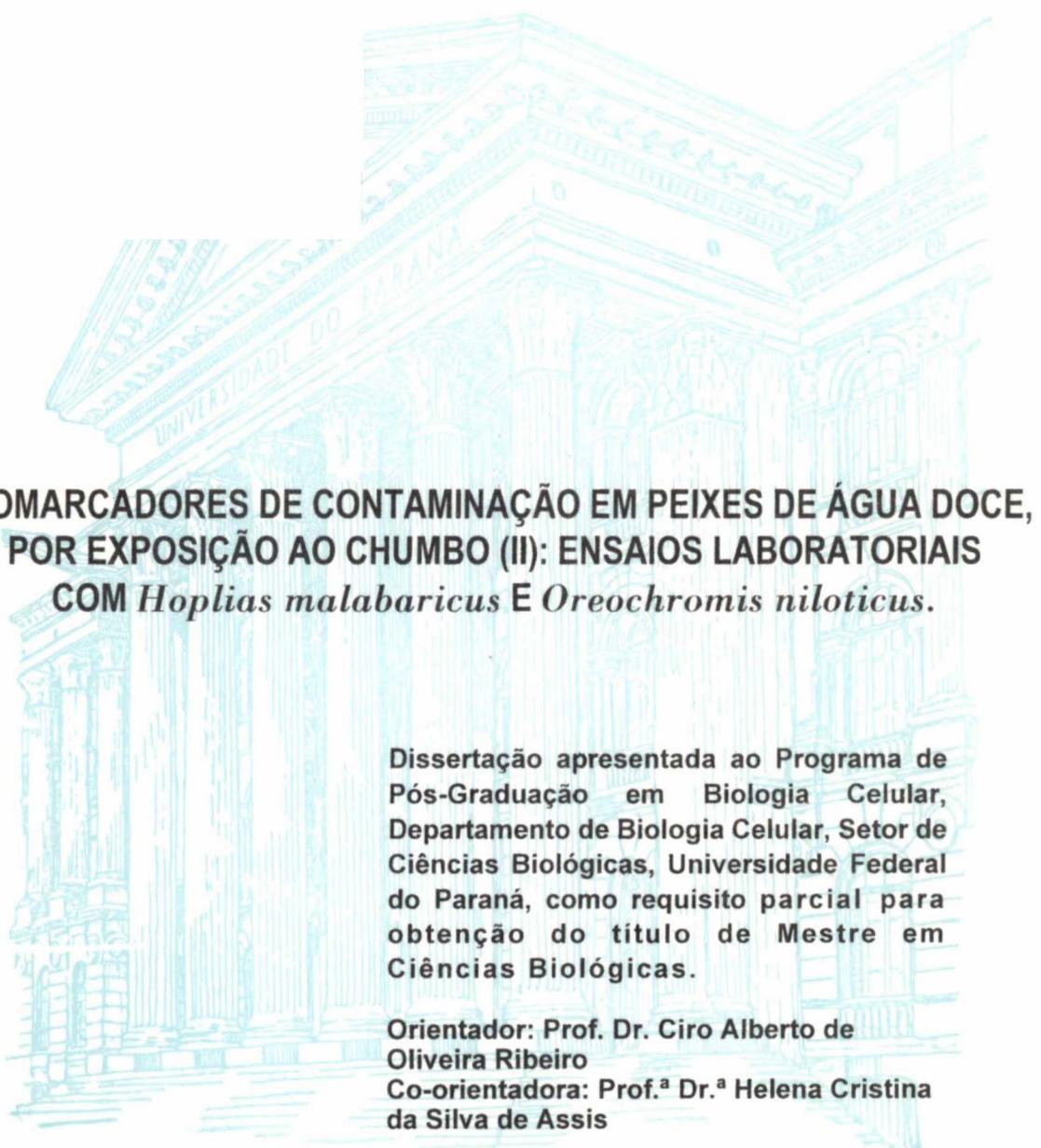


JOÃO RICARDO MALERES ALVES COSTA



**BIOMARCADORES DE CONTAMINAÇÃO EM PEIXES DE ÁGUA DOCE,  
POR EXPOSIÇÃO AO CHUMBO (II): ENSAIOS LABORATORIAIS  
COM *Hoplias malabaricus* E *Oreochromis niloticus*.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular, Departamento de Biologia Celular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro

Co-orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Helena Cristina da Silva de Assis

CURITIBA  
2001

JOÃO RICARDO MALERES ALVES COSTA

**BIOMARCADORES DE CONTAMINAÇÃO EM PEIXES DE ÁGUA DOCE,  
POR EXPOSIÇÃO AO CHUMBO (II): ENSAIOS LABORATORIAIS  
COM *Hoplias malabaricus* E *Oreochromis niloticus*.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular, Departamento de Biologia Celular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro  
Co-orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Helena Cristina da Silva de Assis

CURITIBA  
2001

## PARECER

A Comissão Examinadora de Dissertação de Mestrado **BIOMARCADORES DE CONTAMINAÇÃO DE PEIXES DE ÁGUA DOCE, POR EXPOSIÇÃO AO CHUMBO (II): ENSAIOS LABORATORIAIS E ESTUDO DE CASO PRELIMINAR NO RIO RIBEIRA (SP/PR)**, de autoria do Pós-Graduando João Ricardo Maleres Alves Costa, e composta pelos Professores: Drº. Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro; (como Orientador e Presidente); Drº. Afonso C Dias Bainy (UFSC); e Drª. Carolina Arruda Freire (UFPR). Atribui individualmente as seguintes notas: Drº. Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro, nota 10,0 ( Dez ); Drº. Afonso C Dias Bainy, nota 10,0 ( Dez ); e Drª. Carolina Arruda Freire, nota 10,0 ( Dez ). De acordo com o Regimento interno do Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular, o candidato foi: APROVADO com a nota 10,0 ( Dez ), para a devida publicação o trabalho deve sofrer as modificações sugeridas. Em Curitiba, 20 de Março de 2001.



Drº Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro



Drº. Afonso C Dias Bainy ,



Drª. Carolina Arruda Freire

(...)

*Lá vem a morte pescando*

*De caniço e samburá*

*Lapa ê ê ê, lapa*

*Lapa ê ê ê, lapa*

*Quando a morte pesca peixe*

*que fome não há por lá*

(...)

*(Tema popular resgatado por  
Clementina de Jesus)*

**Este trabalho é dedicado em memória de meu tio-avô e padrinho,  
*Ennio de Arruda Barbato,*  
que sempre me instigou à investigação e incentivou os meus estudos.**

**E ao meu pai,  
*Antonio Fernando Barbato Alves Costa,*  
sempre ao serviço da saúde pública de qualidade no país.**

## AGRADECIMENTOS

A meu prezado orientador, no Dep<sup>to</sup>. de Biologia Celular, UFPR,  
*Prof. Dr. Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro,*  
a minha querida co-orientadora, no Dep<sup>to</sup>. de Farmacologia, UFPR,  
*Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Helena Cristina da Silva de Assis,*  
os meus mais sinceros agradecimentos pela confiança e amizade.

Outrossim, sou grato a todos da UFPR que de alguma forma também me ajudaram e apoiaram nesta dissertação:

na secretaria da Pós-Graduação em Biologia Celular,  
Dep. Biologia Celular, Setor de Ciências Biológicas:  
*Marlene B. de Camargo;*

no Lab. Toxicologia Celular e Reprodução em Peixes,  
Dep. Biologia Celular, Setor de Ciências Biológicas:  
*Angela Pellin, Cintia Nunes Mencinauski, Fabíola Xochilt Valdez Domingos, Fabíola Mazzaro Akaishi, Inês Rabitto e Virgínia Mantovani Benevenuto;*

nos Labs. Central e de Toxicologia, Dep. de Farmacologia, Setor de Ciências Biológicas:  
*Silvia C. Genário, Ana M<sup>a</sup> Pedra e Nair N. Lugo;*

no Lab. de Cultivo Celular, Dep. Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas:  
*Guilhermina Rodrigues Noletto e Priscila Iazen dos Santos;*

no Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR:  
*Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Daura Estofela, Matilde Oliveira, Vera R. Pionteke e Rosi Kugler;*

no Lab. de Hematologia, Dep. Patologia Básica, Setor de Saúde:  
*Prof. Dr. Paulo H. da Silva;*

na Fazenda Experimental Canguiri da UFPR, Pinhais: *Prof. Dr. Antonio Ostrensky;*

e aos profissionais de outras instituições:

*Prof. Dr. Emelien Pelletier,*  
Institut Sciences de la Mer, Université du Québec à Rimouski, CA;  
*Prof. Dr. Peter V. Hodson,*  
Queen's University, Kingston, CA;  
*Prof. Dr. Afonso C. D. Bairy,*  
Dep. Bioquímica, UFSC, Florianópolis (SC).  
*Prof. Dr. Alberto S. Fenocchio* (professor convidado, Dep. Genética, SCB, UFPR),  
Universidad Nacional de Misiones, Argentina.

Sou também muito grato, nesta academia, a:

*Cloris Faraco, Marco Randi, Margarete Cestari, João Carlos, J. Marcelo Aranha, Walter Boeger, Paulo de Tarso, Carolina Freire, Rosana N. de Moraes, Cláudio Greca, Silvio Veiga, Marcia Mendonça, Luís F. Fávoro, Sandro Menezes e Fernando Sedor.*

A *Priscilla Maria Menel Lemos*, agradeço pelo carinho e dedicação.

A meu pai, a *Luiz Gomes dos Santos* (in memoriam), a *José Domingos de Brito* ("Foguinho"), a *Prefeitura Municipal de Ribeira* e a *Câmara Municipal de Ribeira*, sou grato, pelo apoio logístico em campo;

e a **CAPES**, pelo apoio financeiro.

## SUMÁRIO

LISTA DE QUADROS.....	vi
LISTA DE TABELAS.....	vii
LISTA DE FIGURAS.....	vii
RESUMO.....	x
ABSTRACT.....	xi
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
1. Uso de biomarcadores.....	1
2. Entrada de metais na célula.....	2
3. Efeitos de metais pesados na célula.....	5
4. Efeitos tóxicos do chumbo.....	6
5. Chumbo e animais aquáticos.....	9
6. Rio Ribeira, ambiente impactado.....	12
7. Estudo preliminar no Alto Vale do rio Ribeira como justificativa a este trabalho.....	17
CAPÍTULO I: Bioensaio com <i>Hoplias malabaricus</i> , exposição crônica por via trófica.....	20
I.1 Introdução.....	20
I.1.1. Características da espécie.....	20
I.1.2. Fígado.....	20
I.1.3. Efeito neurotóxico do chumbo.....	23
I.1.4. Escolha da dose administrada.....	26
I.2. Objetivos.....	32
I.3. Materiais e Métodos.....	32
I.3.1. Bioensaio.....	32
I.3.2. Histopatologia de fígado.....	35
I.3.3. Ultra-estrutura de fígado.....	36
I.3.4. Atividade colinesterásica no músculo.....	36
I.4. Resultados.....	39
I.4.1. Organização estrutural do fígado controle de <i>H. malabaricus</i> .....	39
I.4.2. Hepatotoxicidade do chumbo em <i>H. malabaricus</i> .....	42
I.4.3. Neurototoxicidade do chumbo em <i>H. malabaricus</i> .....	56
I.5. Discussão.....	57
I.5.1. Organização estrutural do fígado de <i>H. malabaricus</i> ....	57
I.5.2. Efeitos tóxicos do chumbo em <i>H. malabaricus</i> .....	60
Citototoxicidade em hepatócitos.....	60
Neurotoxicidade e atividade colinesterásica.....	68
Alterações cromossômicas e genotoxicidade.....	70
I.6. Conclusões parciais.....	73

CAPÍTULO II: Bioensaio com <i>Oreochromis niloticus</i> , exposição aguda por via hídrica.....	75
II.1 Introdução.....	75
II.1.1. Características da espécie.....	75
II.1.2. Epitélio branquial.....	75
II.1.3. Grupo heme: biosíntese e funcionalidade.....	79
II.1.4. A $\delta$ -aminolevulinato desidratase ( $\delta$ -ALA-d).....	85
Propriedades estruturais e atividade catalítica.....	85
Zinco e apoenzima- $\delta$ -ALA-d.....	86
Interação da $\delta$ -ALA-d com o DL-ditiotreitól (DTT).....	87
Atividade da $\delta$ -ALA-d eritrocitária como biomarcador de exposição ao chumbo.....	87
II.1.5. Escolha das concentrações administradas.....	88
II.2. Objetivos.....	90
II.3. Materiais e Métodos.....	90
II.3.1. Bioensaio.....	90
II.3.2. Estrutura superficial de brânquias.....	93
II.3.3. Quantificação da atividade da $\delta$ -ALA-d eritrocitária.....	93
II.4. Resultados.....	99
II.4.1. Superfície do epitélio branquial de <i>O. niloticus</i> .....	99
II.4.2. Inibição da $\delta$ -ALA-d eritrocitária pelo chumbo.....	104
II.5. Discussão.....	108
II.5.1. Ensaio para a atividade da $\delta$ -ALA-d eritrocitária de <i>O. niloticus</i> .....	108
II.5.2. Efeitos tóxicos do chumbo em <i>O. niloticus</i> .....	113
Brânquias .....	113
Chumbo no sangue.....	115
II.6. Conclusões parciais.....	119
CONCLUSÕES FINAIS.....	120
CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS PARA O RIO RIBEIRA	120
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	123
ANEXOS.....	131

### LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1:</b> Ensaio para determinação da atividade da $\delta$ -ALA-d em sangue de <i>O. niloticus</i> .....	97
---	----

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela I:</b> Concentração de chumbo em amostras de peixes coletadas no rio Ribeira em 1990.....	16
<b>Tabela II:</b> Altos teores de metais (ppm) associados ao despejo da mina do Rocha.....	18
<b>Tabela III:</b> Duas amostras de teores de chumbo ( $\mu\text{g/l}$ ) na água do rio Ribeira.....	27
<b>Tabela IV:</b> Valores de concentrações de chumbo obtidos em uma cadeia trófica experimental com 28 dias de exposição....	29
<b>Tabela V:</b> Frequência de alterações cromossômicas encontradas por LEMOS (2000) em <i>Hoplias malabaricus</i> expostas ao Pb (II)....	71
<b>Tabela VI:</b> Análise da superfície branquial de <i>O. niloticus</i> após exposição hídrica de 96 horas.....	100
<b>Tabela VII:</b> $\Delta\%$ de reativação enzimática da $\delta$ -ALA-d eritrocitária nos grupos controles de BAINY (1990).....	111

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Localização e perfil longitudinal do rio Ribeira.....	13
<b>Figura 2:</b> Mina do Rocha na margem esquerda do ribeirão do Rocha, tributário da margem direita do rio Ribeira, no Alto Vale do rio Ribeira, município de Adrianópolis (PR).....	14
<b>Figura 3:</b> Esquema do bioensaio crônico com <i>H. malabaricus</i> expostas ao chumbo (II) por via trófica.....	33
<b>Figuras 4A e 4B:</b> Ultra-estrutura (MET) da região periférica do fígado de fêmea controle (traíra 7).....	46
<b>Figuras 4C e 4D:</b> Parênquima hepático de fêmea controle (traíra 8), coloração com azul de toluidina borificada.....	46
<b>Figura 5A:</b> Ultra-estrutura (MET) de hepatócitos de fêmea controle (traíra 8).....	47
<b>Figura 5B:</b> Detalhe ultra-estrutural (MET) de um hepatócito de fêmea controle (traíra 7).....	47
<b>Figuras 5C e 5D:</b> Detalhe ultra-estrutural (MET) da interface do fígado com o sangue de fêmea controle (traíra 7).....	47
<b>Figura 6A:</b> Detalhe ultra-estrutural (MET) da interface entre dois hepatócitos de fêmea controle (traíra 8).....	48
<b>Figura 6B:</b> Detalhe ultra-estrutural (MET) da interface entre dois hepatócitos de fêmea controle (traíra 7).....	48
<b>Figura 7A:</b> Detalhe ultra-estrutural (MET) da região perinuclear de um hepatócito de fêmea controle (traíra 7).....	49
<b>Figura 7B:</b> Ultra-estrutura (MET) de um canalículo biliar de macho controle (traíra 9).....	49
<b>Figura 7C:</b> Detalhe ultra-estrutural (MET) de uma região rica em retículo endoplasmático em hepatócitos de fêmea controle (traíra 7).....	49

<b>Figura 8A:</b> Parênquima hepático de fêmea tratada com 4 doses (traíra 3), coloração com hematoxilina-eosina.....	50
<b>Figura 8B:</b> Ultra-estrutura (MET) de hepatócitos alterados em fêmea tratada com 4 doses (traíra 2).....	50
<b>Figura 8C:</b> Detalhe ultra-estrutural (MET) da interface entre dois hepatócitos de fêmea tratada com 4 doses (traíra 3)....	50
<b>Figura 9A:</b> Parênquima hepático de fêmea tratada com 4 doses (traíra 2), coloração com azul de toluidina borificada.....	51
<b>Figuras 9B, 9C e 9D:</b> Detalhe ultra-estrutural (MET) de vesículas intracelulares eletrodensas em fêmea tratada com 4 doses (traíra 2).....	51
<b>Figuras 10A e 10B:</b> Detalhe ultra-estrutural (MET) de hepatócitos alterados em fêmea tratada com 4 doses (traíra 3)....	52
<b>Figuras 10C e 10D:</b> Detalhe ultra-estrutural de região do citoplasma (MET) em hepatócitos de fêmea tratada com 4 doses (traíra 2).....	52
<b>Figura 11A:</b> Irrigação sangüínea do parênquima hepático de macho tratado com 8 doses (traíra 5), coloração com hematoxilina-eosina.....	53
<b>Figura 11B:</b> Veia central no parênquima hepático de macho tratado com 8 doses (traíra 5), coloração com azul de toluidina borificada.....	53
<b>Figura 11C:</b> Capilares sinusóides no parênquima hepático de macho tratado com 8 doses (traíra 5), coloração com hematoxilina-eosina.....	53
<b>Figuras 11D e 11E:</b> Ultra-estrutura (MET) de um vaso no parênquima hepático mostrando células sangüíneas em um exemplar macho tratado com 8 doses (traíra 5).....	53
<b>Figura 12A:</b> Parênquima hepático de macho tratado com 8 doses (traíra 6), coloração com azul de toluidina borificada.....	54
<b>Figura 12B:</b> Parênquima hepático de macho tratado com 8 doses (traíra 5), coloração com azul de toluidina borificada.....	54
<b>Figuras 12C, 12D e 12E:</b> Ultra-estrutura (MET) de hepatócitos alterados em macho tratado com 8 doses (traíra 5).....	54
<b>Figuras 13A e 13B:</b> Ultra-estrutura (MET) de hepatócitos alterados em fêmea tratada com 8 doses (traíra 4).....	55
<b>Figura 13C:</b> Ultra-estrutura (MET) de hepatócitos alterados em macho tratado com 8 doses (traíra 5).....	55
<b>Figura 13D:</b> Ultra-estrutura (MET) de hepatócito em estado avançado de necrose em fêmea tratada com 8 doses (traíra 4)....	55
<b>Figura 14:</b> Atividade colinesterásica com músculo axial de <i>H. malabaricus</i> expostas cronicamente por via trófica ao chumbo (II).....	56
<b>Figura 15:</b> Rota de biossíntese do grupo heme.....	80

<b>Figura 16:</b> Laboratório de Bioensaios: exposição aguda de <i>O. niloticus</i> ao chumbo (II) por via hídrica e em regime semi-estático.....	<b>92</b>
<b>Figura 17:</b> Estrutura superficial das brânquias (MEV) de quatro exemplares controles de <i>O. niloticus</i> .....	<b>102</b>
<b>Figura 18:</b> Estrutura superficial das brânquias (MEV) de três exemplares de <i>O. niloticus</i> , expostos ao chumbo por via hídrica durante 96h.....	<b>103</b>
<b>Figura 19:</b> Inibição da atividade da $\delta$ -ALA-d eritrocitária de <i>O. niloticus</i> .....	<b>104</b>
<b>Figura 20:</b> Concentração de hemoglobina (g/dl) no sangue de <i>O. niloticus</i> .....	<b>105</b>
<b>Figura 21:</b> Reativação enzimática com DTT na atividade da $\delta$ -ALA-d eritrocitária de <i>O. niloticus</i> .....	<b>106</b>
<b>Figura 22:</b> Percentual de inibição em relação a resposta controle da atividade da $\delta$ -ALA-d eritrocitária de <i>O. niloticus</i> expostas.....	<b>107</b>

## RESUMO

No presente trabalho duas espécies de peixes de água doce, *Hoplias malabaricus* (traíra) e *Oreochromis niloticus* (tilápia), foram expostas a condições experimentais para o estudo dos efeitos tóxicos do Chumbo (II), após as exposições trófica (crônica) e hídrica (aguda), respectivamente. A exposição trófica e crônica de *H. malabaricus* ao Chumbo (II) foi realizada com a dose nominal ingerida de  $21\mu\text{g Pb}^{++}\cdot\text{g}^{-1}$  a cada 120h e as amostras de material biológico foram coletadas após 4 doses (18 dias) e 8 doses (41 dias). Os efeitos agudos do chumbo em *O. niloticus* após a exposição hídrica de 96h foram avaliados através das concentrações nominais de 100 e  $300\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ . A dose e as concentrações usadas neste trabalho foram determinadas a partir de estudos em áreas impactadas por chumbo, devido principalmente a atividades de mineração e metalurgia (Alto Vale do rio Ribeira nos estados brasileiros de São Paulo e Paraná).

Para investigar os efeitos da exposição ao chumbo, em ambas as espécies, foram utilizados diferentes biomarcadores morfológicos (aspectos histológicos e ultra-estruturais) e bioquímicos (aspectos moleculares: atividades enzimáticas). Para o tratamento crônico e trófico empregou-se a inibição colinesterásica como parâmetro neurotóxico, de acordo com ELLMAN (1961) e a microscopia de luz e eletrônica de transmissão para se avaliar as alterações na estrutura do fígado de *H. malabaricus*. As amostras para histologia foram fixadas em Bouin e coradas com Hematoxilina-Eosina ou azul de toluidina. Para microscopia eletrônica de transmissão foram usados glutaraldeído a 2,5%, paraformaldeído a 4,0% em tampão cacodilato a 0,1M, pH 7,2 como solução fixadora por 2h, seguida de pós-fixação com tetróxido de ósmio a 1% na mesma solução tampão, ambas a temperatura ambiente. Para o experimento agudo por via hídrica foi analisada a inibição da  $\delta$ -aminolevulinato desidratase ( $\delta$ -ALA-d) eritrocitária de *O. niloticus*, de acordo com HODSON (1976) e BAINY (1990) e a superfície do epitélio branquial por microscopia eletrônica de varredura, com as amostras fixadas em glutaraldeído a 3,0% em tampão cacodilato a 0,1M, pH 7,2.

Os resultados mostraram que o chumbo é capaz de inibir a atividade catalítica da  $\delta$ -ALA-d, quando esta foi comparada com o grupo controle, para ambas as concentrações testadas em *O. niloticus*. Alterações morfológicas foram evidentes na ultra-estrutura do fígado de *H. malabaricus* após 4 e 8 doses ingeridas. A atividade da  $\delta$ -ALA-d é uma específica e sensível estimativa para efeitos do chumbo após doses subletais a *O. niloticus* e este parâmetro foi considerado o melhor biomarcador testado neste trabalho, confirmando seu uso potencial para estudos adicionais em áreas contaminadas no Brasil. Os efeitos morfológicos do chumbo em *H. malabaricus* não são mencionados na literatura especializada, mas se parecem com os efeitos de outros metais pesados.

## ABSTRACT

In the present work, two freshwater species, *Hoplias malabaricus* and *Oreochromis niloticus*, were exposed to experimental conditions to study the effects of inorganic lead (II) after respectively trophic (chronic) and waterborne (acute) expositions. The trophic and chronic exposure to lead (II) on *H. malabaricus* was mounted with nominal ingested dose of  $21\mu\text{g Pb}^{++}\cdot\text{g}^{-1}$  each 120h, and the samples were removed after 4 doses (18 days) and 8 doses (41 days). The acute effects of lead after waterborne exposition to *O. niloticus*, were studied after 96 hours of exposure time at 100 and  $300\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  nominal concentrations. Dose and concentrations used in this work were determined from studies in impacted areas by lead, mainly due to mining and metallurgic activities (High Valley of Ribeira River, in São Paulo and Paraná States, Brazil).

Differents biomarkers using morphological (histological and ultrastructural aspects) and biochemical (enzyme activity aspects), were used to investigate the effects of lead exposure to both freshwater species. For chronic and trophic treatment, were used cholinesterase inhibition as neurotoxic parameter according to ELLMAN (1961), and light and transmission electronic microscopy to evaluate the alterations on liver structure. Samples for histological studies were fixed in Bouin and stained in Haematoxilin/Eosin or toluidine blue stains and for electronic microscopy studies were used glutaraldehyde (2,5%), paraformaldehyde (4,0%) in cacodylate buffer (0,1M) (pH 7,2) as fixative solution for 2 hours and post fixed in 1% osmium tetroxide in the same buffer for 1 hour, both at room temperature. For the waterborne experiment, were studied erythrocyte  $\delta$ -amino levulinic acid dehydratase ( $\delta$ -ALA-d) inhibition according to HODSON (1976) and BAINY (1990), and the surface of gill epithelium using scanning electron microscopy, respectively as biochemical and morphological biomarkers to *O. Niloticus*. For scanning electron microscopy, samples were fixed in glutaraldehyde (3,0%) in cacodylate buffer (0,1M) (pH 7,2).

The results showed that lead is able to inhibit  $\delta$ -ALA-d activity when compared with the control group in both nominal concentrations tested on *O. niloticus*. Morphological alterations on liver ultrastructure are evident to *H. malabaricus* after 4 and 8 doses. The  $\delta$ -ALA-d activity is a specific and sensitive estimates of lead effects after sublethal doses to *O. niloticus*, and this enzyme's activity was considered to the best biomarker tested in this work, confirming its potential use in further studies in contaminated areas in Brazil. The morphological effects of lead to *H. malabaricus* have not been mentioned in the literature, but are closed to other heavy metals effects.

## INTRODUÇÃO GERAL

### 1. USO DE BIOMARCADORES

A contaminação de um organismo é precedida, lógica e empiricamente, pela contaminação de pelo menos uma de suas células. Contudo sabe-se que a simples constatação da presença de metais pesados em organismos não implica a morte dos mesmos, uma vez que estes podem neutralizar ou excretar metais tóxicos. Além disso alguns metais são essenciais aos processos biológicos, quando em teores que não excedem a necessidade metabólica.

Isso faz com que o simples monitoramento ambiental, por quantificação de metais pesados em setores ecossistêmicos impactados, seja insuficiente para se inferir conseqüências da presença desses metais naqueles ecossistemas. Para tais inferências, deve-se ter em mente alguns fatores que auxiliam o diagnóstico com base no monitoramento: se o metal é essencial ou não aos organismos vivos e em que condições; a forma química em que se encontram os metais e sua concentração nos distintos extratos do ambiente; e condições físico-químicas do ambiente, que influenciam diferentemente na biodisponibilidade de cada metal.

Um biomarcador pode ser uma resposta bioquímica, fisiológica ou um parâmetro morfológico alterado, todos conseqüências da exposição de um organismo a um xenobionte (MELANCON, 1995). Biomarcadores são portanto modelos biológicos que indicam contaminação. Para que um modelo seja corretamente interpretado, ele deve estar sujeito a teste, ou seja, à espera de observações empíricas que possam corroborá-lo ou refutá-lo, permitindo assim possíveis predições.

Existe um problema relacionado com o uso de biomarcadores, quando se quer constatar contaminação: as correlações entre a contaminação química de células e o comprometimento de componentes integrantes de níveis emergentes de complexidade são raramente possíveis de se estabelecer. Assim, o que for váli-

do para uma ou poucas células de um indivíduo pode não corresponder a uma propriedade coletiva, não permitindo que se diga, por exemplo, do comprometimento tecidual sem um estudo aprofundado. Outro cuidado também cabe à extrapolação de dados em níveis superiores: alguns animais de uma população podem estar seriamente contaminados, mas em que isso compromete a espécie ou mesmo a comunidade em questão é algo que só irá se saber com estudos ecológicos adequados.

Nesse âmbito, a extrapolação de dados de laboratório para condições reais de contaminação *in natura* deve ser feita com ressalvas e dentro das restrições impostas pelo que está exposto acima. O emprego de biomarcadores é válido quando os parâmetros usados ou as respostas obtidas sejam comuns, em estrutura e organização, à totalidade dos casos possíveis e considerados.

Neste trabalho foram usados parâmetros morfológicos teciduais e celulares, bem como parâmetros moleculares (respostas bioquímicas) como biomarcadores para o estudo da contaminação de peixes de água doce pelo Chumbo (II). Pretendeu-se portanto a padronização de metodologias que possam servir, somando-se ao monitoramento supracitado, à predição de conseqüências da presença do chumbo em ambientes aquáticos tropicais e subtropicais brasileiros.

## **2. ENTRADA DE METAIS NA CÉLULA**

Muito acerca de como os metais entram na célula é comum a situações onde o metal não contamina, mas integra o operar da mesma, como no caso dos metais essenciais que ao entrarem na célula passam a fazer parte dos processos metabólicos ali desenvolvidos.

Os metais (notados abaixo por "M") podem permear ao interior da célula, quando se encontram nas seguintes formas (SIMKISS e TAYLOR, 1995):

- (i) íons metálicos (p.ex.:  $M^{2+}$ );
- (ii) íons hidratados (p.ex.:  $M^{2+}.6H_2O$ );
- (iii) compostos metálicos (p.ex.:  $MCl+.5H_2O$ );
- (iv) compostos inorgânicos sem carga (p.ex.:  $[MCl_2]^0$ );
- (v) organometais (p.ex.:  $CH_3M^+$ ).

Os metais podem ainda ser transportados ao interior da célula de diversas maneiras (SIMKISS e TAYLOR, 1995):

- (i) em solução hidrofóbica, por simples difusão através da membrana;
- (ii) complexados a componentes de membrana (proteínas, açúcares e lipídios) com posterior endocitose;
- (iii) por endocitose (mediada ou não por sinal químico) de componentes ainda não constitutivos da célula: amostras do meio aquoso extracelular ou partículas externas (MASON e JENKINS, 1995);
- (iv) por difusão facilitada a favor de um gradiente (de concentração e/ou de potencial elétrico) através de um canal protéico ou por uma proteína transportadora, específicos ou não;
- (v) por transporte ativo (primário ou secundário) acoplado a uma fonte de energia; realizado por uma proteína transportadora, específica ou não.

Como enfatizado por SIMKISS e TAYLOR (1995), as diferentes maneiras de entrada relacionadas às diferentes formas em que se encontram os metais podem gerar uma complexa matriz de dupla entrada, onde estariam refletidos os processos em que o metal poderia estar disponível à célula. Eles lembram ainda que em cada possível processo podem ser identificadas variáveis adicionais, estas relacionadas com o meio extracelular variável ou com o operar intrínseco à cada tipo celular. Discorrem sobre algumas destas variáveis, como por exemplo: a composição lipídica da membrana, a seletividade dos canais protéicos promovendo “competição” entre os metais, efeitos de pH e dureza do meio aquoso, além da regulação celular diferenciada para os distintos sistemas de transporte de metais.

Segundo PELLETIER (1995), na década de 70 foi desenvolvido um modelo explicativo para o transporte de organometais catiônicos através de membranas biológicas. A porção carregada do composto faria interação com ânions  $\text{Cl}^-$  ou  $\text{OH}^-$  tornando toda a unidade lipossolúvel a passível de difusão pela fase lipídica da membrana. O cloreto ou a hidroxila seriam removidos após o transporte, enquanto os radicais hidrofóbicos do organometal ainda poderiam permanecer em interação com os lipídios da membrana.

A pinocitose é um processo constitutivo e inespecífico, já que não envolve um sinal químico externo e potencialmente pode ser realizado por todas as células eucarióticas. A célula pode incorporar pequenas porções do fluido extracelular e formar vesículas com cerca de 150 nm de diâmetro (ALBERTS *et al.*, 1997). A amostra do meio pode conter pequenas partículas onde o metal está absorvido ou adsorvido, ou simplesmente em solução ou suspensão no fluido. De acordo com MASON e JENKINS (1995), a pinocitose parece ser importante na captação dos metais essenciais à organismos, como o bivalve *Mytilus edulis*. Em contrapartida, devido a sua baixa especificidade, a pinocitose provavelmente deve contribuir para um maior acúmulo de metais tóxicos.

A endocitose mediada por sinal externo é mais específica e envolve um receptor protéico de superfície e um ligante ou sinal químico extracelular (ALBERTS *et al.*, 1997). Em primeira instância, pode-se supor que este processo seja menos prejudicial que a pinocitose, quando da incorporação de agentes tóxicos à célula. Contudo, os metais poderiam estar complexados quimicamente com a partícula a ser internalizada. Isto ocorre em dois casos conhecidos de endocitose mediada, nos quais o metal não contamina, mas é necessário à célula:

- (i) endocitose da *transferrina*, proteína do plasma sanguíneo que, em mamíferos, leva o ferro a ela complexado, do intestino aos tecidos;
- (ii) endocitose da *cobalamina* (vitamina  $\text{B}_{12}$ ) (VOET e VOET, 1995) na incorporação do cobalto à célula (MASON e JENKINS, 1995).

EWERS e SCHLIPKÖTER (1991) revisam que estudos em animais demonstram a deficiência de ferro na dieta como um dos fatores que podem realçar a absorção do chumbo pelo intestino.

A fagocitose também é um processo mediado por sinal, mas difere do modo anterior em escala e no envolvimento do citoesqueleto, como os filamentos de actina requeridos para formação de pseudópodos. Vesículas maiores que 250 nm podem ser formadas e são denominadas fagossomos (ALBERTS *et al.*, 1997). É o modo mais especializado e complexo de endocitose; não obstante, é observado em protistas atuais.

