características dos indivíduos expostos.

Na ecotoxicologia, a avaliação da qualidade dos sistemas aquáticos e da saúde animal tem requerido o desenvolvimento de biomarcadores para o estudo da poluição ambiental (BRAUNBECK E VOLKL, 1993). Isto permite que análises dos efeitos obtidos em ensaios laboratoriais possam ser extrapoladas para condições mais realísticas do ambiente natural. Entretanto, a maioria dos bioensaios realizados atualmente não considera os fenômenos encontrados nos ecossistemas como a bioacumulação via cadeia trófica e negligenciam particularmente os fatores ambientais sobre a toxicidade. A toxicidade não se expressa somente pelos níveis de contaminação resultantes dos diversos processos de acúmulo, mas também pela dinâmica destes processos e pelos mecanismos de eliminação e de degradação dos poluentes. Estes fatores são específicos para cada molécula e cada organismo (GOBAS et al., 1998).

O conhecimento dos mecanismos de toxicidade dos poluentes, em particular em nível celular, pode ser determinante na estimativa dos efeitos em diferentes níveis de organização biológica como indivíduo e até mesmo de uma população ou comunidade. Assim, a toxicologia celular fornece um conceito essencial na compreensão dos processos ecotoxicológicos, e os mecanismos de toxicidade dos pesticidas não foram ainda totalmente elucidados. Estima-se que a ativação e a inibição de certas enzimas são os principais mediadores da ação destes poluentes, cujos mecanismos tóxicos estão igualmente implicados em transdução de sinais (CRUMPTON et al., 2000) ou na organização do citoesqueleto (PROZIALKC et al., 2000). Observa-se ainda uma diminuição da atividade de células fagocíticas, como um dos efeitos destes poluentes sobre o sistema imune (SHABANI E RABBANI, 2000), da mesma forma que estes poluentes podem induzir mecanismos bioquímicos responsáveis pela apoptose tanto *in vitro* como *in vivo* (EL-HASSAN et al., 2003).

### 1.3. BIOMONITORAMENTO DE POPs NO BRASIL E EM OUTROS ECOSISTEMAS

Poucos são os trabalhos de biomonitoramento de POPs realizados no Brasil, a maioria deles tem avaliado a contaminação do solo, da água e dos alimentos. Segundo Indd et al. (2004), o uso indiscriminado e o lançamento no ambiente de POPs resultam em uma contaminação em peixes de água doce e também de espécies marinhas. O aumento dos níveis de PCBs no ambiente é estimado em  $3.7 \times 10^8$  kg (STEFANELLI et al., 2004), mas no Brasil poucos se sabe a este respeito. Um estudo recente feito por Costabeber et al. (2006) e Santos et al. (2006) mostrou a ocorrência de PCBs em carne e seus derivados, e também em queijos no estado do Rio Grande do Sul. O PCB 52 foi o que apresentou maior concentração no estudo de Costabeber et al. (2006) em amostras de carne e Yogui et al. (2003) descreveu a bioacumulação deste tipo de poluente em golfinhos no litoral de São Paulo.

Níveis altos de PCBs foram encontrados no sangue de pessoas expostas a alimentos contaminados em regiões poluídas da Itália (DONATO et al., 2006). Na Alemanha estudos constataram a presença de PCBs e dioxinas em leite materno e a análise realizada no sangue das crianças expostas tiveram índices similares àqueles encontrados no leite (LINK et al., 2005). Quando se tenta predizer o efeito dos poluentes em um ecossistema, não é a concentração absoluta destes poluentes que apresenta dados consistentes sobre estes efeitos, mas o mais importante é a sua biodisponibilidade. Para que se possa mensurar esta biodisponibilidade com mais eficiência o uso de biomarcadores é essencial pois respondem essencialmente à fração biodisponível do contaminante (WAGNER E BOMAN, 2003).

Um estudo detalhado no noroeste do estado de São Paulo analisou a contaminação por POPs, como HCH e seus isômeros, DDT e seus metabólitos e os congêneres dos PCBs em solo e água, avaliando a contaminação, distribuição e possíveis fontes poluidoras. Altos níveis de DDT e seus metabólitos foram encontrados e revelaram o uso recente destes compostos nestes ambientes (RISSATO et al., 2006).

Ainda em São Paulo, o monitoramento químico realizado em sedimento, caranguejos e bivalves mostraram concentrações de DDT, DDE e DDD (TAVARES et al., 1999). No Brasil, o DDT foi banido em 1985 para o uso agrícola, porém depois de 2001 com a Convenção de Estocolmo assinada, ele passou a ser restrito apenas para o uso no combate do vetor da malária. Mesmo assim não deixou de constituir um problema, como mostrou recentemente Villa et al. (2006), onde a contaminação no solo por DDT foi descrita devido ao passivo armazenado em área aberta no Mato Grosso mesmo após a proibição do uso.

A maioria dos autores no país concorda que os níveis de DDT presentes estão relacionados ao uso durante décadas na campanha contra a malária. Apesar de estudos em ovos no Rio de Janeiro (VIEIRA et al., 2001); em plasma de mulheres grávidas e no leite materno no Rio de Janeiro (PAUMGARTTEN et al., 2000; SARCINELLI et al., 2003); e em crianças expostas através do consumo do leite no Rio Grande do Sul (HECK et al., 2006) mostrarem níveis de DDT, nenhum estudo se refere aos níveis em peixes de água doce no Brasil.

Os trabalhos atuais relacionados com POPs demonstram um efeito significativo destes poluentes em processos bioquímicos e funcionais de vários órgãos. Estes trabalhos deixam evidente a grande preocupação na exposição a estes contaminantes, inclusive no que diz respeito à saúde humana. Como estudos em humanos são muito complexos e delicados, o uso de bioindicadores pode ser a solução na avaliação do risco humano a exposição aos poluentes presentes no ambiente. O presente trabalho tem por objetivo mostrar não somente os danos ocasionados pela presença destes poluentes, mas também relacionar as concentrações reais encontradas nos organismos aquáticos com estes danos. A problemática em relação às concentrações que podem estar ocasionando os danos em organismos aquáticos e a possibilidade destes contaminarem os humanos justifica a realização do presente estudo.

## 1.4. SISTEMA IMUNE DOS PEIXES

O sistema imune dos teleósteos vem sendo estudado em algumas espécies de relevância econômica, como salmão, truta, entre outros. O mecanismo de defesa do organismo em peixes se divide em duas respostas imunes: a não específica e a específica. Por estes organismos serem piscilotérmicos, tanto a temperatura corporal como a atividade do sistema imune dependem da temperatura ambiente. Sendo assim a resposta imune específica se torna secundária nestes organismos, pois dependem da temperatura, a qual pode inibir a produção de anticorpos o que torna então a resposta imune não específica de grande importância, pois independentemente da temperatura a fagocitose continua ativa (BETOULLE, 1998).

### 1.4.1. Macrófagos e fagocitose

Os macrófagos possuem um papel crucial na resposta do sistema imune de várias espécies, entre elas os peixes, e atuam em vários mecanismos, diretamente destruindo as bactérias, parasitas, vírus e células tumorais, bem como indiretamente por mediadores como as interleucinas, TNF $\alpha$  (fator de necrose tumoral) e estes por sua vez ativam outras células. Os macrófagos podem ainda servir como apresentadores de antígenos aos linfócitos T (LLOBERAS et al., 2002). Para a destruição dos microorganismos e células tumorais os macrófagos produzem substâncias por duas vias oxidativas separadas, uma envolve a síntese do ânion superóxido ( $O_2^-$ ) e o óxido nítrico (NO), os quais são formados respectivamente pela NADPH oxidase e óxido nítrico sintetase (NOS), além da produção destas espécies reativas do oxigênio. Para exercer sua função adequadamente, os macrófagos modificam a sua morfologia e adquirem propriedades como a habilidade de “espraiamento” e fagocitose (MORETÃO et al., 2004).

A produção destes compostos tóxicos está acompanhada de um consumo aumentado de oxigênio pelos macrófagos e este processo é conhecido por “*burst* respiratório” ou explosão respiratória (ALBERTS et al., 2004). As espécies reativas do oxigênio provêm do metabolismo oxidativo durante o qual os macrófagos produzem por

redução parcial do oxigênio, um grupo de agentes extremamente reativos. O oxigênio singlete ( $^1\text{O}_2$ ), o ânion superóxido ( $\text{O}_2^-$ ), o radical hidroxila ( $\bullet\text{OH}$ ) e o peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) produzidos durante o *burst* respiratório, são poderosos oxidantes de lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos. Logo que eles são produzidos no vacúolo do fagócito, estes metabólitos do oxigênio são os principais fatores microbicidas e este sistema não depende da fusão do fagossoma/lisossoma (BETOULLE, 1998).

A fagocitose é uma função biológica que foi descoberta por Metchnikoff em 1892, ela designa um conjunto de fenômenos que permitem a ingestão de partículas sólidas ou líquidas por células como os macrófagos, neutrófilos e monócitos. A fagocitose independe da produção de espécies reativas do oxigênio, no momento que ocorre a fagocitose, a vesícula chamada de fagossoma, contendo o material fagocitado se funde com as vesículas lisossomais para formar o fagolisossoma (BETOULLE, 1998).

## 1.5. IMUNOTOXICOLOGIA

A imunotoxicologia é uma ciência relativamente nova e interdisciplinar que tem por objetivo a análise ampla de fatores químicos, físicos e biológicos do ambiente que possam causar imunomodulações indesejáveis. Visa proteger seres humanos e outros animais dos efeitos prejudiciais destes fatores químicos presentes no ambiente, como também desenvolver métodos para a determinação das interações entre os fatores do ambiente externo e o sistema imune (KACMÁR et al., 1999).

Vários pesticidas são conhecidos por afetarem o sistema imune resultando em alterações na resposta humoral e celular. As alterações imunológicas podem resultar em doenças auto-imunes, hipersensibilidades ou alergias, enquanto que a supressão do sistema imune pode levar ao aumento da incidência de doenças infecciosas e até mesmo a transformações neoplásicas (DEAN et al., 1982). Sendo assim o uso de biomarcadores imunológicos é muito útil na avaliação do risco toxicológico (STILLER-WINKLER et al., 1999).

Os peixes têm sido bastante utilizados nas análises das respostas biológicas e bioquímicas em decorrência da exposição aos contaminantes presentes no ambiente aquático (POWERS, 1989), pois apresentam um papel importante no transporte de energia de um nível trófico inferior para níveis superiores da cadeia alimentar (VAN DER OOST et al., 2003). Além da avaliação dos níveis de poluição do ecossistema aquático, os peixes, como fonte de alimento do homem, podem servir como espécies sentinelas para estimar o risco toxicológico para a espécie humana. Os poluentes e principalmente as substâncias organopersistentes interagem com a biota em nível celular, e sendo assim, as respostas celulares podem constituir ferramentas sensíveis e satisfatórias para a detecção precoce da exposição a agentes químicos. Estas respostas são comumente utilizadas nas áreas biomédicas e toxicológicas (HIGHTOWER E RENFRO, 1988). O sistema *in vitro* torna-se cada vez mais importante para a ecotoxicologia (FENT, 2001), seja sob a forma de cultura celular primária ou de linhagens, e as células de peixes em especial constituem uma ferramenta importante para a ecotoxicologia aquática.

Numerosos sistemas fisiológicos presentes em peixes podem ser analisados tanto nas respostas celulares como nas moleculares no caso dos estudos em ecotoxicologia. Entre eles, o sistema imune apresenta um interesse particular (BOLS et al., 2001). O sistema imune de peixes é bem desenvolvido e pode ser comparado em vários aspectos ao sistema imune de mamíferos (ELLIS, 1992). Neste aspecto pode-se supor que a sensibilidade das funções do sistema imune frente à contaminação ambiental é comparável entre diferentes espécies. Os contaminantes ambientais são conhecidos por afetarem negativamente diferentes sistemas fisiológicos e em especial no sistema imune que irá causar perturbações no estado geral da saúde dos organismos (ANDERSON, 1990; BLY et al., 1997; AHMED, 2000). A função imune natural não específica dos organismos oferece inúmeras possibilidades como fonte de marcadores biológicos na ecotoxicologia. Como exemplo a atividade fagocítica e a explosão respiratória como biomarcadores de imunotoxicidade (FOURNIER et al., 2000). Esta função é representada nos peixes pelos leucócitos com função fagocítica (macrófagos em particular), o sistema reticuloendotelial e as células citotóxicas naturais

(EVANS E JASO-FRIEDMANN, 1992; SECOMBES, 1996). Os monócitos e macrófagos representam a primeira linha de defesa iniciando a resposta inflamatória. Quando o processo é regulado corretamente, acaba por eliminar o patógeno via fagocitose e explosão respiratória (mecanismo microbicida dependente de oxigênio). Finalmente, o sistema imune tem um papel fundamental na fisiologia dos peixes e qualquer mudança na sua atividade observada em nível celular constitui uma ferramenta importante para a avaliação do risco ecotoxicológico.

Os efeitos dos POPs presentes no ambiente dependem das taxas de exposição dos organismos, da biodisponibilidade, da concentração, da metabolização destes compostos e dos mecanismos de resposta celular. Sabe-se que alguns dos metabólitos, como os epóxidos produzidos na biotransformação do dieldrin e do heptacloro possuem efeitos mais tóxicos que os próprios compostos antes da metabolização. Também pelo fato de estarem presentes em todas as regiões do planeta e por representarem grande risco à saúde, vários estudos têm sido realizados, porém a maioria deles considerando concentrações e situações longe daquelas encontradas no ambiente natural, ou mesmo presente nos organismos contaminados ou expostos.

A fim de aproximar da realidade, o presente trabalho propôs a análise das respostas das células do sistema imune de peixes usando os pesticidas e seus metabólitos extraídos dos tecidos do fígado e do músculo de trairas provenientes de área impactada por POPs. Considerando a absorção destes e a sua remobilização e biodisponibilidade quando existe uma demanda energética, uma vez que se encontram concentrados em tecidos gordurosos por serem lipossolúveis, estaremos estabelecendo uma ligação direta com o contaminante estocado nos tecidos e os seus efeitos sobre células do sistema imune. Desta forma estabelece-se uma situação mais realística, onde os compostos testados já foram biotransformados ou bioativados pelo próprio organismo e encontram-se disponíveis em estoques dentro do próprio organismo.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. OBJETIVO GERAL

- Avaliar qualitativa e quantitativamente os níveis de bioacumulação e os efeitos de bifenis policlorados (PCBs), pesticidas organoclorados (OCs), hexaclorobenzeno (HCB) e diclorodifeniltricloroetano (DDT) e seus metabólicos, em fígado e músculo de traira *Hoplias malabaricus*, coletados em um lago nas proximidades de Ponta Grossa.

### 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar e quantificar a bioacumulação em fígado e músculo por compostos organopersistentes polares e menos polares e seus metabólitos em *Hoplias malabaricus* provenientes de região impactada;
- Relacionar a presença de POPs com o conteúdo de proteínas, glicogênio e lipídeos em fígado e músculo de *Hoplias malabaricus*;
- Avaliar os efeitos dos POPs e seus metabólitos em fígado de *Hoplias malabaricus* através de histopatologia;
- Avaliar os efeitos dos extratos dos poluentes organoclorados estocados no conteúdo lipídico de fígado e músculo de *Hoplias malabaricus*, sobre as células do sistema imune de carpa (*Cyprinus carpio*);
- Mensurar a produção de espécies reativas do oxigênio por meio da técnica do NBT (*nitro blue tetrazolium*) em macrófagos de *Cyprinus carpio* expostos ao extrato de fígado e músculo por meio de cultivo primário;
- Avaliar a atividade fagocítica em macrófagos de *Cyprinus carpio* expostos ao extrato de fígado e músculo por meio de cultivo primário
- Discutir a aplicabilidade do uso da exposição celular a misturas complexas de POPs extraídas do tecido gorduroso de peixes expostos naturalmente, como uma ferramenta mais realística na avaliação dos efeitos de POPs em vertebrados.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. MODELO EXPERIMENTAL E ÁREA DE ESTUDO

Foram utilizadas dez traíras (*Hoplias malabaricus* -BLOCH, 1794) adultas (FIGURA 1) provenientes do município de Ponta Grossa, estado de Paraná, sul do Brasil (latitude 25°05'42" S e longitude 50°09'43" O). O local é impactado pelas atividades agrícola, urbana e industrial. Espécimes adultos foram coletados em agosto de 2005 através de redes, foram realizadas medidas zoológicas e os exemplares foram sacrificados através de punção espinal, fez-se a excisão de fígado e músculo para as análises químicas, fisiológicas, histopatológicas e imunológicas.

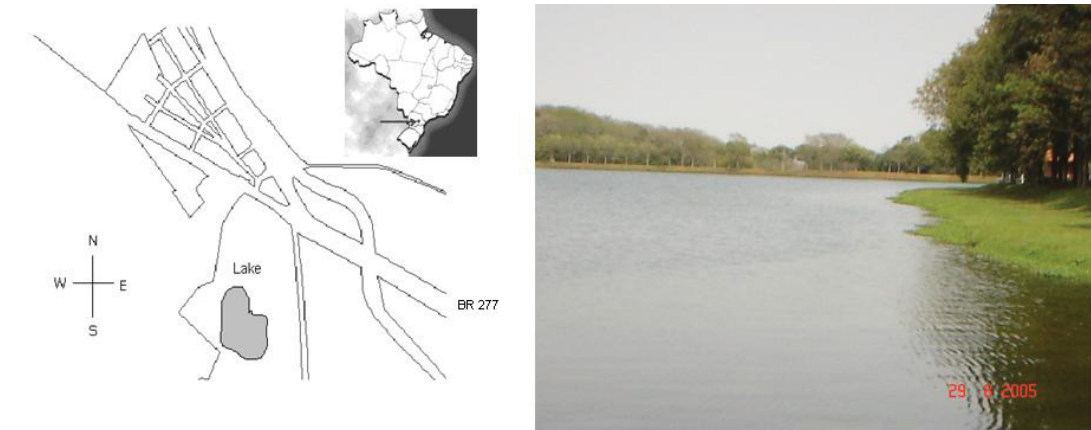


**FIGURA 1.** *Hoplias malabaricus* (BLOCH, 1794). Foto Sonia Grötzner.

A espécie *Hoplias malabaricus* foi escolhida por ser considerada um animal predador, isto é, estar localizado no topo da cadeia alimentar o que a torna interessante como uma espécie bioacumuladora e biomagnificadora de poluentes organopersistentes. A traira apresenta uma ampla distribuição geográfica em todo o território Brasileiro, podendo ser pescada o ano inteiro. Possui tolerância a hipóxia que está atribuída a uma combinação de características tais como o baixo metabolismo e controle muito eficiente da função cardiorespiratória. Além disso, durante situações extremas, a espécie pode ser encontrada enterrada na lama (PAIVA, 1974) e possui ainda uma grande sobrevivência durante longos períodos de privação de alimentos (RIOS et al., 2002).

Ponta Grossa é um município localizado no centro do Paraná, distante 130 km da capital Curitiba, em uma região conhecida como Campos Gerais do Paraná. Possui uma população de pouco mais de 300 mil habitantes e o maior parque industrial do interior do estado. A região é bem irrigada por ampla rede hidrográfica, onde se destacam os rios: Tibagi, Verde, Pitangui e também o Arroio da Chapada, além das bacias hidrográficas do Botuquara, do Rio da Morte, Arroio Terra Vermelha, Ribeirão Quebra-Perna, etc. No setor da indústria se destaca a extração de talco, a agroindústria (principalmente a indústria da soja, madeiras, metalúrgicas, metal-mecânico, alimentícias, têxteis, entre outras). Seu parque industrial está localizado próximo à região do Bairro Cará-Cará (WIKIPÉDIA, 2006).

A lagoa onde foi realizado o estudo (FIGURA 2) foi escolhida por se encontrar em zona industrial e rural, localizada no bairro Cará-Cará. O método de captura foi a rede de arrasto e a maior dificuldade esteve no período escolhido para as coletas, devido ao frio e chuva.



**FIGURA 2.** Mapa da região e lagoa de coleta.

### 3.2. EXTRAÇÃO DE POLUENTES ORGANOPERSISTENTES E METABÓLITOS

Os POPs e seus metabólitos foram isolados da gordura do fígado e músculo de traíra (*H. malabaricus*). Primeiramente, foi realizada a extração lipídica segundo o método de Folch et al (1957) e para isso pesou-se cerca de 1g de tecido que foi triturado em um *gral* com 20ml da mistura dos solventes diclorometano/metanol (2:1 v/v), foi deixado em período de extração dos lipídeos durante 2 horas em temperatura ambiente. Em seguida, filtrou-se em filtro de papel quantitativo (8 $\mu$ m) (Quanty JP 42 – Faixa azul/ teor de cinza: 0,00009g), o resíduo foi coletado foi levado para estufa (overnight / 60° C) e armazenado para análises de glicogênio e proteínas.

O filtrado foi recuperado em balão e levado a total evaporação em rotavapor, foram realizadas 3 lavagens com Etanol 100% para total eliminação da água. O resíduo foi ressuspensão em 1 ml de Hexano e levado a uma segunda filtragem (lenta), onde usamos uma adaptação com seringa de aço inox e filtro de 2  $\mu$ m (FIGURA 3). Este filtro deve ser lavado em metanol e passado por ultrassom durante 5 a 10 minutos, após cada amostra.



**FIGURA 3.** Seringa de aço inox

O segundo filtrado é recuperado em frascos âmbar de 2 ml previamente pesados, e o filtrado é levado a secura através de nitrogênio líquido e posteriormente o frasco é pesado para o cálculo de lipídios totais. Foram coletados cerca de 0,5 g de tecido fresco que foram levados à estufa por 24 horas à 105° C, para posterior quantificação de teor de umidade.

Após foram realizadas a extração e a purificação por SPE (Solid Phase Extraction) em coluna de florisil ( $MgO_3Si$ ) segundo método do EPA 3620 (Bond Elut Florisil, 1 g, 200  $\mu m$  tamanho da partícula Varian, Les Ulis, France), primeiramente com hexano para obter os compostos menos polares (PCBs, HCB, pp'-DDE entre outros) e depois com uma solução de hexano/dietiléter para os compostos mais polares (OCs e triazinas). Os pesticidas foram identificados e quantificados em cromatografia de fase gasosa, em Cromatógrafo Autosystem XL Perkin Elmer, equipado de detector de captura de elétrons ( $^{63}Ni$  Source). O gás usado como carreador foi o nitrogênio. As temperaturas do injetor e do detector foram de 280°C e 350°C respectivamente. A coluna capilar (PE-5 (5% fenil)-metilpolisiloxano) (30 m comprimento, 0.25  $\mu m$  espessura) da Perkin Elmer. Após a injeção à 140°C (12 min), a temperatura do forno do GC sobe 40°C/min até 170°C (19 min), depois 40°C/min até 200°C (25 min) e finalmente at 45°C/min to 270°C (4min). O processo foi adaptado para o método EPA

8081a. O limite de detecção é de 0,05 a 0,20 g kg<sup>-1</sup> para tecidos de peixes. Os padrões para OCs foram da Cambridge Isotope Laboratories (Cluzeau Info Labo Paris La Defense, France). Após quantificação, as amostras foram armazenadas em hexano a -20°C. (Esta parte de projeto foi realizada na França, no laboratório de Ecotoxicologia, Departamento de Ecologia e Evolução – Universidade de Paris Sud XI).

Os seguintes compostos organoclorados (OCs) proibidos ou restritos, seus isômeros e metabólitos foram analisados: lindano (hexaclorociclohexano HCH); clorotalonil; heptacloro; alaclor; aldrin; dieldrin endrin, clordano, endosulfan, nonaclor; hexaclorobenzeno, DDTs; OCs ainda utilizados como: pretilaclor e fipronil; triazinas (simazina; atrazina; propazina terbulilazina), uréias substituídas (diuron, dicloroanilina) e oxadiazol (oxadiazon), além de congêneres de PCBs.

### 3.3. LIPÍDIOS TOTAIS, PROTEÍNAS E GLICOGÊNIO

Os lipídios totais foram determinados pesando o frasco após a extração com solução do diclorometano-metanol segundo método de Folch et de al. (1957). Após a extração lipídica, os resíduos livres foram filtrados e digeridos em solução do NaOH (1N) para a medida de proteínas e glicogênio. A proteína foi medida segundo o método de Lowry et al. (1951). A glicose liberada após a hidrólise enzimática do glicogênio pela amiloglicosidase foi determinada através do método adaptado de Hugget e de Nixon (1957) que usam o ABTS como o cromógeno.

### 3.4. PROCEDIMENTO PARA MICROSCOPIA DE LUZ

Foram coletados 10 espécimes adultos de traíra *Hoplias malabaricus* com comprimento zoológico médio de 28,73. Amostras de fígado foram preservadas em solução fixadora de Alfac durante 16 horas, as amostras passaram por uma bateria crescente e etanol para desidratação (70% a 100%) e foram emblocadas em resina Paraplast Plus (Sigma®). Os blocos foram cortados em secções de 5 µm e as lâminas coradas com Hematoxilina/Eosina. Os cortes foram observados em microscópio Zeiss segundo metodologia descrita por Akaishi et al. (2004).

### 3.5 MODELO EXPERIMENTAL PARA ANÁLISES IMUNOLÓGICAS

Foram utilizadas carpas (*Cyprinus carpio*) entre 22 ± 4g e 10 ± 2 cm de comprimento zoológico, provenientes de estação de cultivo em Reims, França. Estas foram mantidas em tanques de 20 l contendo água aerada com temperatura controlada em 17° ± 1° C, com fotoperíodo de 12 horas claro e 12 horas escuro. Os peixes foram aclimatados em laboratório durante 10 dias antes do início dos experimentos. Foram alimentadas uma vez ao dia com ração comercial (Tetramin™, Germany). A qualidade da água nos tanques foram avaliadas diariamente de acordo com o método *Standard Methods for Examination of Water and Wastewater* (APHA – American Public Health Association, 1989) As carpas foram sacrificadas por punção espinal e o rim anterior foi retirado assepticamente.

### 3.6 ISOLAMENTO DAS CÉLULAS DO SISTEMA IMUNE

A utilização de propriedades físicas específicas, neste caso a densidade diferente em relação a outras células sanguíneas, permitiram obter uma suspensão rica em macrófagos. Os macrófagos podem ser obtidos a partir de várias fontes distintas nos peixes, incluindo sangue, órgãos linfóides ou cavidade peritoneal. No nosso caso, os macrófagos foram extraídos de um órgão linfóide chamado de pronefro ou rim anterior.

#### 3.6.1 Macrófagos de rim anterior de *Cyprinus carpio*

As células fagocíticas foram isoladas segundo o método descrito por Secombes (1990). O rim anterior da carpa foi retirado sob condições assépticas e triturado em filtros estéreis em 5 ml do meio de Leibovitz (L15) com anticoagulante (heparina 0,2%, 10UI/ml). O tecido triturado foi passado por um filtro de nylon (100 µm). A suspensão celular foi então colocada sobre o gradiente de densidade Percoll (34/51 %, v/v). Após foi realizada a centrifugação durante 25 minutos em centrífuga refrigerada à 4° C e em uma velocidade de 800g. A centrífuga deve possuir um suporte adaptado para os tubos Falcon (15 ml) e estes devem ser centrifugados horizontalmente. A interface visível

entre os diferentes gradientes foi coletada. Suspensão rica em macrófagos foi lavada por duas vezes em meio L15 (sem heparina), centrifugando durante 10 minutos a 800g. Em seguida o precipitado foi ressuspenso em meio L15 ou em tampão fosfato (PBS) dependendo dos testes seqüenciais. Foi realizada a contagem em câmara de Mallassez em presença de azul de Trypan (0,4%) e assim pode-se ajustar o número de células vivas desejadas para os testes por ml de meio L15 ou de tampão.

O gradiente de densidade Percoll (34/51 %) permite obter uma suspensão celular contendo 75% de células fagocíticas (20% de macrófagos e 55% de neutrófilos) e 25% de outros tipos celulares. Para o preparo do Percoll foi necessário o preparo de uma solução estoque, que chamamos de 100%, esta solução é preparada a partir de 45 ml de Percoll puro de densidade definida 1,124g/ml mais 5ml de uma solução tampão HBSS (Gibco).

### 3.7 TESTE DO NBT (NITRO BLUE TETRAZOLIUM)

Este método permite mensurar a produção intracelular de ânions superóxidos. Ativadas pelo PMA (Phorbol Myristate Acetate), as células fagocíticas produzem os ânions superóxidos, o NBT colocado em presença destas células é reduzido pelos ânions superóxidos em um produto insolúvel, o formazan, que possui uma coloração azul. A intensidade da coloração é lida em espectrofotômetro de leitura de placas (tipo "ELISA") em comprimento de onda de 630 nm. Paralelamente, faz-se a medida de uma amostra não estimulada pelo PMA o que permite determinar a intensidade da ativação das células testadas. Além disso, esta técnica apresenta a vantagem de permitir a realização de inúmeras incubações de células fagocíticas com diversas moléculas a serem testadas.

Cada poço da placa de cultivo contendo 96 poços recebeu 100 µl de uma suspensão celular rica em macrófagos e outras células fagocíticas ( $5 \times 10^6$  células por ml, em meio L15 contendo P/S); as células foram incubadas com 0,1% dos extratos de pesticidas solubilizados em DMSO. Após 3, 24 e 48 horas de incubação à 21° C, as células são lavadas delicadamente duas vezes com meio L15 (P/S), o que elimina as

células não macrofágicas e as não aderidas. Nos primeiros 48 poços foi colocado 100 µl de NBT apenas e nos outros 48 poços foi colocado 100 µl de NBT + PMA. Após 15 minutos de incubação à 20° C, parou-se a reação pela eliminação das soluções de incubação e adicionou-se metanol puro (100%) para a primeira lavagem e metanol (70%) para a segunda e terceira lavagens, após as lavagens as células foram secas em temperatura ambiente. O formazan de cada poço foi solubilizado com 50 µl de KOH 2M e 75 µl de DMSO, agitou-se a placa durante 5 minutos. A densidade ótica da solução foi lida em leitor de microplaca à 630 nm tendo como branco KOH/DMSO.

A redução do NBT representa a explosão respiratória dos macrófagos. Esta produção de radicais livres é expressa como a diferença da densidade ótica entre os poços sem PMA e os com PMA.

### 3.8 MEDIDA DA ATIVIDADE FAGOCÍTICA ATRAVÉS DE ESFERAS FLUORESCENTES

#### 3.8.1 Isolamento das células fagocíticas do sangue periférico de carpa (*Cyprinus carpio*)

A coleta de sangue em carpas foi realizada por punção ao nível da artéria caudal por meio de seringa heparinizada. A diluição do sangue foi em 1/5 do meio de cultura de Leibovitz L15 complementado com Penicilina e Estreptomicina. O depósito de 5 mL de sangue foi diluído sobre 5 mL de Ficoll-Paque e centrifugado a 800 g durante 15 minutos + a 4°C, e a recuperação do anel de leucócitos procedeu-se com a ajuda de uma pipeta Pasteur. O depósito foi colocado em um tubo Falcon de 50 mL onde foi adicionado um volume suficiente mas indeterminado de meio L15 com P/S. A lavagem das células leucocitárias foi por centrifugação a 400 g, 10 minutos + a 4°C. O sobrenadante foi eliminado da lavagem que contém o meio de cultura e o remanescente de Ficoll. A ressuspensão do precipitado celular foi feita em meio L15 P/S (1 mL) e a contagem em câmara de Mallassez. O teste de viabilidade celular foi com Azul de Trypan (0,4%) com um número total de  $X \cdot 10^6$  células/mL.

### 3.8.2 Isolamento das células fagocíticas do rim anterior de carpa (*Cyprinus carpio*)

O rim foi dissecado e recuperado os dois lóbulos do órgão. Foi feita a trituração da totalidade do órgão em 10 mL de meio de cultura L15 P/S com 0,2% de heparina. O triturado (duas vezes 5 mL) foi depositado sobre um gradiente de Percoll (34%/51%). Foi feita a centrifugação a 800 g 25 minutos + a 4°C. A recuperação do anel de células fagocíticas da interface entre as duas soluções de Percoll, através de uma pipeta Pasteur. Foi feita a centrifugação das células recuperadas (lavagem que permite eliminar o Percoll) a 400 g durante 10 minutos + a 4°C. Eliminou-se o sobrenadante da lavagem que contém o meio de cultura e o remanescente de Percoll. O precipitado celular foi ressuspendido em meio L15 P/S (1 mL). Em câmara de Mallassez foram feitos a contagem e o teste de viabilidade celular com Azul de Trypan (0,4%) obtem-se um número de  $X \cdot 10^6$  células/mL.