Em relação aos metacelulares e aos metais, o processo de fagocitose tem pouca participação na absorção desses agentes a partir do meio (MASON e JENKINS, 1995). Um aspecto importante associado à fagocitose envolve a resposta imune, onde células especializadas do sangue (neutrófilos e macrófagos) endocitam partículas “indesejáveis” ao organismo. Essas partículas, geralmente microorganismos, são previamente recobertas por moléculas de anticorpos, que são um dos tipos de sinais químicos necessários à fagocitose. Sabe-se que a estrutura dos anticorpos é mantida por pontes dissulfeto (-S-S-) entre duas cisteínas e que os metais pesados podem impedir que essas pontes se estabeleçam.

### **3. EFEITOS DE METAIS PESADOS NA CÉLULA**

Alguns metais são, invariavelmente, altamente danosos ao funcionamento da célula. Outros, como o cobre, o zinco e o ferro, por exemplo, são considerados elementos essenciais à vida e não são agentes tóxicos, quando ocorrem em concentrações metabólicas. Porém esses mesmos metais podem adquirir a propriedade tóxica, quando em interações que excedem em quantidade a necessidade metabólica da célula. Portanto o termo tóxico, atribuído aos metais, deve sê-lo com cuidado, já que podem existir diferentes situações de contaminação por esses elementos.

Sabe-se que muitos metais pesados são responsáveis pela quebra ou o impedimento da formação de pontes dissulfeto (-S-S-), podendo assim inutilizar certas enzimas (MANAHAN, 2000). Tais pontes estão em ambientes oxidantes, como o meio extracelular ou o lúmen de organelas. Nestes espaços, componentes moleculares da célula são processados quimicamente. Por outro lado, no citosol os grupos sulfidril (-SH) de cisteínas vizinhas não formam pontes, mas continuam sendo bons doadores de elétrons aos metais. Os metais pesados podem ainda interagir com os grupos ácido carboxílico (-COOH) e amino (-NH<sub>2</sub>), nas extremidades das cadeias protéicas (MANAHAN, 2000).

Em relação à toxicidade dos metais pesados deve-se considerar ainda que a presença e a biodisponibilidade, de dois ou mais deles no ambiente, pode estabelecer dois a dois, casos de antagonismo ou sinergismo, estes relacionados a fatores como tempo de exposição, efeitos deletérios para indivíduos ou populações e taxas de absorção, acúmulo e detoxificação (PAIN, 1995; LANDIS e YU, 1995). Estudos epidemiológicos com idosos em Detroit-ÉUA indicam que as freqüências de exposição ocupacional (mais de 20 anos) ao manganês, cobre, cobre-chumbo, cobre-ferro e ferro-chumbo estão associadas ao mal de Parkinson (GORELL *et al.*, 1999).

#### 4. EFEITOS TÓXICOS DO CHUMBO

O chumbo (Pb) é um metal pesado, tóxico, elemento da família 4A da tabela periódica (6p<sup>2</sup>); tem massa atômica equivalente a 207,19 e possui 82 elétrons em seu estado elementar; tem eletronegatividade de 1,8 *e.v.* e seu ponto de fusão é relativamente baixo (327°C) o que permite sua extração fácil do minério, por calor. É um importante constituinte de mais de 200 minerais. Pode existir no meio ambiente na forma inorgânica (como íons Pb<sup>++</sup> e Pb<sup>4+</sup>, este menos freqüente) e na forma orgânica (complexado covalentemente a compostos de carbono: Pb-C-R<sub>3</sub>) (PAIN, 1995).

O chumbo não é um elemento essencial à organismos e é considerado altamente tóxico: todos os efeitos conhecidos causados pelo chumbo em sistemas biológicos são deletérios (PAIN, 1995). Pode-se citar alterações na atividade catalítica da aminoacil-t-RNA-sintetase (NICHOLLS *et al.*, 1989). Para os animais é um contaminante não específico que age em nível molecular e inibe a atividade de muitas enzimas necessárias ao operar normal da célula.

PAIN (1995) ressalta a importância da distinção entre toxicidade química e contaminação clínica, esta com sintomatologia aparente e conseguinte da outra; em humanos, o chumbo parece ser o único poluente químico que se acumula em concentrações médias próximas do limiar de contaminação clínica potencial. O chumbo inorgânico é menos tóxico que quando na forma orgânica, já que o organometal pode, dependendo de seu tipo, ser mais permeado ao interior de células (lipossolúvel); além disso a toxicidade do chumbo inorgânico aumenta com o acréscimo em quantidade de carbono (PAIN, 1995).

Tanto fatores bióticos quanto abióticos podem influenciar na absorção, na distribuição e, por conseguinte, no efeito tóxico do chumbo em condições naturais (PAIN, 1995). Experimentos indicam que: animais jovens absorvem muito mais chumbo pelo trato digestivo que os adultos; fatores de dieta como baixos teores de cálcio, vitamina D e deficiência de ferro podem realçar a absorção do chumbo pelo trato digestivo (EWERS e SCHLIPKÖTER, 1991).

Uma vez absorvido pelo epitélio, o chumbo é distribuído no organismo pela corrente sangüínea. Diferentes tecidos e órgãos possuem diferentes afinidades ao chumbo. No sangue humano, mais de 95% do chumbo está associado aos eritrócitos, principalmente à hemoglobina. O montante de chumbo em um organismo humano pode ser dividido em três frações primárias (EWERS e SCHLIPKÖTER, 1991):

- (i) no sangue e em tecidos moles com rápida renovação: meia-vida média de 19 dias;
- (ii) tecidos moles e ossos com rápida renovação: meia-vida média de 21 dias;
- (iii) ossos do esqueleto: meia-vida média de 10 a 20 anos.

O chumbo não absorvido pelo epitélio intestinal é eliminado nas fezes. A porção que entra e não se acumula é excretada por filtração glomerular, nos rins. Teores maiores que 10 µg/l já foram aferidos no leite humano, evidenciando esta via de excreção (EWERS e SCHLIPKÖTER, 1991).

Principalmente em crianças, a exposição ao chumbo inorgânico pode ocasionar sérios efeitos deletérios e irreversíveis, dentre eles: disfunções cerebrais que se evidenciam com a perda de memória, declínio da cognição e mau desempenho escolar (LANPHEAR, 1998). Efeitos do chumbo inorgânico em altos teores no sistema nervoso central são mais freqüentes em crianças que em adultos e podem levar, dentre alguns sintomas, à irritabilidade, tremor muscular, delírio, convulsões, paralisia e coma. Crianças que sobrevivam a estas exposições podem apresentar seqüelas neurológicas permanentes. Cerca de 100 µg/l de chumbo no sangue do infante pode levar a danos cerebrais irreversíveis e até mesmo ao óbito (EWERS e SCHLIPKÖTER, 1991).

Efeitos do chumbo inorgânico no sistema nervoso periférico também já foram relatados, mas com maior freqüência em adultos; devido a atual baixa incidência desses efeitos, hoje em dia os estudos nessa área envolvem anormalidades eletrofisiológicas que possam ocorrer na ausência de sinais clínicos (EWERS e SCHLIPKÖTER, 1991).

Outros órgãos ou sistemas de um organismo podem sofrer alterações por exposição ao chumbo inorgânico. Disfunções renais crônicas ou agudas podem ser conseqüência da exposição ao chumbo: danos nos túbulos proximais do néfron, decréscimo da reabsorção tubular do néfron, arteriosclerose local, fibrose intersti-

cial, atrofia glomerular e degeneração hialina dos vasos associados podem ocorrer. O chumbo também está associado a alterações cardiovasculares, com aumento de pressão arterial. Não há evidência definitiva de efeitos adversos causados pelo chumbo ao fígado. Os sistemas endócrino, hematopoiético e imunológico podem ser afetados (EWERS e SCHLIPKÖTER, 1991).

O chumbo causa diversos danos à regulação celular das condições oxidativas normais, intervindo na ação de diversas enzimas responsáveis pela eliminação celular de compostos de oxigênio parcialmente reduzidos, como p.ex., o superóxido ( $O_2^-$ ) e o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). Devido a sua reatividade, esses compostos são altamente tóxicos à célula, podendo promover oxidações (quebras) de macromoléculas celulares. Caso um destes componentes seja DNA, o risco de mutagenicidade por exposição ao metal, pode ser iminente. De fato há evidências de que o chumbo possa ser, de forma indireta, genotóxico. Aberrações cromossômicas em número significativo já foram evidenciadas em linfócitos de populações humanas com 10 a 100  $\mu\text{g}/100\text{ml}$  de chumbo no sangue (EWERS e SCHLIPKÖTER, 1991).

Estudos com animais demonstram que alguns compostos de chumbo induzem a formação de tumores renais malignos e benignos. Outros estudos, epidemiológicos, buscando evidências para o efeito carcinogênico do chumbo em humanos indicam que, de forma geral, exposições de mais de 20 anos ao chumbo podem levar a um acréscimo na incidência de câncer. Efeitos do chumbo relacionados ao decréscimo de fertilidade, abortos espontâneos e teratogenicidade, mortalidade e más formações de embriões em desenvolvimento têm sido investigados (EWERS e SCHLIPKÖTER, 1991).

## 5. CHUMBO E ANIMAIS AQUÁTICOS

Efeitos tóxicos do chumbo em animais aquáticos variam de acordo com a espécie considerada, o tempo e o modo de exposição, o desenvolvimento de tole-

rância fisiológica, os teores de metal e com fatores ambientais locais. A tolerância fisiológica ao metal pode ser adquirida pelo indivíduo ou controlada por expressão gênica hereditária (PAIN, 1995).

Dentre os fatores ambientais que podem influenciar na absorção e acúmulo de chumbo por organismos aquáticos, destacam-se a dureza da água ( $\text{Ca}^{++}$  e  $\text{Mg}^{++}$ ) e seu pH, que alteram a solubilidade do metal e sua biodisponibilidade. BAATRUP (1991) relata que um decréscimo em pH do meio pode aumentar a concentração de chumbo solúvel. Esta maior solubilidade do chumbo pode ocasionar sua maior absorção por organismos aquáticos. Um aumento em dureza da água pode diminuir a solubilidade do  $\text{Pb}^{++}$ , diminuindo sua biodisponibilidade e efeitos tóxicos. Essas considerações foram observadas com um aumento de  $\text{LC}_{50}^1$  aferido a diversas espécies aquáticas; contudo a correlação entre dureza e toxicidade não é constante entre as espécies (PAIN, 1995).

O chumbo está disponível a um organismo aquático por duas vias (PAIN, 1995):

- (i) hídrica (absorção pelas brânquias, pele, intestino, etc.)
- (ii) trófica (pela alimentação com posterior absorção no intestino).

Vale lembrar que peixes de água doce ingerem pouca ou nenhuma água, ao contrário de peixes marinhos.

Em teleósteos, a absorção e acúmulo do chumbo orgânico é maior que do inorgânico. Grande parte dos casos de acúmulo e contaminação em animais são freqüentemente atribuídos ao  $\text{Pb}^{++}$ , já que esta forma iônica é mais biodisponível,

---

<sup>1</sup>  $\text{LC}_{50}$  é a concentração letal que exprime a quantidade total de contaminante necessária para a morte de 50% dos indivíduos do ensaio experimental.

além de ser solúvel em ambientes aquosos, interagindo com a água e sendo assim mais disperso (PAIN, 1995).

Em relação a outros metais, como o mercúrio e o cobre, o chumbo inorgânico tem restrita movimentação através de membranas biológicas. Isto é devido à baixa solubilidade dos sais de chumbo, com freqüente formação de precipitados, como  $Pb(OH)^+$  e  $PbHCO_3^+$ . Foi portanto sugerido que em peixes, há um menor acúmulo de chumbo, relativo àqueles dos outros metais citados (BAATRUP, 1991). Contudo, muitos organismos aquáticos, inclusive peixes, podem absorver e acumular altas concentrações de chumbo (PAIN, 1995) e em geral considera-se que este metal possui efeitos cumulativos (VIGHI, 1981).

Efeitos do chumbo no sistema nervoso de animais podem estar relacionados com alterações de comportamento, afetando alimentação, reprodução ou migração. BAATRUP (1991) comenta sobre o efeito neurotóxico do  $Pb^{++}$  com alteração dos teores normais de neurotransmissores, em peixes expostos de forma crônica.

Em peixes expostos a baixos teores de chumbo na água, já se observou efeitos subletais a  $7 \mu\text{g/l}$  e inibição da atividade de enzimas hematopoiéticas a  $10 \mu\text{g/l}$ . Sob altos teores, há relatos de anemia, redução na eclosão dos ovos, escurecimento da região dorso-caudal e curvatura lateral da espinha. Em doses letais o chumbo aumenta a produção de muco, o que obstrui as brânquias e mata por anoxia (PAIN, 1995).

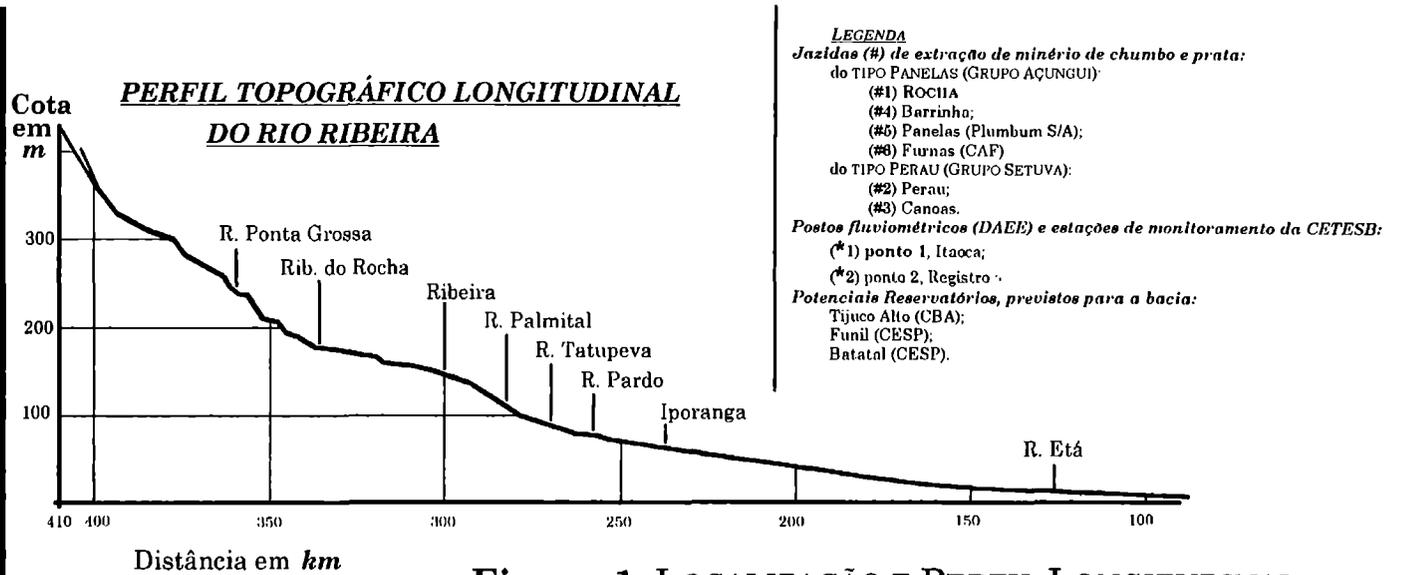
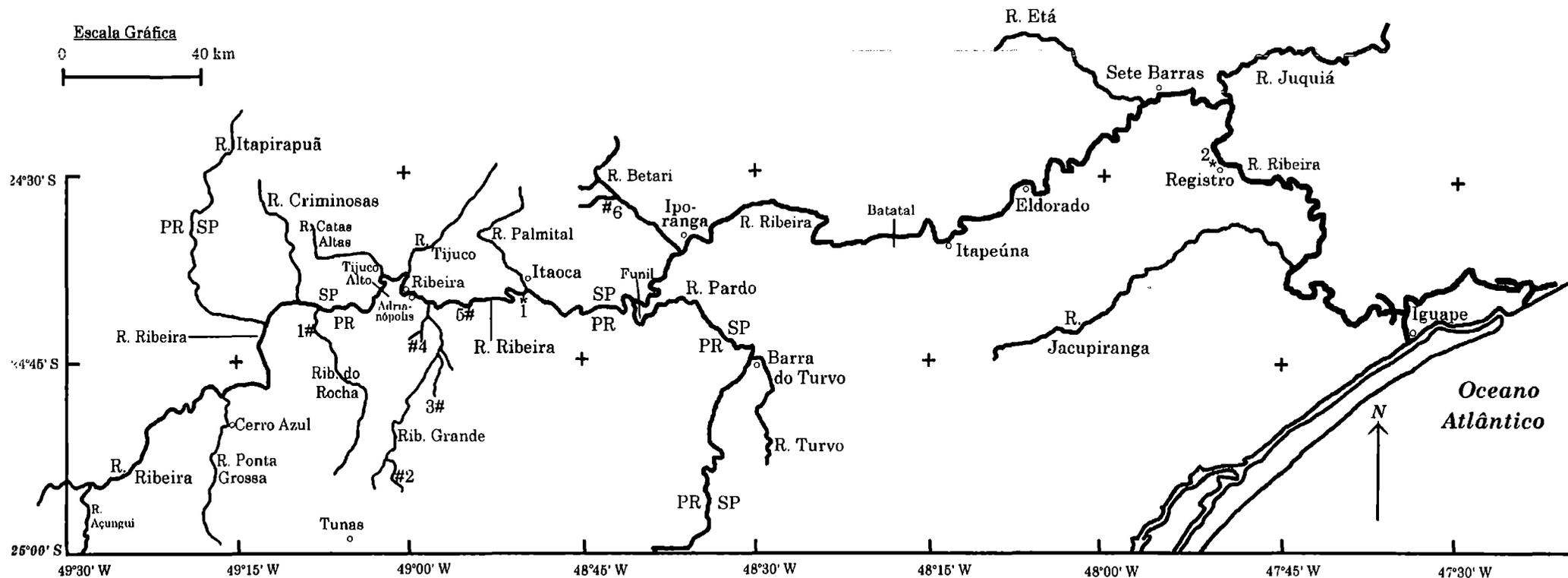
Não foram encontradas evidências plausíveis de biomagnificação do chumbo (PAIN, 1995). Biomagnificação ou magnificação biológica é “um incremento progressivo de concentrações, a partir da fonte de exposição e através dos níveis tróficos de organismos vivos” (PAIN, 1995). Ou ainda: um acúmulo crescente de um xenobionte por estágios ascendentes de cadeias tróficas.

De outra forma, VIGHI (1981) demonstrou com um sistema laboratorial de fluxo de água contínuo, que os níveis tróficos analisados (alga, crustáceo planctônico e peixe) em ascendência, não acumulavam chumbo em correlação positiva. Contudo o mesmo trabalho indica que o nível mais elevado da cadeia trófica experimental, ou seja, o peixe *Poecilia reticulata* acumulou mais chumbo pela via trófica que pela hídrica. Dados obtidos *in natura*, quando isolados, são ineficazes para a constatação de biomagnificação. Isto porque a absorção do chumbo pode não se dar exclusivamente por via trófica (PAIN, 1995).

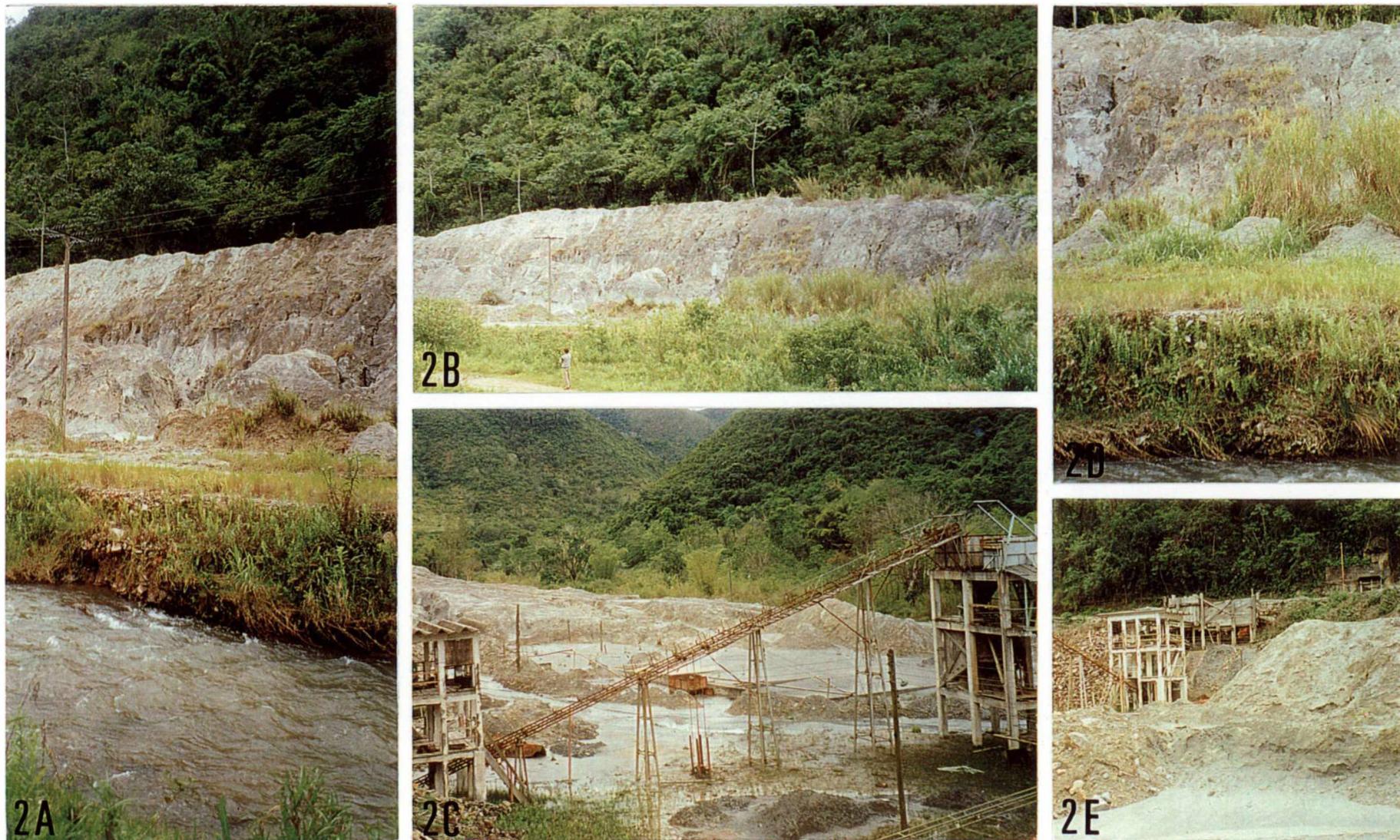
## 6. RIO RIBEIRA, AMBIENTE IMPACTADO

A bacia do rio Ribeira (SP/PR) está situada entre os paralelos 23°50'-25°30' S e entre os meridianos 46°50'-50°00' L (cf. **Figura 1**). A região do vale do Ribeira conta com diferentes tipos de impactos ambientais, pretéritos, atuais ou potenciais. Esses impactos são comuns a regiões habitadas pelo homem e que não possuem um eficiente controle de sustentabilidade ao seu desenvolvimento econômico, com a preservação de seus recursos naturais. Alguns tipos de alterações nos ecossistemas aquáticos locais são: assoreamento dos leitos dos corpos de água, poluição orgânica (lixo e esgoto), desmatamento da floresta ripícola e enchentes periódicas.

Outrossim, impactos ambientais significativos surgiram com a implementação do extrativismo mineral na região do Alto Vale do rio Ribeira. Isso resultou na presença de metais pesados na bacia, em teores por vezes aferidos acima dos limites permissíveis: em organismos aquáticos, sedimentos e materiais em suspensão ou dissolvidos na água (EYSINK *et al.*, 1988, 1990; CETESB, 1978-97, 1991a; MORAES, 1997).



**Figura 1: LOCALIZAÇÃO E PERFIL LONGITUDINAL DO R. RIBEIRA: RIOS, RIBEIRÕES E PONTOS DE INTERESSE.**



**Figuras 2A-E:** Mina do Rocha na margem esquerda do ribeirão do Rocha, tributário da margem direita do rio Ribeira, no Alto Vale do Ribeira, município de Adrianópolis (PR). Ribeirão do Rocha em **A** e **D**. Depósito de rejeitos do beneficiamento de minério de chumbo em **A**, **B** e **D**. Instalações desativadas da mina do Rocha em **C** e **E**.

Esses altos teores de metais são atribuídos a atividades de beneficiamento de minério de chumbo. De fato, na região serrana da bacia (Alto Ribeira) encontram-se, hoje desativadas, muitas unidades de extrativismo de chumbo e prata. O minério dessas minas foi processado por dois parques metalúrgicos situados no Alto Ribeira: a Mineradora Rocha e a Plumbum S/A. O rejeito da metalurgia ou foi jogado diretamente nos corpos d'água por décadas, ou se encontra estocado a céu aberto, nas proximidades dos dois parques citados e junto às margens de corpos de água. O depósito de rejeitos da mina Rocha (cf. **Figura 2A-E**) além de estar a céu aberto e nas margens do ribeirão do Rocha, encontra-se sujeito à lixiviação e na área de inundação do potencial reservatório Tijuco Alto. Esse é um empreendimento proposto pela Companhia Brasileira de Alumínio (CBA) que, se implantado, visaria a geração hidroelétrica e a contenção de cheias. Outros dois reservatórios da CESP estão previstos para a bacia (DAEE, 1998).

O vale do rio Ribeira é um dos últimos focos de Floresta Atlântica intacta do estado de São Paulo e do país. Além disso, o rio Ribeira deságua numa área de manguezais típicos, o Complexo Lagunar-Estuarino de Iguape-Cananéia-Paranaguá. Este ecossistema foi considerado mundialmente como um dos mais importantes criadouros marítimos, e entre os primeiros em produtividade primária (SÃO PAULO, 1992). Teores excessivos de metais pesados também foram aferidos no sedimento e em peixes deste complexo (EYSINK *et al.*, 1988, 1990; CETESB, 1991a).

Em coleta instantânea, em fevereiro de 1995 e logo após uma grande cheia, MORAES (1997) detectou que 57 kg/s de chumbo, adsorvido ao material em suspensão, passavam pela planície de Sete Barras (SP). Ele ainda estimou que, anualmente, 151 toneladas de chumbo (adsorvidas em 840 000 toneladas de sólidos em suspensão na água) passavam por aquele município. Sem se considerar as variações anuais, isto equívale a uma média de 419 kg de chumbo por dia. Para a estimativa, além da comparação com teores de metais em lagoas da região, Moraes obteve dados de coletas no rio Ribeira; de uma série de vazões diárias obtidas

pelo DAEE de 1961-70, *apud* MORAES (1997) e dos relatórios anuais da CETESB (1983-94), estes para a concentração média anual de sólidos em suspensão.

A CETESB (1991a) em 78 amostras de musculatura analisadas, de peixes coletados em fevereiro de 1990 no rio Ribeira, constatou que:

- (i) 26 amostras ultrapassavam o limite internacional mais restritivo para o cádmio (33,3% acima de 0,05 µg/g);
- (ii) 31 amostras ultrapassavam o limite internacional mais restritivo para o chumbo (39,7% acima de 0,5 µg/g);
- (iii) 8 amostras ultrapassavam o limite estipulado para o chumbo pela legislação ambiental brasileira (10,6% acima de 2,0 µg/g) (CONAMA, 1986).

Neste levantamento da CETESB não estão discriminadas as espécies de peixes correspondentes às amostras. Contudo isso faz menos importância quando o pescado é passível de consumo humano. Além da musculatura, que é a parte comestível ao homem, também foram analisadas amostras de vísceras e ossos. A **Tabela I** agrupa os resultados encontrados que são pertinentes ao metal chumbo.

**Tabela I:** Concentração de chumbo em amostras de peixes coletadas no rio Ribeira em 1990.

<i>N amostras</i>	<i>freqüência em que foi detectado Pb</i>	<i>máx.</i>	<i>mtn.</i>	<i>média</i>	<i>Dv.pd.</i>
músculos: 78	52,6% (n = 41)	9,36	<i>nd</i>	<b>0,69</b>	1,43
vísceras: 76	69,7% (n = 53)	624,0	<i>nd</i>	<b>16,46</b>	75,64
ossos: 25	100% (n = 25)	99,3	10,7	<b>33,56</b>	19,6

Fonte: CETESB (1991a).

Valores em µg/g (peso úmido); (*nd*), não determinado: valor menor que o limite de detecção (0,2 µg/g) do método empregado; (*máx.*), valor máximo observado; (*mín.*), valor mínimo observado; (*dv.pd.*), desvio padrão.

O alto desvio padrão encontrado para as amostras de vísceras acima provavelmente reflita o estado nutricional e o hábito alimentar dos animais. Assim, um peixe iliófago que acabou de se alimentar deverá apresentar valores maiores que um piscívoro que não come há algumas horas. As médias para vísceras e os-

soos estão muito acima do limite do CONAMA (1986) para consumo humano: 2 µg/g. Já para musculatura, a média é inferior a tal limite.

Contudo 0,69 µg/g trata-se de um valor médio e mesmo que represente bem a amostra, deve-se ter em mente que o chumbo não é um metal essencial à organismos, ou seja, não integra nenhum de seus processos biológicos e qualquer quantidade detectada pode ser considerada um excesso.

Os valores em músculos e vísceras são indicadores de exposição recente ao chumbo. Uma vez ingerido e absorvido pelo animal, o chumbo ou se acumula nele ou é excretado nas fezes e urina. Os ossos são o tipo de tecido que mais retém o chumbo e, embora comumente não sejam ingeridos pelo homem, são bons indicadores de exposições ao metal, em exposições agudas ou crônicas (HODSON, 1984; EWERS e SCHLIPKÖTER, 1991). O histórico de mineração do vale do Ribeira e os valores para ossos indicados na **Tabela I** demonstram que o chumbo está presente nesse ambiente aquático há muito tempo. Notar que todas as amostras de ossos analisadas continham chumbo e que o menor valor encontrado é cinco vezes maior que o limite do CONAMA (1986).

## **7. ESTUDO PRELIMINAR NO ALTO VALE DO RIBEIRA COMO JUSTIFICATIVA A ESTE TRABALHO**

Em novembro de 1998, o Laboratório de Toxicologia Celular, Dep. de Biologia Celular (SBC-UFPR) esteve em campo visitando o depósito de rejeito da mineradora Rocha, no Alto Vale do rio Ribeira (cf. **Figura 2A-E**). Aferições nas amostras de sedimento coletadas no local indicaram que a mina do Rocha ainda contribuía para a dispersão de metais pesados na bacia, uma vez que foram detectados teores excessivos de Cu, Pb e Zn quantificados nos sedimentos dos rios Rocha e Ribeira.

As amostras foram identificadas por seus locais de origem e levadas ao *Institut des Sciences de la Mer - Université du Québec à Rimouski* (Québec, Canadá), onde foram sujeitas a procedimentos analíticos. Estes consistiram da digestão ácida das amostras e da análise de seu produto, com a determinação das concentrações de metais pesados e outros elementos através de um espectrofotômetro de absorção atômica com forno de grafite.

As amostras coletadas no depósito de rejeitos da mina do Rocha continham concentrações de metais que puderam ser expressos em grandeza percentual. A **Tabela II** compila alguns dos maiores valores de concentração encontrados, comparando-os com os limites normais para os sedimentos de ambientes lóticos da região. Ao todo foram determinados os teores de 35 elementos nas amostras (cf. **Anexo 1**).

**Tabela II:** Altos teores de metais (ppm) associados ao despejo da mina do Rocha.

LOCAL DE OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS (ORDEM CORRESPONDENTE AO CURSO DAS ÁGUAS) E CLASSIFICAÇÃO DO MATERIAL	CONCENTRAÇÕES EM ppm (1% = 10000 ppm)		
	Cu	Pb	Zn
<i>Concentração natural para o sedimento do Ribeira*</i>	18	16	47
<i>Rejeito estocado junto as margens do ribeirão do Rocha:</i>			
GI, areia do alagado próximo às máquinas (R1)	240	0,97%	440
GI, monte próximo às máquinas (R2)	210	0,63%	460
GI, monte próximo às máquinas (R3)	570	2,34%	450
GI, monte na porção intermediária do depósito (R4)	350	1,11%	420
GI, monte na porção intermediária do depósito (R5)	520	3,12%	600
GF, do chão, próximo ao final do depósito (R6)	490	1,37%	340
<i>Rochas junto à mina:</i>			
(P1)	9,93%	4,47%	0,37%
(P2)	3,18%	10,5%	49
<i>Sedimento dos corpos de água:</i>			
GF, ribeirão do Rocha (S1)	290	0,2%	670
GF, ribeirão do Rocha (S2)	160	860	470
GG, foz do ribeirão do Rocha, margem direita do rio Ribeira (S3)	79	570	140
GG, foz do ribeirão do Rocha, margem direita do rio Ribeira (S4)	89	430	160
GI, rio Ribeira, próximo à Ilha acima do Estolete (S5)	8	13	45
GF, r. Ribeira, porto da balsa junto ao município de Ribeira (S6)	17	29	63

**Legenda:** (GI) granulação intermediária; (GF) granulação fina; (GG) granulação grossa, granel.  
\* média geométrica regional dos níveis basais naturais, por CPRN (1974) *apud* MORAES (1997).

Este estudo preliminar despertou o interesse para a elaboração do projeto que se realiza nesta dissertação. Estudos com o chumbo são inúmeros em outros países, por monitoramento ambiental atual ou pretérito, ou por inúmeros trabalhos científicos já realizados e publicados. Contudo em algumas regiões do território nacional brasileiro a lacuna de informações permanece vasta.

**CAPÍTULO I:**  
**BIOENSAIO COM *Hoplias malabaricus*,**  
**EXPOSIÇÃO CRÔNICA POR VIA TRÓFICA AO CHUMBO (II).**

## **I.1 INTRODUÇÃO**

### ***I.1.1. Características gerais da espécie***

A traíra, *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794), pertence a ordem Characiformes e família Erythrinidae. *H. malabaricus* é uma espécie com ampla distribuição geográfica (Tropical e Neotropical) que abrange quase todas as bacias desde a América Central ao Rio Colorado, na Argentina e apresentam diferentes áreas de endemismo; habitam preferencialmente ambientes lênticos, apresentando comportamento territorialista e ocorrem na bacia do Ribeira.

Esta espécie é onívora durante o primeiro ano de desenvolvimento, com uma dieta que compreende microcrustáceos, algas e insetos aquáticos. Após este período (normalmente após alcançarem 12 cm de comprimento) tornam-se estritamente carnívoras, altamente especializadas à piscivoria. Os lambaris (*Astyanax* sp) correspondem a alguns dos alimentares preferenciais, porém, em situações de pouca abundância de presas, enriquecem a sua dieta com outros itens, como crustáceos por exemplo. Estas presas alternativas tanto podem ser animais que habitam a coluna de água quanto animais bentônicos (LOUREIRO, 1995).

### ***I.1.2. Fígado***

O fígado é a maior glândula em qualquer vertebrado, podendo chegar a  $\frac{1}{4}$  da massa corpórea de alguns Elasmobranchii. Produz secreções exócrinas não enzimáticas, a bile, que é coletada por um sistema de ductos e liberada no trato digestivo. A bile em parte é resíduo (de toxinas ou metabólitos neutralizados) e em parte suco digestivo. Esta fração emulsifica compostos lipídicos tornando-os

substratos acessíveis às enzimas pancreáticas, facilitando a digestão dos mesmos e conseqüentemente sua absorção pelo epitélio do intestino (HILDEBRAND, 1995; POUGH *et al.*, 1999).

O fígado é o primeiro órgão atuante na biotransformação de xenobiontes e também participa da excreção de metais prejudiciais. O órgão processa metabólitos e nutrientes, estes absorvidos do material digerido, no intestino. Assim converte peptídeos em carboidratos ou lipídios, liberando resíduos nitrogenados que são eliminados pelas brânquias (ou rins). Serve à estocagem de carboidratos (glicogênio) e, especialmente em Cyclostomata e peixes, lípidos. Produz grande parte do vitelo transferido aos óvulos em desenvolvimento. O fígado embrionário (e de peixes adultos) é hematopoiético. Renova o sangue, removendo dele eritrócitos não mais funcionais, libera substâncias envolvidas com a coagulação sangüínea, processa ou estoca vitaminas e está envolvido com o metabolismo dos hormônios sexuais esteróides (HEATH, 1995; HILDEBRAND, 1995; POUGH *et al.*, 1999).

A organização lobular, em nível tecidual do fígado de mamíferos, não é aparentemente característica de peixes. A considerável variabilidade dessa organização, existente entre os vários grupos do tema “peixes”, pode influenciar a toxicidade de xenobiontes e as respostas fisiológicas a poluentes. Doze a 15% da massa do fígado de peixes é sangue (HEATH, 1995).

Os hepatócitos, células do parênquima hepático, são o tipo celular dominante no fígado e têm a forma variável, de oval a polígonos irregulares; estão concentricamente arranjados ao redor de capilares sangüíneos (sinusóides) formando os cordões de hepatócitos. Seus núcleos são geralmente esféricos e contêm quantidades variáveis de heterocromatina, dispersa ou periférica e um único e proeminente nucléolo. Os hepatócitos são dotados de estruturas secretórias e biosintéticas, como retículo endoplasmático rugoso e liso, aparelho de Golgi e vários tipos de vesículas. A abundância de retículo endoplasmático rugoso e mitocôndrias é consistente com a alta atividade metabólica do fígado, principalmente biosintéti-

ca. Em hepatócitos de peixes o retículo endoplasmático rugoso encontra-se, por vezes, localizado paralelamente à membrana plasmática. O retículo endoplasmático liso é escasso e localiza-se geralmente na periferia de depósitos de glicogênio ou intercalado com o aparelho de Golgi. Este está normalmente orientado entre o núcleo e a superfície secretora de bile. As mitocôndrias raramente estão entre os agregados de glicogênio e comumente no citoplasma basal, próximas ao espaço de Disse. Este compreende a região de matriz extracelular entre o parênquima hepático e o endotélio capilar dos sinusóides, podendo conter poucas fibras colágenas e fibroblastos (chamado de fino conjuntivo) bem como raras células de estoque lipídico (células Ito). A superfície do hepatócito voltada ao espaço de Disse contém numerosos microvilos (HEATH, 1995; TAKASHIMA e HIBIYA, 1995).

Canalículos biliares são regiões especializadas da membrana de 2 a 4 hepatócitos justapostos, formando um canal intercelular que recebe bile por secreção celular. A membrana dos hepatócitos voltada para o canal contém numerosos microvilos e a estrutura do canal é mantida por complexos juncionais, usualmente desmossomos. Os canalículos biliares se juntam para formarem um ducto biliar, delimitado por epitélio cubóide ou colunar e com conjuntivo subjacente; os ductos biliares convergem em um ducto hepático que deixa o fígado e se abre no duodeno, na porção anterior do bulbo intestinal ou alimenta a vesícula biliar, dependendo da espécie de peixe (TAKASHIMA e HIBIYA, 1995).

As células endoteliais dos capilares sinusóides são pavimentosas, com pouco citosol e formam um tecido com fenestras. Estas e os microvilos dos hepatócitos voltados ao espaço de Disse maximizam as trocas entre o sangue e os hepatócitos, em ambos os sentidos. Aderidos ao endotélio e projetando-se à luz do sinusóide, podem ser encontrados macrófagos asteriformes especializados que internalizam particulados do sangue e eritrócitos não mais funcionais, são as células de Von Kuppfer. Contudo, tais células formam um sistema menos desenvolvido em peixes que em mamíferos (TAKASHIMA e HIBIYA, 1995; FERGUSON, 1989).

Células mesoteliais formam a membrana serosa que recobre o fígado. O mesotélio é um epitélio simples-pavimentoso que recobre as vísceras e no fígado, constitui-se de uma extensão do peritônio.

### ***1.1.3. Efeito neurotóxico do chumbo***

O cálcio ( $\text{Ca}^{++}$ ) é um importante sinalizador intracelular em vários tipos celulares. Em condições normais, tende a se apresentar em baixas concentrações no citosol, em relação ao meio extracelular ou ao lúmen de organelas que estocam este íon. A inversão deste quadro promove uma resposta celular, que pode constituir-se de uma mudança de estado, variando com o tipo celular em questão. Para células eletricamente excitáveis, como neurônios ou fibras musculares, o influxo de  $\text{Ca}^{++}$  para o citosol, por canais protéicos transmembrana, é um evento de suma importância.

Cátions divalentes como manganês, magnésio, cobalto, chumbo, mercúrio, lantânio e cádmio competem com o  $\text{Ca}^{++}$  em domínios hidrofílicos disponíveis, reprimindo ou bloqueando a transmissão sináptica entre duas células eletricamente excitáveis. Isso ocorre porque o  $\text{Ca}^{++}$  é requerido para a fusão de vesículas intracelulares na membrana pré-sináptica, com a liberação de neurotransmissores na fenda sináptica, quando um potencial de ação chega nos terminais nervosos (COOPER e STEINBERG, 1977).

Há evidências fisiológicas para o chumbo inorgânico atuando como bloqueador de canais de cálcio e impedindo o influxo deste cátion em terminais nervosos, o que inibe a liberação de neurotransmissores na fenda sináptica. Tanto as transmissões sinápticas colinérgicas quanto adrenérgicas podem ser afetadas pelo chumbo (MANALIS e COOPER, 1973; KOBER e COOPER, 1976; COOPER e STEINBERG, 1977).

COOPER e STEINBERG (1977) estudaram a transmissão neuromuscular simpática da safena de coelhos, constatando a inibição do efeito adrenérgico, causada pelo chumbo. A artéria foi canulada, para a medida da pressão arterial como resposta efetora, perfundida e imersa em solução de Ringer. Os terminais nervosos periarteriais foram estimulados por eletrodos, para obtenção da resposta controle. Quando o chumbo foi adicionado no banho (parte externa) a 5-20  $\mu\text{M}$   $\text{PbCl}_2$  por 15 a 30 minutos, obteve-se uma diminuição da resposta efetora em relação ao controle, ou seja, uma menor pressão arterial devida a uma menor contração da musculatura lisa. A adição de  $\text{Ca}^{++}$  ao banho, em concentração 4 vezes maior que no controle, antagonizou o efeito do chumbo e o caracterizou como reversível (COOPER e STEINBERG, 1977).

COOPER e STEINBERG (1977) adicionaram noradrenalina (1-8  $\mu\text{g/ml}$ ) como um estímulo químico direto, o que restaurou quase completamente a resposta controle e localizou o efeito do chumbo principalmente na membrana pré-sináptica. O efeito pós-sináptico do chumbo, que inibe a ação da célula efetora foi considerado como um dos fatores que impediu a restauração completa da resposta efetora, após o estímulo direto.

MANALIS e COOPER (1973) demonstraram que a transmissão neuromuscular somática também é afetada pelo chumbo. Este inibiu o efeito colinérgico na junção entre o nervo siático e o músculo sartório de *Rana pipiens*. De forma semelhante ao experimento descrito acima, eles localizaram a inibição do chumbo principalmente nas membranas pré-sinápticas: adicionaram manualmente o neurotransmissor (neste caso a acetilcolina) e obtiveram a restauração parcial da resposta controle.

KOBER e COOPER (1976) evidenciaram os efeitos do chumbo inibindo a liberação mediada por cálcio de acetilcolina, em terminais nervosos pré-sinápticos de fibras pré-ganglionares simpáticas. Fazendo uso do 9º. ou 10º. gânglio paraverte-

bral de *Rana catesbiana*, eles demonstraram o antagonismo entre o chumbo e o cálcio.

Além de interferir na liberação de neurotransmissores na fenda sináptica, o chumbo também parece exercer um outro tipo de efeito neurotóxico. Na transmissão sináptica colinérgica é essencial que a acetilcolina seja degradada rapidamente, antes da chegada de um novo impulso nervoso (STENESH, 1998). Tal reação ocorre mediada pela acetilcolinesterase (AChE; E.C.:3.1.1.7). Enzimas desta classe são proteínas sulfidrílicas que têm suas conformações dependentes dos grupos tiólicos, estes sabidamente reativos frente a metais pesados.

A AChE catalisa a hidrólise da acetilcolina, que é então transformada em colina e acetato, com a liberação de um próton (STENESH, 1998). A hidrólise ocorre tão logo o neurotransmissor já tenha cumprido seu papel, ou seja, ligar-se ao receptor nicotínico da membrana pós-sináptica permitindo sua abertura, a entrada de íons  $\text{Na}^+$  e a despolarização da membrana, o que irá propagar o potencial de ação subsequente. Quando a atividade da AChE é inibida de alguma forma, há um bloqueio na transmissão de impulsos nervosos, o que rapidamente paralisa as funções vitais (STENESH, 1998). Isso ocorre pela sobreposição dos impulsos nervosos, devido a permanência dos canais de  $\text{Na}^+$  abertos.

Efeitos resultantes da inibição da AChE podem ocorrer no sistema nervoso central ou periférico, autônomo ou somático. Alterações do sistema nervoso autônomo parassimpático (efeito colinérgico pré e pós-ganglionar) são muito comuns em contaminações, quando o xenobionte inibe a AChE. Dentre os primeiros sintomas, pode-se destacar salivação, lacrimejamento e aumento da atividade da musculatura lisa. A atividade da AChE é comumente determinada no cérebro e em eritrócitos. Já para a atividade das ChEs usa-se a determinação no plasma, soro ou músculo.

Dentre os xenobiontes com potencial para a inibição da atividade colinesterásica destacam-se os pesticidas organofosforados, carbamatos e metais pesados (STURM *et al.*, 1999).

Em vertebrados, há dois grupos de proteínas homólogas denominadas genericamente como colinesterases (ChEs): a AChE e a butirilcolinesterase (BChE, ou pseudo-colinesterase, ou colinesterase não-específica; E.C.: 3.1.1.8). A acetilcolina não é a única molécula degradada pelas ChEs, outros compostos podem servir *in vitro* como substratos a essas enzimas (STURM *et al.*, 1999).

No entanto, a AChE *in vitro* é capaz apenas de degradar um substrato específico, o iodeto de acetil- $\beta$ -(metil)tiocolina (STURM *et al.*, 1999). Atualmente tem-se empregado a inibição da atividade das ChEs como um biomarcador de contaminação em peixes; a seguir constam alguns dos substratos usados *in vitro*, para a quantificação da atividade colinesterásica (STURM *et al.*, 1999):

- (i) atividade das ChEs: iodeto de acetiltiocolina ou iodeto de propioniltiocolina;
- (ii) atividade da BChE: iodeto de S-butiriltiocolina;
- (iii) atividade da AChE: iodeto de acetil- $\beta$ -(metil)tiocolina.

#### ***1.1.4. Escolha da dose administrada***

A quantidade de chumbo administrada nas traíras variou com o peso total de cada animal e em função de uma dose pré-estabelecida. Para o estabelecimento da dose buscou-se um valor representativo que fosse próximo de uma situação possível, uma dose realística em relação a condições *in natura*. Portanto, usou-se dois parâmetros:

- (i) uma média de concentrações de chumbo na água da bacia do rio Ribeira;
- (ii) o fator de concentração (FC) de chumbo obtido de uma cadeia trófica experimental (VIGHI, 1981) e de outros dados provenientes de regiões impactadas.

Este último (item ii) pode ser entendido como a razão entre a concentração de chumbo no organismo e a concentração do metal na água na qual o animal está exposto.

Desde 1978 a CETESB vem realizando aferições de teores de metais na água do rio Ribeira. Essas medidas foram em alguns períodos bimestrais e em outros mensais. Ainda ocorreram ausências de aferições ou, em alguns casos, a concentração era menor que o limite de detecção para o método empregado. Muitos dos valores relatados foram superestimados e notados com o sinal "<" precedente. Dentre as aferições exatas, por vezes, os teores ultrapassaram os limites máximos permissíveis pela legislação brasileira, para metais como cobre, zinco, cádmio e chumbo. Tais limites foram estabelecidos pela resolução do CONAMA (1986) decreto n.º.20, para abastecimento de água e preservação das comunidades aquáticas. A CETESB monitora dois pontos do rio Ribeira que, para o chumbo, apresentaram as seguintes concentrações na água:

**Tabela III:** Duas amostras de teores de chumbo ( $\mu\text{g/l}$ ) na água do rio Ribeira.

<i>LOCAL</i>	<i>PERÍODO</i>	<i>N</i>	<i>MÉDIA</i>	<i>DESVIO PADRÃO DA AMOSTRA</i>
<i>Registro (SP)</i>	1978-97	76	27,88	47,12
<i>Itaoca (SP)</i>	1983-97	28	83,67	136,06

Fonte: relatórios anuais da CETESB (1978-1997).

Itaoca é o ponto mais próximo do local deste estudo (Alto Vale do Ribeira). Contudo a amostra de Registro é maior e será adotada, a despeito deste município já se encontrar no baixo curso do rio. Além disso, a média das concentrações de chumbo constatada para Registro (27,88  $\mu\text{g/l}$ ) é menor que o limite da legislação brasileira (30,00  $\mu\text{g/l}$ ). Este é o máximo teor de chumbo permissível, segundo o CONAMA (1986). Um valor menor adotado para os testes pode dizer melhor da validade da legislação.

VIGHI (1981) elaborou um experimento onde uma cadeia trófica experimental opera durante 28 dias de exposição ao chumbo. A cadeia é simples e é consti-

tuída por três espécies: a alga *Selenastrum capricornutum*, o microcrustáceo planctônico *Daphnia magna* e o consumidor secundário *Poecilia reticulata*. Com um sistema de fluxo contínuo de água, VIGHI (1981) pôde expor os peixes *P. reticulata* por duas vias:

- (i) via hídrica: os peixes foram alimentados com exemplares de *D. magna* livres de chumbo;
- (ii) via hídrica e trófica: os peixes foram alimentados como a espécie terminal da cadeia trófica, onde todos os organismos estavam sujeitos à exposição hídrica e trófica.

Pela diferença das quantidades de chumbo acumuladas nos peixes segundo as duas formas de exposição, VIGHI (1981) pôde estimar o acúmulo de chumbo por via trófica e constatar que este metal não sofre biomagnificação na cadeia experimental proposta. De fato os fatores de concentração encontrados decrescem do menor para maior nível trófico. Isto foi observado nas duas concentrações nominais<sup>2</sup> de chumbo total na água que foram testadas em 28 dias de exposição (cf. **Tabela IV**).

Estudos *in natura* também indicam que o chumbo não sofre magnificação biológica, apontando os maiores fatores de concentração para espécies de produtores. Namminga *et al.* em 1974, *apud* PAIN (1995) encontraram em um ecossistema lacustre os seguintes fatores de concentração para espécies de plâncton, bentos e peixe, respectivamente:  $216,15 \times 10^3$ ;  $28,46 \times 10^3$  e  $8,85 \times 10^3$ .

---

<sup>2</sup> **Concentração nominal** ou teórica reflete a quantidade administrada o que difere da quantidade encontrada (**concentração real**), que é menor devido à adsorção do chumbo ao vidro e aparatos.

**Tabela IV:** Valores de concentrações de chumbo obtidos em uma cadeia trófica experimental com 28 dias de exposição.

NÍVEL TRÓFICO	VIA DE EXPOSIÇÃO	CONCENTRAÇÃO DE CHUMBO:	CONCENTRAÇÃO NOMINAL ( $\mu\text{g/l}$ )	
			5	50
PRODUTOR ( <i>Selenastrum Capricornutum</i> )	HÍDRICA E TRÓFICA	no organismo ( $\mu\text{g/g}$ peso seco)	460,00	1300,0
		total na água ( $\mu\text{g/l}$ )	4,60	44,40
		fator de concentração ( $\times 10^3$ )	100,00	29,20
CONSUMIDOR PRIMÁRIO ( <i>Daphnia magna</i> )	HÍDRICA E TRÓFICA	no organismo ( $\mu\text{g/g}$ peso seco)	23,00	68,00
		total na água ( $\mu\text{g/l}$ )	4,60	36,30
		fator de concentração ( $\times 10^3$ )	5,0	1,87
CONSUMIDOR SECUNDÁRIO ( <i>Poecilia reticulata</i> )	HÍDRICA E TRÓFICA	no organismo ( $\mu\text{g/g}$ peso seco)	16,00	36,00
		total na água ( $\mu\text{g/l}$ )	4,50	35,70
		fator de concentração ( $\times 10^3$ )	3,56	1,01
	HÍDRICA	no organismo ( $\mu\text{g/g}$ peso seco)	4,10	12,00
		total na água ( $\mu\text{g/l}$ )	3,80	33,20
		fator de concentração ( $\times 10^3$ )	1,08	0,36
TRÓFICA	no organismo ( $\mu\text{g/g}$ peso seco)	11,90	24,00	
	total na água ( $\mu\text{g/l}$ )	4,50	35,70	
	fator de concentração ( $\times 10^3$ )	2,64	0,67	

**Observação:** os valores para o sistema controle, onde nenhuma concentração nominal de chumbo foi administrada, estão excluídos.

**Fonte:** compilado de VIGHI (1981).

Resultados semelhantes foram observados em ambientes lóticos por Leland e McNurney em 1974, *apud* VIGHI (1981):

- (i) produtores (perífton):  $58 \times 10^3$
- (ii) consumidores primários (invertebrados):  $25 \times 10^3$  a  $6,7 \times 10^3$
- (iii) consumidores secundários (peixes omnívoros):  $3,4 \times 10^3$  a  $3,0 \times 10^3$
- (iv) consumidores terciários (peixes predadores):  $2,4 \times 10^3$  a  $1,7 \times 10^3$

Para o cálculo da dose foi usado o fator de concentração  $FC = 3 \times 10^3$ , correspondente a um suposto forrageiro de uma traíra adulta, um consumidor se-

cundário genérico exposto por via hídrica e trófica ao chumbo. Não foram encontrados estudos sobre o Alto Vale do Ribeira que corroborem esse número. Contudo o mesmo valor fora obtido por Leland e McNurney em 1974, *apud* VIGHI (1981) para consumidores secundários em um ecossistema ripícola poluído.

VIGHI (1981) observou os valores de FC de  $1,01 \times 10^3$  e  $3,56 \times 10^3$  para as respectivas concentrações de 35,7 e 4,5  $\mu\text{g}$  de chumbo por litro de água, em seus dois sistemas experimentais testados com *Poecilia reticulata*. Isso revela que o FC pode variar, para uma mesma espécie, em relação à concentração de chumbo na água (cf. Tabela IV). Tanto a média de teor de chumbo observada em Registro (27,88  $\mu\text{g}/\text{l}$ ) quanto o FC aqui adotado ( $3 \times 10^3$ ) são intermediários aos valores obtidos por VIGHI (1981). Esta aproximação ou uma comparação não exata é justificável, já que tratam-se de espécies distintas e que, nas deduções que seguem abaixo, busca-se uma maior dose possível que seja ainda subletal. A continuidade do raciocínio exige uma hipótese ainda não testada, por falta de estudos de campo na região da bacia do Ribeira.

Hipótese 1: as espécies forrageiras de traíras adultas, quando expostas ao chumbo por via hídrica e trófica, em um meio onde a concentração na água é de 27,88  $\mu\text{g}/\text{l}$ , acumulam este metal com um fator de concentração médio de  $3 \times 10^3$ .

Vale lembrar que esta afirmação serve *a priori* somente à busca de uma dose representativa, subletal e portanto passível de ser testada pelo bioensaio aqui proposto. Em condições *in natura* há um série de fatores bióticos e abióticos, que são variáveis, por vezes não mensuráveis e que alteram a biodisponibilidade do chumbo. Dentre eles, a presença de outros metais na água, a estrutura populacional das espécies em questão e a condição de cada organismo, por exemplo.

Então, tem-se que:

$$FC = \frac{[\text{Pb}] \text{ no organismo } (\mu\text{g/g, peso seco})}{[\text{Pb}] \text{ na } \acute{\text{a}}\text{gua } (\mu\text{g/l} = 10^{-3} \mu\text{g/g})}$$

segundo a hipótese 1 ∴

$$[\text{Pb}] \text{ no forrageiro da traíra} = 3 \times 10^3 \times 27,88 \times 10^{-3} = 83,64 \mu\text{g/g (peso seco)}$$

Conhece-se muito pouco das estruturas populacionais das espécies de peixes do Ribeira. Toma-se aqui como referência um estudo com a população de *Hoplias malabaricus* do Reservatório de Segredo, no município de Pinhão (PR). BENEDITO-CECÍLIO e AGOSTINHO (1997) relatam um comprimento padrão médio ( $C_m$ ) de 26,3 cm ( $n = 1841$ , desvio padrão de 5,79) para traíras adultas. No mesmo capítulo (*op. cit.*) consta a relação isométrica entre peso (P) e comprimento padrão ( $C_m$ ) da amostra da espécie, a saber:  $P = 0,0162 \times C_m^{3,09}$  ( $n = 1809$ ,  $r^2 = 0,98$ ). Os dados fornecem uma estimativa para o peso médio daquela população de *H. malabaricus*,  $P = 395,53$  g. Uma segunda hipótese se faz agora necessária:

Hipótese 2: uma traíra de aproximadamente 390 g ingere em média, desde que disponível, cerca de 50g (peso úmido) da espécie forrageira por dia. Isto corresponde a 100g em peso seco (40% do peso úmido) a cada 5 dias.

As seguintes deduções finais fornecem a dose que foi empregada no bioensaio.

83,64  $\mu\text{g Pb /g}$  forrageiro (peso seco):

a ingestão de 100g (peso seco) a cada 5 dias pela traíra

lhe fornece a quantidade de 8364  $\mu\text{g Pb /5 dias}$  ∴

$$\frac{8364 \mu\text{g Pb /5 dias}}{395,53 \text{ g traíra}} = 21 \mu\text{g Pb /g traíra} \times 5 \text{ dias}$$

## I.2. OBJETIVOS

Os objetivos desta fase do trabalho foram:

REALIZAR um bioensaio crônico (41 dias e 8 doses) com exemplares de *Hoplias malabaricus* (traíra) expostos ao chumbo inorgânico (II) por via trófica.

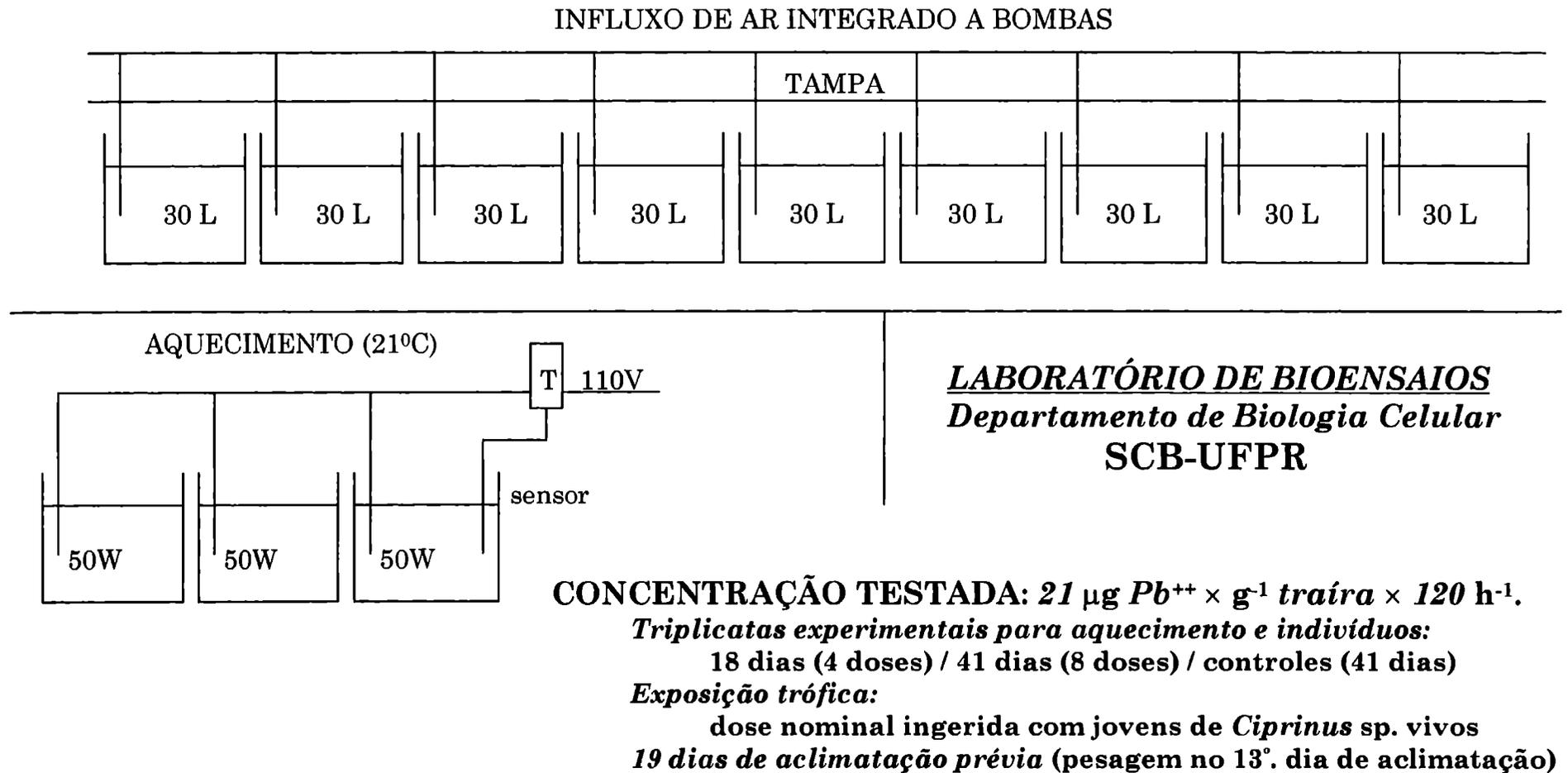
ESTUDAR o efeito tóxico do chumbo na estrutura tecidual e subcelular do fígado de *H. malabaricus* após exposição crônica por via trófica ao metal através respectivamente de microscopia de luz e eletrônica de transmissão.

ANALISAR o efeito neurotóxico do chumbo pela determinação da atividade colinésterásica no músculo axial de *H. malabaricus* expostas ao chumbo.

## I.3. MATERIAIS E MÉTODOS

### I.3.1. Bioensaio

Nove espécimens de *Hoplias malabaricus*, capturados na fazenda Canguiri (UFPR), Pinhais (PR), foram transportadas para o Laboratório de Bioensaios, Dep. de Biologia Celular (SBC-UFPR) e distribuídos randomicamente em nove aquários, cada qual com 30 litros de água de torneira desclorificada. Influxo de ar constante, temperatura ( $21^{\circ}\text{C} \pm 2$ ) e fotoperíodo (12h luz : 12h escuro) foram controlados até o fim do experimento, respectivamente: com um sistema de bombas de ar integradas por mangueiras; com um sistema de termostatos e aquecedores (50W cada em 110V); e por um *timer* que controlava a luz ambiente. A **Figura 3** ilustra todo o sistema.



**Figura 3:** Representação esquemática do *design* experimental utilizado para a exposição crônica de *Hoplias malabaricus* ao Chumbo (II) através da via trófica.

A sifonagem regular do fundo dos aquários para a retirada das fezes e resíduos sólidos, com a troca da água (20l) e a limpeza manual da parede dos aquários (com esponja) ocorreram nos 2 dias consecutivos que seguiram cada um dos dias em que os indivíduos foram alimentados. A limpeza dos aquários foi um fator importante, pois resíduos de chumbo dissolvidos na água ou adsorvidos ao vidro poderiam colocar o experimento em risco. Através destas medidas procurou-se minimizar a quantidade de chumbo dissolvido no meio, para que a não absorção pela via hídrica fosse otimizada. Filtros internos de água foram utilizados e trocados sempre que necessário.

O suprimento alimentar foi realizado com exemplares vivos de *Ciprinus* sp. jovens, quando cada traíra se alimentou de 1 exemplar de presa, após um período de 120h de jejum. No 13º. dia as 9 traíras foram anestesiadas em água com 0,02% de MS-222 Sigma® (ácido etil-éster-3-aminobenzóico), foram pesadas e redistribuídas nos 9 aquários, em 3 grupos.

Três animais serviram como controles. Após 19 dias de aclimação ao confinamento e nessas condições, as traíras foram alimentadas da forma descrita acima, mas com presas que receberam uma injeção intraperitoneal de solução de  $Pb^{++}$ , a partir de  $Pb(NO_3)_2$ . Os 3 animais controles foram alimentados com presas que receberam uma injeção intraperitoneal de água destilada. O volume injetado nas presas, em ambos os casos, variou em relação ao peso de cada traíra, isto para o estabelecimento da dose nominal ingerida pelos peixes tratados com chumbo:  $21 \mu g Pb \times g^{-1}$  traíra.

O bioensaio consistiu-se de um experimento crônico de 41 dias. Ao 18º. dia (4 doses) 3 traíras expostas ao chumbo foram anestesiadas como já descrito e sacrificadas para obtenção do material biológico: músculo e fígado. As amostras de músculo de cada peixe foram congeladas (-20°C) para posterior análise, as de fígado, fixadas logo a seguir para microscopia de luz e eletrônica. No 41º. dia o material dos 3 animais controles e das 3 traíras expostas restantes (8 doses) foi obti-

do e processado da mesma forma. Em todos os peixes, as mesmas áreas, de fígado e de músculo foram padronizadas para a coleta.

Algumas considerações quanto à manutenção de *H. malabaricus* em condições de laboratório devem ser feitas: para traíras de até 350 g não se deve usar aquários com capacidade inferior a 30 litros, pois o animal precisa de espaço para a captura da presa; devido ao comportamento territorialista e voraz da espécie, não é aconselhada a permanência de duas ou mais traíras juntas no mesmo aquário ou tanque, principalmente durante o período de aclimatação; os aquários devem ser mantidos tampados, com pesos sobre as tampas.

### ***1.3.2. Histopatologia de fígado***

O fígado foi escolhido como órgão alvo pois o sangue proveniente do intestino, após absorção, irriga este órgão.

As peças de fígado foram fixadas em solução aquosa de Bouin para que fossem analisadas por microscopia de luz pelo procedimento padrão: inclusão e emblocagem em resina (Paraplast, Sigma®), microtomia (cortes com 5 µm de espessura) e coloração por hematoxilina de Harris seguida de eosina-floxina. O protocolo seguido até emblocagem encontra-se anexado (cf. **Anexo 2**). Cortes semifinos confeccionados no ultramicrotomo (cf. **seção 1.3.3.**) também foram analisados por microscopia de luz.

Os registros fotográficos foram realizados no fotomicroscópio do Setor de Ciências Biológicas (UFPR): Zeiss® — AxioPhot. Para o estudo morfológico do fígado foram confeccionados 27 positivos de cortes histológicos previamente analisados; o material controle foi analisado primeiro. A análise foi subjetiva, mas em busca de padrões morfológicos alterados que fossem exclusivos dos animais que receberam chumbo.

### ***1.3.3 Ultra-estrutura de fígado***

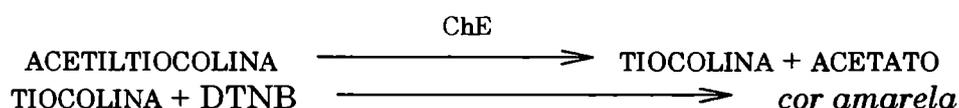
O protocolo seguido no processamento do material até a emblocagem, para análise por microscopia eletrônica de transmissão, encontra-se anexado (cf. **Anexo 2**) e foi construído de acordo com SOUZA (1998), com modificações. A fixação com  $\text{CaCl}_2$  e a pós-fixação com uranila em bloco, que constam no protocolo anexado, são facultativas e não foram realizadas.