### 3.8.3 Incubação das células com as esferas fluorescentes

As células foram incubadas com esferas de látex de 1,5  $\mu\text{m}$  de diâmetro. Estas esferas são fluorescentes (excitação 488 nm e emissão à 520 nm). As células são incubadas com as esferas numa proporção de 100 esferas para cada célula fagocítica. É necessário calcular a concentração das esferas de látex por mL utilizando a seguinte equação:

$$\text{Número de esferas por mL} = (6W \times 10^{12}) / \pi \times \delta \times \beta^3$$

W = Gramas de polímero por mL (0,025 g para uma solução de latex a 2,5%)

$\delta$  = Densidade do latex = 1,05

$\pi$  = 3,14159

$\beta$  = 1,5 (diâmetro das esferas).

Antes de realizar a incubação, é necessário passar a solução de esferas no ultrassom para separar as esferas umas das outras. As células são incubadas com as esferas

durante 18 h sob ligeira agitação à temperatura ambiente. Ao fim de 18h, a suspensão de células + esferas é depositada sobre um gradiente de BSA (Bovine Serum Albumin) 3% e centrifugadas a 150g durante 8 min + a 4°C. O sobrenadante contendo somente as células que tenham fagocitado mais ou menos esferas, é colocado numa cubeta de medida em espectrofluorímetro e a fluorescência emitida pelas células que correspondem às esferas fagocitadas é medida (excitação 488 nm e emissão a 520 nm).

### 3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os testes estatísticos realizados foram o teste t de student para as análises químicas e ANOVA seguido pelo pós-teste Dunnett's para as análises imunológicas.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. ANÁLISES QUÍMICAS

O sexo e o comprimento zoológico dos indivíduos do grupo estudado estão representados na Tabela 1. Um total de vinte seis moléculas, seus isômeros e seus metabólitos foram quantificados e os valores médios e os erros padrão encontrados no fígado e no músculo estão apresentados respectivamente na Figura 4 e na Figura 5, e os valores individuais na Tabela 1. Seis indivíduos apresentaram valores totais de compostos organoclorados maiores que 1000 ng/g de tecido seco em fígado e três foram encontrados no músculo, dois indivíduos acumularam mais de 1500 ng/g de tecido seco no fígado e um no músculo e somente um indivíduo acumulou mais de 2000 ng/g de tecido seco no fígado (TABELA 1).

Somente o resíduo de alaclor foi encontrado em amostras do fígado e do músculo de todos os indivíduos estudados, mas trans-heptacloro epóxido concentrou-se no músculo e o aldrin no fígado em todos os indivíduos estudados. A simazina foi observada no fígado de nove indivíduos e no músculo de oito indivíduos. Nove indivíduos apresentaram o trans-clordano acumulado no fígado e sete indivíduos acumularam a dicloranilina no músculo (TABELA 1).

Todos os indivíduos apresentaram contaminação por HCB tanto em fígado como em músculo, o DDT está presente em 100% dos músculos e em 90% dos fígados e seus metabólitos variaram entre 60% e 90% dos indivíduos (TABELA 2).

Dos PCBs, apenas o CB28 foi encontrado no músculo de todos os indivíduos, no fígado os PCBs que apresentaram maiores índices de ocorrência foram CB28, CB101 e CB 81 que apareceram em 90% dos indivíduos analisados (TABELA 3).

As figuras 6 e 7 representam as médias das concentrações de HCB, DDT e PCBs encontradas em fígado e músculo de *H. malabaricus*, respectivamente.

TABELA 1. Dados descritivos dos compostos organoclorados encontrados em *Hoplias malabaricus*, assim como o sexo e comprimento dos mesmos.

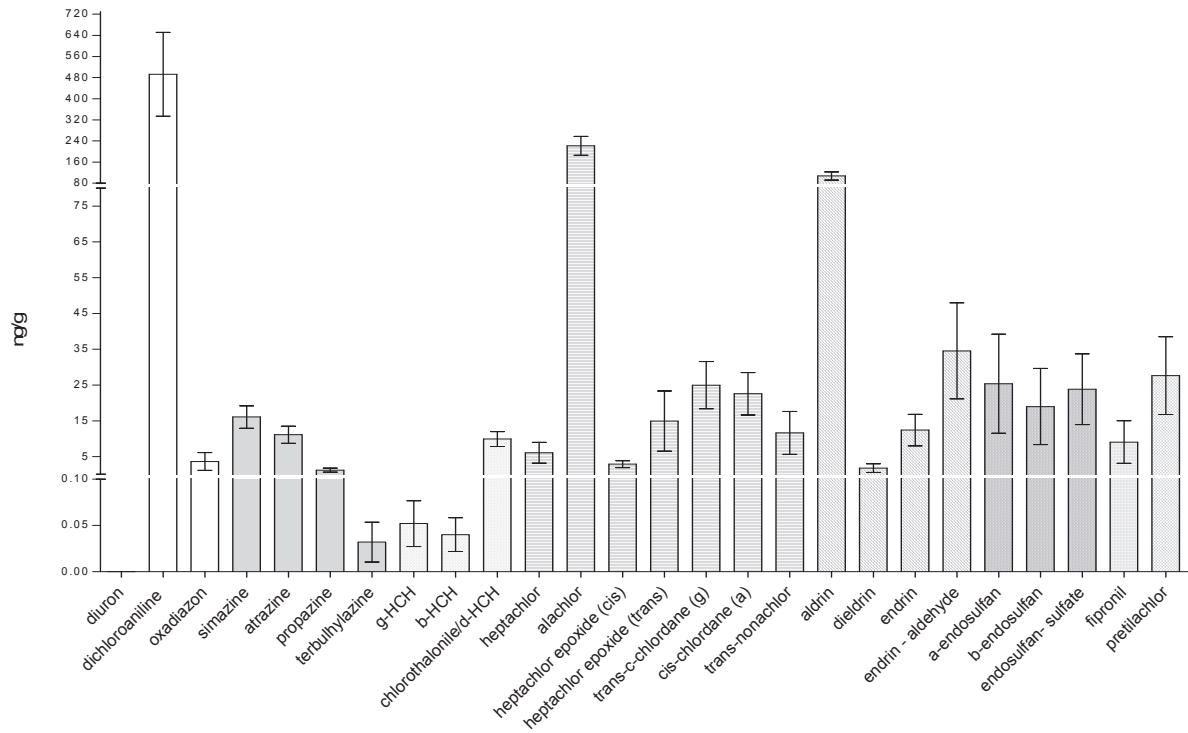
Sexo	Peixe 1		Peixe 2		Peixe 3		Peixe 4		Peixe 5		Peixe 6		Peixe 7		Peixe 8		Peixe 9		Peixe 10			
	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F		
Comprimento (cm)	27,0		28,0		24,7		29,1		32,0		27,0		28,0		27,0		28,0		27,0		29,5	
<b>Tecidos</b>	<b>F</b>	<b>M</b>	<b>F</b>	<b>M</b>	<b>F</b>	<b>M</b>	<b>F</b>	<b>M</b>	<b>F</b>	<b>M</b>	<b>F</b>	<b>M</b>	<b>F</b>	<b>M</b>	<b>F</b>	<b>M</b>	<b>F</b>	<b>M</b>	<b>F</b>	<b>M</b>	<b>F</b>	
Diuron	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	885,6
Dichloroanilina	652,0	28,3	0	13,8	740,7	0	154,1	8,1	0	0	803,7	0	582,6	18,3	0	23,9	606,6	7,0	0	0	17,1	
Oxadiazon	0	0	16,6	0	0	0	0	23,3	0	0	0	0	0	0	0	0	20,2	0	0	0	0	
Simazina	4,0	5,6	26,5	4,3	21,9	0	31,5	3,5	17,9	0	19,0	4,0	18,4	5,4	6,6	5,0	15,2	3,3	0	0	9,6	
Atrazina	14,4	0	26,0	0	0	0,6	17,0	3,7	10,5	0	12,1	0	9,4	2,5	10,1	0,6	12,1	0	0	0	0	
Propazina	2,3	0	4,7	0	0	0,1	3,4	0	0	0,1	0	0	0	0	0	0	2,1	0,1	0	0	0,1	
Terbitiazina	0,1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,2	0	0	0	0	
$\gamma$ -HCH	0	0	0	0	0,2	2,1	0	1,3	0	0	0	0	0	0	0,1	0	0,1	0,7	0,2	2,2	0	
$\beta$ -HCH	0	0	0	0	0,1	33,5	0	0	0	0	0,2	0	0,1	0	0	0	0	0	0	0	0	
Clorotalomil/ $\delta$ -HCH	16,7	7,2	11,7	0	11,8	0	18,4	139,5	9,3	0	15,4	0	0	3,3	4,4	0	11,7	0	0	0	0	
Heptacloro	0,9	0	13,1	0	11,5	0	27,8	28,3	0	0	0	0	0	32,9	0	0	7,6	0	0	0	0	
Alacloro	103,3	146,6	112,5	133,4	290,3	72,7	399,8	44,4	383,5	38,8	114,0	187,1	101,3	44,2	220,5	123,2	244,0	78,8	246,1	84,6	0	
<i>c</i> -Heptacloro epóxido	2,3	0	2,8	5,1	0	0	6,4	16,1	7,8	0	0	0	3,6	0	0	4,4	6,1	0	0	0	39,7	
<i>z</i> -Heptacloro epóxido	0	88,1	5,1	56,3	8,3	20,7	13,4	5,3	81,4	2,8	0	13,3	41,4	1,2	0	22,4	0	2,4	0	0	9,8	
<i>t</i> - <i>c</i> -clordano (g)	55,3	0	10,3	0	12,9	0	46,4	5,0	60	0	16,9	0	19,9	0	16,2	0	11,9	6,4	0	0	42,3	
<i>c</i> -clordano (a)	51,1	0	0	0	23,9	0	45,6	0	23,7	0	32,4	0	15,3	0,2	0	0	33,7	0	0	0	0	
<i>t</i> -nonaclor	7,3	0	5,1	0	0	0	0	45,5	0	0	25,7	52,8	19,4	0	0	0	0	0	0	0	58,9	
Aldrin	56,9	16,7	58,5	97,8	141,1	0	217,2	0	64,5	0	114,6	0	83,5	0	105,7	0	124,7	0	105,2	0	0	
Dieldrin	0	0	7,2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	37,5	0	0	10,7	0	0	0	230,6	
Endrin	14,3	0	0	37,4	4,3	38,0	18,9	0	43,7	0	9,6	0	25,1	3,3	0	0	8,6	0	0	0	0	
Endrin aldeido	50	0	36,4	0	88,8	0	22,0	0	0	0	123,7	0	0	0	0	3,0	24,7	0	0	0	85,9	
$\alpha$ -endossulfan	15,7	0	5,2	0	5,0	0	7,8	0	146,7	1,5	11,0	0	33,6	5,9	21,6	0	7,3	0	0	0	72,1	
$\beta$ -endossulfan	0	0	20,3	0	23,9	110	32,8	0	0	0	167,6	108,3	1,5	0	0	120	4,7	26,0	0	0	96,1	
Endossulfan sulfato	25,6	54,6	0	24,2	43,5	0	55,2	0	0	0	91,4	0	0	0	0	0	22,9	0	0	0	66,9	
Fipronil	0	0	10,8	0	58,6	2,0	0	15,8	0	2,0	0	0	0	10,4	0	10,5	21,4	3,0	0	0	42,1	
Peritlaclor	60,9	0	17,9	0	53,1	0	0	0	0	0	58,4	94,1	0,4	0	0	0	50,5	0	0	0	0	
$\Sigma$ OCs	1133	347,2	390,7	372,3	1540	279,6	2504	339,7	848,8	45,2	1390	1171	1156	260,4	385,3	312,9	1247	127,6	410,3	1685	0	0

TABELA 2. Perfil de contaminação por PCBs (médias e valores máximos) de 10 indivíduos de *Hoplias malabaricus* provenientes do lago situado em Ponta Grossa. Concentração (ng/g de tecido seco) de 23 congêneres. Análises cromatográficas do congêner 8 ao 180 em amostras de músculo e fígado.

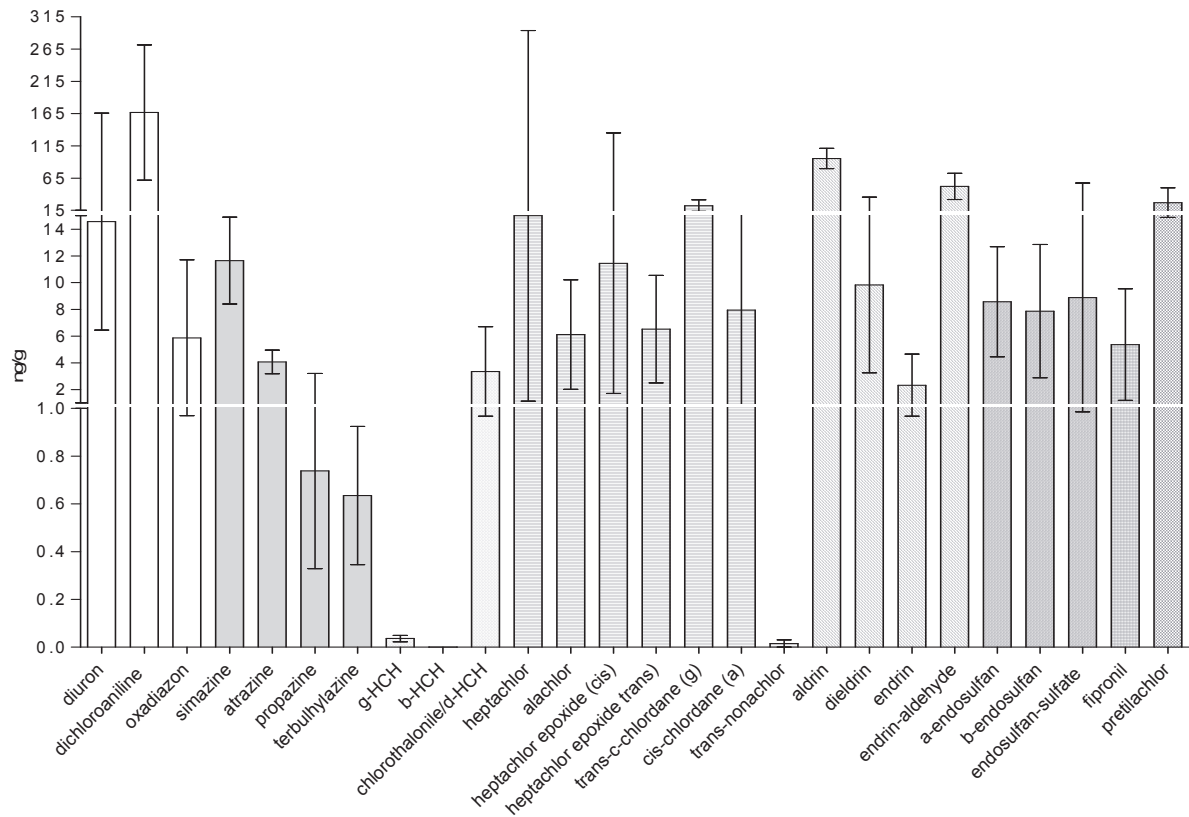
PCBs	Músculo			Fígado		
	média±sd	Média geom [min-max]	% indivíduos contaminados	média±sd	Média geom [min-max]	% indivíduos contaminados
CB8	12.3±4.6	0.62 [nd-41]	60%	157.0±58.7	15.2 [nd-503]	80%
CB18	12.5±7.0	0.52 [nd-67.7]	60%	56.0±26.8	0.5 [nd-205]	50%
<b>CB28</b>	48.0±12.4	38.3 [17-136]	100%	140.0±42.9	38.2 [nd-397]	90%
<b>CB31-52</b>	10.2±5.6	0.12 [nd-48]	40%	5.4±5.7	0.01 [nd-54]	10%
CB44	12.9±5.3	0.3 [nd-44]	50%	59.8±24.1	1.3 [nd-208]	60%
CB70	17.7±5.9	2.3 [nd-44]	80%	73.9±33.2	3.3 [nd-302]	70%
<b>CB101</b>	25.7±9.6	1.6 [nd-68]	70%	129.3±51.7	32.2 [nd-431]	90%
CB81	25.2±11.1	0.86 [nd-98]	60%	272.8±160.3	32.0 [nd-1513]	90%
<i>CB77</i>	27.3±17.5	0.4 [nd-167]	50%	127.2±46.6	2.6 [nd-388]	60%
CB151	21.9±11.1	0.7 [nd-98]	60%	44.8±19.2	1.3 [nd-183]	60%
<b>CB118</b>	13.3±7.7	0.2 [nd-57]	50%	95.1±32.4	12.8 [nd-337]	80%
<i>CB123</i>	nd	nd	nd	7.9±7.3	0.04 [nd-70]	20%
<i>CB114</i>	6.2±4.5	0.1 [nd-43]	40%	54.5±16.6	8.4 [nd-139]	80%
<b>CB153</b>	16.1±7.0	0.3 [nd-64]	50%	25.9±14.4	0.18 [nd-122]	40%
<i>CB105</i>	30.6±17.7	0.4 [nd-157]	50%	11.5±7.8	0.06 [nd-70]	30%
CB137	17.6±10.1	0.07 [nd-85]	30%	10.1±7.4	0.03 [nd-62]	20%
<i>CB126</i>	nd	nd	0%	nd	nd	0%
CB128	4.7±4.2	0.02 [nd-40]	20%	3.8±4.0	0.01 [nd-38]	10%
<b>CB138</b>	33.2±14.2	0.5 [nd-102]	50%	13.4±13.1	0.03 [nd-125]	20%
<i>CB167</i>	16.8±9.7	0.11 [nd-79]	40%	23.4±10.1	0.4 [nd-76]	50%
<i>CB156</i>	17.6±8.0	0.7 [nd-77]	60%	20.4±10.0	0.4 [nd-80]	50%
<i>CB157</i>	56.5±18.3	3.3 [nd-131]	70%	9.7±7.3	0.03 [nd-65]	20%
<b>CB180</b>	6.6±5.1	0.02 [nd-47]	20%	0.5±0.6	0.01 [nd-5.2]	10%

TABELA 3. Bioacumulação de HCB, DDT e seus metabólitos (*op'*-DDD ; *pp'*-DDD ; *op'*-DDE ; *pp'*-DDE; *op'*-DDT and *pp'*-DDT) em músculo e fígado de *Hoplias malabaricus* provenientes do lago situado em Ponta Grossa. Concentração (ng/g de tecido seco).

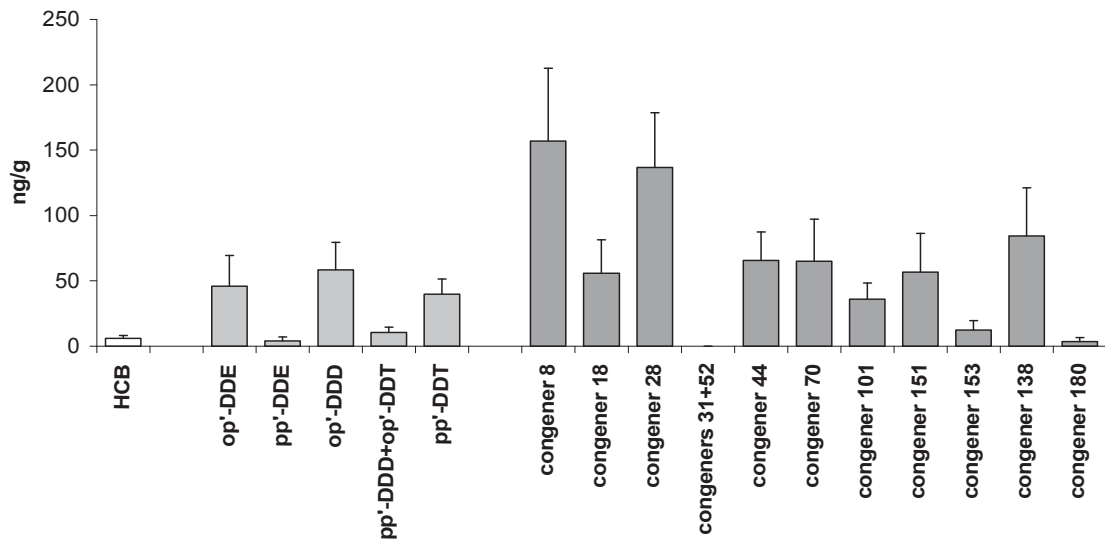
	Músculo			Fígado		
	média±sd	Média geom [min-max]	% indivíduos contaminados	média±sd	Média geom [min-max]	% indivíduos contaminados
HCB	19.2±3.6	16.7 [9.7-36]	100%	90.3±19.5	71.7 [8.9-232]	100%
<i>op'</i> -DDE	28.8±10.4	20.9 [0.8-102]	80%	175.3±76.8	130 [44-719]	80%
<i>pp'</i> -DDE	30.5±11.9	42.1 [15-102]	60%	81.7±36.8	77.7 [27-327]	70%
<i>op'</i> -DDD	17.7±5.2	22.6 [9.9-42]	70%	32.3±12.4	35.0 [8.6-119]	70%
<i>pp'</i> -DDD/ <i>op'</i> -DDT	34.1±12.6	21.6 [3.6-107]	90%	77.1±65.2	31.0 [5.7-632]	70%
<i>pp'</i> -DDT	48.9±12.9	32.8 [3.3-113]	100%	49.3±20.0	33.6 [5.3-205]	90%



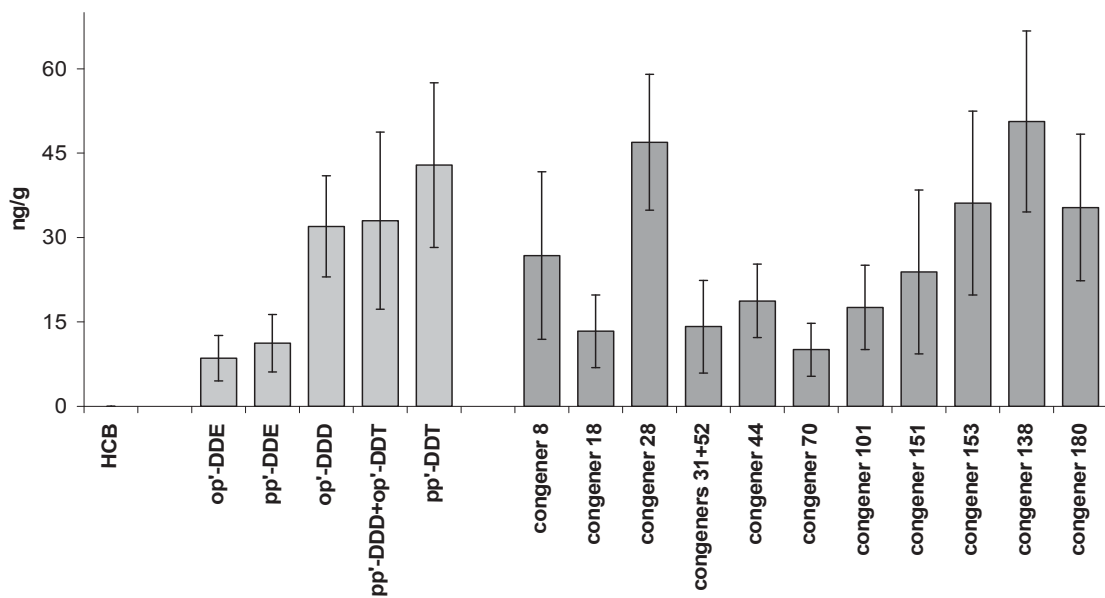
**FIGURA 4.** Concentração de compostos organoclorados em lipídeos extraídos do fígado de *Hoplias malabaricus*. Concentração estabelecida em ng/g de tecido seco.



**FIGURA 5.** Concentração de compostos organoclorados em lipídeos extraídos do músculo de *Hoplias malabaricus*. Concentração estabelecida em ng/g de tecido seco.



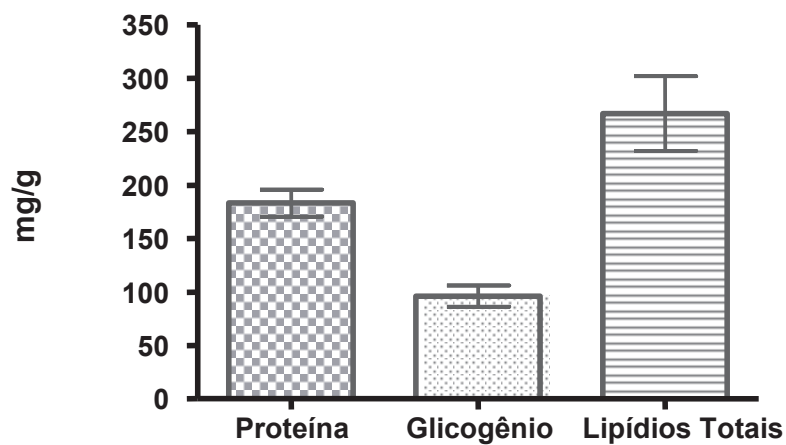
**FIGURA 6.** Concentração de HCB, PCBs, DDT e seus metabólitos retirados de lipídeos do fígado de *Hoplias malabaricus*. Concentração estabelecida em ng/g de tecido seco.



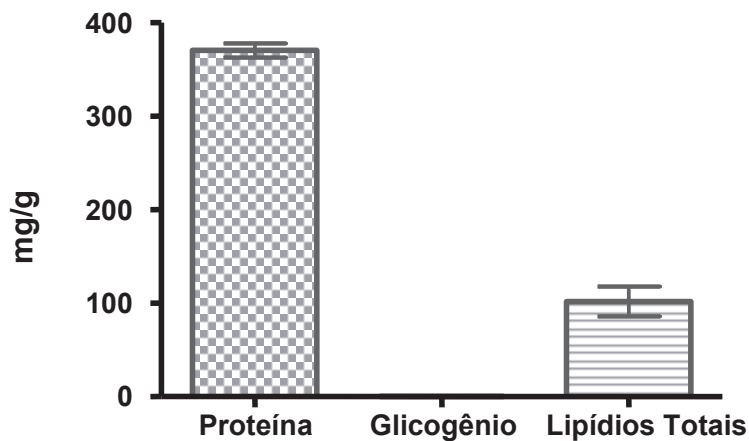
**FIGURA 7.** Concentração de HCB, PCBs, DDT e seus metabólitos retirados de lipídeos do músculo de *Hoplias malabaricus*. Concentração estabelecida em ng/g de tecido seco.

#### 4.2. RESULTADOS DAS DOSAGENS DE PROTEÍNAS, GLICOGÊNIO E LIPÍDIOS TOTAIS

Os parâmetros fisiológicos como lipídios totais, proteínas e glicogênio medidos no fígado e no músculo de todos os indivíduos estudados estão representados nas Figuras 8 e 9. Curiosamente o glicogênio não foi observado no músculo, nem se apresentou elevado nos valores detectados no fígado, observou-se proteína no fígado e no músculo, onde a quantidade mais expressiva foi encontrada no músculo. O parâmetro mais variável foi à presença de lipídios totais no fígado.



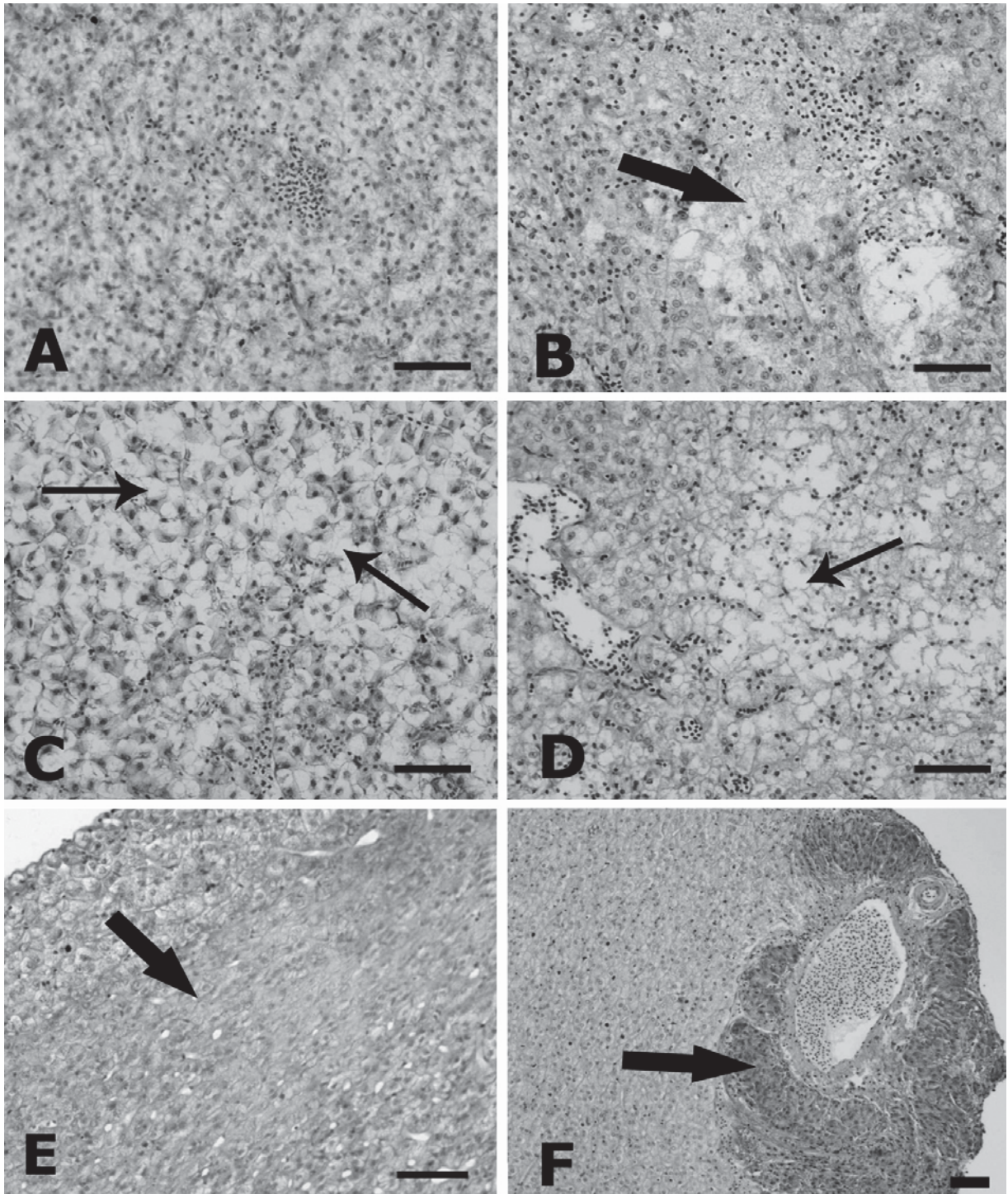
**FIGURA 8.** Distribuição de proteína, glicogênio e lipídios totais em fígado de *Hoplias malabaricus*. Concentrações expressas em mg/g de tecido seco.