Quando da ultramicrotomia, foram confeccionados cortes semifinos com navalha de vidro ( $0,5 \mu\text{m}$  de espessura) para visualização por microscopia de luz após coloração com azul de toluidina a 1% borificada (borato de sódio a 1%). Os cortes ultrafinos (com aproximadamente  $70 \text{ nm}$  de espessura) foram obtidos utilizando-se navalha de diamante e contrastados com uranila a 5% por 20 minutos, seguida de citrato de chumbo segundo Reynolds em 1963, *apud* SOUZA (1998) por 5 minutos.

A observação e registros fotográficos foram realizados no Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR, através do microscópio eletrônico de transmissão Jeol® — JEM 1200 EXII. Para o estudo morfológico ultra-estrutural dos cortes de fígado foram confeccionados 46 positivos de eletromicrografias. A análise foi subjetiva, mas em busca de padrões morfológicos alterados que fossem exclusivos dos animais que receberam chumbo. O material controle foi analisado primeiro.

### ***1.3.4. Atividade colinesterásica no músculo***

Usou-se um método modificado daquele descrito por ELLMAN *et al* (1961) cujo princípio é a reação colorida que ocorre entre a tiocolina e o DTNB (5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzoato):



Após descongeladas sob gelo moído, as amostras de músculo (cerca de 250 mg cada) foram então homogeneizadas em 2 ml de tampão fosfato 0,1 M, pH 7,5. Nos passos seguintes, o material foi sempre mantido em gelo moído.

Os homogenatos foram transferidos a ependorfes de 2 ml e centrifugados por 10 minutos, a 4°C e a 10 000 rpm. O sobrenadante foi estocado em novos ependorfes e congelado a -20°C para análises posteriores. Esta espera é opcional e o sobrenadante só pode ser congelado uma vez, sem que as colinesterases percam atividade; o tempo de congelamento, se repetido com outras baterias de amostras, deve ser padronizado.

As amostras de sobrenadante foram diluídas (1:10 ou 10% v/v) em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,5. Após a diluição, cada amostra foi agitada e pipetada em 4 réplicas de 50µl na microplaca de leitura em espectrofotômetro. O sobrenadante (original e diluído) foi novamente congelado para posterior quantificação protéica (proteína total) pelo método de BRADFORD (1976).

Todas as absorbâncias consideradas para cada amostra de músculo, inclusive na quantificação protéica, foram médias de no mínimo três valores: a quadruplicata analítica permitiu que um dos valores, o mais distante da média, fosse desconsiderado no caso de erro de pipetagem. Para as determinações, foi usado o espectrofotômetro Benchmark Microplate Reader da BioRad®.

Na microplaca foram adicionados 200 µl de DTNB a 0,75 mM sobre cada amostra, seguidos de 50 µl de iodeto de acetiltiocolina a 9 mM. O substrato foi adicionado somente pouco antes das leituras em espectrofotômetro. A luz absorvida teve 415 nm de comprimento de onda. Dois brancos com tampão fosfato (0,1 M, pH 7,5) substituindo a amostra diluída, foram lidos junto com os amostras. A média dos valores de absorbância dos brancos foi subtraída do valor médio de cada amostra. Seis leituras foram feitas em intervalos de 1 minuto para construção de um gráfico: a relação linear da absorbância em função do tempo. Obteve-se

um delta de absorvância para cada amostra: o valor no tempo (6') subtraído do valor no tempo (1') e o resultado dividido por 5 (intervalos de tempo).

Para a quantificação protéica (BRADFORD, 1976) foi escolhida a diluição de 1:20 (5% v/v) de sobrenadante em tampão fosfato 0,1M, pH 7,5. A microplaca recebeu as amostras (10 µl) e o reagente de Bradford (Bio Rad®) foi pipetado (250 µl) sobre cada uma, a leitura deu-se com o filtro para 595 nm. Os valores finais da quantificação protéica colorimétrica foram obtidos em miligramas de proteína por mililitro de amostra. Para tal, sobrepõe-se os valores de absorvância lidos nas amostras aos valores de absorvância de uma curva padrão de albumina de soro bovino, lidas também a 595 nm.

Os valores finais da quantificação colinesterásica são dados pela fórmula:

$$\text{Atividade} = \{[A \times (t \times \varepsilon \times d)^{-1}] \times [1 \times (1 \times D)^{-1}] \times [1 \times (\varepsilon \times d)]\} \times [Pt]^{-1}$$

Cuja unidade é  $\eta\text{mol} \times \text{minuto}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$  de proteína e onde:

**A** = absorvância de cada ensaio menos absorvância dos brancos, a 415 nm;

**t** = tempo;

**D** = fator de diluição das amostras, ou

$$\begin{aligned} & \text{volume final na microplaca} / \text{volume de amostra de sobrenadante} \times 10 = \\ & = 300 \mu\text{l} / 50 \mu\text{l} \times 10 = 60; \end{aligned}$$

**ε** = coeficiente de extinção nanomolar para o reagente de cor (DTNB) =

$$= 1,36 \times 10^4 \text{ml} \times \eta\text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1};$$

**d** = diâmetro da cavidade na microplaca = 0,9 cm;

**[Pt]** = concentração de proteína nas amostras (em mg/ml).

O tratamento estatístico dos resultados foi realizado através da análise de variância a um critério (ANOVA *one way*), para comparação entre as médias dos três grupos (controles, 4 e 8 doses), seguida do teste de Tukey, para comparações

múltiplas entre os grupos, ambos os testes com um nível crítico de significância de 5%. Foi usado o programa GraphPad Prism®, v.3.00, © 1994-1999 para as análises.

#### **I.4. RESULTADOS**

Não houve mortalidade de *Hoplias malabaricus* durante o bioensaio de exposição crônica e os peixes permaneceram aparentemente saudáveis até o final do experimento. A temperatura da água dos aquários manteve-se em torno de 21°C e o pH em torno de 7,5. O peso médio dos animais (n = 9) no início do experimento foi de 148,2 g (EPM = 33,51). A média dos 3 grupos formados pelo peso (2 traíras pequenas e 1 grande em cada) não diferiu significativamente entre os grupos: ANOVA a um critério (P = 0,70). Nenhuma alteração macro-estrutural foi observada a olho nu nos órgãos internos dos peixes, quando da coleta de material biológico.

##### ***I.4.1. Organização estrutural do fígado controle de H. malabaricus***

O fígado é envolto por um fino tecido conjuntivo fibroso, subjacente a uma membrana serosa. Esta é um epitélio simples-pavimentoso (mesotélio) que recobre a víscera como uma extensão do peritônio, suas células são unidas por junções (desmossomos) ligadas ao citoesqueleto (filamentos intermediários de  $\alpha$ -queratina). Essas estruturas foram observadas no fígado de *Hoplias malabaricus* (cf. **Figuras 4A-B**). A presença do conjuntivo foi inferida pela ocorrência de células consideradas fibroblastos, abaixo da serosa ou penetrando no parênquima hepático. A membrana dos hepatócitos em contato com a cápsula de conjuntivo apresentou microvilos. Na membrana das células da serosa ocorreram vesículas pinocíticas na superfície que, *in vivo*, faz contato com a cavidade peritoneal.

Através da análise dos cortes histológicos após coloração com azul de toluidina borificada (cf. **Figuras 4C-D**) e com hematoxilina-eosina pôde-se observar que as seguintes estruturas integram o tecido hepático de *H. malabaricus*: células

do parênquima hepático (hepatócitos); cordões de hepatócitos concentricamente arranjados ao redor de capilares sanguíneos; estes (capilares sinusóides) e outros vasos com eritrócitos e leucócitos em sua luz; células endoteliais formando vasos; veias centrais; veias do sistema porta com pâncreas exócrino associado; artérias e conjuntivo associado; ductos biliares delimitados por epitélio e com conjuntivo subjacente.

A intensidade de basofilia e eosinofilia do parênquima hepático variou bastante entre os peixes controles e até mesmo em relação a cada um, isolado. Regiões intracelulares basofílicas, que não o núcleo, foram observadas quase sempre em associação com o núcleo (freqüentemente voltadas para os sinusóides) ou nos limites celulares junto à membrana da célula: a microscopia eletrônica revela que a maior parte desses domínios ácidos são atribuídos ao retículo endoplasmático granular (cf. **Figuras 4C-D, 5A-D, 6A-B, 7A, 7C**). Os ribossomos livres dissociados do retículo endoplasmático também foram visualizados no citoplasma através das eletromicrografias (cf. **Figura 5B**).

Os hepatócitos contiveram quase sempre várias mitocôndrias, freqüentemente agregadas, nas proximidades da membrana plasmática voltada ao sinusóide e, na maioria dos casos, associadas às regiões em que se encontra o retículo endoplasmático rugoso. Este apresentou-se em cisternas paralelas, concentrado em regiões próximas ao núcleo e em continuidade com a membrana externa do envoltório nuclear, constituindo este um padrão para o material controle. Outrosim a localização do retículo granular, próximo a regiões de contato do hepatócito com o sinusóide e próximo a regiões de contato entre dois hepatócitos (paralelo à membrana plasmática; cf. **Figuras 5B-D, 6A-B**) constitui uma característica deste material e explica a forte marcação entre os hepatócitos quando observados pela microscopia de luz. A visualização do retículo endoplasmático liso foi menos evidente se comparado com o a presença do retículo granular.

Os núcleos dos hepatócitos de *Hoplias malabaricus* mostraram uma tendência à esfericidade, quantidades variáveis de heterocromatina (dispersa ou periférica) (cf. **Figura 5B**) e um único e proeminente nucléolo (cf. **Figura 5A**). A eucromatina é mais dispersa, homogênea e clara (menos eletrodensa) que a heterocromatina e nos hepatócitos controles mostrou-se abundante (cf. **Figura 5A-B**), indicando altas taxas de síntese protéica. Regiões equivalentes aos complexos protéicos que formam poros nucleares também foram visualizadas no envoltório nuclear (cf. **Figuras 4B, 7A**).

Os aparelhos de Golgi foram visualizados nas proximidades dos núcleos e em associação com vários tipos de vesículas intracelulares (cf. **Figuras 4B, 5B**). Estas últimas também ocorreram distantes do complexo de Golgi e apresentaram variações de forma, tamanho e eletrodensidade, como se pode ver nos hepatócitos da periferia do órgão (cf. **Figura 4A-B**); não obstante, tais vesículas também ocorreram em hepatócitos do interior do órgão. No que se refere à heterogeneidade dessas vesículas, não é possível sua identificação sem uma marcação citoquímica específica, já que elas podem ser endossomos (prematuros ou tardios), lisossomos, vesículas de transporte ou de secreção. Por isso elas são aqui genericamente classificadas, por exclusão em relação às outras organelas, como vesículas intracelulares.

O fígado de *Hoplias malabaricus* estoca substâncias de reserva energética, o que foi evidenciado nos hepatócitos com a presença de corpos lipídicos osmiofílicos (cf. **Figura 4A**) e grânulos de glicogênio (cf. **Figuras 6A-B**), ambos no citosol.

A preservação das membranas mostrou-se eficiente para a visualização de alguns tipos de especialização de membranas nas regiões de contato entre células vizinhas. Regiões limítrofes entre dois hepatócitos mostraram estreitos espaços intercelulares (cf. **Figuras 5C-D, 6A-B**). Estas regiões de matriz extracelular, quando entre os hepatócitos e o endotélio do sinusóide, mostraram-se mais espessas e corresponderam ao espaço de Disse, onde a superfície do hepatócito apre-

sentou microvilos e a do endotélio, fenestras. Células de Von Kupffer foram raras e no espaço de Disse não foram visualizadas células de estoque lipídico (células Ito) nem fibroblastos ou fibras colágenas, contudo estas estruturas provavelmente estão presentes em *H. malabaricus*.

Outros tipos de especializações de membrana foram observados quando 2 a 4 hepatócitos justapostos formavam um canalículo biliar. A membrana apical dos hepatócitos voltada para o canalículo apresentou vários microvilos e junções intercelulares (desmossomos) que apareceram mantendo a estrutura do canal (cf. **Figura 7B**).

O canalículo biliar recebe bile por exocitose. Contudo foi observado um tipo de célula que sugere um maior grau de complexidade do sistema coletor de bile. Algumas células associadas ao canalículo, o apresentaram em seu interior, com o seu lúmen internalizado pela célula, por invaginação da membrana. Tais células têm o núcleo não esférico, diferindo dos hepatócitos na forma e tamanho. Aqui são denominadas células de canalículo biliar e podem ser observadas nas **Figuras 4A e 13A-B**.

#### ***I.4.2. Hepatotoxicidade do chumbo em H. malabaricus***

Não houve nenhuma alteração morfológica significativa, com as análises efetuadas por microscopia de luz no fígado de *Hoplias malabaricus* expostas ao chumbo durante 18 e 41 dias (respectivamente 4 e 8 doses). Os cortes histológicos dos peixes expostos foram corados com hematoxilina-eosina (cf. **Figura 8A, 11A, 11C**) e com azul de toluidina borificada (cf. **Figura 9A, 11B, 12A-B**) e observados depois de analisado o material controle.

A ultra-estrutura dos hepatócitos mostrou vesículas escuras (eletrodensas), de formato variado, envoltas por membrana e associadas ou não com material fibroso menos eletrodense, bem como corpos lipídicos osmiofílicos (cf. **Figuras**

**9B-D**). Tais vesículas possivelmente correspondam a maioria dos pontos negros observados nos cortes histológicos corados com toluidina borificada (cf. **Figuras 9A, 11B, 12A-B**) e ocorreram em todos os animais, inclusive controles. Um dos animais expostos ao chumbo durante 18 dias (fêmea, 4 doses) foi escolhido para a ilustração dessas vesículas, embora elas não pareçam associadas com a administração do chumbo. Essa escolha levou em conta o menor período que os animais desse grupo permaneceram em laboratório.

Com recorrência, no grupo de *H. malabaricus* que recebeu 4 doses, também se pôde observar na ultra-estrutura dos hepatócitos (cf. **Figuras 8-10**):

- (i) mudança na forma do núcleo: perda da tendência à esfericidade observada nos controles (**8B**);
- (ii) aumento do espaço intercelular entre hepatócitos (**8C**);
- (iii) regiões de retículo endoplasmático rugoso desorganizadas: perda do paralelismo entre as cisternas, e porções isoladas da organela (**8B-C e 10A-B**);
- (iv) aumento na quantidade de mitocôndrias por célula (sugerindo proliferação) e algumas mitocôndrias excessivamente grandes (sugerindo fusão) (**10A-B**);
- (v) retículo endoplasmático cingindo estreitamente muitas mitocôndrias, o que sugere autofagocitose dessas organelas (**10C**);
- (vi) vesículas que sugerem um estado avançado da autofagocitose do item (v): autofagossomos ou autofagolisossomos (**10D**).

A análise por microscopia de luz do fígado dos animais que receberam 8 doses de chumbo em 41 dias demonstrou, em relação aos controles, um decréscimo em coloração positiva para hematoxilina e toluidina borificada, ou seja, uma diminuição na basofilia dos hepatócitos (cf. **Figuras 11B-C, 12A-B**). Isso está correlacionado com a evidência ultra-estrutural da alteração na distribuição e organização do retículo endoplasmático granular no citoplasma.

Também em relação ao fígado dos animais controles, houve uma recorrência muito maior de monócitos no sangue dos animais que receberam 8 doses; esse fato sugere uma ativação de respostas auto-imunes mesmo que indiretamente relacionadas ao chumbo (cf. **Figuras 11B, 11D-E**).

Nos animais sacrificados no 41º. dia (8 doses), a análise ultra-estrutural dos hepatócitos revelou, com recorrência (cf. **Figuras 11-13**):

- (i) mudança na forma do núcleo com perda da tendência à esfericidade observada nos controles e aumento da eletrodensidade da eucromatina em relação aos controles (**12C-D** e **13B-C**);
- (ii) regiões de retículo endoplasmático rugoso desorganizadas: decréscimo em quantidade dessa organela, perda do paralelismo entre as cisternas, distanciamento da superfície interna da membrana plasmática e muitas porções isoladas da organela (**12C-D** e **13C**);
- (iii) retículo endoplasmático rugoso cingindo estreitamente muitas mitocôndrias (**13B-D**) e estruturas citosólicas que revelam indícios de estado avançado de autofagocitose (**13C**), embora este fenômeno esteja mais relacionado na literatura como função do retículo endoplasmático liso;
- (iv) decréscimo na quantidade de mitocôndrias em muitas células, com desagregação das remanescentes no citosol (**12C-D** e **13C**); e mitocôndrias excessivamente grandes (sugerindo fusão em **13C**);
- (v) consumo de material de reserva (polissacarídeos na forma de grânulos de glicogênio) com escassez quase completa associada ao item abaixo (vi), ou focos de consumo inicial (**13A** e **13B**);
- (vi) desorganização generalizada dos componentes celulares (**12C-E** e **13C-D**);
- (vii) células em estado avançado de necrose como registrado na figura **13D**.

**ORGANIZAÇÃO TECIDUAL E ULTRA-ESTRUTURAL DO FÍGADO  
DE *Hoplias malabaricus* EMPREGADAS NO BIOENSAIO:**

Identificação dos exemplares de *H. malabaricus*:

**Traíras 1, 2 e 3:** 4 doses de  $Pb^{++}$  ingeridas ( $21\mu g \times g^{-1} \times 120h^{-1}$  durante 18 dias);

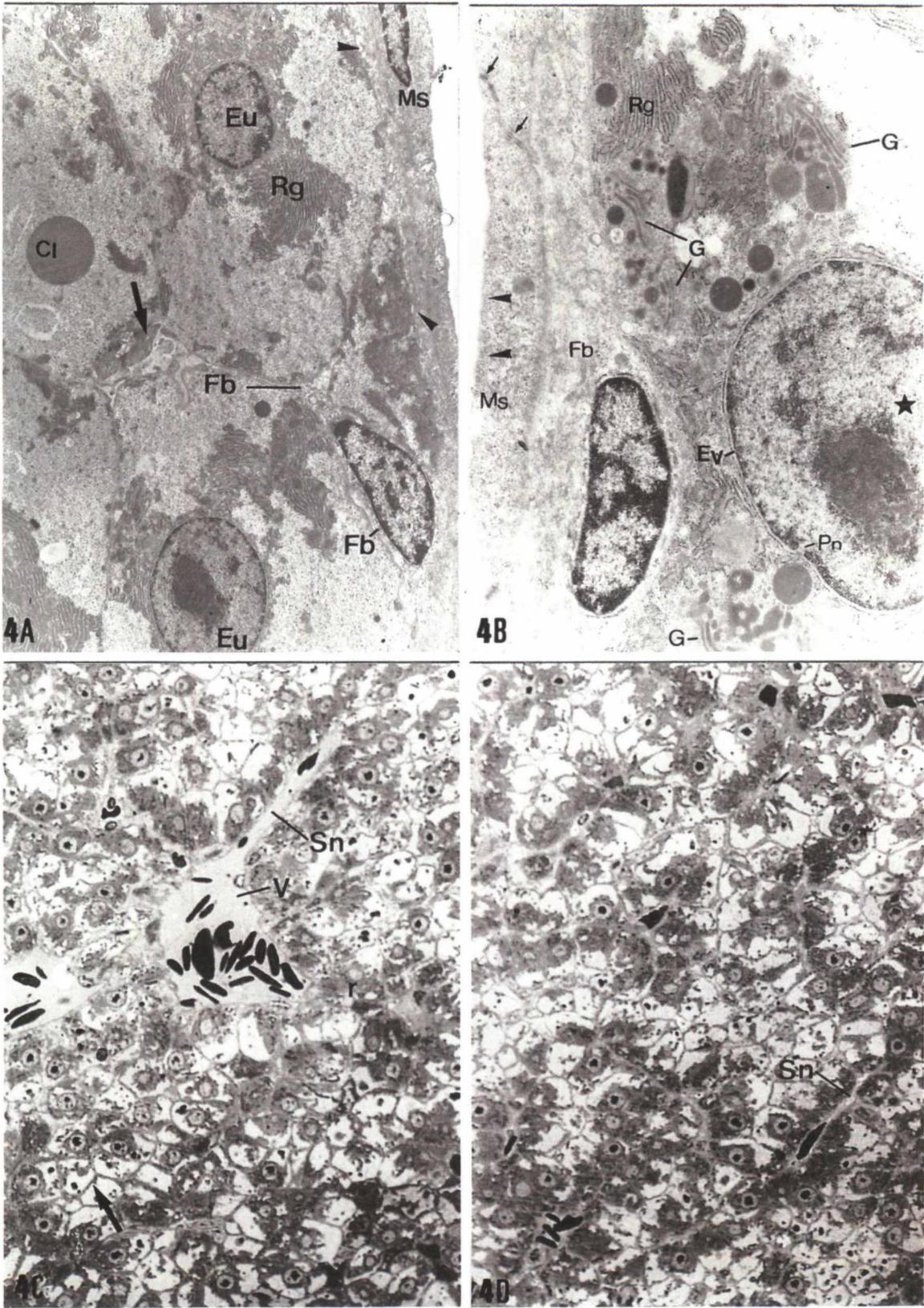
**Traíras 4, 5 e 6:** 8 doses de  $Pb^{++}$  ingeridas ( $21\mu g \times g^{-1} \times 120h^{-1}$  durante 41 dias);

**Traíras 7, 8 e 9:** animais controles sacrificados no 41º dia.

**Figura 4A:** Ultra-estrutura (MET) da região periférica do fígado de fêmea controle (**traíra 7**). O canto superior direito mostra parte da membrana serosa (epitélio simples-pavimentoso) formada por células mesoteliais (**Ms**), uma extensão do peritônio; logo abaixo está a cápsula de conjuntivo que recobre o órgão, onde se encontram curtos microvilos (**►**) na superfície dos hepatócitos periféricos e um fibroblasto (**Fb**) inserido parcialmente no parênquima hepático; célula de canaliculo biliar (**→**); corpo lipídico (**Cl**). Observa-se ainda a esfericidade do núcleo com o nucléolo bastante evidente e regiões pouco eletrodensas que correspondem a eucromatina (**Eu**); as regiões do citoplasma tomadas pelo retículo endoplasmático granular (**Rg**) estão localizadas próximas ao núcleo. Aumento: **X3900**.

**Figura 4B:** Ultra-estrutura (MET) da região periférica do fígado de fêmea controle (**traíra 7**). A junção entre duas células da serosa (**Ms**) mostra os desmossomos (**→**) e este tipo celular apresenta vesículas pinocíticas (**►**) na superfície que, *in vivo*, faz contato com a cavidade peritoneal. Subjacente à serosa encontra-se um fibroblasto (**Fb**) compondo a fina lamina de conjuntivo abaixo da serosa. O núcleo do hepatócito periférico evidencia, junto ao envoltório nuclear, regiões equivalentes aos complexos protéicos que formam os poros nucleares (**Pn**), presentes no envoltório nuclear (**Ev**) e, internamente, a eucromatina abundante (**★**); nesta célula ainda podem ser visualizados o retículo endoplasmático granular (**Rg**) e complexo de Golgi (**G**) associados a vários tipos de vesículas intracelulares. Aumento: **X10400**.

**Figuras 4C e 4D:** Parênquima hepático de fêmea controle (**traíra 8**), coloração com azul de toluidina borificada. Está evidenciada a variação na coloração positiva, com destaque para regiões coradas na periferia dos hepatócitos (**→**) e em associação com o núcleo, neste caso, algumas vezes voltadas para os capilares sinusóides (**Sn**); o nucléolo dos hepatócitos e os eritrócitos no interior dos vasos sanguíneos coram-se fortemente pelo corante; veia central (**V**). Aumentos (**C e D**): **X715**.

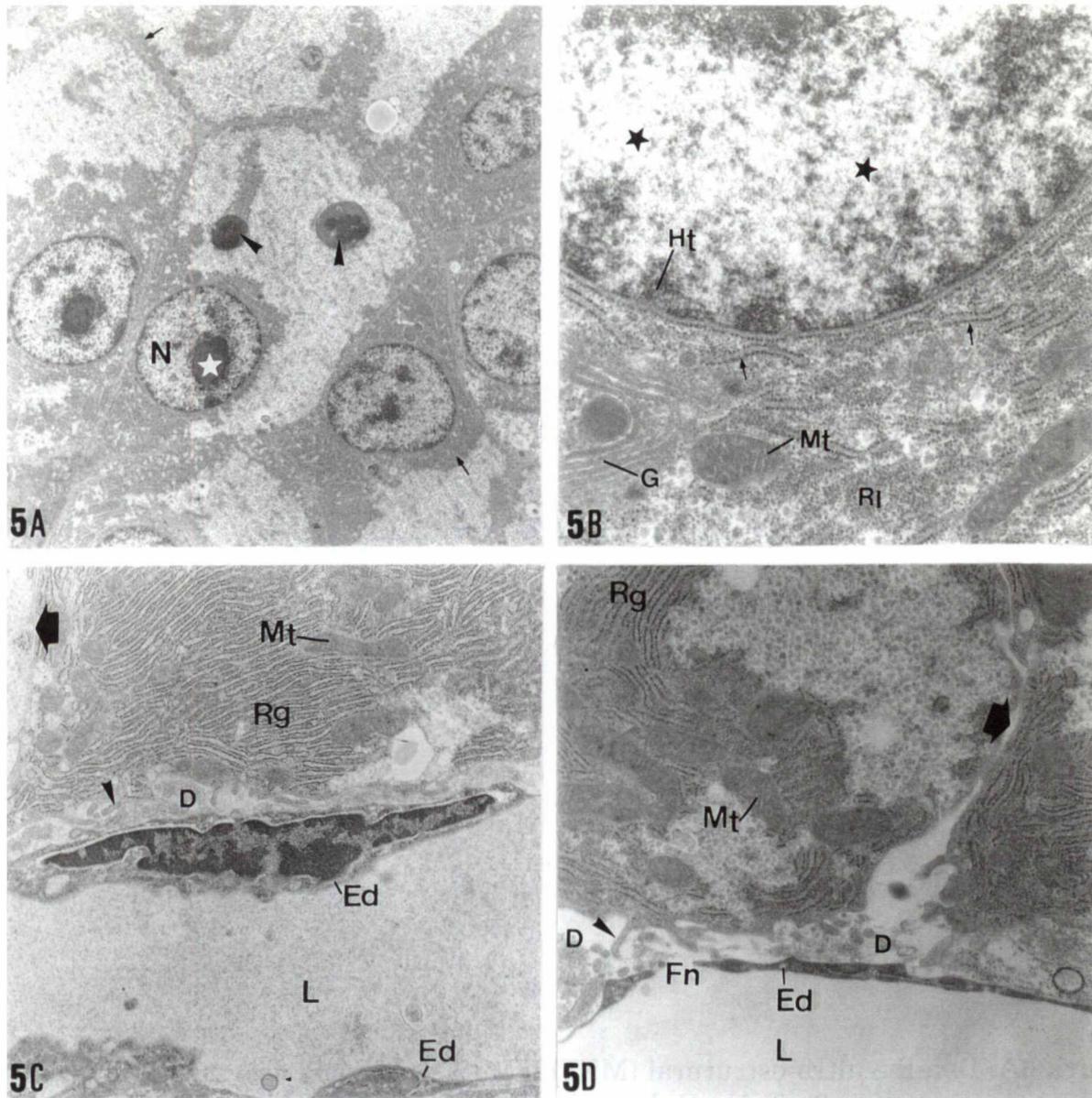


**Figura 4**

**Figura 5A:** Ultra-estrutura (MET) de hepatócitos de fêmea controle (**traíra 8**). Regiões com retículo endoplasmático granular (→) encontram-se na periferia das células ou nas proximidades do núcleo (N); este apresenta um único nucléolo (★) eletrodenso e eucromatina abundante. Observe a presença de grânulos eletrodensos no citoplasma (►). Aumento: **X3900**.

**Figura 5B:** Detalhe ultra-estrutural (MET) de um hepatócito de fêmea controle (**traíra 7**). Observe como o retículo endoplasmático granular (→) encontra-se próximo ao núcleo, o qual mostra uma distribuição da heterocromatina na periferia da organela (Ht) e eucromatina abundante (★). As mitocôndrias de diferentes tamanhos e formas encontram-se distribuídas entre as lamelas do retículo endoplasmático granular (Mt), vários ribossomos livres no citoplasma podem ser observados (Rl) bem como o aparelho de Golgi (G) com vesícula na face TRANS. Aumento: **X19500**.

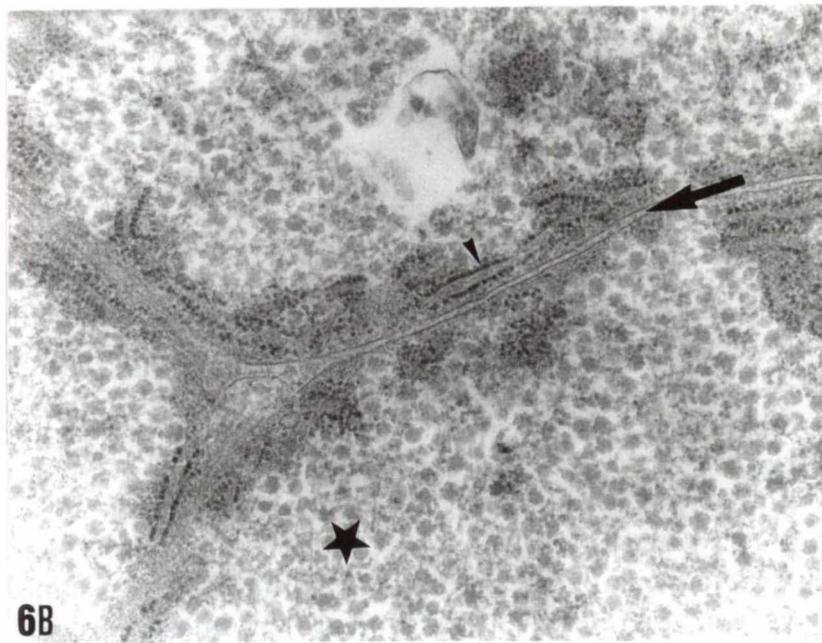
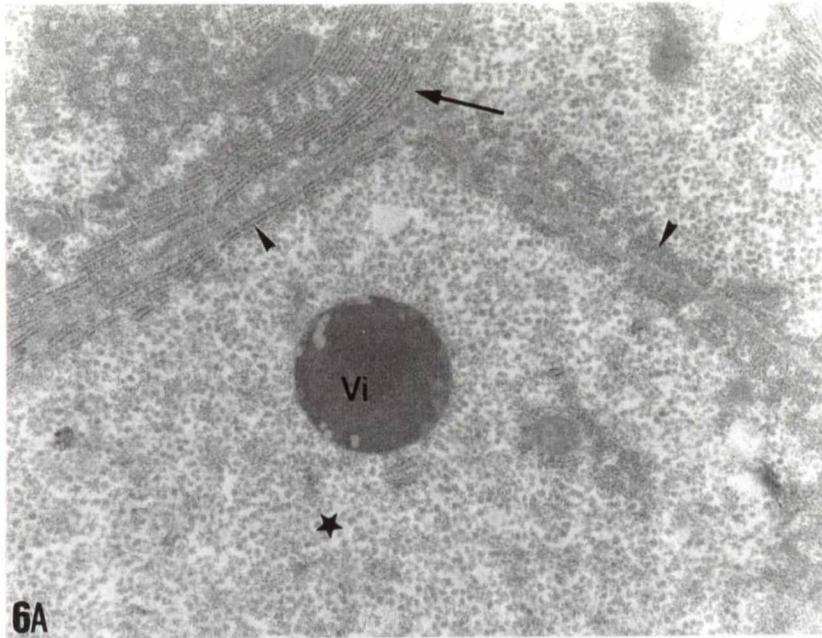
**Figuras 5C e 5D:** Detalhe ultra-estrutural (MET) da interface do fígado com o sangue de fêmea controle (**traíra 7**). Os Estreitos espaços intercelulares entre dois hepatócitos (◆) são diferentes das regiões em que essas células estão em contato com as células endoteliais (Ed), onde o espaço é maior, constituindo o espaço de Disse (D). Neste a região da superfície dos hepatócitos apresenta microvilos (►) e as células endoteliais mostram fenestras (Fn), características que otimizam as trocas entre o parênquima hepático e a luz do sinusóide (L). Mitocôndrias (Mt) e retículo endoplasmático granular (Rg) frequentemente estão presentes no citosol voltado ao espaço de Disse. Aumentos: **X7800** em C e **X13000** em D.



**Figura 5**

**Figura 6A:** Detalhe ultra-estrutural (MET) da interface entre dois hepatócitos de fêmea controle (**traíra 8**). Três células são mostradas e existem estreitos espaços intercelulares entre dois hepatócitos ( $\rightarrow$ ), com pouca matriz extracelular. Associado à periferia do hepatócito está o retículo endoplasmático granular ( $\blacktriangleright$ ), paralelo à superfície interna da membrana plasmática e que, nesta eletromicrografia, aparece seccionado em duas orientações. No citosol encontram-se os agregados de grânulos de glicogênio ( $\star$ ) e uma vesícula citoplasmática contendo material altamente eletrodensso desconhecido (**Vi**). Aumento: **X13000**.

**Figura 6B:** Detalhe ultra-estrutural (MET) da interface entre dois hepatócitos de fêmea controle (**traíra 7**). A seta ( $\rightarrow$ ) mostra os estreitos espaços intercelulares entre dois hepatócitos. É evidenciado também a íntima associação do retículo endoplasmático granular com a membrana plasmática do hepatócito ( $\blacktriangleright$ ); agregados de grânulos de glicogênio são observados espalhados no citoplasma ( $\star$ ). Aumento: **X32500**.