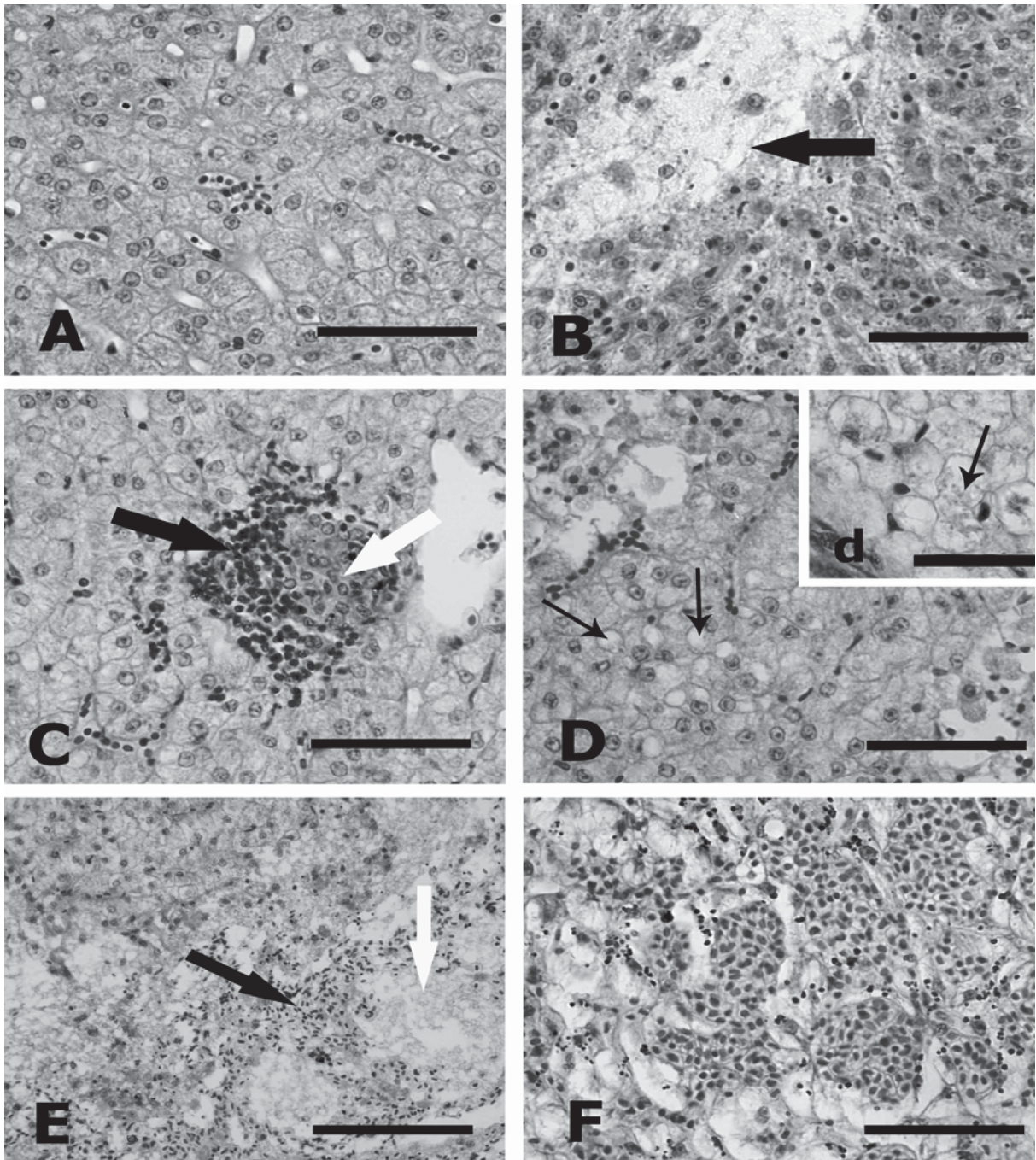
**FIGURA 9.** Distribuição de proteína, glicogênio e lipídios totais em músculo de *Hoplias malabaricus*. Concentrações expressas em mg/g de tecido seco.

#### 4.3. RESULTADOS DAS AVALIAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS DE FÍGADO DE *Hoplias malabaricus*

Os achados histopatológicos no trabalho atual mostram danos severos no fígado do *Hoplias malabaricus* incluindo uma incidência elevada de necroses, vacuolização celular, fibrose hepática, área hiperplásica, diferenciação tecidual e respostas inflamatórias (FIGURAS 10 e 11). A presença destas lesões mostra que os indivíduos estão expostos aos contaminantes de forma aguda e crônica. O controle usado como referência do tecido hepático de *Hoplias malabaricus* já tem sido descrito por Rabitto et al. (2005) e pode ser observada nas figuras 10A e 11A. Uma incidência elevada de áreas de necroses foi encontrada em todos os indivíduos estudados e representa uma lesão muito importante no estudo atual (FIGURAS 10 e 11). A presença de vacuolização celular é observada em grandes áreas do tecido (FIGURAS 10C e 11E) ou representado por focos de células alteradas (FIGURA 10D). A presença da resposta inflamatória foi observada também (FIGURA 11C) na maioria dos indivíduos estudados. As lesões crônicas importantes como diferenciação do tecido (FIGURA 11E e 11F), fibrose (FIGURA 10F) e neoplasia pancreática (FIGURA 10F) foi evidente em alguns indivíduos. Os indivíduos não apresentaram ocorrência de centros de melanomacrófagos no fígado, embora estas estruturas sejam encontradas normalmente no fígado desta espécie de peixes.



**FIGURA 10.** Corte histológico de fígado de *Hoplias malabaricus*. A – Tecido hepático normal. Escala = 50 $\mu$ m. B – Área de necrose (seta). Escala = 50 $\mu$ m. C e D – Focos de vacuolização (setas). Observa-se infiltração leucocitária (seta). Escala = 50 $\mu$ m. E – Diferenciação do tecido hepático (seta). Escala = 100 $\mu$ m. F – Grande área de diferenciação e hiperplasia do tecido pancreático ao redor de um vaso. Escala = 100 $\mu$ m.



**FIGURA 11.** Corte histológico de fígado de *Hoplias malabaricus*. A – Tecido hepático sem alterações. Escala = 50 $\mu$ m. B – Área de necrose bastante desenvolvida (seta). Escala = 50 $\mu$ m. C – Processo inflamatório (seta escura) e área de diferenciação tecidual tipo neoplásica (seta branca). Escala = 50 $\mu$ m. D – Vacuolização celular (setas). Escala = 50 $\mu$ m. No detalhe (d) observa-se a presença de células necróticas (seta). Escala = 50 $\mu$ m. E – Área de necrose bastante já em fase de cicatrização (seta branca). As setas escuras mostram infiltração leucocitária. Escala = 100 $\mu$ m. F – Áreas de diferenciação tecidual avançada e invasão leucocitária. Escala = 100 $\mu$ m.

#### 4.4. TESTES DA PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DO OXIGÊNIO PELO MÉTODO DO NBT

As células expostas aos extratos lipídicos de fígado de *Hoplias malabaricus* (FIGURA 12A), demonstraram um decréscimo no estímulo de produção de ROS quando comparadas às células controle (C). Apenas a amostra F2 apresentou um estímulo na produção de ROS significativa quando exposta isoladamente, na presença do PMA todas as amostras incluindo o DMSO tiveram uma redução significativa.

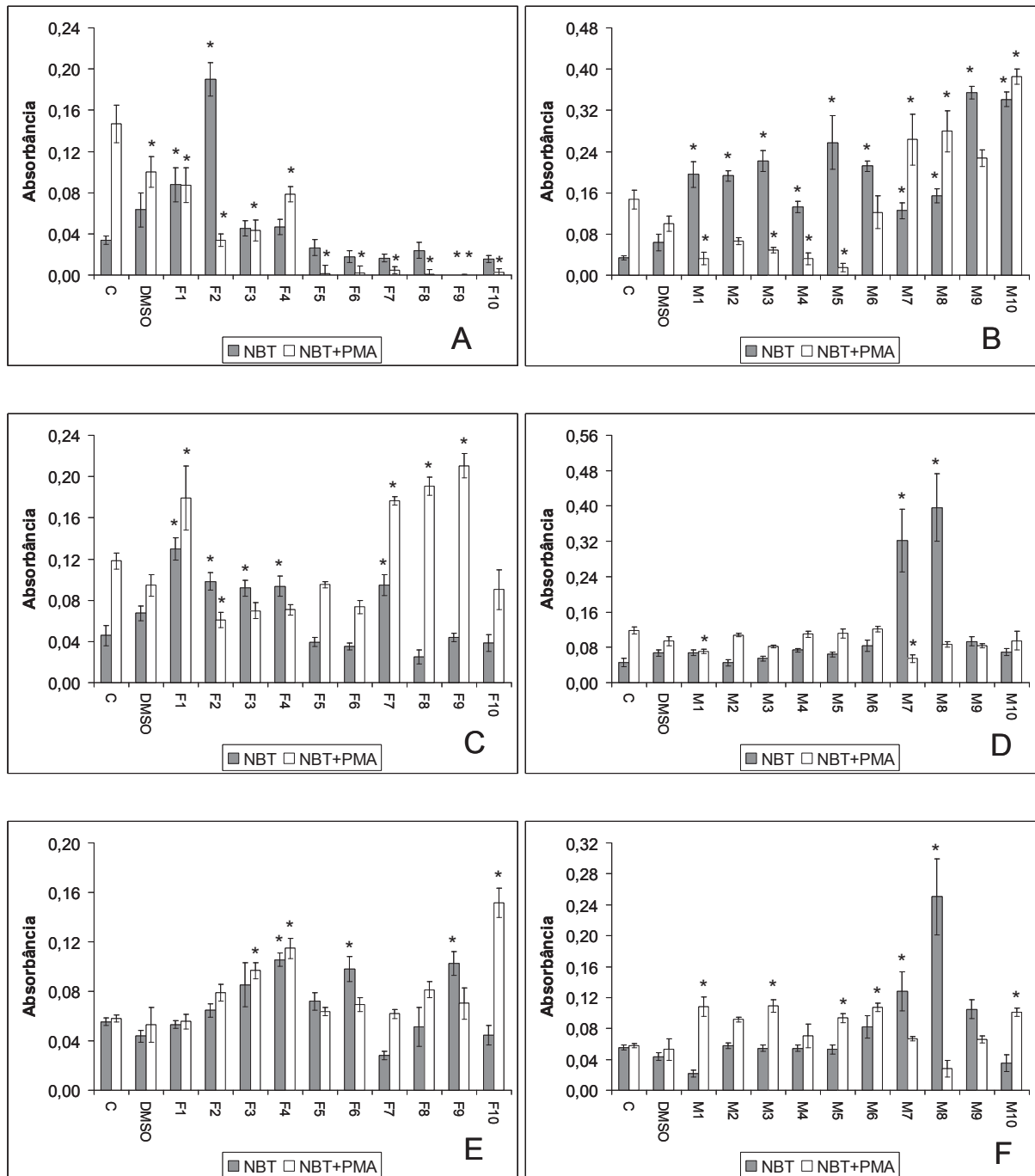
No tempo de exposição de 24 horas (FIGURA 12C) as amostras F1, F2, F4 e F7 quando expostas isoladamente tiveram um aumento significativo na produção de ROS. Porém quando expostas juntamente com o PMA apenas as amostras F1, F7, F8 e F9 apresentaram um aumento significativo. A amostra F2 continuou com o mesmo comportamento daquele observado no tempo 3.

Durante a exposição de 48 horas (FIGURA 12E), apenas as amostras F4, F6 e F9 demonstraram um aumento significativo na produção de ROS. As amostras F3, F4 e F10 apresentaram um aumento quando em presença do PMA.

Todas as amostras de células expostas isoladamente aos extratos lipídicos de músculo de *Hoplias malabaricus* (FIGURA 12B), apresentaram um aumento significativo. As amostras M1, M3, M4 e M5 quando expostas juntamente com o PMA tiveram um decréscimo significativo, já as M7, M8 e M10 apresentaram um acréscimo significativo.

Em 24 horas (FIGURA 12D), M7 e M8 apresentaram aumento significativo em relação as células controles, quando expostas isoladamente aos extratos. As amostras M1 e M7 foram as únicas que tiveram um decréscimo no estímulo na presença de PMA.

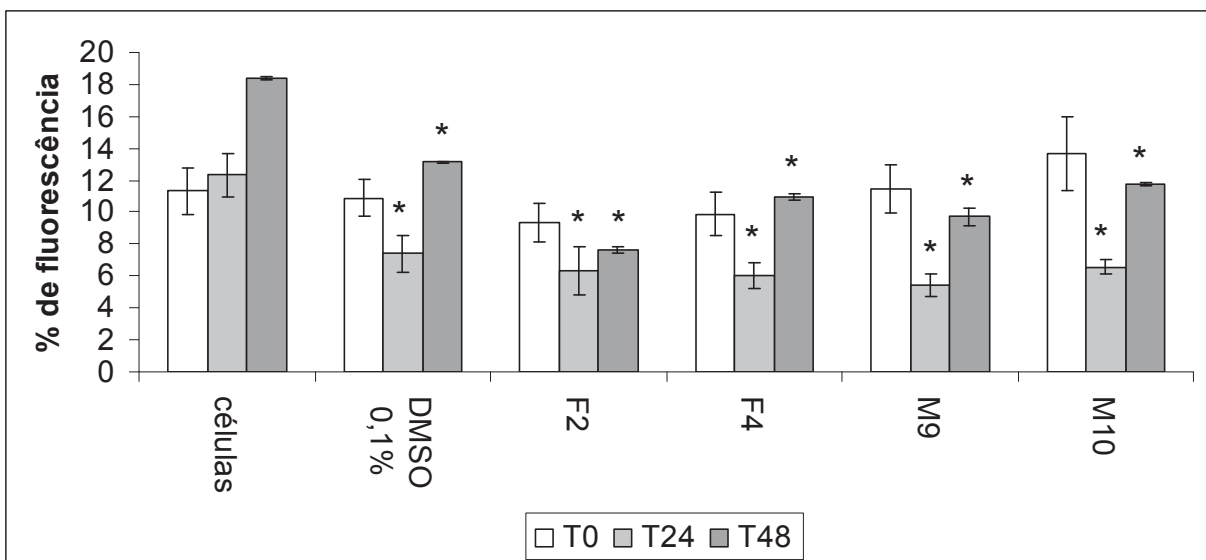
Na exposição de 48 horas (FIGURA 12F), as amostras M7 e M8 tiveram o mesmo comportamento em relação ao tempo de 24 horas de exposição. As amostras M1, M3, M5, M6 e M10 mostraram um aumento significativo quando expostas juntamente ao PMA.



**FIGURA 12.** Avaliação da produção das espécies reativas do oxigênio através do teste de NBT em macrófagos de *Cyprinus carpio*, expostos aos extratos lipídicos de fígado e músculo, contendo diferentes concentrações de compostos organoclorados. A; C; E – Macrófagos incubados com extratos lipídicos de fígado durante 3, 24 e 48 horas respectivamente. B; D; F - Macrófagos incubados com extratos lipídicos de músculo durante 3, 24 e 48 horas respectivamente. \*  $p < 0,05$

#### 4.5. TESTE DA ATIVIDADE FAGOCÍTICA PELO ENSAIO DE FLUORESCÊNCIA

Nota-se na figura 13 que a houve uma diminuição significativa na atividade fagocítica nos tempos de 24 e 48 horas de todas as amostras quando comparadas com as células controle. Apenas em T0 não houve diferença significativa em nenhuma das exposições. A escolha das amostras F2, F4, M9 e M10, foi feita a partir da concentração e da variedade de compostos organoclorados presentes em cada uma delas. F2 apresentou a menor somatória das concentrações (390,7 ng/g) em relação ao número de compostos (18), F4 apresentou a maior somatória das concentrações (1540 ng/g) e alguns compostos diferentes de F2 (dicloroanilina, c-clordano, endrin e endossulfan sulfato), M9 apresentou a menor somatória das concentrações (127,6 ng/g) em relação ao número de compostos (9), M10 apresentou a maior somatória das concentrações (1685 ng/g) e apresentou alguns compostos diferentes de M9 (dicloroanilina, c-heptacloroepóxido, dieldrin, endrin aldeído,  $\alpha$ -endossulfan, endossulfan sulfato).



**FIGURA 13.** Avaliação da atividade fagocítica através do ensaio de fluorescência utilizando macrófagos expostos aos extratos lipídicos de fígado (F2 e F4) e músculo (M9 e M10).

## 5. DISCUSSÃO

Os indivíduos desta espécie (*Hoplias malabaricus*) estão localizados no topo da cadeia alimentar e sobrevivem em condições de privação extrema de alimentos (RIOS et al., 2005), e, portanto tendem a concentrar os compostos organopersistentes em seus tecidos lipídicos como observado neste trabalho. Segundo Roche et al. (2002) estes compostos são altamente lipofílicos e resistentes a degradação bioquímica.