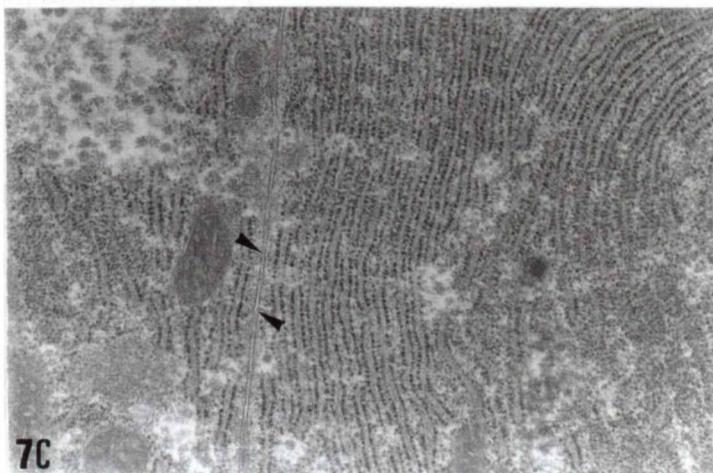
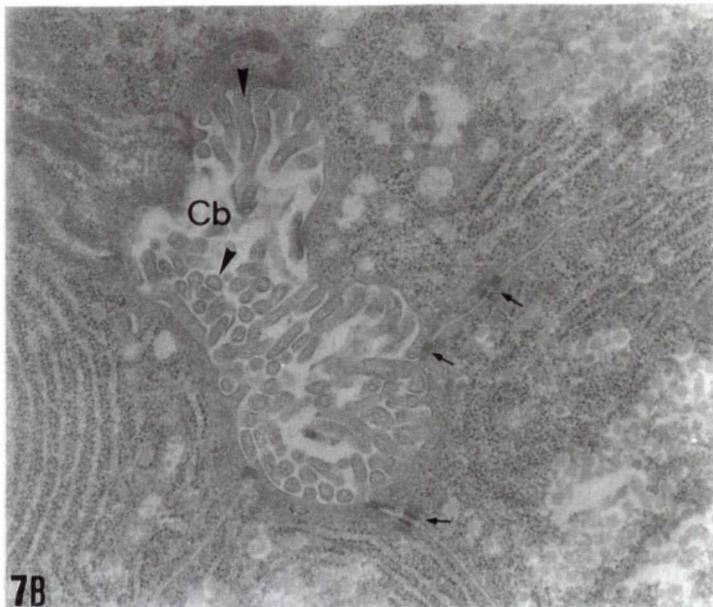
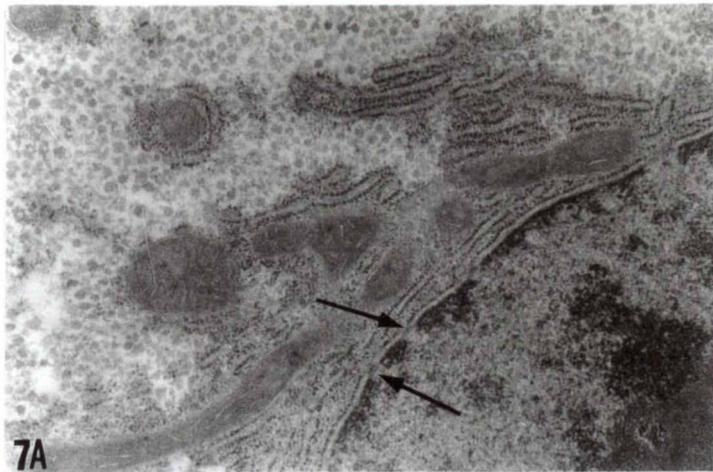


**Figura 6**

**Figura 7A:** Detalhe ultra-estrutural (MET) da região perinuclear de um hepatócito de fêmea controle (**traíra 7**). No envoltório nuclear estão indicadas regiões equivalentes aos complexos protéicos que formam os poros nucleares (→), nessas regiões a heterocromatina periférica mostra-se interrompida. Próximas ao núcleo estão as mitocôndrias e o retículo endoplasmático granular. Aumento: **X19500**.

**Figura 7B:** Ultra-estrutura (MET) de um canalículo biliar de macho controle (**traíra 9**). A superfície apical dos hepatócitos voltada para o canalículo biliar (Cb) apresenta vários microvilos digitiformes (➤) que aparecem em seção transversal ou longitudinal. A estrutura do canalículo é mantida por desmossomos (→) que selam a região baso-lateral superior dos hepatócitos. Aumento: **X19500**.

**Figura 7C:** Detalhe ultra-estrutural (MET) de uma região rica em retículo endoplasmático em hepatócitos de fêmea controle (**traíra 7**). O retículo endoplasmático granular delimita um compartimento único na célula, em continuidade com o envoltório nuclear (não demonstrado). A figura evidencia a recorrente organização dessa organela em cisternas paralelas e sua proximidade com a superfície interna da membrana plasmática, esta indicada por (➤). Aumento: **X19500**.

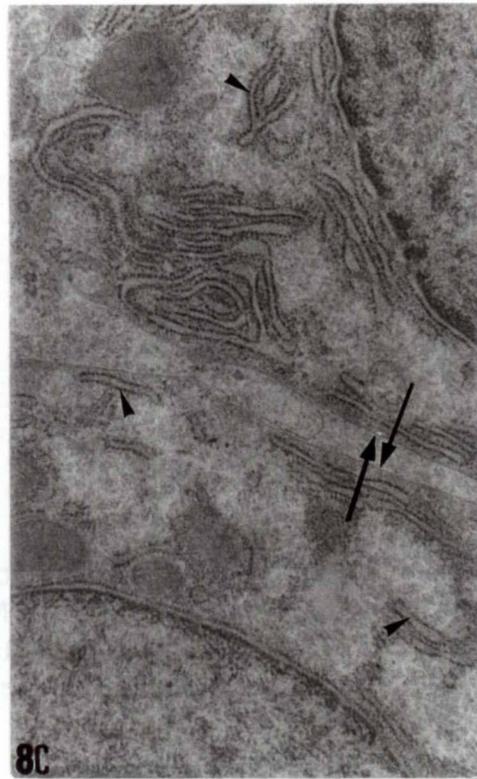
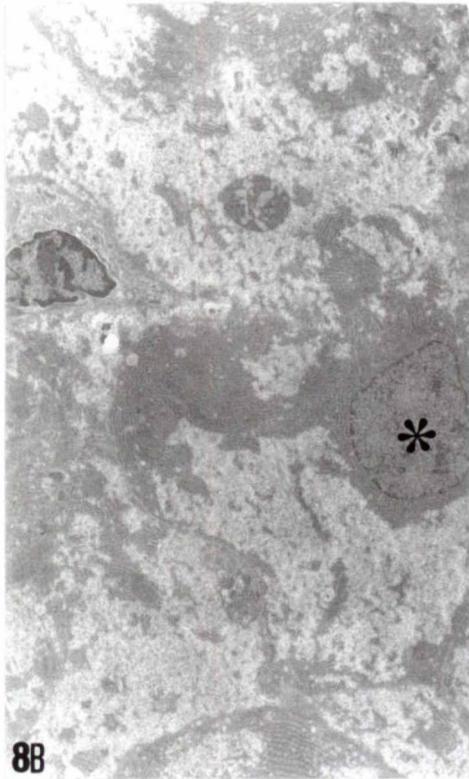
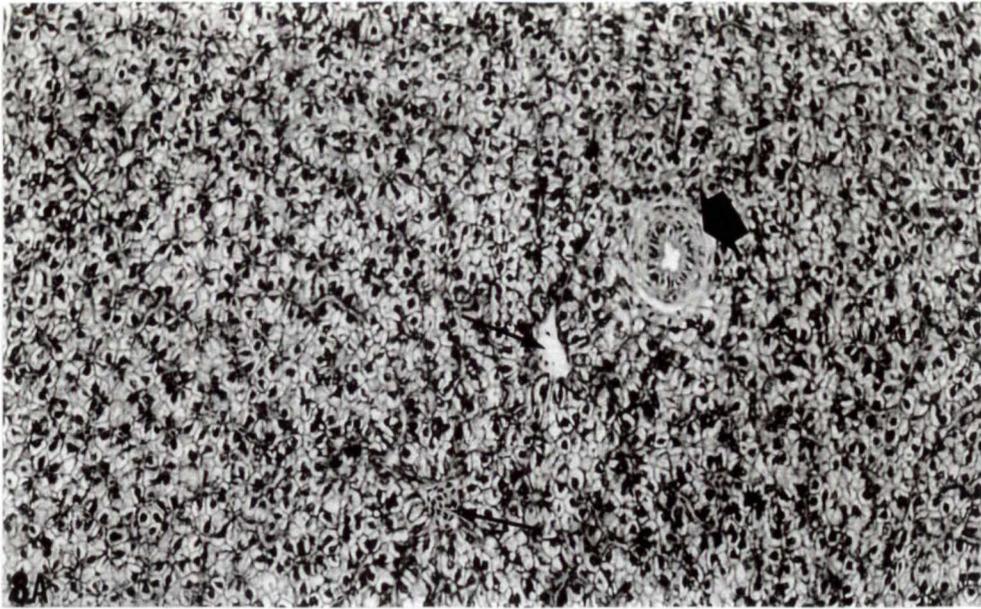


**Figura 7**

**Figura 8A:** Parênquima hepático de fêmea tratada com 4 doses (traíra 3), coloração com hematoxilina-eosina. Nenhuma alteração evidente foi observada. Veias centrais (→) e ducto biliar (◆) estão demonstrados. Esse último é delimitado por tecido epitelial (voltado à luz) sobre tecido conjuntivo (inconspícuo). Aumento: X227.

**Figura 8B:** Ultra-estrutura (MET) de hepatócitos alterados em fêmea tratada com 4 doses (traíra 2). Alterações morfológicas dos núcleos, como a indicada aqui por (\*), foram recorrentes para o grupo e são identificadas pela perda da tendência à esfericidade, característica dos núcleos controles. Porções isoladas de retículo endoplasmático granular começam a ser visualizadas em 18 dias de exposição, indicando um princípio de alteração na estrutura do citoesqueleto. Aumento: X3900.

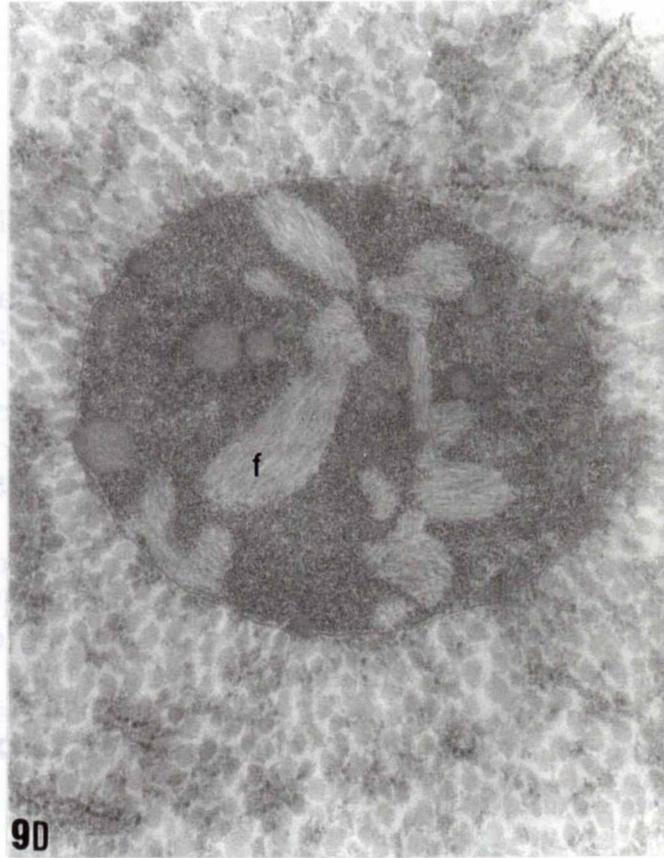
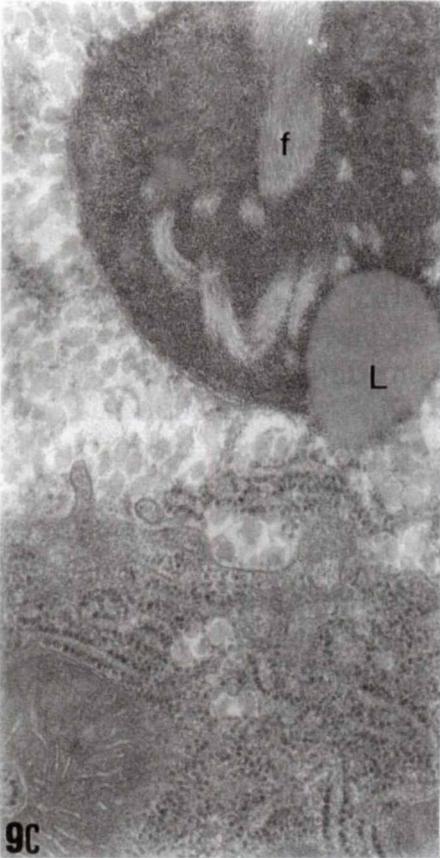
**Figura 8C:** Detalhe ultra-estrutural (MET) da interface entre dois hepatócitos de fêmea tratada com 4 doses (traíra 3). Observe o afastamento da membrana plasmática de duas células adjacentes (→); a desorganização do retículo endoplasmático granular começa a ser visualizada em 18 dias de exposição, com perda do paralelismo entre as cisternas, o que se mostra como porções isoladas da organela (➤). Aumento: X15600.



**Figura 8**

**Figura 9A:** Parênquima hepático de fêmea tratada com 4 doses (**traíra 2**), coloração com azul de toluidina borificada. Nenhuma alteração foi evidente por microscopia de luz. A maior parte da quantidade dos pontos negros no citosol (→) possivelmente corresponda às vesículas mostradas nas **figuras 9B, C e D**. Aumento: **X715**.

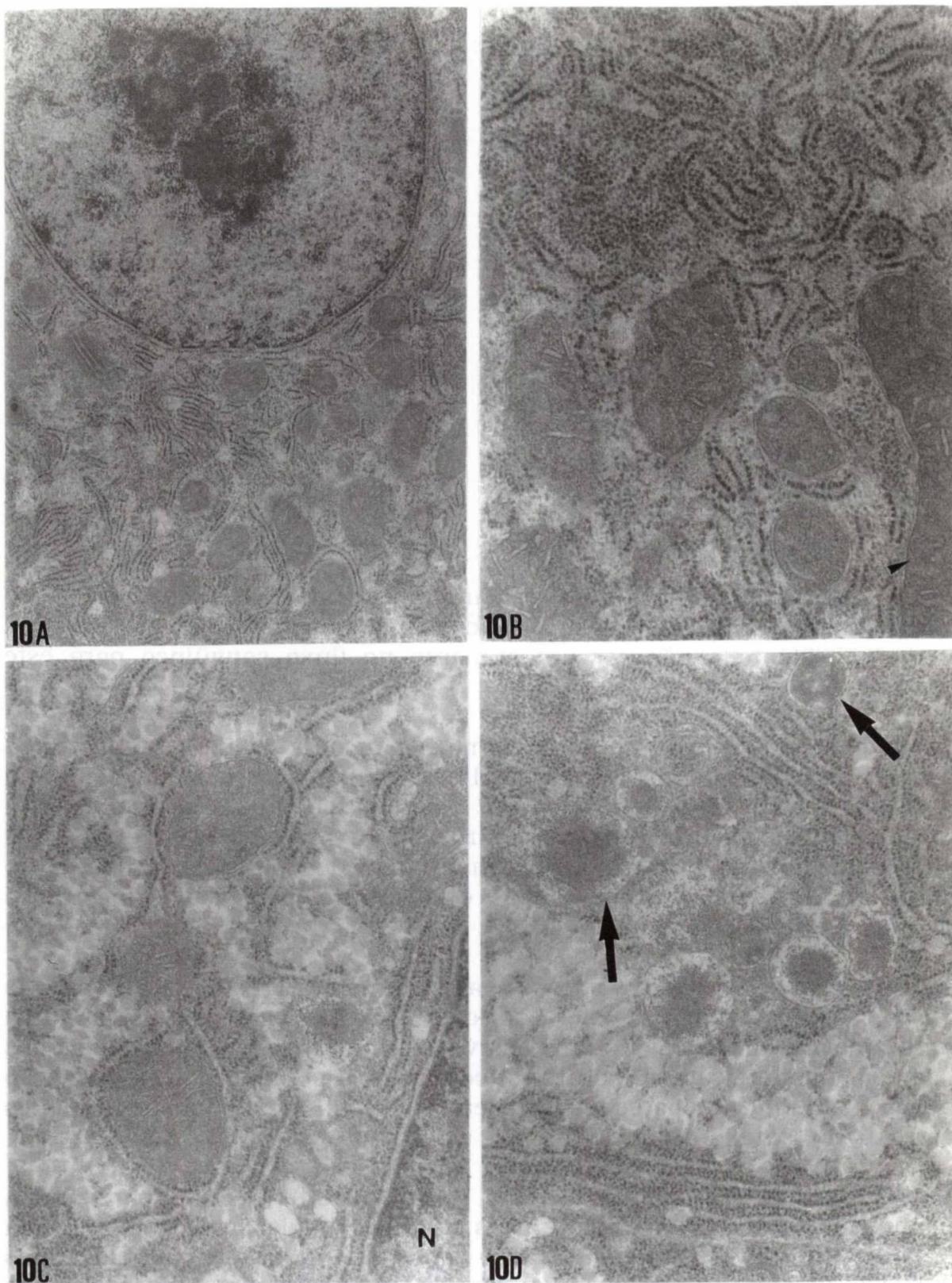
**Figuras 9B, 9C e 9D:** Detalhe ultra-estrutural (MET) de vesículas intracelulares eletrodensas em fêmea tratada com 4 doses (**traíra 2**). Essas vesículas, contendo material de natureza desconhecida são envoltas por membrana e ocorreram em todos os exemplares estudados, freqüentemente mostram-se associadas com material fibroso menos eletrodenso (**f**) e/ou corpos lipídicos osmiofilicos (**L**). Aumentos: **X19500** em **B**; **X32500** em **C** e **D**.



**Figura 9**

**Figuras 10A e 10B:** Detalhe ultra-estrutural (MET) de hepatócitos alterados em fêmea tratada com 4 doses (**traíra 3**). As figuras mostram a desorganização evidente do retículo endoplasmático granular: perda do paralelismo entre as cisternas e porções isoladas da organela. Em relação ao controle, observa-se em **A** um aumento na quantidade de mitocôndrias, sugerindo proliferação dessas organelas e em **B**, uma mitocôndria (►) excessivamente grande (não visualizada por inteiro), sugerindo fusão mitocondrial. Aumentos: **X13000** em **A** e **X32500** em **B**.

**Figuras 10C e 10D:** Detalhe ultra-estrutural de região do citoplasma (MET) em hepatócitos de fêmea tratada com 4 doses (**traíra 2**). A **figura C** mostra o retículo endoplasmático granular cingindo estreitamente algumas mitocôndrias nas proximidades do núcleo (**N**) e a **figura D** mostra um estágio avançado do processo de autofagocitose, com a presença de autofagossomos ou autofagolisossomos (→). Aumentos (**C** e **D**): **X26000**.



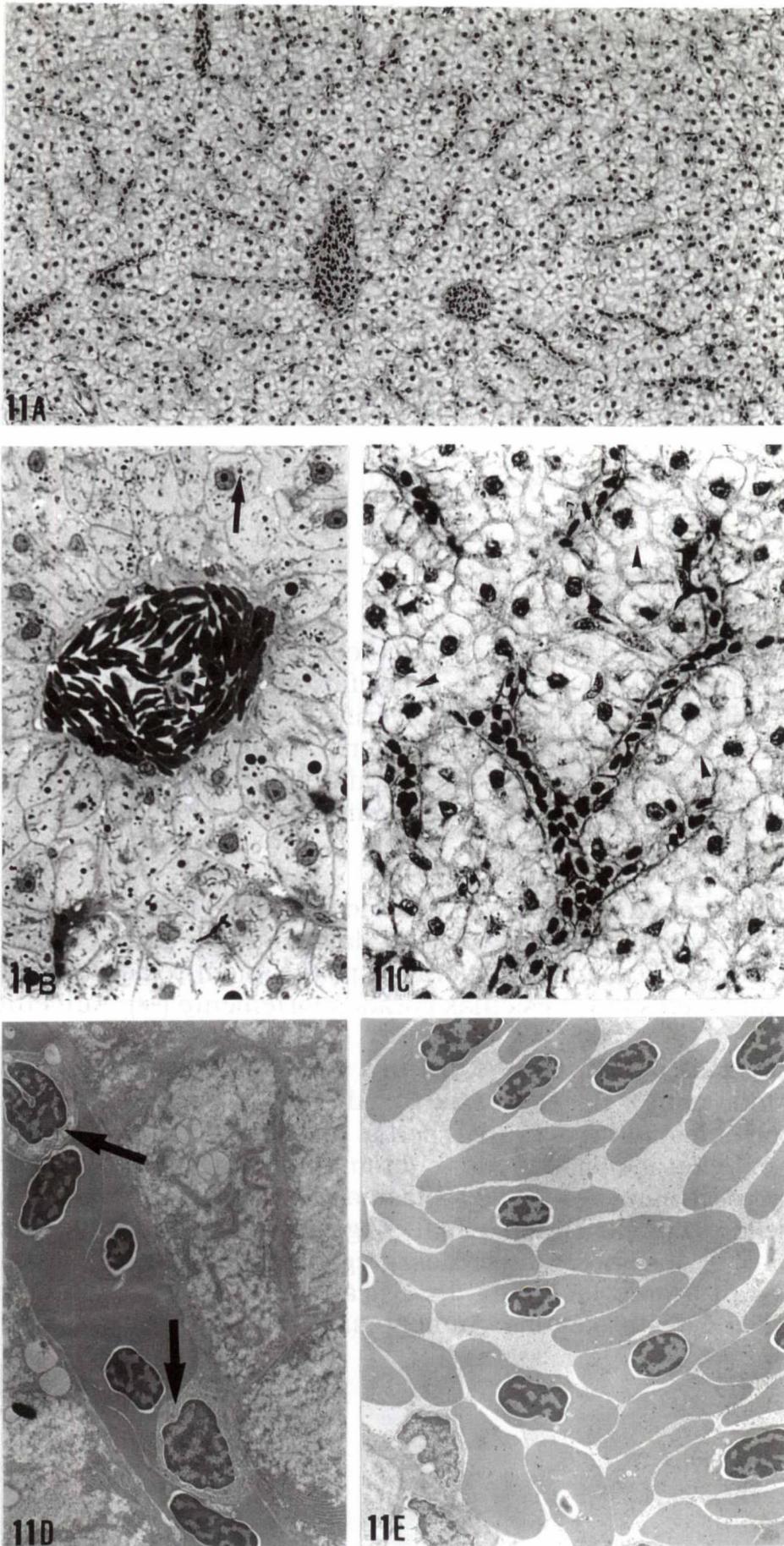
**Figura 10**

**Figura 11A:** Irrigação sangüínea do parênquima hepático de macho tratado com 8 doses (**traíra 5**), coloração com hematoxilina-eosina. Nenhuma alteração evidente a não ser um aumento no fluxo sangüíneo para este exemplar. Aumento: **X227**.

**Figura 11B:** Veia central no parênquima hepático de macho tratado com 8 doses (**traíra 5**), coloração com azul de toluidina borificada. Nenhuma alteração consistente, mas observou-se um decréscimo na coloração positiva dos hepatócitos (em relação aos controles) e a presença de leucócitos (♠ brancas) na luz do vaso. A maior quantidade dos pontos negros (→) no citosol dos hepatócitos possivelmente corresponda às vesículas mostradas nas **Figuras 9B-D**. Aumento: **X715**.

**Figura 11C:** Capilares sinusóides no parênquima hepático de macho tratado com 8 doses (**traíra 5**), coloração com hematoxilina-eosina. Nenhuma alteração consistente, no entanto observa-se um decréscimo em basofilia dos hepatócitos em relação aos controles, bem como a perda da nítida marcação basofílica entre os hepatócitos adjacentes (➤) observada nos exemplares controle. Aumento: **X715**.

**Figuras 11D e 11E:** Ultra-estrutura (MET) de um vaso no parênquima hepático mostrando células sangüíneas em um exemplar macho tratado com 8 doses (**traíra 5**). Nenhuma alteração consistente quanto à morfologia das hemácias, no entanto um maior número de leucócitos (→) foi recorrente nos animais desse grupo. Os eritrócitos são nucleados e têm o citosol mais eletrodense que os leucócitos. Aumentos (**D e E**): **X3900**.

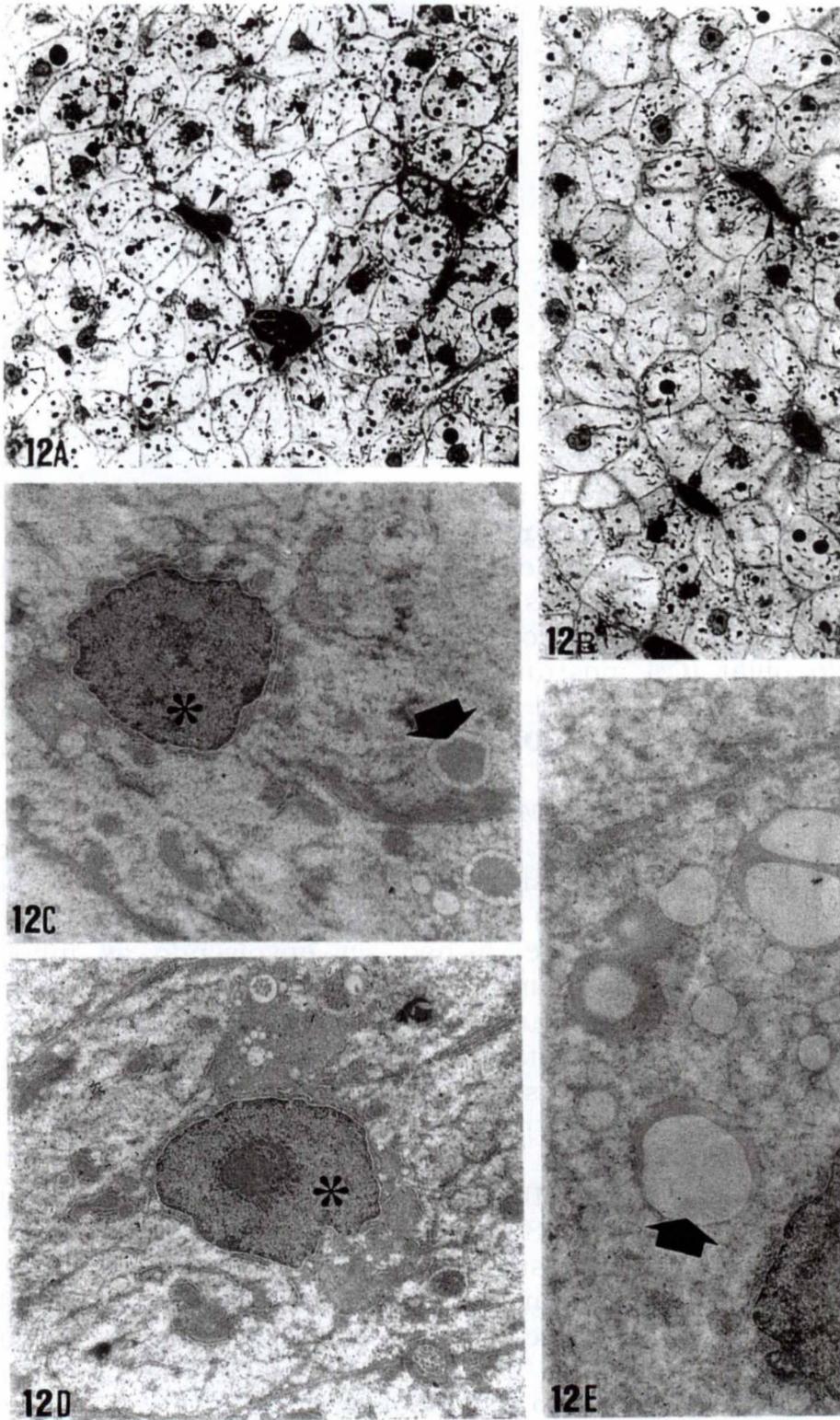


**Figura 11**

**Figura 12A:** Parênquima hepático de macho tratado com 8 doses (**traíra 6**), coloração com azul de toluidina borificada. Nenhuma alteração mais consistente foi observada, no entanto verifica-se uma mudança na coloração positiva (em relação aos controles). Observe, como nas **Figuras 11B-C**, que houve uma diminuição na marcação nítida entre os hepatócitos adjacentes. Vasos sanguíneos (**V**) ou capilares sinusóides (**►**). Vesículas coradas fortemente (**→**). Aumento: **X715**.

**Figura 12B:** Parênquima hepático de macho tratado com 8 doses (**traíra 5**), coloração com azul de toluidina borificada. Nenhuma alteração consistente, mas houve um decréscimo na coloração positiva (em relação aos controles). Capilares sinusóides (**►**). Vesículas coradas fortemente (**→**). Aumento: **X715**.

**Figura 12C, 12D e 12E:** Ultra-estrutura (MET) de hepatócitos alterados em macho tratado com 8 doses (**traíra 5**). Alterações morfológicas dos núcleos foram recorrentes para o grupo: perda da tendência à esfericidade (\*) e aumento na eletrodensidade da eucromatina em relação aos controles. Ocorre um esvaziamento do citoplasma com um nítido decréscimo em quantidade de retículo endoplasmático granular, grânulos de glicogênio e mitocôndrias. Estas mostram-se desagregadas pelo citosol (em **C** e **D**). Há uma desorganização evidente da disposição das organelas e um desequilíbrio no metabolismo destas células. Aumentos: **X6500** em **C** e **D**; **X7800** em **E**.

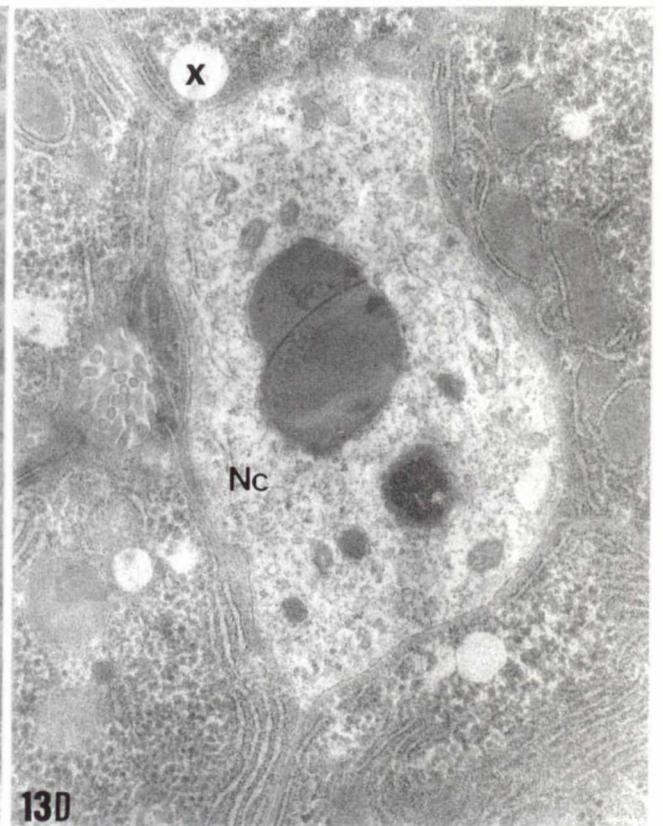
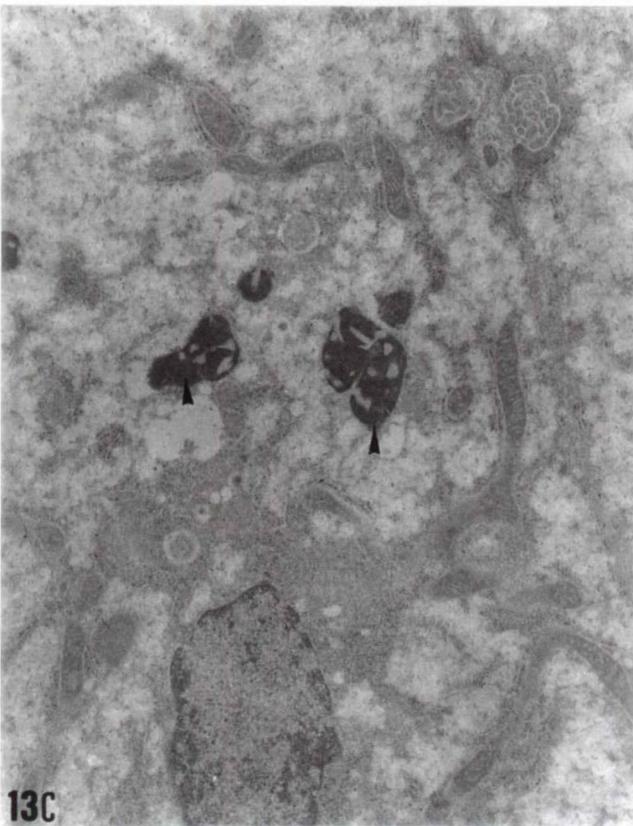
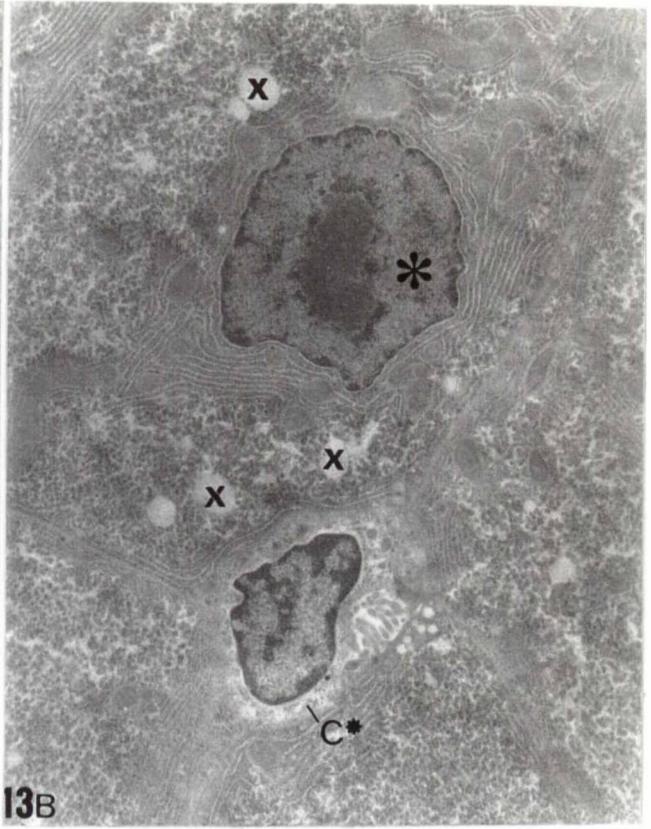
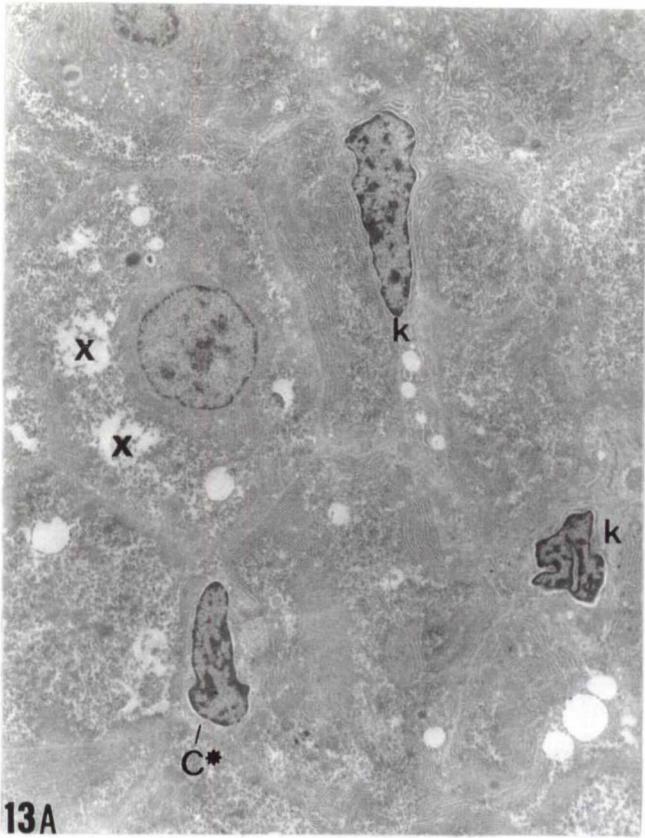


**Figura 12**

**Figuras 13A e 13B:** Ultra-estrutura (MET) de hepatócitos alterados em fêmea tratada com 8 doses (**traíra 4**). Em **B** nota-se a perda da tendência à esfericidade do núcleo (\*) e aumento da eletrodensidade da eucromatina em relação aos controles. Dentre os agregados de glicogênio aparecem regiões claras (**X**) que podem indicar o consumo desse material de reserva. Células de canalículo biliar (**C\***) mostram-se aparentemente inalteradas e, em **A**, ocorrem células que podem ser macrófagos infiltrados no parênquima (**k**). Aumentos: **X3900** em **A** e **X7800** em **B**.

**Figura 13C:** Ultra-estrutura (MET) de hepatócitos alterados em macho tratado com 8 doses (**traíra 5**). Há perda da tendência à esfericidade do núcleo e aumento da eletrodensidade da eucromatina (na parte inferior da eletromicrografia). O retículo endoplasmático granular encontra-se desorganizado e quase ausente, a não ser envolvendo as mitocôndrias remanescentes, que se apresentam excessivamente grandes, sugerindo fusão mitocondrial. O citosol indica um estado avançado de autofagocitose de mitocôndrias e a célula apresenta uma desorganização generalizada do seu citoplasma. Observe ainda as vesículas eletrodensas amorfas, diferentes das descritas no material controle (►). Aumento: **X10400**.

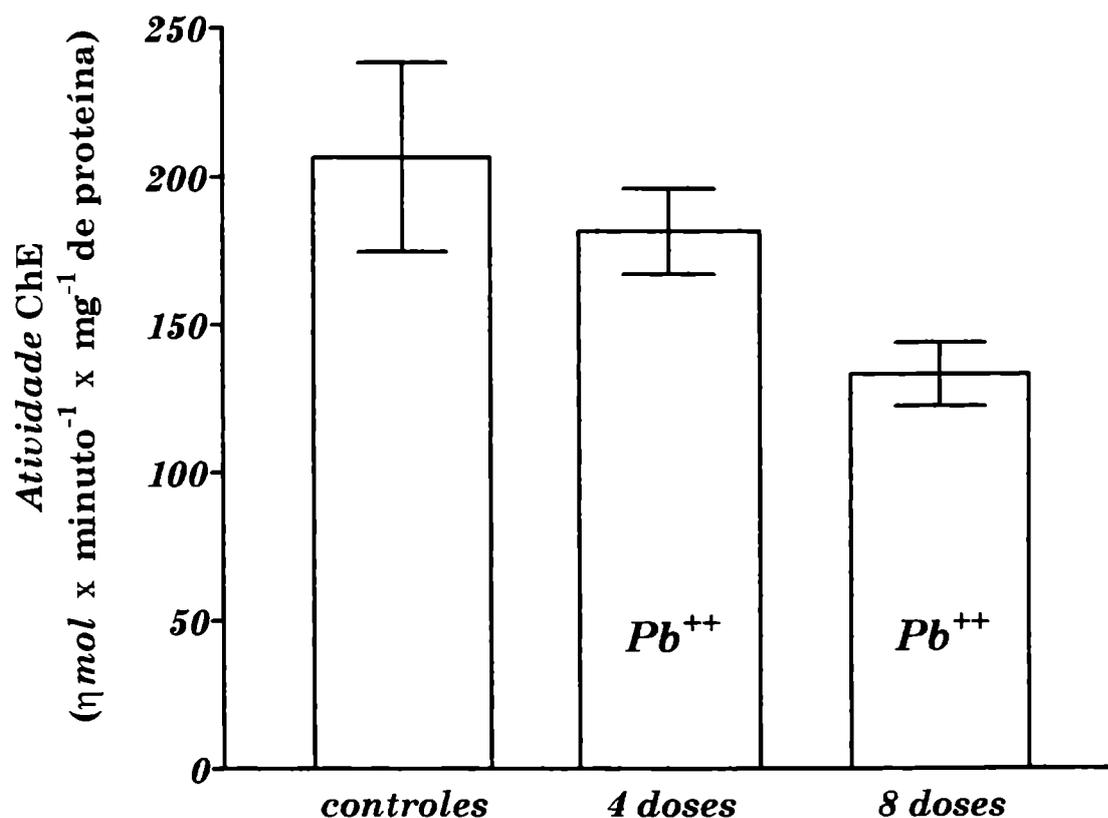
**Figura 13D:** Ultra-estrutura (MET) de hepatócito em avançado estado de necrose em fêmea tratada com 8 doses (**traíra 4**). A célula em processo de necrose (**Nc**) apresenta o citoplasma pouco eletrodenso, contendo estruturas indefinidas, caracterizando uma completa desorganização celular. Se observada atentamente pode-se perceber que a membrana plasmática encontra-se bastante alterada. Os hepatócitos que circundam a célula central apresentam retículo endoplasmático rugoso envolvendo estreitamente as mitocôndrias (canto superior direito) e consumo de glicogênio (**X**), numa situação semelhante a das **figuras 13A e 13B**. Aumento: **X13000**.



**Figura 13**

### I.4.3. Neurotoxicidade do chumbo em *H. malabaricus*

Houve uma tendência à inibição da atividade colinesterásica das traíras expostas ao chumbo. Contudo nenhuma distinção comparativa entre os tratamentos e controles foi significativa (cf. **Figura 14**). O **Anexo 3A** copila as análises estatísticas dos dados relativos à atividade colinesterásica.



**Figura 14:** Atividade colinesterásica com músculo axial de *Hoplias malabaricus* expostas cronicamente por via trófica ao Chumbo (II). Cada valor (barra) é a média de três indivíduos; erro padrão médio indicado; **4 doses:** 18 dias de experimento; **8 doses:** 41 dias de experimento; controles sacrificados no 41º dia.

## I.5. DISCUSSÃO

Por não ter ocorrido mortalidade durante os períodos de aclimação e de exposição, considera-se que o ensaio experimental para a exposição crônica das traíras ao Chumbo (II), por via trófica, foi satisfatório aos objetivos propostos neste trabalho. Considera-se que a dose empregada é subletal à *Hoplias malabaricus*, no tempo de exposição de 41 dias (8 doses) e nas condições experimentais testadas. A espécie *H. malabaricus* é aqui considerada um bom modelo biológico para o estudo de biomarcadores de contaminação aquática, pois adaptou-se bem às condições laboratoriais e à manipulação durante o experimento.

### ***I.5.1. Organização estrutural do fígado de H. malabaricus***

A serosa e a cápsula de conjuntivo que recobrem o fígado de *H. malabaricus* ocorrem em outros teleósteos (GROMAN, 1982; MORRISON, 1987; TAKASHIMA e HIBIYA, 1995) e a membrana dos hepatócitos em contato com a cápsula de conjuntivo contendo curtos microvilos, foi também descrita por TAKASHIMA e HIBIYA (1995).

Através da observação dos cortes histológicos pôde-se notar que, de modo geral, a organização do tecido hepático de *H. malabaricus* assemelha-se a de outros teleósteos (GROMAN, 1982; YASUTAKE e WALES, 1983; BELL *et al.*, 1986; MORRISON, 1987; TAKASHIMA e HIBIYA, 1995). O sangue venoso vindo do intestino entra no fígado pela veia porta, que pode estar associada ao pâncreas exócrino (hepatopâncreas); a veia porta se ramifica nos capilares sinusóides; estes também recebem sangue arterial dos terminais (arteríolas) da artéria hepática, mas há muitas espécies de peixes que não têm um suprimento de sangue arterial bem desenvolvido; em seção transversal, os hepatócitos estão concentricamente organizados ao redor de um sinusóide, o que longitudinalmente se apresenta como um cordão de hepatócitos; os sinusóides convergem a uma das veias centrais; estas unem-se na veia hepática para a saída do órgão (não observado); vários sinusói-

des podem circundar paralelamente um canalículo biliar (não observado); os canalículos biliares convergem a ductos biliares e estes, por sua vez, convergem a um ducto hepático (não observado) que deixa o fígado (HEATH, 1995; TAKASHIMA e HIBIYA, 1995). As estruturas descritas acima e que não foram observadas em *Hoplias malabaricus*, provavelmente ocorram nesta espécie. Para sua visualização e descrição deve ser feita uma análise de seções ao longo de todo o órgão.

A organização lobular característica do fígado de mamíferos consiste de repetições morfológicamente compartimentalizadas da organização descrita acima, com a veia central no centro de cada lóbulo (WELSCH, 1999). Mas isso não ocorre em peixes. Embora topologicamente a veia central de mamíferos não tenha um correspondente em peixes, manteve-se aqui a nomenclatura, para as veias que recebem sangue dos capilares sinusóides de *H. malabaricus*.

A aparência de hepatócitos de peixes varia muito entre espécies, estações do ano, estado nutricional, idade, sexo e exposição a xenobiontes, principalmente no que se refere a quantidade de material de reserva (lipídio e glicogênio) e de retículo endoplasmático (FERGUSON, 1989; HEATH, 1995). Tais variações estão relacionadas com a variação de eosinofilia e basofilia (coloração positiva para hematoxilina e toluidina) encontrada no parênquima hepático de *H. malabaricus*.

A presença de mitocôndrias e a abundância de retículo endoplasmático rugoso nos hepatócitos de *H. malabaricus* é compartilhada com outras espécies e indica a alta atividade metabólica dessas células. Outrossim, para hepatócitos de outras espécies de peixes, sob análise ultra-estrutural: as mitocôndrias raramente estão entre os agregados de glicogênio, mas comumente encontram-se agregadas no citoplasma basal, nas proximidades da membrana plasmática voltada ao espaço de Disse; o retículo endoplasmático rugoso ocorre paralelo a membrana plasmática; o retículo endoplasmático liso é freqüentemente escasso ou inconspícuo; e o aparelho de Golgi encontra-se associado com vários tipos de vesículas (HEATH, 1995; TAKASHIMA e HIBIYA, 1995).

A eucromatina é mais dispersa, homogênea e clara (menos eletrodensa) que a heterocromatina e nos hepatócitos de *Hoplias malabaricus* mostrou-se abundante, indicando altas taxas de síntese protéica. A cromatina corresponde ao DNA associado a proteínas e a cromatina ativa (em transcrição) constitui-se da eucromatina menos a matriz nuclear; já a heterocromatina é inativa e dita “silenciosa”.

O retículo endoplasmático delimita um compartimento único na célula, em continuidade com o envoltório nuclear e isso é raramente visualizado. A organização de organelas no citosol sofre regulação do citoesqueleto que por associação com proteínas motoras (quinesina no caso do retículo endoplasmático) posicionam estas organelas dentro da célula (ALBERTS *et al.*, 1997). A organização em cisternas paralelas, do retículo endoplasmático granular dos hepatócitos de *H. malabaricus*, e sua proximidade recorrente com a superfície interna da membrana plasmática devem sofrer portanto a mesma regulação.

O fígado de peixes estoca carboidratos (glicogênio) e lipídios como material de reserva energética (HEATH, 1995). Corpos lipídicos osmiofílicos e grânulos de glicogênio foram observados no citosol de hepatócitos de *H. malabaricus*.

Outras espécies de peixes também possuem as especializações de superfície celular observadas no tecido hepático de *H. malabaricus*: junções de ancoragem conectadas ao citoesqueleto interno (usualmente desmossomos relacionados a filamentos intermediários de  $\alpha$ -queratina); e microvilos de hepatócitos projetando-se ao espaço de Disse, à luz do canalículo biliar ou à capsula de conjuntivo que recobre o fígado (GROMAN, 1982; YASUTAKE e WALES, 1983; BELL *et al.*, 1986; MORRISON, 1987; TAKASHIMA e HIBIYA, 1995; ALBERTS *et al.*, 1997).

*Hoplias malabaricus* também compartilha com outras espécies as células endoteliais pavimentosas dos capilares sinusóides, que formam um tecido com fenestras; estas e os microvilos dos hepatócitos, no espaço de Disse, maximizam

as trocas entre o sangue e o parênquima hepático, em ambos os sentidos; células de Von Kupffer foram raras, mas tais células formam um sistema menos desenvolvido em peixes que em mamíferos (TAKASHIMA e HIBIYA, 1995; FERGUSON, 1989).

O sistema intracelular de coleta de bile (células de canalículo biliar) observado em *H. malabaricus* foi descrito também para outras espécies de peixes (TAKASHIMA e HIBIYA, 1995) como *Gadus morhua* (MORRISON, 1987) que pode apresentar até 3 canalículos internalizados numa célula de canalículo biliar.

### ***I.5.2. Efeitos tóxicos do chumbo em H. malabaricus***

#### **Citototoxicidade em hepatócitos**

Não foi observada nenhuma alteração morfológica consistente, em nível tecidual, associada aos tratamentos (peixes expostos). Isso impossibilita qualquer asserção segura acerca dos efeitos histopatológicos que o chumbo possa causar em *H. malabaricus*, nas condições experimentais testadas e pelas técnicas histoquímicas usadas.

Não há evidência definitiva de efeitos adversos causados pelo chumbo ao fígado (EWERS e SCHLIPKÖTER, 1991). SIPPEL *et al* (1983) não encontraram nenhuma resposta histopatológica consistente no fígado de *Salmo gairdneri* expostas ao chumbo por vias hídrica (120 µg/l) e trófica (1 mg/ kg × dia) durante 32 semanas. De modo geral, modificações morfológicas observadas no tecido hepático de peixes nem sempre são específicas ao xenobionte (HEATH, 1995), no entanto alguns tipos de contaminantes podem causar lesões altamente específicas a este tipo de tecido como o benzo[a]pireno, com propriedades carcinogênicas para fígado de teleósteos.

Contudo foi recorrente a observação, relativa a dos controles, de um decréscimo em coloração positiva para toluidina e hematoxilina (basofilia) nos cortes histológicos dos animais que ingeriram 8 doses de chumbo. Evidências ultra-estruturais suportam este fato e são discutidas a seguir.

Estudos com *Hoplias malabaricus* e outras espécies de peixes de regiões tropicais e subtropicais são escassos em relação à exposição a xenobiontes e, especificamente, ao chumbo. Isso faz com que muitas das considerações que seguem sejam generalizações descritivas especulativas (HULL, 1975), relacionadas com conhecimentos básicos sobre a célula eucariótica. As dimensões da análise ultra-estrutural impossibilitaram uma amostragem segura e sua representatividade não foi corroborada em alguns aspectos com a microscopia de luz. Isso impossibilitou a atribuição de propriedades, aos elementos teciduais, que fossem características do efeito tóxico no qual o chumbo participaria suficientemente, em conjunto com outros fatores, e necessariamente, por si só (HULL, 1975). Mesmo assim algumas células foram identificadas por atributos que são aqui associados com graves danos celulares.

O retículo endoplasmático (liso ou granular) pode apresentar reorganização ou proliferação quando em resposta a um poluente e isso pode ser atribuído à indução da síntese de enzimas biotransformadoras de xenobiontes. Essa indução é considerada uma adaptação fisiológica e não um efeito patológico, mas de certo envolve custos à célula (HEATH, 1995). Estudos com peixes expostos a poluentes diversos revelam vários tipos de alterações nas células hepáticas: aumento do número de vacúolos, aumento do tamanho de lisosomas, mudanças na forma dos núcleos, necrose, isquemia (bloqueio da circulação capilar), atrofia de hepatócitos, regressão de microvilos no canalículo biliar, lipidose (excesso de reserva lipídica) e perda de glicogênio. Estas duas últimas podem ser devido a jejum ou elevados níveis de hormônios envolvidos com estresse (cortisol e adrenalina) (HEATH, 1995; SIPPEL *et al.*, 1983).

A análise dos hepatócitos de *Hoplias malabaricus* por microscopia eletrônica de transmissão revelou vesículas escuras (bastante eletrodensas) de formato variado no citosol, envoltas por membrana e associadas ou não com corpos lipídicos e material fibroso. Leland em 1983 e Lanno *et al.* em 1987, *apud* HEATH (1995) encontraram grânulos eletrodensos no citosol de hepatócitos de trutas expostas ao cobre e associaram-nos com pontos danificados do citosol ou áreas de deposição do metal, estas últimas envolvidas com o “seqüestro” do cobre (compartimentalização) ou com o processo de excreção do metal com a bile. Contudo a ocorrência dos grânulos eletrodensos, observados aqui em hepatócitos de *H. malabaricus*, não parece ser o diagnóstico da exposição ao chumbo. Isso porque tais grânulos ocorreram nos animais controles do experimento, bem como nos controles e tratados de um experimento semelhante realizado no Laboratório de Bioensaios, Dep. de Biologia Celular (SBC-UFPR), onde traíras foram expostas por via trófica ao tributílo-estanho (4 e 8 doses, 20 e 40 dias). Por outro lado, outras alterações subcelulares parecem estar envolvidas com a administração do chumbo na dieta de *H. malabaricus*.

A perda da tendência à esfericidade dos núcleos, nos hepatócitos dos animais expostos (4 e 8 doses), foi interpretada como uma alteração morfológica no fígado em resposta ao chumbo. Essa interpretação foi subjetiva, contudo há evidências de que o núcleo concentre o chumbo mais intensamente que outras regiões da célula, o que ocorre pela presença de proteínas ácidas intranucleares. Isso foi demonstrado pela centrifugação fracionada de homogenatos de rim de ratos expostos ao chumbo. Este metal interage com proteínas nucleares que provavelmente contêm grupos sulfidrila: grânulos intranucleares (com o centro eletrodenso e a periferia fibrilar) são observáveis em células do túbulo proximal renal e do parênquima hepático de mamíferos; esses grânulos podem ser identificados por microscopia de luz (tratamento com fucsina básica) como inclusões nucleares que não estão associadas aos ácidos nucléicos. Em rim de ratos tais grânulos contêm cerca de 50 µg de chumbo por miligrama de proteína (GOYER *et al.*, 1970; GOYER e MOORE, 1974). Contudo nenhum grânulo foi observado nos núcleos hepáticos de

*Hoplias malabaricus* e, segundo SIPPEL *et al* (1983), ainda não haviam sido em outras espécies de peixes.

Houve aumento da eletrodensidade da eucromatina dos animais que receberam 8 doses, em relação aos controles. Mesmo que o núcleo não acumule chumbo em quantidade maior que outras regiões da célula, a mudança de sua forma foi recorrente nas traíras tratadas e isso é corroborado pelo efeito que o metal exerce nas extremidades amino e carboxi-terminais de cadeias polipeptídicas.

Filamentos intermediários formam uma rede (lâmina nuclear) subjacente ao envoltório nuclear, sustentando-o. Esta malha é extremamente dinâmica, desestruturando-se rapidamente no início da mitose e se reconstituindo no final da divisão celular. O entrelaçado bidimensional é dependente da associação com outras proteínas, para que se estabeleça estruturalmente. As proteínas que integram a lâmina nuclear (lamínas) são moléculas fibrosas e alongadas, com uma região central em  $\alpha$ -hélice e duas extremidades, uma amino e outra carboxi-terminal. Estes domínios terminais determinam a especificidade interacional das lamínas com outros componentes moleculares da célula. As lamínas possuem um sinal nuclear de transporte, que as direciona de seu compartimento de origem (citosol) para o núcleo. Tetrâmeros solúveis dessas subunidades formam a unidade funcional de polimerização dos filamentos, um processo controlado pela fosforilação de resíduos de serina na extremidade amino-terminal. Assim a célula regula e determina a montagem, a quantidade, o comprimento e a posição dos filamentos que formam a lâmina nuclear (ALBERTS *et al.*, 1997).

O chumbo pode intervir em um ou mais dos processos supracitados, desde a síntese das lamínas até a polimerização dos filamentos, já que seu efeito é reconhecidamente prejudicial a estruturas protéicas. E provavelmente interferiu, nos hepatócitos dos exemplares de *Hoplias malabaricus* expostos. Contudo técnicas mais apuradas que aquelas aqui usadas são necessárias para corroborar esse fato com maior acurácia. Sugere-se a marcação imunocitoquímica.

Outras alterações morfológicas foram encontradas nos hepatócitos, acredita-se, em resposta à administração do chumbo e são também consideradas como um efeito da ação desse metal em proteínas do citoesqueleto, mas agora com uma outra classe de polímeros, os microtúbulos.

Microtúbulos são macromoléculas tubulares que formam um cilindro rígido (25 nm de diâmetro) composto por protofilamentos lineares e paralelos que somam 13 em seção transversal. Os protofilamentos são formados por subunidades globulares de tubulina (tipos  $\alpha$  e  $\beta$ ) associadas em heterodímeros, que são as unidades funcionais de polimerização. Os microtúbulos interagem com outros componentes protéicos do citosol e isso resulta em movimentos relacionados com: a morfogênese, por criar padrões organizacionais de tipos celulares, promover o crescimento diferencial de partes celulares e a polarização de células; com o movimento de flagelos e cílios, determinando a funcionalidade de tecidos; e com a localização e coordenação de componentes celulares (por locomoção interna). Este último tipo de movimento pode ser: a migração de cromátides durante a divisão celular (ligação com os cinetócoros e despolimerização dos microtúbulos); ou a locomoção de componentes moleculares (RNA, ribossomos, pigmentos) e organelas (retículo endoplasmático, complexo de Golgi, vesículas de secreção) associadas a proteínas motoras (dineína e quinesina) que promovem movimento vetorial por hidrólise de ATP (ALBERTS *et al.*, 1997).

Levanta-se aqui a hipótese de que a integridade dos microtúbulos, a coordenação de sua polarização e despolarização, as suas interações com outros componentes celulares, ou todos esses processos foram afetados pelo chumbo nos hepatócitos de *Hoplias malabaricus*. Contudo, para se comprovar precisamente tal efeito sugere-se novamente o uso de técnicas mais apuradas como a marcação imunocitoquímica. Não obstante, a análise do fígado dos animais expostos (4 e 8 doses) revelou alterações morfológicas que parecem estar associadas ao efeito do chumbo nos microtúbulos. A desorganização do retículo endoplasmático rugoso, relativa a sua posição e quantidade, é o fator principal que suporta esse hipótese.

Em muitos hepatócitos dos animais que ingeriram 8 doses de chumbo a quantidade de retículo endoplasmático rugoso, mitocôndrias e outras organelas foi bem menor que em relação aos controles. Considera-se que isso está relacionado com o decréscimo em coloração positiva para toluidina e hematoxilina (basofilia) observado por microscopia de luz. Além da quantidade, a posição atípica das organelas remanescentes foi indicativa dos efeitos do chumbo na dieta de *H. malabaricus*.

As mitocôndrias são organelas consideradas “alvos”, relacionados aos efeitos subcelulares do chumbo. Estes estão descritos em mitocôndrias de células hepáticas, do túbulo proximal renal e de reticulócitos da medula óssea de humanos e outros animais. A conseqüência é o comprometimento de processos endergônicos e portanto dependentes do acoplamento estrutural que ocorre entre a produção de ATP e o consumo de energia pela célula. Contudo pode haver, na intoxicação crônica, algum grau de eficiência fisiológica adquirida ou remanescente, desde que não acompanhada por evidências morfológicas como necrose e apoptose (morte celular programada) (GOYER e MOORE, 1974).

O desacoplamento estrutural parcial em mitocôndrias, causado pelo chumbo, foi demonstrado pela mensuração do influxo de oxigênio e ADP na organela, com baixa atividade metabólica, decréscimo em taxas respiratórias e em fosforilação oxidativa (ensaio enzimático com o piruvato como substrato). O decréscimo em eficiência oxidativa e fosforilativa é acompanhado pelo aumento da permeabilidade na membrana mitocondrial interna, o que causa alterações no transporte de metabólitos, por exemplo: a vazão de  $H^+$  para a matriz mitocondrial, eliminando a força próton-motriz que movimenta elétrons pela membrana. O processo é reversível e similar a outros casos de envenenamento celular. As alterações morfológicas que acompanham esse desequilíbrio são: aumento da cavidade delimitada pela membrana interna (matriz), com afastamento da crista à periferia; figuras mielínicas e autofagossomos; aumento da taxa de renovação mitocondrial (divisão da organela); e grânulos de inclusão na organela, semelhantes aos do núcleo (descritos acima) (GOYER e MOORE, 1974).

Esta última característica foi observada somente *in vitro*, em hepatócitos e somente a proliferação e imagens que se supõe serem relacionadas com a autofagocitose foram observadas em *Hoplias malabaricus*. A variação no tamanho das mitocôndrias e na sua quantidade por célula foi muito maior nos animais que ingeriram 8 doses e algumas organelas muito grandes sugeriram fusão mitocondrial. A escassez da organela também foi marcante em algumas células que mostraram uma desorganização generalizada do citosol acompanhada pelos núcleos atípicos já descritos.

Em hepatócitos, uma mitocôndria média tem cerca de 10 dias de vida e em células normais podem existir imagens de lisossomos possivelmente digerindo mitocôndrias e/ou outras organelas (ALBERTS *et al.*, 1997). Contudo as disfunções associadas com as mitocôndrias, nos hepatócitos de *H. malabaricus* que ingeriram chumbo, foram muito mais recorrentes que em relação aos animais controles. Nestes, nem chegou-se a observar a autofagocitose: as mitocôndrias quase sempre estiveram próximas do retículo endoplasmático, mas isto mostrou-se uma situação distinta do envolvimento estreito daquela organela por essa.

Não há transporte vesicular conhecido entre o retículo endoplasmático e as mitocôndrias; em adição, as proteínas mitocondriais (inclusive as de membrana) são sintetizadas em polirribossomos livres no citosol (60-80%) ou pela expressão interna do próprio genoma mitocondrial. Esses fatos sugerem que a proximidade estreita entre as mitocôndrias e o retículo endoplasmático rugoso não é aleatória, mas determinada pelo reconhecimento de receptores, na superfície da mitocôndria. As imagens identificadas com autofagossomos ou autofagolisossomos precisariam ser vistas após marcação específica, para que sua natureza fosse comprovada.

O comprometimento mitocondrial causado pelo chumbo em *Hoplias malabaricus* parece estar associado, ou pelo menos foi acompanhado pela escassez de grânulos de glicogênio, o que se observou sempre com a condição de desorganiza-

ção generalizada do citosol. Contudo alguns hepatócitos dos animais que receberam 8 doses mostraram grânulos de glicogênio em abundância, mas também focos de consumo desse material; neste caso a quantidade e aparência das mitocôndrias pareceu normal, embora estivessem em estreita associação com o retículo endoplasmático rugoso. O consumo de substâncias de reserva energética está envolvido com processos metabólicos dependentes do acoplamento entre a produção de ATP e o consumo de energia pela célula.

Levando em conta a progressão da situação em que os hepatócitos mostram uma evidente desorganização na distribuição citoplasmática das principais organelas (8 doses), algumas células em necrose também foram visualizadas ao microscópio eletrônico. A necrose não é um processo natural em células saudáveis, pois a renovação celular de tecidos dá-se por apoptose que é um processo morfológicamente distinto: restos apoptóticos mostram-se como vesículas envoltas por membrana, subdivisões da antiga célula que são fagocitadas por macrófagos ou neutrófilos. Já a necrose provoca a liberação no interstício de substâncias responsáveis pela resposta inflamatória. No sangue hepático dos animais que ingeriram 8 doses de chumbo, a maior recorrência de células livres do sistema imunológico parece estar associada com esse processo. Tais células foram freqüentemente identificadas como os monócitos descritos por TAKASHIMA e HIBIYA (1995).

Os monócitos de peixes têm atividade fagocítica e apresentam antígenos aos linfócitos. Sua migração aos locais de inflamação ocorre junto com a dos granulócitos, mas os monócitos podem persistir no local em fases crônicas do processo. Os monócitos de peixes podem dar origem aos macrófagos, como em mamíferos, mas neste grupo a diferenciação celular é mais evidente TAKASHIMA e HIBIYA (1995).

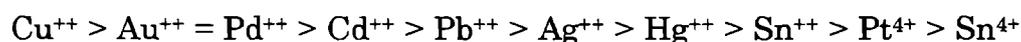
## Neurotoxicidade e atividade colinesterásica

O efeito neurotóxico do chumbo com alteração dos teores normais de neurotransmissores (acréscimo dos níveis de serotonina e histamina e decréscimo de GABA, MAO e ACh) em peixes expostos de forma crônica, foi relatado por BAATRUP (1991).

A respeito da atividade colinesterásica aferida com amostras de músculo axial de *Hoplias malabaricus*, nenhuma distinção comparativa entre os grupos tratados e controles foi significativa, quando da análise estatística (cf. Seção I.4.3.). Isso pode ter ocorrido devido ao baixo número amostral, somente três indivíduos em cada situação. Contudo, os resultados mostram que houve uma tendência à inibição progressiva da atividade colinesterásica, de acordo com a ordem cronológica das coletas de músculo (18 e 41 dias) e em relação ao grupo controle (cf. Figura 14).

Por outro lado, sabe-se que as colinesterases são enzimas que têm suas atividades catalíticas inibidas por vários compostos ou substâncias; destacam-se os metais pesados como chumbo e cádmio, os organofosforados e os carbamatos. Tais xenobiontes interagem com os grupos sulfidrila dessas proteínas alterando seu sítio ativo, numa inibição que pode ser estérica ou diretamente química.

Segundo Olson e Christensen em 1980, *apud* GILL *et al* (1991), vários metais, dentre eles o chumbo, podem provocar inibições neuroquímicas na espécie *Pimephales promelas* relacionadas com a atividade deficiente da AChE do músculo; Olson e Christensen propõem ainda a seguinte ordem de neurotoxicidade:



GILL *et al* (1991), com estudos *in vivo*, demonstraram a inibição da atividade da AChE causada pelo  $\text{Cd}^{++}$  em brânquias de *Barbus conchoniuis*, mas encon-

traram um acréscimo da atividade em músculo e cérebro. STURM *et al* (1999) estudaram a atividade colinesterásica (AChE e BChE) em 3 espécies de teleósteos e concluíram que no cérebro há atividade exclusiva da AChE, em contraste, no músculo as duas enzimas estão presentes.

FONTOURA-DA-SILVA e CHAUTARD-FREIRE-MAIA (1996) estudaram a variabilidade genética relacionada com a expressão da BChE em uma amostra de agricultores expostos a pesticidas (n = 72) e em uma amostra controle (n = 62). Para a expressão da BChE, as composições genótípicas variantes são dadas em dois *loci*, um com quatro possíveis alelos variantes e outro com dois. O estudo aponta que distintas expressões fenotípicas da BChE oferecem proteção diferencial contra a inibição da AChE de eritrócitos.

Portanto existe uma relação entre a presença da BChE com a inibição da AChE e, por conseguinte, com o efeito tóxico de um eventual xenobionte. Em peixes pode ocorrer algo parecido. A contribuição da atividade da BChE na atividade colinesterásica total (ChE), em músculo, variou entre as três espécies estudadas por STURM *et al* (1999). Eles também demonstram que a inibição da BChE por organofosforados foi maior que a da AChE.

STURM *et al* (1999) postulam a existência de uma AChE com propriedades atípicas em músculo e cérebro, além da existência de uma BChE atípica em músculo axial; esta última teve a propriedade de degradar a acetil- $\beta$ -(metil)tiocolina (substrato específico para a AChE) e também foi inibida por um bloqueador específico da AChE. Em adição, STURM *et al* (1999) citam outros trabalhos em que também foram descritas ChEs com propriedades bioquímicas anormais: degradam substratos diagnósticos da BChE, mas são inibidas por bloqueadores da AChE.

Um interferente que pode ter levado à não distinção significativa entre os três grupos aqui estudados (cf. **Figura 14**) é um suposto polimorfismo genético

intrapopulacional em *Hoplias malabaricus*, associado ao baixo número das amostras. Variantes fenotípicas da BChE, ou até mesmo da AChE, poderiam estar intervindo diferencialmente na inibição pelo chumbo.