Vários parâmetros estão associados com a bioacumulação dos compostos organopersistentes em peixes, incluindo a lipossolubilidade, grau de ionização, estabilidade, forma e tamanho da molécula, e conteúdo lipídico das espécies (ESSER E MOSER, 1982). As diferenças entre as concentrações destes compostos nos dados obtidos neste trabalho em relação a outros trabalhos (OLIVEIRA RIBEIRO et al., 2005; PAZOU et al., 2006) podem ser atribuídos a estes e outros fatores. Ainda que, indivíduos do sexo feminino tenham apresentado uma maior concentração de organoclorados no fígado, estes dados não puderam ser completamente explicados, embora a diferença tenha sido constatada neste estudo. Como as coletas ocorreram em agosto, pode-se sugerir, no entanto que as fêmeas acumulem mais reservas na forma de gordura neste período para a maturação dos ovos e posterior desova na primavera, explicando a maior ocorrência destes poluentes nestes indivíduos.

O aldrin é um pesticida usado no controle de térmitas, vermes que atacam as raízes do milho, controle de coleópteros e larvas no cultivo de arroz. Foi completamente banido em mais de 110 países devido a sua persistência no ambiente e por ser considerado um contaminante altamente perigoso aos organismos vivos (DNR, 2006). Podendo ser absorvido pela pele, por ingestão ou por inalação, sua toxicidade deve-se a seu rápido metabolismo gerando metabólitos como o dieldrin. Os sintomas de intoxicação estão relacionados com a inibição do neurotransmissor GABA, causando em humanos dores de cabeça, tremores, vertigens, hiperexcitabilidade, desmaios e coma. Este composto é muito tóxico para os peixes e crustáceos aonde a  $CL_{50}$  varia de 2,2 a 5,3  $\mu\text{g/l}$ . Tanto o aldrin como o dieldrin, são poluentes que estão relacionados com

danos hepáticos, provavelmente induzidos por estresse oxidativo (EPA, 2004), efeitos no sistema nervoso central e supressão do sistema imune. Estes compostos podem ser considerados disruptores endócrinos com efeitos no desenvolvimento fetal, e a concentração destes em peixes usados na dieta humana pode aumentar o risco de contaminação destas populações, onde a dose diária é fixada em 0,0001 mg/kg/dia. O presente estudo mostra que as traíras desta região constituem uma fonte de exposição humana em potencial a este contaminante, e confirmam a importância da mesmas como sentinelas em áreas poluídas.

O diuron é um herbicida da família das uréias substituídas, muito utilizada contra no combate a plantas daninhas em zonas agrícolas, mas também em jardins, parques e calçadas. O produto é absorvido pela raiz do vegetal e tem ação antigerminativa atuando nas folhas. Segundo uma decisão da Comunidade Européia de 2001, este composto foi considerado nocivo ao ambiente devido às suspeitas dos seus efeitos carcinogênicos. É um produto tóxico para os organismos aquáticos, podendo ocasionar distúrbios de reprodução e desenvolvimento nestes organismos (EPA, 2004). O diuron é biologicamente ativo e persistente, encontrado no solo, água e sedimento, apresenta baixa toxicidade para mamíferos e pássaros e toxicidade moderada aos invertebrados aquáticos (GIACOMAZZI et al., 2004). Entretanto, o principal produto de sua biodegradação é a 3,4-dicloroanilina (DCA) que possui uma alta toxicidade e também é altamente persistente no solo e água (GIACOMAZZI et al., 2004). A DCA e seus análogos trazem distúrbios ao crescimento e desenvolvimento. Estudos sugerem que o DCA induz a geração de radicais livres e a depleção de antioxidantes, causando o estresse oxidativo e lipoperoxidação no fígado de carpas (LI et al., 2003), corroborando com a alta incidência de necroses observadas nos fígados das traíras e outras lesões degenerativas encontradas no fígado.

O alaclor [2-cloro-N-metoximetil-N-(2,6-dietilfenil) acetamida] é extensamente usado como um herbicida pré - emergente do cloroacetanilida que foi classificado pelo USEPA como um provável carcinogênico humano (COLEMAN et al., 1999). A alta persistência do alaclor pode ser esperada em baixas temperaturas e em condições anaeróbicas. Com relação aos compostos organoclorados analisados neste trabalho,

este composto foi encontrado em todas as amostras de fígado e músculo, mostrando que se encontra biodisponível em mesmo em condições ambientais distintas das descritas acima. Além disso, a translocação dos resíduos em tecido lipídico e a bioacumulação destes compostos em peixes é significativa nos termos da contaminação residual (RAMESH et al., 2004). Muitos dos efeitos à saúde devido a exposição ao alaclor são as irritações da pele ou dos olhos devido ao contato direto, mas a exposição trófica pode causar danos no fígado, nos rins, nos olhos, e no baço (IDPH, 2006).

Segundo Alvarez et al. (2005), a atrazina foi desenvolvida para inibir a fotossíntese das plantas, mas causa efeitos múltiplos nos animais interferindo no comportamento social e antipredador do goldfish (*Carassius auratus*). Alguns efeitos em nível de população são discutidos como o crescimento do período larval e a redução da população juvenil. Embora não haja nenhuma evidência que o alaclor e o atrazina causem o câncer nos seres humanos, eles são classificados ainda como carcinogênicos potenciais humanos devido ao registro da incidência dos tumores em ratos (IDPH, 2006). A presença de uma incidência elevada de áreas neoplásicas ou diferenciadas no fígado, constituem fortes evidências de que estes compostos possam estar relacionados com a diferenciação tecidual e as áreas de hiperplasia tecidual observados em *Hoplias malabaricus*.

O fipronil é um inseticida do grupo químico dos fenilpirazóis de segunda geração usado extensamente na medicina veterinária como pesticida contra pulgas e carrapatos. Este composto é um potente inibidor do canal de cloro dependente do ácido gama-aminobutírico (GABA) onde a morte do inseto é causada pela hiper-excitação, convulsões e por paralisia (OHI et al, 2004), sendo ativo em baixas doses em vários insetos terrestres (CHANTON et al, 2001). O fipronil é altamente tóxico para peixes e invertebrados aquáticos, mas sua tendência em ligar-se ao sedimento e sua baixa hidrossolubilidade podem reduzir o potencial tóxico aos animais aquáticos selvagens (WWF, 1999). Embora as concentrações em alguns espécimes não seja demasiado elevadas, a presença deste composto na traíra mostra uma biodisponibilidade interessante apesar das características hidrofóbicas deste composto.

Embora as lesões observadas no fígado de *H. malabaricus* destaquem a severidade dos danos encontrados neste importante órgão, não podemos fazer uma correlação direta com a presença dos compostos organoclorados acumulados neste tecido, porque nenhum dano específico pode ser atribuído a este ou aquele composto devido a grande diversidade de moléculas encontradas no órgão. Algumas lesões hepáticas como a incidência de necroses no fígado é geralmente típica para exposições a múltiplos contaminantes como os metais pesados, poluentes organopersistentes, entre eles os pesticidas organoclorados e os bifenis policlorados, como descrito por outros autores (AU, 2004; OLIVEIRA RIBEIRO et al., 2002; BONDY et al., 2003; PADROS et al., 2003; AKAISHI et al., 2004; BROWN E STEINERT, 2004; RABITTO et al., 2005; OLIVEIRA RIBEIRO et al., 2005). De acordo com o Li et al. (2000) e Avci et al. (2005) necroses estão fortemente associadas com o estresse oxidativo onde a lipoperoxidação da membrana é a fonte mais importante das espécies oxidativas quando o tecido é exposto à presença de poluentes.

Os PCBs são estruturalmente relacionados com o grupo de hidrocarbonetos aromáticos halogenados e possuem 209 congêneres com diferentes posições e números de átomos de cloro. Devido a sua estabilidade química e seu uso extensivo na indústria em meados dos anos 60 os PCBs se tornaram contaminantes ubíquos e permanentes no ambiente. Altamente lipofílicos os PCBs podem ser encontrados ao longo da cadeia alimentar e tendem a se acumular nos tecidos animais. A toxicidade destes compostos depende em parte da sua estrutura química onde os coplanares possuem características menos tóxicas que os não planares. Porém, os PCBs aparecem no ambiente em misturas múltiplas e congêneres variados, desta forma os animais nunca estão expostos a um único tipo de PCB (POCAR et al., 2006). Por esta razão, estudo dos danos causados aos organismos se torna extremamente necessário bem como a compreensão do sinergismo ou antagonismo destas misturas complexas. Este trabalho tentou correlacionar o aparecimento destes compostos com os danos histopatológicos e variações fisiológicas. Sabe-se que os PCBs como o CB77, CB28, CB118, CB153, CB128 e CB105 estão relacionados a danos histopatológicos em fígado (ATSDR, 2002), e sendo assim os dados encontrados como necroses e diferenciação

celular podem estar relacionados à exposição também a estes compostos, uma vez que todos eles se mostraram presentes neste estudo. No entanto existem outros poluentes que igualmente provocam lesões em tecidos como alguns metais pesados, pesticidas, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos dentre outros (AKAISHI et al., 2004; RABITTO et al., 2005; OLIVEIRA RIBEIRO et al., 2005), e que não foram estudados neste trabalho. A presença de vários danos no fígado de *Hoplias malabaricus* provenientes do lago de Ponta Grossa sugerem uma relação destes com os efeitos já descritos ocasionados pelos congêneres CB28, CB118, CB153, CB128 e ainda aos chamados “*dioxin-like PCBs*” CB77 e CB105, onde danos histopatológicos são freqüentes em vertebrados (ATSDR, 2000). Acreditamos, portanto, que os sérios danos encontrados na estrutura do fígado de *H. malabaricus*, devem-se também a um efeito múltiplo de vários contaminantes difícil de avaliar, mas que sugere uma participação efetiva do acúmulo POPs no fígado.

Suwalsky et al. (1999) relata ainda uma relação do HCB com danos na membrana de eritrócitos, modificando a morfologia destas células e mais recentemente Song et al (2006) observou um aumento na produção das espécies reativas do oxigênio e aumento da lipoperoxidação em *Cyprinus carpio*. Estes dados sugerem ainda que os danos encontrados no fígado da espécie em estudo podem estar correlacionados, apesar de terem sido evidenciados neste mesmo trabalho a presença de outras substâncias como os OCs que também são potencialmente capazes de provocar tais alterações. Da mesma forma, como já citado neste trabalho a presença de outros contaminantes não identificados, em conjunto podem estar favorecendo este tipo de dano.

Segundo Binelli et al. (2004) a presença de DDT no lago Maggiore na Itália ocasiona problemas reprodutivos em mexilhões, mesmo 7 anos depois do real lançamento deste composto no ambiente. Foi verificado ainda que a presença de DDT e seus metabólitos podem ocasionar necroses em gônadas e danos na membrana lisossomal (Werner et al., 2004). Embora as lesões encontradas no presente trabalho não estejam relacionadas com aspectos reprodutivos, as lesões citadas por Werner et al. (2004) fornece evidências de que o DDT pode potencialmente provocar danos na

estrutura de tecidos de órgãos alvos como o fígado. Sendo assim, acreditamos que o DDT em conjunto com os outros poluentes encontrados no fígado e músculo de *H. malabaricus* esteja envolvido com as lesões descritas neste trabalho, no entanto outros estudos serão necessários para confirmar tais hipóteses.

O carboidrato está armazenado como o glicogênio tanto no músculo como no fígado, mas no fígado constitui a primeira linha de defesa quando a concentração de glicose do sangue cai. Está bem descrito que os parâmetros fisiológicos e bioquímicos no sangue dos peixes e nos tecidos poderiam mudar quando expostos aos poluentes (CICIK et al., 2005). A presença de compostos organoclorados no fígado e no músculo poderia mudar níveis das reservas de glicogênio nos peixes afetando as atividades bioquímicas em ambos os tecidos, explicando a ausência de glicogênio no músculo. As substâncias encontradas no presente trabalho são todas lipofílicas e as correlações positivas são exibidas entre índices de lipídeos e concentração destes compostos nos respectivos tecidos. Se a impregnação hepática indica uma contaminação mais recente, tais resultados sugerem um uso recente de compostos organoclorados próximo ao local estudado, possivelmente uma pulverização do fipronil. Os níveis da proteína raramente estão correlacionados com as concentrações de compostos organoclorados exceto para o trans-nonachlor no músculo e o fipronil no tecido hepático. Esta observação deixa claro um efeito metabólico típico do fipronil.

Entre todos os compostos organoclorados bioacumulados nas traíras o único que ainda é utilizado em vários países é o endosulfan, todos os outros já foram banidos. O endosulfan é aplicado para tratar uma extensa variedade de cultivos de alimento tais como o chá, avelã, frutas, cereais, milho e outros grãos. Com relação a este composto, Capkin et al. (2006) descreveu que peixes apresentaram necroses focais severas quando expostos ao endosulfan, o que foi relatado também para as traíras do local estudado.

Algumas correlações significativas foram mostradas entre o glicogênio hepático e muscular e as concentrações de compostos organoclorados em *Hoplias malabaricus*. Estas concernentes ao alaclor e o heptaclorepóxido no fígado e o diuron no músculo. O aumento dos índices do glicogênio prova ser um marcador significativo da

contaminação orgânica. Não obstante estas observações contradigam aquelas descritas classicamente. A respeito da concentração do glicogênio, um número de resultados contraditórios foi descrito em estudos ecotoxicológicos. A intoxicação aguda pode conduzir a uma depleção do glicogênio (GIMENO et al. 1995, SANCHO et al. 1998, STRMAC E BRAUNBECK 1999, WALTER et al. 2000) como uma consequência de uma privação do alimento e uma diminuição da gliconeogenesis, frequentemente dose-dependente, devido a uma atividade diminuída das enzimas gliconeogênicas chaves (FEELEY 1995; VILUKSELA et al. 1999). Além disso, Braunbeck e Appelbaum (1999) descreveram a depleção de glicogênio e de lipídeos e mudanças ultraestruturais observadas no fígado em doses extremamente baixas de endosulfan em carpa. Opostamente Oruc e Uner (1998) mostraram uma falta de tal resposta fisiológica em *Cyprinus carpio* L. (carpa) submetida a estresse químico. Os autores concluíram que uma elevação da glicogenólise ocorreu seguida a um estresse químico agudo e os mecanismos compensatórios são desenvolvidos durante a exposição crônica. A correlação positiva entre o índice do glicogênio e micro concentrações do poluente tende a mostrar uma coexistência de uma alteração patológica e uma estimulação geral do metabolismo hepático.

A contaminação do ambiente aquático natural por produtos químicos de resíduos industriais e/ou agrícolas é um fator imunossupressor importante resultando em uma susceptibilidade mais elevada às doenças infecciosas (KÖLLNER et al., 2002). Recentemente, estes parâmetros foram utilizados em espécies não - mamíferas como indicadores para prever a imunotoxicidade induzida por estes produtos (ZELIKOFF et al., 2002). Entre a grande classe dos contaminantes alguns deles podem modular a resposta imune em diferentes espécies incluindo os seres humanos: cádmio, chumbo, níquel, inseticidas organoclorados e organofosforados, dibenzo-p-dioxina e benzo(a)pireno (ZELIKOFF, 1998). Habitualmente os melanomacrófagos são encontrados no fígado da traíra saudáveis, mas a completa ausência destas células nos indivíduos provenientes do local estudado vai de encontro aos dados descritos acima, onde os compostos organoclorados podem atuar como um agente imunossupressor importante.

Resultados similares foram descritos em nosso laboratório em condições experimentais também em trairas expostas troficamente ao chumbo inorgânico (RABITTO et al., 2005) e ao metilmercúrio (MELA et al., 2006). Os resultados deste trabalho sugerem fortemente que os compostos organoclorados atuem como agentes imunossupressores.

Com base nos dados indicados em outros trabalhos como os compostos organoclorados sendo imunossupressores em peixes e por estes se localizarem no topo da cadeia trófica aquática, os peixes constituem formidáveis indicadores dos poluentes presentes no meio (água, sedimentos, biota) (VAN DER OOST et al., 2003). A compreensão do acúmulo e da evolução dos produtos tóxicos nos peixes assim como os efeitos biológicos associados apresenta uma pertinência ecotoxicológica inegável. Além disso, é importante notar que os peixes, como vertebrados consumidos pelo homem (pesca e piscicultura) podem igualmente servir de espécies sentinelas para considerar o risco toxicológico para a espécie humana.