As BChEs não degradam a acetilcolina *in vivo*. Neste âmbito, têm-se questionado sobre alguma função para a existência destas enzimas nos organismos (STURM *et al.*, 1999). Pode-se supor que estas proteínas tenham função de defesa, já que a sua não expressão gênica em mamíferos não causa nenhum efeito, a não ser aumentar a susceptibilidade a alguns xenobiontes, segundo Massoulié *et al.*, *apud* STURM *et al* (1999). Contudo este não é o único caso em que uma proteína parece não ter uma função específica, quando em condições normais. É mais sensato supor que as proteínas não tenham “função” alguma, num sentido finalista, mas simplesmente “funcionam” integrando sistemas biológicos complexos. Assim poderiam, em alguns casos, serem previamente aptas a novas interações, como aquelas que parecem ser de defesa ao observador.

### **Alterações cromossômicas e genotoxicidade**

Do bioensaio realizado com *H. malabaricus* também foram obtidos dados citogenéticos no Laboratório de Citogenética Animal, Dep. de Genética (SBC-UFPR). Com o processamento e análise de uma porção do rim anterior de cada animal, LEMOS (2000), em busca de alterações cromossômicas, pôde concluir que o Chumbo (II) possui efeitos genotóxicos, clastogênicos e possivelmente carcinogênicos para a espécie.

A **Tabela V** fornece as frequências em que foram observadas metáfases com uma ou mais alterações cromossômicas.

**Tabela V:** Frequência de alterações cromossômicas encontradas por LEMOS (2000) em *Hoplias malabaricus* expostas ao Pb (II).

<i>Traira n.º</i>	<i>sexo</i>	<i>Especificação do animal</i>	<i>N.º. de metáfases analisadas</i>	<i>f absoluta (e relativa) de alts. cromossômicas</i>
1	♂	21µg Pb / g traíra, ingerido em 4 doses, por 18 dias.	207	59 (18,84%)
2	♀		202	47 (23,27%)
3	♀		84	20 (23,81%)
4	♀	21µg Pb / g traíra, ingerido em 8 doses, por 41 dias.	200	38 (19,00%)
5	♂		207	39 (18,84%)
6	♂		95	18 (18,95%)
7	♀	Controles 41 dias.	203	5 (2,46%)
8	♀		209	0
9	♂		201	2 (0,99%)

Fonte: LEMOS (2000).

Nos indivíduos que receberam 4 doses (18 dias de exposição) foram observadas alterações cromossômicas em algumas metáfases, como: quebras (deleções) envolvendo apenas uma das cromátides, inversões pericêntricas (cromátides que parecem ter executado um giro de 180° na região do centrômero) e pequenos fragmentos de material genético desagregado, provavelmente resultantes de quebras envolvendo as duas cromátides. Nos indivíduos que receberam 8 doses (41 dias de exposição) foram observadas alterações cromossômicas semelhantes as do primeiro grupo e também poliploidia e modificações na estrutura do cromossomo, como regiões descondensadas que indicam desestruturação do cromossomo com aparentes problemas na espiralização das fitas de DNA (LEMOS, 2000).

As alterações cromossômicas como resposta ao chumbo são provavelmente causadas indiretamente pelo metal e devem-se ao metabolismo oxidativo anormal da célula, o que causa um acúmulo de espécies reativas de oxigênio, parcialmente reduzidas à água ( $O_2^-$ ,  $H_2O_2$  e  $OH^\cdot$ ). Estas por sua vez, podem causar inativação das enzimas envolvidas com a integridade e reparo do DNA, promoverem trocas na seqüência de bases e ainda atacar os resíduos de açúcar causando fragmentação, perda de bases e quebra de uma das fitas, segundo Friedberg *et al.* em 1995, *apud* LEMOS (2000).

Com um estudo realizado em duas indústrias brasileiras do estado de São Paulo, MONTEIRO *et al* (1985) encontraram aumento nas atividades eritrocitárias da superóxido dismutase e da glutathiona peroxidase, como resposta à exposição ocupacional de trabalhadores ao chumbo. DAGGETT *et al* (1998) demonstraram que o chumbo pode induzir a transcrição da glutathiona S-transferase em células de rim de ratos e que o aumento da atividade dessa enzima não está associado com outros indicadores de estresse oxidativo.

Em relação ao chumbo interferindo em processos controlados pelo núcleo, também há evidências de: aumento da renovação celular, com aumento de síntese de DNA e proliferação celular; afinidade do chumbo a ácidos nucléicos e a proteínas ácidas que regulam a replicação e a transcrição; desagregação de polirribossomos; inibição da incorporação da leucina no RNAt de *E. coli*; e despolimerização de RNA purificado (GOYER e MOORE, 1974).

De fato há evidências de que o chumbo possa ser, de forma indireta, genotóxico. Aberrações cromossômicas em número significativo já foram evidenciadas em linfócitos de populações humanas com 10 a 100 µg/100ml de chumbo no sangue (EWERS e SCHLIPKÖTER, 1991). KRISTENSEN *et al* (1993) revisam que o potencial genotóxico de compostos de chumbo é mais indireto que direto, possivelmente por inibir enzimas de reparo do DNA; ainda demonstraram que o chumbo inorgânico influencia em processos mutagênicos induzidos por ciclofosfamidas, em estádios tardios de espermatogênese e em espermatozoides de camundongos (mutações letais dominantes).

Há vários relatos de efeitos mutagênicos e carcinogênicos do chumbo em animais; e do aumento do risco teratogênico, do risco de abortos instantâneos, do risco de más formações congênitas e da incidência de câncer em humanos, por exposição ocupacional ao chumbo (EWERS e SCHLIPKÖTER, 1991; KRISTENSEN *et al.*, 1993).

Cerca de somente 5 a 10% da quantidade de chumbo ingerido por humanos é absorvido pelo epitélio intestinal (GOYER *et al.*, 1970; KARMAKAR *et al.*, 1986), o resto é eliminado com as fezes. Caso esse número seja próximo do que ocorre em peixes, a dose aqui empregada fica reduzida entre 1,05 e 2,10  $\mu\text{g Pb} \times \text{g}^{-1} \text{traíra} \times 120\text{h}^{-1}$ , caracterizando o forte efeito tóxico deste metal em células de *Hoplias malabaricus* expostas por 18 e 41 dias.

## I.6. CONCLUSÕES PARCIAIS

- ✓ A espécie *Hoplias malabaricus*, mostrou-se um excelente modelo biológico para estudos dos efeitos de xenobiontes administrados através da via trófica.
- ✓ Alterações na ultra-estrutura do fígado de *H. malabaricus*, analisadas através de microscopia eletrônica de transmissão, mostrou-se um eficiente biomarcador dos efeitos do Chumbo (II), após exposição crônica por via trófica.
- ✓ A perda da tendência à esfericidade dos núcleos encontrada nos hepatócitos de *H. malabaricus* pode estar relacionada aos efeitos do Chumbo (II) sobre a lâmina nuclear.
- ✓ O decréscimo em quantidade e desorganização posicional do retículo endoplasmático granular, é atribuído a possíveis efeitos do Chumbo (II) sobre o citoesqueleto.
- ✓ A autofagocitose mitocondrial, escassez de grânulos de glicogênio e células isoladas em necrose, observadas em hepatócitos de *H. malabaricus*, estão associados com a exposição ao Chumbo (II).

- ✓ A alteração não significativa na atividade colinesterásica de *H. malabaricus*, após exposição trófica ao Chumbo (II), mostrou que há a necessidade de uma amostragem maior para se comprovar o real efeito neurotóxico deste metal.

**CAPÍTULO II:**  
**BIOENSAIO COM *Oreochromis niloticus*,**  
**EXPOSIÇÃO AGUDA POR VIA HÍDRICA AO CHUMBO(II).**

## II.1 INTRODUÇÃO

### ***II.1.1. Características gerais da espécie***

*Oreochromis niloticus* é uma espécie originalmente considerada algívora, mas que eventualmente ingere insetos e vermes junto com algas do perífton (LOWE-MCCONNELL, 1999), pode portanto ser considerada onívora. É amplamente empregada em tanques de piscicultura de todo o mundo e está entre as espécies mais recomendadas para o cultivo intensivo em regiões tropicais e com alta densidade de estocagem; destaca-se pela rusticidade, curto ciclo de reprodução, crescimento rápido em boas condições e boa aceitação no mercado; possui maturação precoce, cujo efeito pode ser controlado com reversão sexual por administração de hormônio (RIBEIRO e CAETANO FILHO, 1995). A espécie é elemento da família Cichlidae, ordem Perciformes. É encontrada às margens dos corpos de água, onde desova, se protege e se alimenta. *O. niloticus* é nativa da bacia do rio Nilo e co-evoluiu com outras 5 espécies endêmicas de ciclídeos no lago Albert, de onde foram originalmente estocadas. Sua taxa de crescimento pode variar muito de acordo com as condições e fêmeas que maturam ainda jovens possuem ovócitos menores e em maior número, em relação ao peso total da fêmea (LOWE-MCCONNELL, 1999).

### ***II.1.2. Epitélio branquial***

A área da superfície das branquias é mais de 10 vezes superior que a do resto do corpo do peixe (FERGUSON, 1989). Teleósteos possuem 5 pares de arcos branquiais, mas o mais posterior geralmente apresenta-se como um par de ossos faríngeos e não desempenha nenhum papel na respiração. Cada elemento do par

possui um esqueleto visceral de sustentação (septos branquiais), vasos sanguíneos do respectivo arco aórtico, músculos branquiais intrínsecos, nervo craniano ou cervical associado e epitélio de revestimento relacionado. Teleósteos possuem vários pares de filamentos branquiais que se ramificam em direção posterior e em oposição aos septos branquiais (HILDEBRAND, 1995; TAKASHIMA e HIBIYA, 1995).

Os filamentos branquiais (ou lamelas primárias) possuem um suporte cartilaginoso, sistema vascular e epitélio de revestimento. Este último apresenta células com a superfície apical lembrando impressões digitais. Ao longo de cada filamento branquial emanam, transversalmente e de ambos os lados, vários pares de lamelas semicirculares enfileiradas, são as lamelas branquiais (ou lamelas secundárias) (TAKASHIMA e HIBIYA, 1995).

Cada lamela secundária lembra um fino “envelope” de 2 camadas epiteliais (simples ou duplas). As duas camadas são mantidas juntas por células de suporte (células pilares) que têm capacidade contráctil e também delimitam os capilares sanguíneos. De ambos os lados do “envelope” a integridade do epitélio é mantida por interdigitações, desmossomos e junções tipo compacta. Em nível de lamelas secundárias as trocas gasosas ocorrem por um mecanismo de contracorrente, isto é, o sangue flui em direção oposta a da água. Dependendo da espécie, o número de espaços entre 2 lamelas secundárias (por onde flui a água) varia de 10 a 60 por milímetro de filamento branquial, bem como o espaço entre 2 lamelas (20 a 100  $\mu\text{m}$ ) e a espessura da lamela (10 a 25  $\mu\text{m}$ ) (FERGUSON, 1989; PERRY e MCDONALD, 1993; TAKASHIMA e HIBIYA, 1995).

O epitélio branquial é um tecido extremamente sensível, altamente dinâmico e metabolicamente ativo, tendo participação crucial em processos importantes no organismo, como trocas gasosas, regulação osmótica e iônica, regulação ácido básica e excreção de nitrogênio (amônia em teleósteos) (MCDONALD e WOOD, 1993).

Além das células de revestimento que são responsáveis pela difusão de gases ( $O_2$  e  $CO_2$ ), outros dois tipos de células são importantes na superfície branquial: as células produtoras de muco e as células de cloreto ricas em mitocôndrias. As células de cloreto representam 10% do volume das células das brânquias, enquanto as células de muco, menos numerosas, integram 1% deste volume. Contudo as células de muco podem produzir quantidades substanciais de muco, como uma barreira físico-química a vários xenobiontes quando o animal está sob estresse (MCDONALD e WOOD, 1993).

O muco das brânquias contém sulfomicinas neutras e ácido siálico, este o principal ligante de cátions metálicos e responsável pela diminuição das taxas de difusão (influxo) dos metais nas brânquias (MCDONALD e WOOD, 1993).

O ácido siálico (ácido N-acetilneuroamínico: NANA) é um monossacarídeo (hexose) carregado negativamente. Além de ser secretado associado a glicoproteínas do muco, o NANA integra os glicolípídios da monocamada externa das membranas plasmáticas, ou da luz de organelas como o Complexo de Golgi, que é topologicamente equivalente ao exterior da célula. Da mesma forma pode estar associado a glicoproteínas transmembrana, como nos receptores de superfície celular ou nas glicoforinas de eritrócitos. O NANA confere aos glicolípídeos e glicoproteínas que o possuem importantes efeitos elétricos: “sua presença alterará o campo elétrico através da membrana e as concentrações de íons — especialmente  $Ca^{++}$  — na sua superfície externa” (ALBERTS *et al.*, 1997).

As células de cloreto têm importante participação no transporte trans-epitelial de íons pelas brânquias. Estas células podem exibir a função absorptiva ou secretora, em relação a cada íon e dependendo se o peixe é de água doce ou marinho. O transporte iônico através do epitélio branquial pode ser:

(i) paracelular: pelas junções entre 2 células epiteliais e a favor de um gradiente eletroquímico (de concentração e de potencial elétrico);

(ii) passivo (difusão facilitada): a favor de um gradiente eletroquímico e realizado por canais iônicos (proteínas integrais, transmembrana e multipasso) que formam poros hidrofílicos altamente específicos a íons;

(iii) ativo: contra um gradiente eletroquímico e acoplado estruturalmente a uma fonte energética; esta pode ser uma reação com variação negativa de energia livre, como no caso da hidrólise de ATP (transporte ativo primário), ou um gradiente eletroquímico de um segundo soluto (transporte ativo secundário).

O transporte ativo é sempre realizado por um *carrier*, também chamado de proteína carreadora, permease, ou transportador. Os *carriers* também podem realizar transporte passivo e são proteínas integrais, transmembrana e multipasso que diferem do canal iônico por atuarem como enzimas, ligando-se ao soluto (substrato) e mudando sua conformação para o transporte. No epitélio branquial os *carriers* são as ATPases, que operam como “bombas” acopladas à hidrólise de ATP.

Um teleósteo de água doce tem os fluidos corporais com concentrações em torno de 300 mOsm/litro e é hiperosmótico em relação ao ambiente em que se encontra (< 20 mOsm/litro). A água em excesso, que entra por osmose nas brânquias, deve ser excretada. Isto ocorre com a produção de uma urina diluída (cerca de 20 mOsm/litro) e copiosa (cerca de 5 ml/kg/h); os rins reabsorvem sais ativamente e o animal não bebe água, para evitar o influxo osmótico pelo trato digestivo. Devido a perda de sais por difusão facilitada nas brânquias, pele e urina (esta menor) o animal deve transportar íons ativamente da água para o sangue, através do epitélio branquial. Isto presumivelmente é feito pelas células de cloreto e possivelmente por outros tipos celulares que também utilizariam a hidrólise do ATP para tal, através das “bombas” Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase e Ca<sup>++</sup>-ATPase que mantêm a regulação operante. As células de cloreto transportam os íons Na<sup>+</sup> e Cl<sup>-</sup> independentemente e trocam estes eletrólitos pela amônia, prótons, e bicarbonato do sangue, estando também envolvidas com a regulação de pH e a excreção de nitro-

gênio. Uma grande variedade de hormônios afetam o operar das células de cloreto, numa complexa regulação endócrina (POUGH *et al.*, 1999; HEATH, 1995).

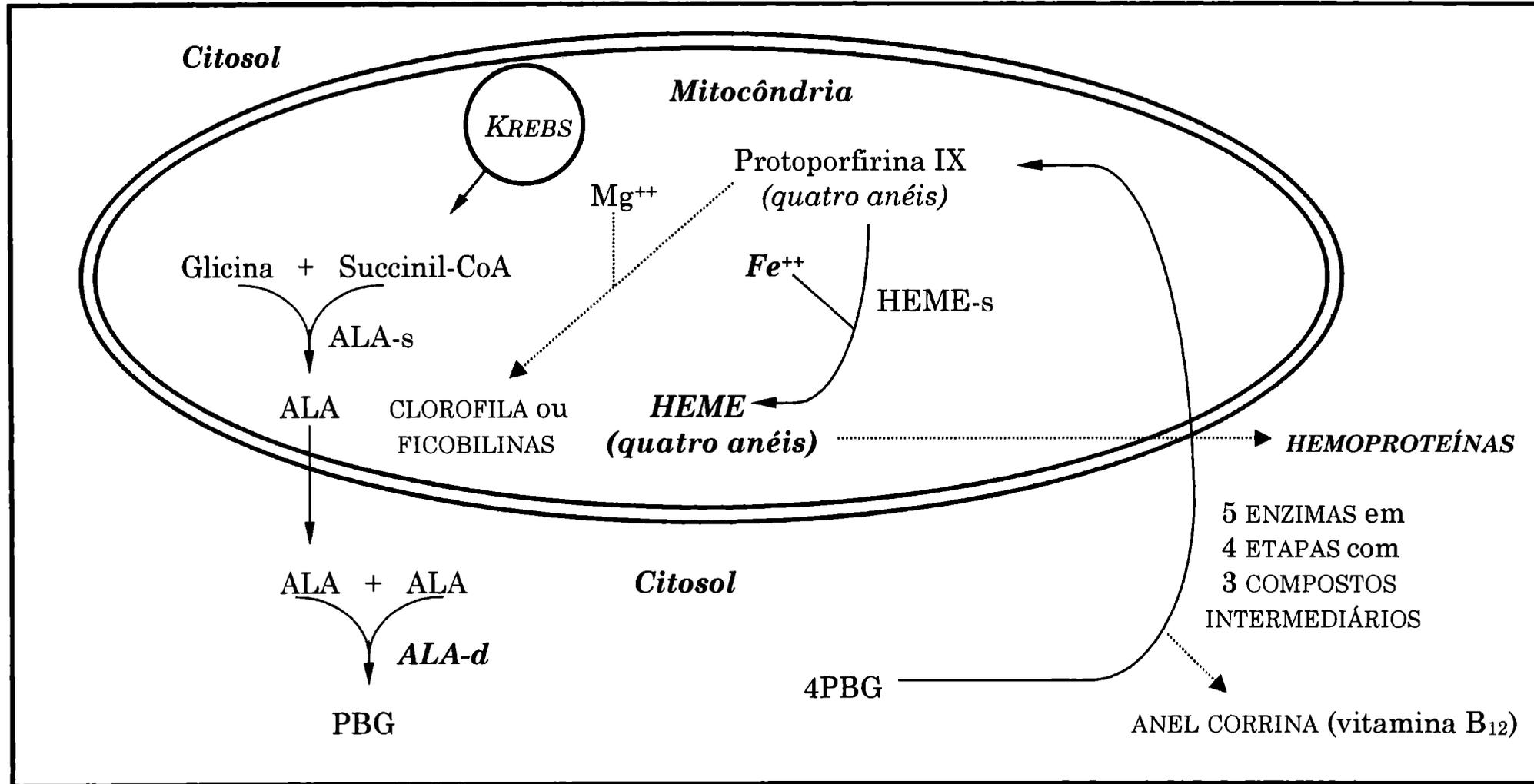
Alterações na regulação iônica e osmótica têm sido estudadas, em peixes expostos a xenobiontes, por métodos que envolvem a quantificação de eletrólitos ou da osmolaridade total no plasma ou soro sanguíneos. Isótopos radioativos e ensaios da atividade de ATPases podem servir de instrumentos para se medir as taxas de trocas iônicas entre sangue e água (HEATH, 1995).

Danos físicos causados por metais no epitélio branquial aumentam a permeabilidade iônica e têm sido apontados como condição *sine qua non* para a aclimatização fisiológica branquial subsequente. Esta pode ser definida como um acréscimo em tolerância fisiológica, a uma concentração usualmente letal de um xenobionte, que surge com a exposição crônica a uma concentração subletal do mesmo xenobionte (MCDONALD e WOOD, 1993).

### ***II.1.3. Grupo heme: biosíntese e funcionalidade***

Um dos efeitos do chumbo, que é comum a muitos vertebrados, é a anemia. Sintoma do saturnismo (em organismos humanos) ela é também observada em outros vertebrados, inclusive peixes. A anemia é conseqüência de um decréscimo em quantidade de grupos heme, que têm sua síntese alterada nas células contaminadas por chumbo: o metal torna inoperantes algumas das enzimas que participam do processo biosintético (HODSON *et al.*, 1984; PAIN, 1995).

O grupo heme é um composto molecular formado por quatro anéis dispostos de forma plana e resultantes de uma complexa rota de biosíntese (cf. **Figura 15**). Os quatro anéis formam um anel de porfirina, em cujo centro está um átomo de ferro, sustentado covalentemente por quatro átomos de nitrogênio nos vértices de um quadrado.



**Legenda:**

**HEME-s:** heme-sintetase ou ferro-quelatase; **ALA-d:** δ-aminolevulinato desidratase; **ALA-s:** δ-aminolevulinato sintetase; **setas cheias:** rota de síntese do grupo heme; **ALA:** ácido δ-amino-levulínico ou δ-aminolevulinato; **PBG:** porfobilinogênio (1 anel pirrólico); **setas pontilhadas:** rotas paralelas.

**Figura 15:** Rota de biossíntese do grupo heme.

Os grupos heme dão a cor vermelha ao sangue, mas sua principal participação nesse tecido é conseguir atrair a molécula de O<sub>2</sub>. Isto torna o sangue arterial vermelho escarlate (ZUBAY, 1993; DEVLIN, 1992; VOET e VOET, 1995).

A molécula heme é considerada o grupo prostético da metaloenzima que faz o transporte de oxigênio no sangue. A hemoglobina (Hb) está presente no interior dos eritrócitos e cada unidade protéica funcional possui quatro unidades heme, que capturam o oxigênio dissolvido e transportam-no dos pulmões aos tecidos periféricos. A rota de transformações que origina a Hb funcional, nos tecidos hematopoiéticos, é inibida na presença do chumbo. Segundo ZUBAY (1993), DEVLIN (1992), VOET e VOET (1995), HODSON *et al* (1984), EWERS e SCHLIPKÖTER (1991) e PAIN (1995) as três enzimas responsáveis pela formação da Hb funcional que têm suas atividades afetadas pelo chumbo são, na ordem das reações:

- (i)  $\delta$ -aminolevulinato sintetase ( $\delta$ -ALA-s);
- (ii)  $\delta$ -aminolevulinato desidratase ( $\delta$ -ALA-d);
- (iii) ferro-quelatase ou heme-sintetase (HEME-s).

#### $\delta$ -ALA-s

Enzima mitocondrial que catalisa a formação do  $\delta$ -aminolevulinato ou ácido  $\delta$ -amino-levulínico ( $\delta$ -ALA) em um processo dependente da coenzima piridoxal-5'-fosfato (PLP) um derivado da piridoxina (vitamina B<sub>6</sub>). Uma molécula de glicina e uma de succinil-CoA, este do ciclo de Krebs, são transformadas em uma molécula da  $\delta$ -ALA pela catálise promovida pelo complexo PLP —  $\delta$ -ALA-s (VOET e VOET, 1995). A presença do chumbo estimula esta ação catalítica pois a via é regulada pela concentração de heme, numa retroalimentação negativa (EWERS e SCHLIPKÖTER, 1991; GOYER e MOORE, 1974).

#### $\delta$ -ALA-d

Enzima citosólica que é inibida pelo chumbo (discutida na **Seção II.1.4**).

### *HEME-s*

Enzima mitocondrial que tem sua ação inibida pelo chumbo (EWERS e SCHLIPKÖTER, 1991). A catálise em condições normais consiste na incorporação do íon  $\text{Fe}^{++}$  ao centro da protoporfirina IX. Esta é a molécula resultante da ação de outras 5 enzimas, em 4 etapas: transformação e união de 4 anéis pirrólicos de porfobilinogênio (PBG). Com a inibição da heme-sintetase, o zinco ou o cobre podem ser incorporados no centro dos quatro anéis, ou simplesmente eles podem permanecer sem metal algum. Nos três casos os compostos resultantes são fluorescentes e passíveis de quantificação por espectrofluorometria (PAIN, 1995; EWERS e SCHLIPKÖTER, 1991).

Em relação a rota total de biosíntese do heme, quando afetada pelo  $\text{Pb}^{++}$ , pode-se supor:

- (i) o estímulo da  $\delta$ -ALA-s por escassez de grupos heme (retroalimentação negativa) promove uma maior concentração de  $\delta$ -ALA na célula;
- (ii) uma hipotética inibição completa das catálises promovidas pela  $\delta$ -ALA-d manteria esta maior concentração, com valor estipulado pela razão de 2 moléculas de  $\delta$ -ALA excedentes para cada PBG não formado;
- (iii) a inibição da HEME-s diminui a concentração de heme mitocondrial, mesmo se, eventualmente, algum PBG for produzido, numa rota livre da presença do  $\text{Pb}^{++}$ . Esse fato contribui para o item (i).

Grupos heme são sintetizados e estão presentes em todas as células eucarióticas, já que são requeridos na cadeia de transferência de elétrons (respiração celular). O heme está envolvido com a atração de elétrons pelas cargas positivas do metal ferro, átomo que muda do estado férrico ( $\text{Fe}^{+++}$ ) para o estado ferroso ( $\text{Fe}^{++}$ ), quando esse recebe um elétron (ALBERTS *et al.*, 1997). Isto pode assumir diferentes papéis no operar da célula eucariótica. A degradação do heme em células do fígado (exócrino) origina os pigmentos da bile.

O PBG, molécula precursora do heme, pode originar também outros compostos tetrapirrólicos, como os pigmentos clorofila  $\alpha$  e ficobilinas (cf. **Figura 15**). Além disso, outras metaloenzimas, que não a Hb, também possuem o grupo heme como parte não protéica da unidade (VOET e VOET, 1995). Algumas dessas hemoproteínas são comentadas abaixo, devido a sua importância ou relação com processos celulares de defesa a substâncias tóxicas:

**MIOGLOBINA (Mb):** correspondente em eficácia, na captura de oxigênio no sangue, a 1/4 da molécula de hemoglobina: possui somente uma subunidade e, por conseguinte, um grupo heme (MATHEWS, 1990).

**CITOCROMOS:** grande família de metaloenzimas coloridas que estão relacionadas com a presença de um grupo heme; os componentes deste variado grupo são classificados de acordo com seus picos de absorção espectral (MATHEWS, 1990).

**CITOCROMOS  $\alpha$ ,  $b$ , e  $c$ :** metaloproteínas envolvidas com o transporte de elétrons na cadeia respiratória mitocondrial; o ferro do heme serve como carreador de elétrons nas reações redox que reduzem o oxigênio à água, numa série de reações acopladas que fornecem o gradiente eletroquímico para síntese de ATP (MATHEWS, 1990).

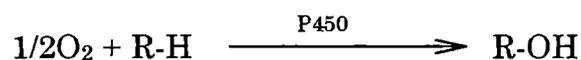
**CITOCROMO  $c$ :** é o único tipo que ocorre isolado e não integrante de membranas; além de participar do processo acima descrito, está envolvido com a morte celular programada (apoptose) essencial à renovação dos tecidos; quando na mitocôndria, encontra-se no espaço intermembranas (MATHEWS, 1990; ALBERTS *et al.*, 1997).

**COMPLEXO CITOCROMO  $b$ - $c_1$ :** possui pelo menos 8 cadeias polipeptídicas distintas, operando como um dímero de 500 kD; cada monômero tem 3 moléculas heme ligadas a citocromos  $b$  e  $c$  e a uma proteína de ferro-enxofre; complexo intermediário na cadeia de transporte de elétrons (ALBERTS *et al.*, 1997).

COMPLEXO CITOCROMO  $\alpha$ - $\alpha_3$  OXIDASE: heterodímero transmembrana de 300 kD com heme modificado (átomos de cobre adicionais); cada monômero possui pelo menos 9 cadeias polipeptídicas; catalisa o último passo da cadeia de transporte de elétrons, transmitindo 2 deles a um átomo de oxigênio (último acceptor na formação de H<sub>2</sub>O) (MATHEWS, 1990; ALBERTS *et al.*, 1997).

CITOCROMO  $b_5$  REDUTASE: envolvido com o metabolismo de ácidos graxos (MATHEWS, 1990).

COMPLEXO CITOCROMO *P450*: quando complexado ao monóxido de carbono, absorve fortemente a luz com  $\lambda = 450 \text{ nm}$ . É um complexo protéico integrante da membrana do retículo endoplasmático liso de células eucarióticas. Sua estrutura assemelha-se a do complexo citocromo  $\alpha$ - $\alpha_3$  oxidase; também possui o grupo heme modificado (reduzido); em sua atividade pode dispor do O<sub>2</sub> ou do CO como substratos (atraídos pelo ferro), para a hidroxilação de uma variedade de compostos lipossolúveis. Os compostos tornam-se solúveis na luz do retículo endoplasmático liso, o que ajuda na excreção e detoxificação:



Em reações dependentes das coenzimas NADH e NADPH, o complexo P450 pode transformar ácidos graxos, anéis esteróides, barbitúricos, benzo[a]pireno e outras drogas ou xenobiontes. A expressão do complexo é regulável pelos substratos, no fígado e outros tecidos (MATHEWS, 1990).

CATALASES: a catalase animal consiste de uma metaloproteína com 4 subunidades e 4 grupos heme. É uma enzima oxidativa do interior de organelas celulares (peroxissomos) e degrada o peróxido de hidrogênio em oxigênio e água, catalisando uma dismutação (um reagente é oxidado e o outro, reduzido) (MATHEWS, 1990):



Além disso, nas células de fígado e de rim as catalases comportam-se como peroxidases, usando o  $H_2O_2$  na oxidação de substratos orgânicos indesejáveis (p.ex.: álcool, fenóis, ácido fórmico e formaldeído). Assim, estes órgãos são essenciais à eliminação de moléculas tóxicas que entram na corrente sanguínea (ALBERTS *et al.*, 1997).

#### **II.1.4. A $\delta$ -aminolevulinato desidratase ( $\delta$ -ALA-d)**

##### **Propriedades estruturais e atividade catalítica**

A  $\delta$ -aminolevulinato desidratase ( $\delta$ -ALA-d; E.C.: 4.2.1.24), também conhecida como porfobilinogênio sintetase ou  $\delta$ -aminolevulinato hidrolase, pode ser encontrada na maioria das bactérias aeróbicas e em plantas e animais. A atividade catalítica da  $\delta$ -ALA-d permite a transformação química de duas moléculas de  $\delta$ -aminolevulinato ( $\delta$ -ALA) em um dos quatro anéis pirrólicos constituintes do grupo heme, o porfobilinogênio (PBG): ocorre uma condensação aldólica e uma ciclização, com eliminação de duas moléculas de água (HODSON *et al.*, 1984; RODRIGUES, 1987; cf. **Figura 15**).

Com sua ação catalítica diretamente inibida pelo  $Pb^{++}$ , a  $\delta$ -ALA-d é um componente citosólico não exclusivo dos eritrócitos e que requer indiretamente o metal zinco para sua catálise (RODRIGUES, 1987; BAINY, 1990). GIBSON *et al.* (1955) isolaram e purificaram pela primeira vez a  $\delta$ -ALA-d a partir de fígado de boi e demonstram que a enzima é facilmente solúvel em água e está presente quase que exclusivamente na fração solúvel das células. Wu *et al.* em 1974, *apud* RODRIGUES (1987) descreveram a estrutura cúbica octomérica da  $\delta$ -ALA-d, com simetria diédrica ( $D_4$ ). Cada monômero possui cerca de 35 kD e o conjunto, cerca de 280 kD, como revisado por RODRIGUES (1987).

De acordo com a fonte enzimática (microorganismo, animal ou vegetal) o pH ótimo para catálise varia de 6,2 a 9,5; a temperatura de máxima atividade *in*

*vitro*, de 40 a 65°C e o  $K_m$  (constante de Henri-Michaelis-Menten) de 0,14 até 6,6 mM (RODRIGUES, 1987).

A  $\delta$ -ALA-d é uma enzima sulfidrílica, segundo Tsukamoto *apud* BAINY (1990), quando de sua catálise, os grupos tiólicos do sítio ativo em estado reduzido são imprescindíveis para a plena atividade enzimática da  $\delta$ -ALA-d. De acordo com Gibbs, *apud* BAINY (1990), os grupos sulfidrila somam 32 grupos tiólicos reativos por octâmero (ou 4 grupos / subunidade) que atuam em quatro classes de reatividade distintas, observáveis com um agente bloqueador (DTNB): alta reatividade (tipos I e II), média (tipo III) e baixa (IV),

Das 8 subunidades constituintes da  $\delta$ -ALA-d, somente 4 reagem com o substrato (*half-site reactivity*) e postulou-se que a estrutura mínima para a atividade catalítica seria um dímero funcional formado por 2 subunidades, provavelmente com a mesma composição de aminoácidos.

O sítio ativo é composto por 2 resíduos de cisteína, um átomo de Zn, 1 ou 2 resíduos de histidina e de lisina e restos de aminoácido hidrofóbicos; fora do sítio ativo há 9 resíduos de tirosina, 4 de triptofano e 6 de metionina por subunidade (revisado por RODRIGUES, 1987). A presença do  $Pb^{++}$  no sítio ativo da  $\delta$ -ALA-d, com a interação entre o metal e seus grupos -SH, inibe sua atividade catalítica, segundo Tsukamoto *et al.* em 1979 e 1980, *apud* BAINY (1990). A enzima é sensível a vários metais *in vitro*, mas somente ao chumbo *in vivo* (HODSON *et al.*, 1984).

### **Zinco e apoenzima- $\delta$ -ALA-d**

O  $Zn^{2+}$  compõe estruturalmente a enzima funcional, em interações que estabilizam a estrutura da proteína, possibilitando sua conformação requerida à catálise e mantêm os grupos tiólicos em seu estado reduzido, o que promove proteção contra a inativação pelo oxigênio (revisado por RODRIGUES, 1987 e BAINY,

1990). Embora o  $Zn^{2+}$  e a apo- $\delta$ -ALA-d sejam elementos coletivamente suficientes para a catálise, o  $Zn^{2+}$  não é separadamente necessário, não interagindo com o substrato e permitindo, por ausência, que a apoenzima tenha atividade em condições anaeróbicas. Isso quer dizer que da ocorrência dos elementos causais pode-se deduzir o efeito, a catálise, mas sendo a recíproca impossível. Quatro íons  $Zn^{2+}$  por octâmero são requeridos para a máxima ativação da apo- $\delta$ -ALA-d (RODRIGUES, 1987 e BAINY, 1990).