Numerosos sistemas fisiológicos presentes nos peixes podem ser analisados tanto em nível das suas respostas celulares quanto moleculares no âmbito de estudos em ecotoxicologia. Entre eles, o sistema imune apresenta um interesse específico (BOLS et al., 2001). Eventuais mudanças prejudiciais da função imune apresentam um interesse ecotoxicológico, certas pelas repercussões potenciais que podem ter sobre a evolução da população afetando a sensibilidade dos indivíduos às doenças.

A função imune natural não específica dos peixes oferece numerosas possibilidades como fonte de bioindicadores de efeitos toxicológicos (KÖLLNER et al., 2002). A nível celular, esta função natural não específica é representada no peixe pelos leucócitos com função fagocitária (macrófagos em particular) (SECOMBES, 1996). Esta função fagocitária compreende duas etapas principais conhecidas por: ingestão das partículas antigênicas (etapa que corresponde à fagocitose propriamente dita) e a explosão oxidativa que corresponde ao mecanismo microbicida dependente do oxigênio e reflete a atividade lítica das células macrofágicas. Os macrófagos têm posição central na resposta imune dos peixes, eles são componentes celulares essenciais da imunidade não específica (NEUMANN et al., 2001) que contribuem igualmente para a

iniciação da resposta imune específica pelo seu papel na apresentação do antígeno (SECOMBES, 1996). Qualquer modulação desta função constitui um indicador importante de efeito imunotóxico.

No ambiente aquático, os poluentes e em especial as substâncias organopersistentes interagem com a biota em nível celular. Por este motivo, bioensaios *in vitro* podem constituir instrumentos sensíveis e satisfatórios para a detecção precoce dos efeitos tóxicos destes agentes químicos em escala celular. Os dados obtidos podem permitir prever o modo de ação das moléculas poluentes referidas. Tais abordagens são utilizadas geralmente nas ciências médicas e toxicológicas, contudo, os dados fornecidos por estes testes de toxicidade celular apresentam ainda certas limitações.

Os ensaios *in vitro* são realizados atualmente com moléculas nativas e assim não é levado em conta à distribuição tissular ou mesmo celular nem a biotransformação ou bioativação do agente tóxico que intervêm normalmente *in vivo* no organismo como um todo. É assim que a maior parte dos estudos de toxicologia ambiental *in vitro* refere-se a compostos químicos tomados separadamente sem levar em conta as formas - essencialmente das misturas multimoleculares e multielementares resultando ou não de mecanismos de metabolização e de desintoxicação - que estão realmente em contato com as células *in vivo*.

Assim sendo, o presente trabalho chegou o mais perto possível da realidade toxicológica ambiental, com extratos moleculares de POPs que foram isolados a partir de órgãos de peixes que têm sofrido no seu meio natural, contaminações mais ou menos importantes por estes poluentes, seus efeitos imunotóxicos foram estudados sobre a atividade lítica oxidativa *in vitro* de macrófagos de peixe.

Os resultados relativos à exposição dos macrófagos de carpa aos diferentes extratos obtidos a partir de fígado ou músculo revelam uma grande heterogeneidade dos efeitos medidos sobre a atividade oxidativa destas células. Algumas destas respostas podem estar associadas a alguns dos compostos encontrados nas amostras. No tempo de T3, apenas F1 e F2 estimularam de forma significativa à produção de espécies reativas de oxigênio, enquanto que a amostra F9 inibiu, as diferenças na

composição destes extratos estão na presença do trans-nonaclor em F1 e F2 e a presença do  $\gamma$ -HCH (lindano) em F9. Baixas concentrações de lindano são responsáveis pelo aumento na produção de espécies reativas do oxigênio (DUCHIRON et al., 2002), o que é contraditório em relação aos dados encontrados neste estudo. Porém F9 é a única amostra que apresenta a maior diversidade de compostos químicos o que torna difícil prever quais destes compostos poderiam estar ocasionando tal efeito.

A exposição dos macrófagos com algumas das amostras de moléculas extraídas de fígado de *Hoplias malabaricus* está associada a uma inibição transitória da atividade oxidativa das células. Após uma incubação de 24 horas, uma estimulação desta mesma atividade pôde ser observada. Enquanto as amostras F1 e F2 mantiveram o estímulo; F3, F4 e F7 que não haviam apresentado estímulo em 3 horas de exposição, mostraram tal efeito quando incubadas por 24 horas. Apesar de apresentarem composições químicas semelhantes o que se pode notar é a presença de concentrações diferentes de certos compostos o que poderia explicar o efeito tardio sobre as células. Após a incubação de 48 horas, alguns efeitos se mantiveram (ex. F4 – estimulador), mas outras amostras se tornaram estimuladoras como F6 e F9. No entanto, é preciso ressaltar que o controle positivo representado pelas células expostas ao PMA teve um decréscimo no estímulo, o que pode estar sendo provocado pela atuação do sistema antioxidante das células e isto também poderia estar influenciando as diferentes respostas encontradas neste período de incubação.

Nas amostras retiradas do músculo de *Hoplias malabaricus* e utilizadas para exposição das células do sistema imune de carpas foi observado efeito estimulador em 3 horas de exposição para todas as amostras, porém apenas M7 e M8 mantiveram este estímulo em 24 e 48 horas. A importante diversidade química, tanto qualitativa como quantitativa dos extratos pode explicar estes resultados, porém para prever o papel de certas famílias de pesticidas ou mesmo certas moléculas nas modulações observadas ao nível de atividade oxidativa dos macrófagos de peixe, é necessário um estudo isolado de cada uma das moléculas, bem como as associações destas em diferentes concentrações, o que torna o estudo exaustivo e quase que impraticável do ponto de vista logístico.

A avaliação dos impactos tóxicos promovidos por poluentes químicos é um desafio importante que traduz a forte demanda em termos de investigações e validação dos protocolos experimentais para ajudar na avaliação do risco. Assim, a análise dos efeitos *in vitro* de extratos biológicos expostos ricos em poluentes orgânicos persistentes sobre a função lítica oxidativa dos macrófagos, fornece uma estimativa da atividade biológica em conjunto destas moléculas presentes em cada uma das amostras biológicas, como de fato ocorreria no animal *in vivo*. Os efeitos observados integram também possíveis interações que possam existir entre as diferentes moléculas no interior da amostra. Este tipo original de ensaio *in vitro* constitui um instrumento bioanalítico indicador para a avaliação toxicológica de amostras ambientais aquáticas mais ou menos contaminadas. Este procedimento deve permitir uma melhoria no caráter preventivo destes tipos de ensaios.

Este trabalho mostrou a importância do biomonitoramento na referida região de estudo, assim como a necessidade de um estudo mais aprofundado na área, identificando o real potencial tóxico destes poluentes para as espécies nativas locais como para a população humana que utiliza estes animais contaminados em sua dieta. É necessário também investigar a presença de outros poluentes que possam estar presente e interferindo de forma a potencializar ou não os efeitos mencionados no presente trabalho. Outras espécies de peixes também merecem ser estudadas para se entender a dispersão destes poluentes na cadeia alimentar deste ecossistema em especial.

## 6. CONCLUSÕES

- Presença de compostos organoclorados no lago de Ponta Grossa mostra pela primeira vez que este ambiente está altamente impactado por poluentes orgânicos persistentes de fontes diversas e pode constituir sério risco para a população humana;
  
- Os dados atuais confirmam que compostos organoclorados bioacumulados em fígado de *Hoplias malabaricus* e as lesões hepáticas podem estar fortemente associados, mas os mecanismos tóxicos envolvidos com estes poluentes precisam ser ainda elucidados;
  
- Os achados histopatológicos mostraram que compostos organoclorados possivelmente associados a outros poluentes não mensurados, causam lesões severas com diferentes níveis de danos no fígado da traíra quando expostas naturalmente a estes contaminantes;
  
- A análise das lesões no fígado de peixes expostos naturalmente pode fornecer uma base para reconhecer síndromes de toxicidade e deve conseqüentemente ser utilizada no diagnóstico ambiental;
  
- A ausência de incidência dos melanomacrófagos no fígado dos indivíduos do local estudado pode estar relacionada com as concentrações elevadas de compostos organoclorados nos órgãos tais como: dicloroanilina, simazina, alaclor, diuron e aldrin, conhecidamente como moléculas imunossupressoras;
  
- A exposição de células do sistema imune de peixes à diversidade química encontrada nos tecidos lipídicos demonstra o potencial papel destas moléculas na imunomodulação, porém um estudo mais aprofundado para elucidar os mecanismos implicados nestas respostas deve ainda ser realizado.

## 7. REFERÊNCIAS

AHMED, S.R. The immune system as a potential target for environmental oestrogens (Endocrine disruptors): a new emerging field. **Toxicology** 150, 191-206, 2000.

AKAISHI, F.M.; SILVA DE ASSIS, H.C.; JAKOBI, S.C.G.; STJEAN, S.; COUTERNAY, S.C.; LIMA, E.; WAGNER, A.L.R.; SCOFIELD, A.; OLIVEIRA RIBEIRO, C.A. Morphological and neurotoxicological findings in tropical freshwater fish (*Astyanax* sp.) after waterborne and acute exposure to water soluble fraction (WSF) of crude oil. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.** 46, 244–253.2004.

ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J. D. **Biologia Molecular da Célula**. 4ª ed.; Artes Médicas. Porto Alegre, 2004.

ALVAREZ, M.C.; FUIMAN, L.A. Environmental levels of atrazine and its degradation products impair survival skills and growth of red drum larvae. **Aquat. Toxicol.** 74,229-241, 2005.

ANDERSON, D.P. Immunological indicators : Effects of Environmental stress on immune protection and disease outbreaks. **American Fisheries Society Symposium** 8, 38-50, 1990.

ATSDR. **Toxicological Profile for Chlordane**. US Department of Health and Human Services, Atlanta, USA. pp 133, 1994.

ATSDR. **Toxicological Profile for PCBs**. US Department of Health and Human Services, Atlanta, USA. 2000.

AU, D.W.T. The application of histo-cytopathological biomarkers in marine pollution monitoring: a review. **Marine Pollution** 48,817–834, 2004.

AVCI, A.; KAÀMAZ, M.; DURAK, I. Peroxidation in muscle and liver tissues from fish in a contaminated river due to a petroleum refinery industry. **Ecotoxicol. Environ. Safet.** 460,101-105, 2005;.

BETOULLE, S. Action du lindane sur l'activité sécrétrice (radicaux libres oxygénés et cytokines à activités « MAF ») des cellules phagocytaires de truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*): implication du calcium intracellulaire. Thèse ( Doctorat en Biologie ,sciences et santé). **Université de Limoges/France**, 1998.

BINELLI, A.; BACCHETTA, R.; MANTECCA, P.; RICCIARDI, F.; PROVINI, A.; VAILATI, G. DDT in zebra mussels from Lake Maggiore (N. Italy): level of contamination and endocrine disruptions. **Aquatic Toxicology** 69,175–188, 2004.

BLOCH, M.E. **Naturgeschichte der ausländischen Fische**. Berlin, v.8, 74f., 1794.

BLY, J.E., QUINIOU, S.M.A., CLEM, L.W. Environmental effects of fish immune mechanisms. In : **Fish vaccinology** (Gudding R., Lillehaug, A., Midtlyng, P.J., Brown, F. Eds). Karger, Basel, pp. 33-43, 1997.

BOLS, N.C.; BRUBACHER, J.L.; GANASSIN, R.C.; LEE, L.E.J. Ecotoxicology and innate immunity in fish. **Developmental and Comparative Immunology** 25, 853-873, 2001.

BONDY, G.; ARMSTRONG, C.; COADY, L.; DOUCET, J.; ROBERTSON, P.; FEELEY, M.; BARKER, M. Toxicity of the chlordane metabolite oxychlordane in female rats: clinical and histopathological changes. **Food Chem. Toxicol.** 41:291-301, 2003.

BRANCO, S. M. **O Meio Ambiente em Debate**, Ed. Moderna: São Paulo, 1988.

BRAUNBECK, T.; APPELBAUM, S. Ultrastructural alterations in the liver and intestine of carp *Cyprinus carpio* induced orally by ultra-low doses of endosulfan. **Dis. Aquat. Organ.** 36, 183-200, 1999.

BRAUNBECK, T.; VÖLKL, A. Induction of biotransformation in the liver of eel (*Anguilla anguilla* L.) by sublethal exposure to dinitro-o-cresol: An ultrastructural and biochemical study. **Ecotoxicology and Environmental Safety** 21,109-127, 1991.

BROWN, S.S.; GASTON G.R.; RAKOCINSKI, C.F.; HERAD, R.W. Effects of sediment contaminants and environmental gradients on macrobenthic community trophic structure in gulf of Mexico estuaries. **Estuaries** 23, 411-484, 2000.

BROWN, J.S.; STEINERT, S.A. DNA damage and biliary PAHs metabolites in flatfish from Southern California bays and harbors, and the Channel Islands. **Ecol. Ind.** 3, 263-274, 2004.

CAPKIN, E.; ALTINOK, I.; KARAHAN, S. Water quality and fish size affect toxicity of endosulfan, an organochlorine pesticide, to rainbow trout. **Chemosphere** 64, 1793-1800, 2006.

CARSON, R. **Silent Spring**. Boston: Houghton Mifflin; 1962.

CHATON, P.F.; RAVANEL, P.; MEYRAN, J.C.; TISSUT, M. The Toxicological Effects and Bioaccumulation of Fipronil in Larvae of the Mosquito *Aedes aegypti* in Aqueous Medium. **Pest. Biochem. Phys.** 69, 183–188, 2001.

CICIK, B.; ENGIN, K. The Effects of Cadmium on Levels of Glucose in Serum and Glycogen Reserves in the Liver and Muscle Tissues of *Cyprinus carpio* (L., 1758). **Turk. J. Vet. Anim. Sci.** 29:113-117,2005.

COLEMAN, S.; LIU, S.; LINDERMAN, R.; HODGSON, E.; ROSE, R.L. In vitro metabolism of alachlor by human liver microsomes and human cytochrome P450 isoforms. **Chem-Biol. Interact.** 122, 27–39, 1999.

COSTABEBER, I.; SIFUENTES DOS SANTOS, J.; ODORISSI XAVIER, A.A.; WEBER, J.; LEAL LEÃES, F.; BOGUSZ JUNIOR, S.; EMANUELLI, T. Levels of polychlorinated biphenyls (PCBs) in meat and meat products from the state of Rio Grande do Sul, Brazil. **Food and Chemical Toxicology** 44, 1–7, 2006.

CRUMPTON T.; ATKINS D.; BARONE S.; ZAWIA N.H. Lead exposure in pheochromocytoma (PC12) cells alters neural differentiation and Sp1 DNA-binding. **Neurotoxicol.**;7, 1-14,2000.

DEAN, J.C.; LUSTER, M.I.; MUNSON, A.E.; KIMBER, I. (eds): Immunotoxicology and immunofarmacology. New York, Raven, 1994. In: Klassen, C.D.; Watkins, J.B. **Toxicologia a ciência básica dos tóxicos de Cassarett e Doull's**. pp.271-310,2001.

DNR, <http://dnr.wi.gov/environmentprotect/pbt/chemicals/aldrin.htm/> acessado em 09/2006.

DONATO, F.; MAGONI, M.; BERGONZI, R.; SCARCELLA, C.; INDELICATO, A.; CARASI, S.; APOSTOLI, P. Exposure to polychlorinated biphenyls in residents near a chemical factory in Italy: The food chain as main source of contamination. **Chemosphere**, 64,1562–1572, 2006.

DUCHIRON, C.; BETOULLE, S.; REYNAUD, S.; DESCHAUX, P. Lindane increases macrophage-activating factor production and intracellular calcium in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) leukocytes. **Ecotoxicology and Environmental Safety** 53, 388-396, 2002.

EL-HASSAN H.; ANWAR K.; MACANAS-PIRARD-CRABTREE M.; CHOW S.C.; JOHNSON V.L.; LEE P.C.; HINTON R.H.; PRICE S.C.; KASS G.E.N. Involvement of mitochondria in acetaminophen-induced apoptosis and hepatic injury roles of cytochrome c, Bax, Bid and caspases. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**; 191,118-129, 2003.

ELLIS, A.E. Fish immunology. In Roitt, I.M., Delves P.J. (Eds.), **Enciclopedia of immunology**, vol.III, San Diego, USA, pp, 536-539,1992.

EPA, <http://www.epa.gov/pesticides/> acessado em 2004.

ESSER, O.H.; MOSER, P. An appraisal of problems related to the measurement and evaluation of bioaccumulation. **Ecotoxicol. Environ. Safet.** 6,131-148,1982.

EVANS, D.L.; JASO-FRIEDMANN, L. Nonspecific cytotoxic cells as effectors of immunity in fish. **Annual Review of Fish Diseases** 2, 109-121,1992.

FEELEY, M.M. Biomarkers for Great Lakes priority contaminants: halogenated aromatic hydrocarbons. **Environ. Health Perspect.** 103, 7-16, 1995.

FENT, K. Fish cells lines as versatile tools in ecotoxicology : assessment of cytotoxicity, cytochrome P4501A induction potential and estrogenic activity of chemicals and environmental samples. **Toxicology in vitro** 15, 477-488,2001.

FLEEGER J.W.; CARMAN K.R.; NISBET R.M. Indirect effects of contaminants in aquatic ecosystems. **The Science of Total Environment**, 317, 207-233, 2003.

FOLCH J.; LESS M.; SLOANE-STANLEY G.H. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. **Journal of Biology Chemistry**, 226, 497-509,1957.

GIACOMAZZI, S.; COCHET, N. Environmental impact of diuron transformation: a review. **Chemosphere** 56, 1021-1032, 2004.

GIMENO, L.; FERRANDO, M.D.; SANCHEZ, S.; GIMENO, L.O.; ANDREU, E. Pesticide Effects on Eel Metabolism. **Ecotoxicol. Environ. Safet.** 31,153-157,1995.

GOBAS F.A.P.C.; WILCOKSON J.B.; RUSSEL R.W.; HAFFNER G.D.Mechanism of biomagnification in fish under laboratory and field conditions. **Environmental Science and Technology**, 33, 133-141,1999.

HECK, M.C.; SIFUENTES DOS SANTOS, J.; BOGUSZ JUNIOR, S.; COSTABEBER, I.; EMANUELLI, T. Estimation of children exposure to organochlorine compounds through milk in Rio Grande do Sul, Brazil. **Food Chemistry** article in press, 2006.

HIGHTOWER, L.E.; RENFRO, J.L., Recent applications of fish cell culture to biomedical research. **Journal of Experimental Zoology** 248, 290-302,1988.

HUGGET, A.S.G.; NIXON, D.A. Use of glucose oxidase, peroxidase and o-dianisidine in determination of blood and urinary glucose. **Lancet** 2, 368-379,1957.

IDPH <http://www.idph.state.il.us/envhealth/factsheets/alachlor-atrazine.htm> acessado em 09/2006.

KACMAR, P.; PISTL, J.; MIKULA, I. Immunotoxicology and veterinary medicine. **Acta Vet. Brno.** 68,57–79, 1999.

KÖLLNER, B.; WASSERRAB, B.; KOTTERBA, G.; FISCHER, U. Evaluation of immune functions of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)—how can environmental influences be detected? **Toxicol. Lett.** 131, 83-95, 2002.

LI, W.; YIN, D.; ZHOU, Y.; HU, S.; WANG, L. 3,4-Dichloroaniline-induced oxidative stress in liver of crucian carp (*Carassius auratus*). **Ecotoxicol. Environ. Safet.** . 56, 251– 255, 2003.

LINK, B.; GABRIO, T.; ZOELLNER, I.; PIECHOTOWSKI, I.; PAEPKE, O.; HERRMANN, T.; FELDER-KENNEL, A.; MAISNER, M.; SCHICK, K-H.; SCHRIMPF, M.; SCHWENK, M.; WUTHE, J. Biomonitoring of persistent organochlorine pesticides, PCDD/PCDFs and dioxin-like PCBs in blood of children from South West Germany (Baden-Wuerttemberg) from 1993 to 2003. **Chemosphere**, 58 ,1185–1201, 2005.

LLOBERAS, J.; CELADA, A. Effect of aging on macrophage function. **Experimental Gerontology**, 37,1323–1329, 2002.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.** 193, 265–275,1951.

MELA, M.; RANDI, M.A.F.; VENTURA, D.F.; CARVALHO, C.E.V.; PELLETIER, E.; OLIVEIRA RIBEIRO C.A. Effects of dietary methylmercury on liver and kidney histology in the neotropical fish *Hoplias malabaricus*. **Ecotoxicol. Environ. Safet.** Article in press, 2006.

MORETÃO, M.P.; ZAMPRONIO, A.R.; GORIN, P.A.J.; IACOMINI, M.; OLIVEIRA, M.B.M. Induction of secretory and tumoricidal activities in peritoneal macrophages activated by an acidic heteropolysaccharide (ARAGAL) from the gum of *Anadenanthera colubrina* (Angico branco). **Immunology Letters**, 93,189-197, 2004.

NEUMANN, F.N.; STAFFORD, J.L.; BARREDA, D.; AINSWORTH, A.J.; BELOSEVIC, M. Antimicrobial mechanisms of fish phagocytes and their role in host defense. **Developmental and Comparative Immunology** 25, 807-825, 2001.

NOBBS, D.; CHIPMAN,G. Contaminated site investigation and remediation of chlorinated aromatic compounds. **Separation and Purification Technology**, 31,37-40, 2003.

OHI, M.; DALSENTER, P.R.; ANDRADE, A.J.M.; NASCIMENTO, A.J. Reproductive adverse effects of fipronil in Wistar rats. **Toxicol. Lett.** 146,121–127, 2004.

OLIVEIRA RIBEIRO, C.A.; SCHATZMANN, M.; SILVA DE ASSIS, H.C.; SILVA, P.H.; PELLETIER, E.; AKAISHI, F.M. Evaluation of tributyltin subchronic effects in tropical freshwater fish (*Astyanax bimaculatus*, Linnaeus, 1758). **Ecotoxicol. Environ. Saf.** 51, 161–167, 2002.

OLIVEIRA RIBEIRO, C.A.; VOLLAIRE Y.; SANCHEZ-CHARDI A.; ROCHE H. Bioaccumulation and the effects of organochlorine pesticides, PAH and heavy metals in the Eel (*Anguilla anguilla*) at the Camargue Nature Reserve, France. **Aquat. Toxicol.** 74, 53-69,2005.

ORUC, E.O.; UUMLNER, N. Effects of Azinphosmethyl on Some Biochemical Parameters in Blood, Muscle, and Liver Tissues of *Cyprinus carpio* (L.) **Pest. Biochem. Physiol.** 62, 65-71, 1998.

PADROS. J.; PELLETIER, E.; OLIVEIRA RIBEIRO,C.A. Metabolic Interactions Between Low Doses of Benzo[a]pyrene and Tributyltin in Artic Charr (*Salvelinus alpinus*): a Long-term in vivo Study. **Toxicol. App. Pharm.** 192, 45-55,2003.

PAIVA, M.P. **Crescimento, Alimentação e Reprodução da Traíra *Hoplias malabaricus* no Nordeste Brasileiro.** Editora da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 1974.

PAUMGARTTEN, F.J.R.; CRUZ, C.M.; CHAHOUD,I.; PALAVINSKAS, R.; MATHAR, W. PCDDs, PCDFs, PCBs, and Other Organochlorine Compounds in Human Milk from Rio de Janeiro, Brazil. **Environmental Research Section A** 83, 293-297, 2000.

PAZOU, E.Y.A.; LALÈYÈ, P.; BOKO, M.; VAN GESTEL, C.A.M.; AHISSOU, H.; AKPONA, S.; VAN HATTUM, B.; SWART, K.; VAN STRAALLEN, N.M. Contamination of fish by organochlorine pesticide residues in the Ouémé River catchment in the Republic of Bénin. **Environ. Intern.** 32, 594-599, 2006.

PERSIC, A. Modalités de contamination par polluants organiques persistants des réseaux trophiques lagunaires. Application de la méthode des isotopes stables. Thèse (Doctorat en Sciences). **Université Paris XI – Orsay/France**, 2004.

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

POWERS, D.A. Fish as model systems. **Science** 246, 352-358,1989.

PROZIALCK, W.C.; GRUNWALD, G.B.; DEY, P.M.; RRUHL, K.R.; PARRISH, A.R. Cadherins and NCAM as potential targets in metal toxicity. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**; 182, 255-265, 2002.

RABITTO, I.; ALVES COSTA J.R.M.; AKAISHI F.M.; SILVA DE ASSIS H.C.; PELLETIER E.; OLIVEIRA RIBEIRO C.A. Dietary Pb(II) and TBT (tributyltin) Exposures to Neotropical Fish *Hoplias malabaricus*: Histopathological and Biochemical Findings. **Ecotoxicol. Environ. Safet.** 60, 147-156, 2005.

RAMESH, A.; MAHESWARI, S.T. Dissipation of alachlor in cotton plant, soil and water and its bioaccumulation in fish. **Chemosphere** 54, 647–652, 2004.

RAND, G. M.; PETROCELLI, S. R. **Fundamentals of Aquatic Toxicology Methods and Application**, Hemisphere Publishing Co: Washington, 1985.

RIOS, F.S.; KALININ, A.L.; RANTIN, F.T. The effects of long-term food deprivation on respiration and haematology of the neotropical fish *Hoplias malabaricus*. **J. Fish Biol.** 61, 85–95, 2002.

RISSATO, R.S.; GALHIANE, M.S.; XIMENES, V.F.; ANDRADE, R.M.B.; TALAMONI, J.L.B.; MARCELO LIBÂNIO, M.; ALMEIDA, M.V.; APON, B.M.; CAVALARI, A.A. Organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in soil and water samples in the Northeastern part of São Paulo State, Brazil. **Chemosphere**, article in press , 2006.

ROCHE, H.; BUET, A.; RAMADE, F. Accumulation of lipophilic microcontaminants and biochemical responses in Eels from the Camargue biosphere reserve. **Ecotoxicology** 11,155-164, 2002.

SANCHO, E.; FERRANDO, M.D.; FERNÁNDEZ, C.; ANDREU, E. Liver Energy Metabolism of *Anguilla anguilla* after Exposure to Fenitrothion. **Ecotoxicol. Environ. Safet.** 41,168- 175, 1998.

SANTOS, J.S.; XAVIER, A.A.O.; RIES, E.F.; COSTABEBER, I.; EMANUELLI, T. Assessment of polychlorinated biphenyls (PCBs) in cheese from Rio Grande do Sul, Brazil. **Chemosphere** article in press, 2006.

SARCINELLI, P.N.; PEREIRA, A.C.S.; MESQUITA, S.A.; OLIVEIRA-SILVA, J.J.; MEYER, A.; MENEZES, M.A.C.; ALVES, S.R.; A MATTOS, R. C.O.C.; MOREIRA, J.C.; WOLFF, M. Dietary and reproductive determinants of plasma organochlorine levels in pregnant women in Rio de Janeiro. **Environmental Research** 91,143–150, 2003.

SECOMBES, C.J. The non specific immune system : cellular defences. In : **Fish Immune System : Organism, Pathogen and Environment** (G. Iwama, T. Nakanishi, Eds). San Diego: Academic Press. pp. 63-103, 1996.

SHABANI, A.; RABBANI, A. Lead nitrate induced apoptosis in alveolar macrophages from rat lung. **Toxicology** 149, 109-114,2000.

SONG, S.B.; SY, Y.; ZHOU, B .S. Effects of hexachlorobenzene of antioxidant status of liver and brain of common carp (*Cyprinus carpio*). **Chemosphere** 65, 699-706, 2006.

STEFANELLI, P.; AUSILI, A.; DI MUCCIO, A.; FOSSI, C.; DI MUCCIO, S.; ROSSI, S.; COLASANTI, A. Organochlorine compounds in tissues of swordfish (*Xiphias gladius*) from Mediterranean Sea and Azores islands. **Marine Pollution Bulletin** 49, 938–950, 2004.

STILLER-WINKLER, R.; HADNAGY, W.; LENG, G.; STRAUBE, E.; IDEL, H. Immunological parameters in humans exposed to pesticides in the agricultural environment. **Toxicology Letters**. 107,219–224, 1999.

STRMAC, M.; BRAUNBECK, T. Effects of Triphenyltin Acetate on Survival, Hatching Success, and Liver Ultrastructure of Early Life Stages of Zebrafish (*Danio rerio*). **Ecotoxicol. Environ. Safet.** 44,25-39,1999.

SUWALSKY, M.; RODRIGUEZ, C.; VELLENA, F.; AUILAR, F.; SOTOMAYOR, C.P. The pesticide hexachlorobenzene induces alterations in the human erythrocyte membrane. **Pesticide biochemistry and Physiology** 65, 205-214, 1999.

TAVARES, T.M.; BERETTA, M.; COSTA, M.C. Ratio of DDT/DDE in the all saints bay, brazil and its use in environmental management. **Chemosphere** 38,1445-1452, 1999.

TRAVIS, C.C. Use of biomarkers in assessing health and environmental impacts of chemical pollutants. New York: Plenum, 1993. In: Klassen, C.D.; Watkins, J.B.**Toxicologia a ciência básica dos tóxicos de Cassarett e Doull's**. pp. 733-749,2001.

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

VIEIRA, E.D.R.; TORRES, J.P.M.; MALM, O. DDT Environmental Persistence from Its Use in a Vector Control Program: A Case Study. **Environmental Research Section A** 86,174-182, 2001.

VILLA, R.D.; A, DORES, E.F.G.C.; CARBO,L.; FERREIRA CUNHA, M.L. Dissipation of DDT in a heavily contaminated soil in Mato Grosso, Brazil. **Chemosphere** 64, 549–554, 2006.

VILUKSELA, M.; UNKILA, M.; POHJANVIRTA, R.; TUOMISTO, J.T.; STAHL, B.U.; ROZMAN, K.; TUOMISTO, J. Effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) on liver phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) activity, glucose homeostasis and plasma amino

acid concentrations in the most TCDD-susceptible and the most TCDD-resistant rat strains. **Arch. Toxicol.** 73, 323-336, 1999.

WAGNER, A.; BOMAN, J. Biomonitoring of trace elements in muscle and liver tissue of freshwater fish. **Spectrochimica Acta Part B**, 58, 2215–2226, 2003.

WALTER, G.L.; JONES, P.D.; GIESY, J.P. Pathologic alterations in adult rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, exposed to dietary 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. **Aquat. Toxicol.** 50, 287-299, 2000.

WERNER, I.; THE, S.J.; DATTA, S.; LU, X.; YOUNG, T.M. Biomarker responses in *Macoma nasuta* (Bivalvia) exposed to sediments from northern San Francisco Bay. **Marine Environmental Research** 58,299–304, 2004.

WIKIPÉDIA, Enciclopédia livre. [http://pt.wikipedia.org/wiki/Ponta\\_Grossa](http://pt.wikipedia.org/wiki/Ponta_Grossa) acessado em 10/2006.

WWF, Beneficial bugs at risk from pesticides. [www.neteffct.ca/pesticides/resources/bug-at.resk.pdf](http://www.neteffct.ca/pesticides/resources/bug-at.resk.pdf) acessado em 10/2006.

YOGUI, G. T.; SANTOS, M. C.O.; MONTONE, R.C. Chlorinated pesticides and polychlorinated biphenyls in marine tucuxi dolphins (*Sotalia fluviatilis*) from the Cananéia estuary, southeastern Brazil. **The Science of the Total Environment** 312,67–78, 2003.

ZELIKOFF, J.T.; CARLSON, E.; LI, Y.; RAYMOND, A.; DUFFY, J.; BEAMAN, J.R.; ANDERSON, M. Immunotoxicity Biomarkers in Fish: Development, Validation and Application for Field Studies and Risk Assessment. **Hum. Ecol. Risk Assess.** 8, 253-263, 2002.

ZELIKOFF, J. Biomarkers of immunotoxicity in fish and other non-mammalian sentinel species: predictive value for mammals? **Toxicology** 129, 63-71, 1998.