### **Interação da $\delta$ -ALA-d com o DL-ditiotreitol (DTT)**

“O DTT, ou reagente de Cleland é um agente capaz de reduzir dissulfetos quantitativamente e de manter grupos tiólicos no estado reduzido (Cleland, 1964), bem como funcionar como eficiente quelante metálico.” (BAINY, 1990).

A inibição da  $\delta$ -ALA-d por íons metálicos ocorre pela formação de um mercaptídeo entre os cátions e os grupos  $-SH$  do sítio ativo da enzima, segundo Tsukamoto *et al.* em 1979 e 1980, *apud* BAINY (1990). Com a presença do DTT no meio ocorre a redução desses mercaptídeos com a remoção do íon metálico do sítio ativo. Portanto o DTT opera como reativador enzimático, ou protetor dos grupos  $-SH$ , mantendo-os no estado reduzido (BAINY, 1990).

### **Atividade da $\delta$ -ALA-d eritrocitária como biomarcador de exposição ao chumbo**

Com o decréscimo da atividade enzimática o substrato ( $\delta$ -ALA) aumenta em concentração, podendo ser excretado pela urina e nela detectado e quantificado (difícil em peixes); a inibição da atividade da  $\delta$ -ALA-d não é exclusiva aos eritrócitos, podendo ocorrer em células do cérebro, fígado, e rins de aves e mamíferos (PAIN, 1995). Em peixes a enzima é um bom indicador de hematopoiese e a inibição induzida pelo chumbo pode ocorrer no fígado, rins, baço e sangue (HODSON *et al.*, 1984).

A  $\delta$ -ALA-d parece ser uma enzima não funcional em eritrócitos de mamíferos, já que a formação da hemoglobina geralmente está completa antes da circulação de células vermelhas no sangue (HODSON *et al.*, 1984). Por consequência a inibição da atividade catalítica pode ocorrer não acompanhada da sintomatologia (anemia) ou de um decréscimo em produção de heme (HODSON *et al.*, 1984; PAIN, 1995). De fato muitos animais podem compensar a inibição da  $\delta$ -ALA-d: cães que ingerem quantidades de chumbo suficientes para inibir a catálise podem permanecer aparentemente saudáveis (PAIN, 1995).

Alterações da capacidade catalítica da  $\delta$ -ALA-d, causadas pela presença do chumbo em organismos, têm sido estudadas por métodos que envolvem ensaios bioquímicos *in vitro* e quantificação por espectrofotometria. Tal metodologia, aplicada a peixes por vários autores na década de 70, foi considerada como uma rápida, consistente, específica e sensível estimativa para concentrações de chumbo causando danos subletais; além disso o método serviria à identificação de fontes deste metal, por estimar graus de exposição de populações *in natura* (HODSON, 1976; HODSON *et al.*, 1977).

Nesse último trabalho estão evidenciadas correlações lineares significativas entre o *log* de concentrações de chumbo na água e no sangue e a atividade mensurável da enzima dos eritrócitos. Algumas variações deste método permitem a estimativa da atividade da  $\delta$ -ALA-d em pequenos peixes inteiros, dos quais é difícil a extração de tecidos (BURDEN *et al.*, 1998).

### **II.1.5. Escolha das concentrações administradas**

No experimento com *Oreochromis niloticus* foram testadas 2 concentrações nominais de Chumbo (II) dissolvido na água dos aquários: 100 e 300  $\mu\text{g/l}$ .

HODSON *et al* (1977) demonstraram uma inibição consistente na atividade da  $\delta$ -ALA-d eritrocitária de 4 espécies de peixes expostas ao  $\text{Pb}^{++}$  por via hídrica,

por 2 semanas e às concentrações mínimas de 10 µg/l (*Salmo gairdneri*, truta arco-íris), 90 µg/l (*Salvelinus fontinalis*, truta do arroio), 470 µg/l (*Carassius auratus*, peixe-ouro) e 90 µg/l (*Lepomis gibbosus*, pumpkinseeds).

BAINY (1990) estudou a inibição da  $\delta$ -ALA-d eritrocitária de *Pimelodus maculatus* (mandi). Além de outros vários resultados, em 2 dias de exposição dos animais ao Pb<sup>++</sup> por via hídrica, Bairy encontrou 78,76% e 85,84% de inibição da enzima para as concentrações reais de  $86,8 \pm 18,3$  µg/l e  $160,3 \pm 8,6$  µg/l, respectivamente e em relação à resposta controle média.

Em condições *in natura* há um série de fatores bióticos e abióticos que são variáveis, por vezes não mensuráveis e que influem na biodisponibilidade e na toxicidade do chumbo. Dentre eles, por exemplo: a presença de outros metais na água, parâmetros físico-químicos da água, a espécie considerada, o sexo e a idade dos animais e a condição fisiológica de cada organismo. Não obstante, além dos estudos em laboratório citados acima, para o estabelecimento das doses também foram considerados teores de chumbo na água de uma região impactada por chumbo.

A CETESB (1978-97) no período de 1983 a 1997 aferiu periodicamente a concentração de chumbo na água do rio Ribeira, junto ao município de Itaoca (SP). De 28 aferições observa-se uma média de 83,67 µg/l (desvio padrão = 136,06); o maior valor foi de 570 µg/l, 19 vezes maior que o limite máximo permísivel para abastecimento de água e preservação das comunidades aquáticas, segundo a resolução do CONAMA (1986) decreto n°.20. Por 8 vezes a concentração mostrou-se superior a 100 µg/l.

Na maioria dos *habitats* aquáticos as concentrações de metais são menores que o limite para detecção de alterações morfológicas em brânquias; além disso o espectro de variação dessas concentrações é grande e depende da toxicidade do metal, situando-se entre 1 e 1000 µg/l (MCDONALD e WOOD, 1993).

## II.2. OBJETIVOS

REALIZAR um bioensaio de exposição aguda (96 horas) com exemplares de *Oreochromis niloticus* (tilápia) expostos ao Chumbo (II) por via hídrica e em regime semi-estático.

PADRONIZAR a técnica para a determinação da atividade da enzima eritrocitária  $\delta$ -aminolevulinato desidratase (E. C.: 4.2.1.24) utilizando amostras de sangue de exemplares de *O. niloticus*.

DETERMINAR a atividade da  $\delta$ -ALA-d eritrocitária com o sangue de *O. niloticus* utilizadas no experimento de exposição hídrica e estabelecer se esta técnica é válida para futuras pesquisas com a espécie.

ESTUDAR os possíveis efeitos morfológicos nas brânquias de *O. niloticus* expostas ao Chumbo (II) por via hídrica, com análises realizadas através de microscopia eletrônica de varredura.

## II.3. MATERIAIS E MÉTODOS

### II.3.1. Bioensaio

Os espécimens de *Oreochromis niloticus* foram cedidos pela fazenda Canguiri (UFPR), Pinhais (PR), onde nas primeiras 3 a 3,5 semanas de vida a população de alevinos foi submetida a administração de 17- $\alpha$ -metil-testosterona (60 mg/kg de ração) para reversão sexual das fêmeas a machos.

Quinze tilápias do mesmo sexo e idade aproximada (cerca de 200g) foram randomicamente distribuídas em cada um dos 15 aquários, cada qual com 16 litros de água de torneira desclorificada.

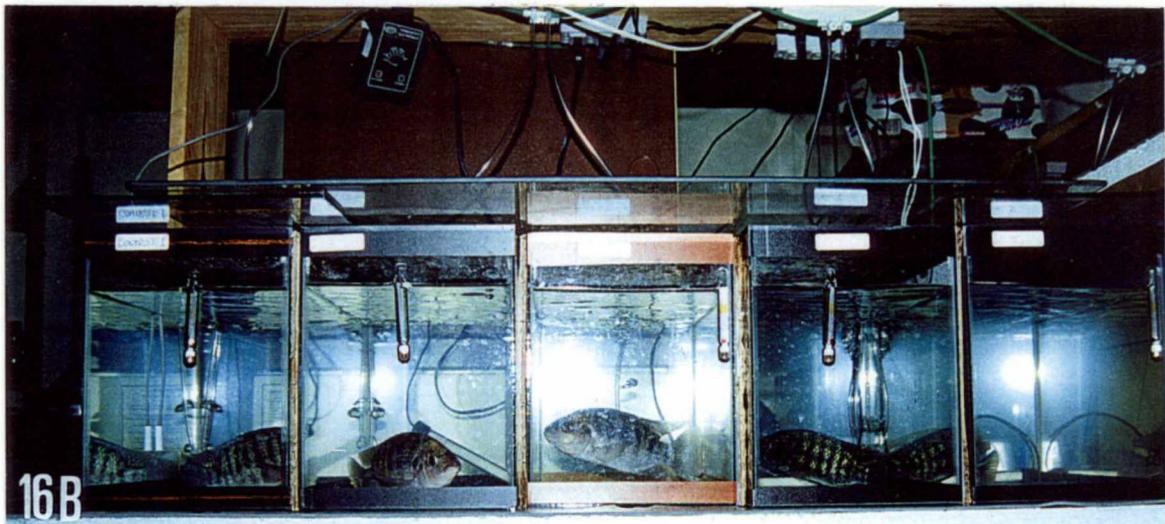
Influxo de ar constante, temperatura ( $23,6^{\circ}\text{C} \pm 1,7$ ) e fotoperíodo (12h luz : 12h escuro) foram controlados até o fim do experimento, respectivamente: com um sistema de bombas de ar integradas por mangueiras; com um sistema de termostatos e aquecedores (50W cada em 110V); e por *timer* controlador da luz ambiente. Houve jejum de todos os animais durante o período experimental em que estiveram no laboratório. A **Figura 16A** ilustra o sistema para os animais expostos em capela, os controles foram montados sobre bancada (cf. **Figura 16B**).

Após 120h de aclimatação dos animais, três sistemas paralelos foram elaborados de forma semelhante ao experimento anterior: 5 aquários sem adição de chumbo serviram como controles (peixes C), 5 aquários serviram para a exposição a concentração nominal de  $100 \mu\text{gPb/l}$  (peixes B) e 5 aquários para  $300 \mu\text{gPb/l}$  (peixes A). A fonte foi o sal  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ .

A exposição experimental ocorreu por 96h (aguda) e em regime semi-estático (2 ciclos de 48h) de troca de água reconstituída, esta segundo CETESB (1991b):  $133,5 \text{ mg MgSO}_4$ ;  $10,5 \text{ mg NaHCO}_3$ ;  $6,5 \text{ mg CaCl}_2$ ; e  $0,4 \text{ mg KCl}$  por litro de água destilada. Nenhum filtro interno foi utilizado.

Ao fim da exposição os animais foram anestesiados em água com 0,02% de MS-222 Sigma<sup>®</sup> (ácido etil-éster-3-aminobenzóico). Amostras de sangue heparinizado extraído da artéria caudal e de brânquias foram coletadas para as análises. O sangue foi imediatamente congelado em nitrogênio líquido (criotubos de 2 ml) até o momento do ensaio para atividade da  $\delta$ -ALA-d. Padronizou-se a coleta de brânquias para todos os peixes: segundo arco branquial esquerdo em norma anterior, que foi logo em seguida fixado para análises estruturais.

**Figura 16:** Laboratório de Bioensaios: exposição aguda de *Oreochromis niloticus* ao Chumbo (II) por via hídrica e em regime semi-estático. Vista geral dos animais expostos em capela (A), controles sobre bancada (B) e detalhe do animal C2 (controle)(C).



**Figura 16**

### ***II.3.2. Estrutura superficial de brânquias***

As brânquias foram escolhidas como órgão alvo pois são a primeira barreira biológica a xenobiontes biodisponíveis por via hídrica.

As peças de brânquias foram fixadas em glutaraldeído a 3% em tampão cacodilato 0,1 M, pH 7,2 por 12h e estocadas refrigeradas (4°C) no fixador por 20 dias. Após este período as peças foram lavadas e desidratadas por bateria etanólica de concentrações crescentes: 3 lavagens de 5 minutos cada em álcool a 70%; banho de 10 minutos em etanol a 95%; e 2 banhos de 15 minutos cada em etanol absoluto. Os 3 últimos banhos foram realizados com etanol da Merck®.

Após desidratação as peças foram sujeitas à substituição do etanol pelo dióxido de carbono líquido (ponto crítico), metalizadas com ouro, observadas e fotografadas no microscópio eletrônico de varredura Philips®, SEM - 505. Esses quatro últimos procedimentos foram realizados no Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR.

### ***II.3.3. Quantificação da atividade da $\delta$ -ALA-d eritrocitária***

O método empregado para a  $\delta$ -ALA-d eritrocitária foi modificado de HODSON (1976 e comunicação pessoal), HODSON *et al* (1977), RODRIGUES (1986) e BAINY (1990). As modificações são detalhadas na discussão (cf. **Seção II.5.1.**) mas de forma geral compreendem uma mescla dos procedimentos utilizados por esses autores e uma adaptação para leitura em espectrofotômetro de microplaca. Uma outra diferença é que aqui a atividade é expressa em relação a concentração de hemoglobina no sangue e não em relação ao micro-hematócrito (razão percentual do volume de eritrócitos pelo volume de sangue) como nos trabalhos citados. Para as determinações, foi usado o espectrofotômetro Benchmark Microplate Reader da BioRad®.

Aproximadamente 1 ml de sangue de cada tilápia foi extraído da artéria caudal dos animais. O sangue foi congelado imediatamente em nitrogênio líquido até o procedimento dos ensaios bioquímicos. Para estes, foram preparadas as soluções descritas abaixo e as concentrações usadas são comentadas na discussão (cf. **Seção II.5.1.**). Os seguintes passos foram seguidos:

#### **Tampão fosfato monossódico/disódico; 0,1 M; pH 6,3 (TFS 0,1/6,3)**

Pesar 2,76 g de fosfato monobásico ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) e completar 100 ml com água destilada e deionizada ( $\text{H}_2\text{O-D/D}$ ), para 0,2 M. Pesar 7,17 g de fosfato dibásico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ) e completar 100 ml com  $\text{H}_2\text{O-D/D}$ , para 0,2 M. Juntar 77 ml da primeira solução e 23 ml da segunda, para pH 6,3. Aferir o pH e corrigir, se necessário. Completar 200 ml com  $\text{H}_2\text{O-D/D}$ , para 0,1 M. Estocar refrigerado a 4°C. Filtrar o tampão com milipore antes do uso.

#### **Solução A: Triton X-100 a 0,5% em TFS 0,1/6,3**

Para 7 peixes, juntar 0,1 ml de triton X-100 (detergente para análises bioquímicas) com 19,9 ml de TFS 0,1/6,3, agitar manualmente para dissolução. Guardar a solução refrigerada (4°C) até o uso. Fazer a solução pouco antes do uso.

#### **Solução B: $\delta$ -aminolevulinato-hidrocloreto ( $\delta$ -ALA.HCl) a 804 $\mu\text{g/ml}$ em A**

Para 7 peixes, pesar 0,0121 g de  $\delta$ -ALA.HCl e adicionar 15 ml da solução A refrigerada, para 804  $\mu\text{g/ml}$ . Esta concentração corresponde a 629  $\mu\text{g/ml}$  de substrato sem o hidrocloreto ( $\delta$ -ALA). O substrato deve ser estocado a -20°C e a pesagem deve se dar o mais rápido possível. Guardar a solução refrigerada (4°C) até o uso. Fazer a solução pouco antes do uso.

#### **Solução C: DL-ditiotreitól ( $\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}_2\text{S}_2$ ) a 508 mM**

Pesar 0,2351 g de DL-ditiotreitól (DTT) e adicionar 3 ml de  $\text{H}_2\text{O-D/D}$  refrigerada. O DTT deve ser estocado a -20°C e a pesagem deve ser rápida. Guardar a solução refrigerada (4°C) até o uso. Fazer a solução pouco antes do uso.

**Solução D: solução de ácido tricloroacético (TCA) e HgCl<sub>2</sub>**

Para 7 peixes, pesar 2 g de TCA e 1,35 g de HgCl<sub>2</sub>, juntar e adicionar aproximadamente 35 ml de H<sub>2</sub>O-D/D, dissolver a quente com agitação e completar 50 ml com H<sub>2</sub>O-D/D.

**Solução E: reagente de Ehrlich (reagente de cor)**

Para 7 peixes, pesar 0,1455 g de p-dimetil-amino-benzaldeído e 0,0159 g de HgCl<sub>2</sub>, juntar e adicionar 6,1091 ml de ácido acético glacial, mais 1,4545 ml de ácido perclórico a 70% e 0,4364 ml de H<sub>2</sub>O-D/D. Guardar a solução refrigerada (4°C) até o uso. Fazer a solução pouco antes do uso.

Todas as soluções foram preparadas em excesso, para pipetagem segura. O ensaio com as tilápias do bioensaio deu-se em duas vezes (7 peixes por vez) e foram gastos 4 dias no total. Para cada animal usou-se 10 endorfses: 2 brancos, 4 com DTT e 4 sem DTT. Todas as absorvâncias consideradas para cada amostra de sangue foram médias de no mínimo três valores (exceto brancos): a quadruplicata analítica permitiu que um dos valores, o mais distante da média, fosse desconsiderado no caso de erro de pipetagem.

O sangue total foi descongelado sob gelo moído e uma alíquota de cada peixe serviu à quantificação da hemoglobina (g/dl). O restante foi alíquotado como descrito acima (10 endorfses/peixe) e submetido a uma hemólise (Triton X-100) para que a enzima do interior dos eritrócitos fosse liberada em solução. O substrato ( $\delta$ -ALA) foi adicionado (exceto nos brancos) e o preparado foi incubado a 37°C por 1h. Após a interrupção da reação enzimática (desproteínização com TCA e HgCl<sub>2</sub>) as alíquotas foram centrifugadas (10 minutos a 4900 rpm) e o sobrenadante pipetado sobre microplaca de leitura em espectrofotômetro.

Todo o material usado, até a parada da reação, foi mantido sob gelo moído ou refrigerado a 4°C. O resultado final do ensaio consistiu da quantificação do produto da catálise da  $\delta$ -ALA-d, o PBG, que produz a cor vermelho-rósea quando

reage com o Ehrlich (reagente de cor). A intensidade da cor varia com a concentração de PBG e isto é quantificável pelo espectrofotômetro, com o filtro para absorção de luz com 550 nm de comprimento de onda.

O **Quadro 1** compila detalhadamente o procedimento seguido, as concentrações utilizadas, as condições na incubação da enzima e a demanda exata de reagentes.

O uso do DTT no ensaio enzimático teve por finalidade a reativação catalítica da  $\delta$ -ALA-d. Uma maior reativação enzimática indica uma maior quantidade de chumbo acumulado no sangue. Calculou-se então o  $\Delta\%$  de reativação enzimática da  $\delta$ -ALA-d que, como em BAINY (1990), é expresso por:

$$\Delta\% \text{ de reativ.} = (\text{ativ. com DTT} - \text{ativ. sem DTT}) \times 100 / \text{ativ. com DTT}$$

<b>PROCEDIMENTO de aferição de porfobilinogênio em sangue de <i>Oreochromis niloticus</i></b>						
coletar cerca de 1 ml (ou mais) de sangue heparinizado			[substrato] na incubação: 524,5 µg/ml ou 4 mM ou 28,57 x Km			
misturar minuciosamente o sangue (sem hemólise)						
congelar (opcional) em nitrogênio líquido; descongelar a 4oC						
remover alíquotas p/ hemoglobinometria						
aliquotar o sangue nos tubos (10 ependorfes/peixe)						
			<i>volumes adicionados, por peixe, em cada um dos 10 tubos (µl)</i>			<b>DEMANDA DE REAGENTES POR PEIXE (ml)</b>
			2x BRANCO	4x ENSAIO	4x DTT	
água destilada/deionizada:			25	25	10	
A: triton X-100 a 0,5% em TFS 0,1M; pH 6,3:			250	\\	\\	0,50
B: ALA a 629 µg/ml (em A):			\\	250	250	2,00      2,50 de A
C: DTT a 508 mM (quelante, protetor sulfidrilico):			\\	\\	15	0,06 [DTT] na incubação:
sangue total (brancos: 1 a 1 até a parada da reação e agitação):			25	\\	\\	\\      25,4 mM
VORTEX COM OS BRANCOS						
D: TCA a 40 mg/ml e HgCl2 a 99,45 mM (precipitante):			700	\\	\\	\\
VORTEX COM OS BRANCOS						
sangue total:			\\	25	25	0,25
<i>tudo no GELO até aqui</i>						
VORTEX EM TUDO						Volume de incubação: 300 µl
INCUBAÇÃO (1h a 37oC)						(exceto brancos)
D: TCA a 40 mg/ml e HgCl2 a 99,45 mM (precipitante):			\\	700	700	7,00
VORTEX						
<i>[overnight opcional a 4oC]*</i>						
VORTEX						
CENTRIFUGAÇÃO: 10 minutos a 4900 rpm						
remover sobrenadante (SN) para novos ependorfes						
<i>[overnight opcional a 4oC]*</i>						
VORTEX						
<b>MICROPLACA</b>			SN:	100	100	100
E: EHRLICH (reagente de cor) [T]:				100	100	100
ler ABSORBÂNCIA a 550 nm após exatamente 15 min.			pipetagem de E fracionada na placa (1 peixe/minuto)			
* ler em até 24h após a parada da reação			No máximo 9 peixes por vez (1 peixe por linha de placa)			
[T]: marcar tempo no início da pipetagem de cada peixe						

**Quadro 1:** Ensaio para determinação da atividade da delta-aminolevulinato desidratase em sangue de *O. niloticus*.

Para o cálculo e expressão dos resultados analíticos da atividade catalítica da  $\delta$ -ALA-d, HODSON (1976) utiliza a seguinte fórmula:

$$\text{Atividade} = (\text{OD} \times \text{D}) / (\text{t} \times \text{H})$$

onde:

**OD** = valor de absorvância;

**D** = fator de diluição do reagente de Ehrlich (adimensional);

**t** = tempo de incubação (em horas);

**H** = valor do hematócrito percentual dividido por 100 (em mililitros).

HODSON (1976) expressa os valores encontrados em unidades, por mililitros de eritrócitos, por hora. Esta forma de expressão, embora não reflita a quantidade exata da taxa de produção de PBG (produto da catálise), serve para a comparação e análises estatísticas entre os grupos de animais tratados e controles. A fórmula supracitada foi aqui adaptada para a expressão em função da concentração de hemoglobina no sangue, ao invés do hematócrito percentual. A atividade pôde então ser expressa em: unidades, por concentração de hemoglobina, por tempo. Para tal empregou-se a seguinte fórmula:

$$\text{Atividade} = (\text{OD} \times \text{D}) / (\text{t} \times [\text{Hb}])$$

onde:

**OD** = absorvância média de cada ensaio menos absorvância média dos brancos, a 550 nm;

**D** = fator de diluição do reagente de Ehrlich, ou

$$\begin{aligned} & \text{volume de sobrenadante} + \text{volume de Ehrlich} / \text{volume de Ehrlich} = \\ & = 100 \mu\text{l} + 100 \mu\text{l} / 100 \mu\text{l} = \mathbf{2}; \end{aligned}$$

**t** = tempo de incubação (**1h**);

**[Hb]** = concentração de hemoglobina no sangue (em **g/dl**);

Os animais do grupo A (300 µgPb/l) e os do grupo B (100 µgPb/l) forneceram 5 amostras de sangue por grupo, uma de cada peixe. Uma amostra de sangue do grupo controle (n =4) foi perdida.

A concentração de hemoglobina nas amostras de sangue foi determinada pelo Laboratório de Hematologia, Dep. de Patologia Básica (SS-UFPR).

O tratamento estatístico dos resultados (atividade da δ-ALA-d, concentração de hemoglobina e reativação enzimática) foi realizado com programa GraphPad Prism®, v.3.00, © 1994-1999 e consistiu de dois testes em sequência:

- (i) análise de variância a um critério (ANOVA *one way*), para comparação entre as médias dos três grupos, com um nível crítico de significância de 5%;
- (ii) teste de Tukey, para comparações múltiplas entre os grupos, com um nível crítico de significância de 1%.

## II.4. RESULTADOS

Não houve mortalidade de *Oreochromis niloticus* durante os períodos de aclimação e experimental, de exposição aguda, e os peixes permaneceram aparentemente saudáveis até o final do experimento. A temperatura da água dos aquários manteve-se a  $23,6^{\circ}\text{C} \pm 1,7$ ; o pH manteve-se em  $7,7 \pm 0,1$  e a condutividade a  $134,8 \pm 5,5$  mOs. Para estes parâmetros, não houve diferença significativa entre os 3 grupos paralelos: ANOVA a um critério (pH: P = 0,60; condutividade: P = 0,63; temperatura: P = 0,71 a 0,85). Não houve nenhuma alteração macroestrutural nas brânquias, no momento da coleta.

### II.4.1. Superfície do epitélio branquial de *O. niloticus*

O epitélio branquial é um tecido pavimentoso que recobre os filamentos e as lamelas branquiais de *Oreochromis niloticus*. Nos filamentos branquiais as

células do epitélio de revestimento têm a superfície apical lembrando impressões digitais, já nas lamelas a superfície é lisa (cf. **Figura 17**).

Não houve alteração consistente na superfície das brânquias que pudesse ser associada à presença do chumbo na água. Apenas o enrugamento epitelial e um espessamento na base das lamelas foi observado. Contudo essas características ou devem-se ao preparo do material ou não foram observadas de forma que se possa concluir que são devidas ao chumbo. A **Tabela VI** compila a análise dessas alterações, que estão ilustradas na **Figura 18**.

**Tabela VI:** Análise da superfície branquial de *O. niloticus* após exposição hídrica de 96 horas.

<b>Ocorrência:</b>	<i>efE</i>	<i>elE</i>	<i>Ebl</i>	<i>efN</i>	<i>elN</i>	<i>blN</i>
No grupo A (300 µgPb <sup>++</sup> × l <sup>-1</sup> × 96h <sup>-1</sup> )	+	0	+	+	+	+
No grupo B (100 µgPb <sup>++</sup> × l <sup>-1</sup> × 96h <sup>-1</sup> )	0	+	0	+	+	+
No grupo C (animais controles)	0	0	0	+	+	+
Em todos os animais de cada grupo	0	0	0	+	+	+

(+): presente

(0): ausente

**Características:**

*efE*: epitélio do filamento enrugado; *elE*: epitélio da lamela enrugada;

*Ebl*: espessamento da base da lamela;

*efN*: epitélio do filamento normal; *elN*: epitélio da lamela normal;

*blN*: base da lamela normal

**ORGANIZAÇÃO DA SUPERFÍCIE DO EPITÉLIO BRANQUIAL  
DE *Oreochromis niloticus* EMPREGADAS NO BIOENSAIO:**

Identificação dos exemplares de *O. niloticus*:

**Tilápias A1, A2, A3, A4 e A5:** expostas por via hídrica a  $300 \mu\text{gPb}^{++} \times \text{l}^{-1} \times 96\text{h}^{-1}$ ;

**Tilápias B1, B2, B3, B4 e B5:** expostas por via hídrica a  $100 \mu\text{gPb}^{++} \times \text{l}^{-1} \times 96\text{h}^{-1}$ ;

**Tilápias C1, C2, C3, C4 e C5:** animais controles.

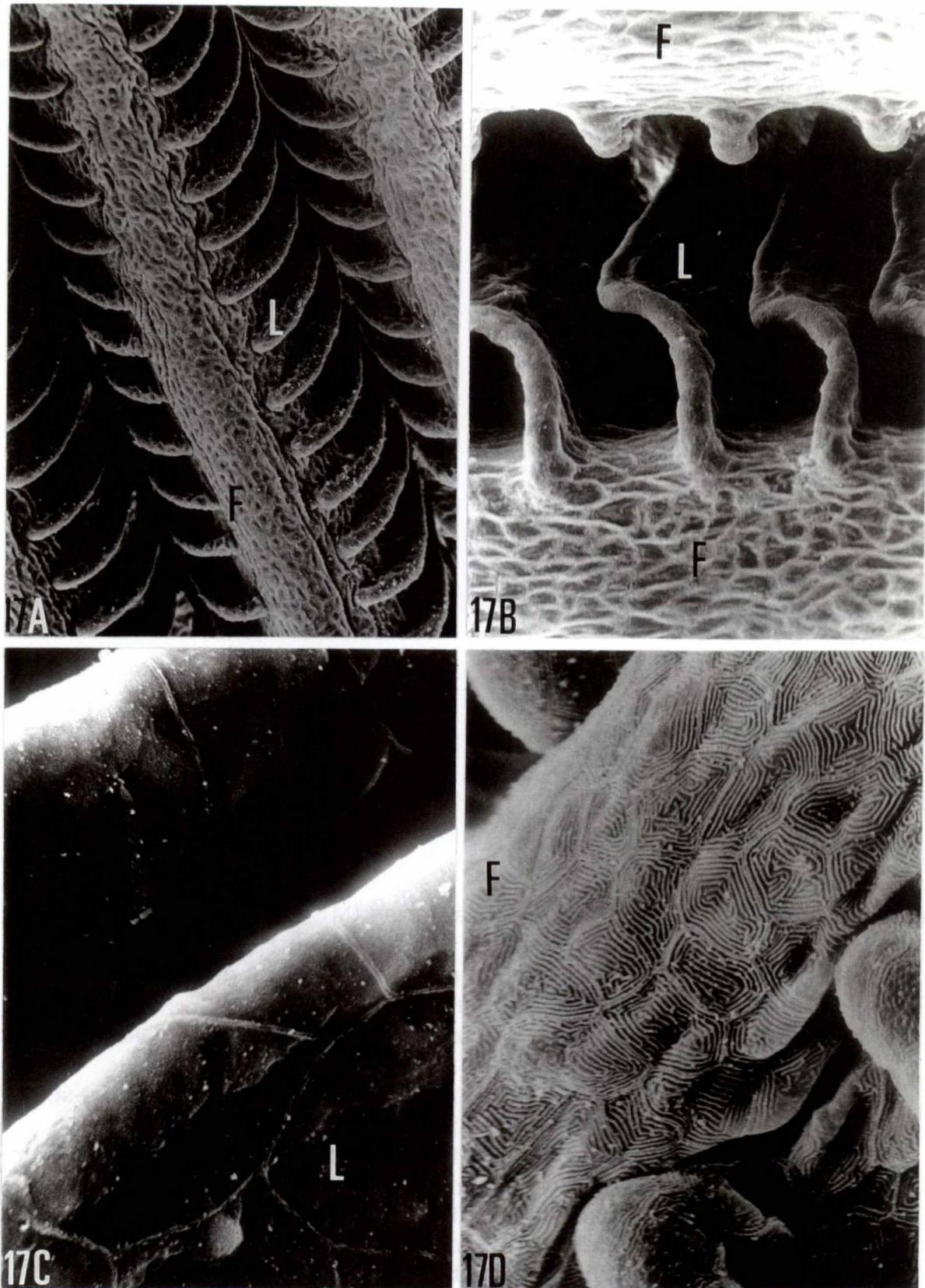
**Figura 17:** Estrutura superficial das brânquias (MEV) de quatro exemplares controles de *O. niloticus*:

**17A:** tilápia C4, filamentos branquiais (F) e lamelas branquiais (L);  
Aumento: **X309**;

**17B:** tilápia C3, filamentos branquiais (F) e lamelas branquiais (L);  
Aumento: **X584**;

**17C:** tilápia C1, epitélio branquial da lamela (L);  
Aumento: **X2473**;

**17D:** tilápia C2, epitélio branquial do filamento (F) com a superfície apical das células lembrando impressões digitais; Aumento: **X2473**.



**Figura 17**

**Figura 18:** Estrutura superficial das brânquias (MEV) de três exemplares de *O. niloticus*, expostos ao chumbo por via hídrica durante 96h:

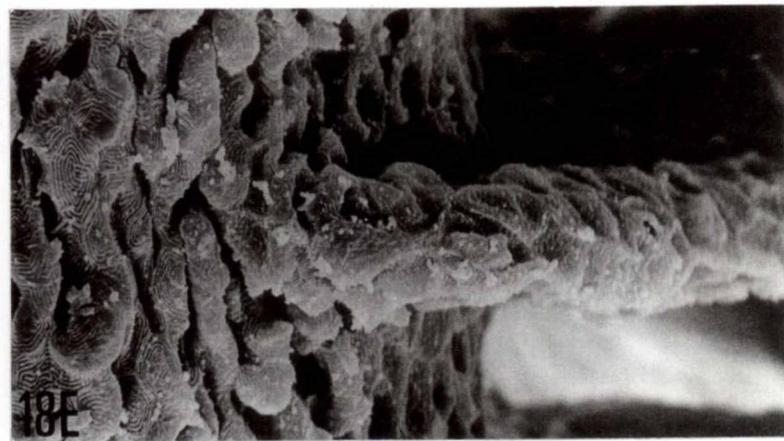
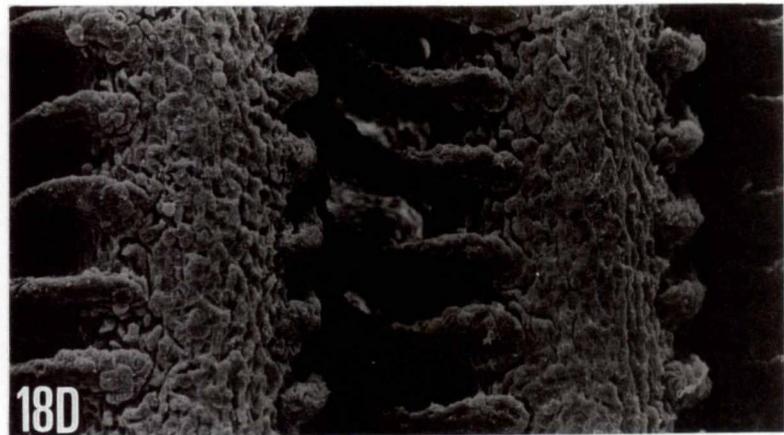
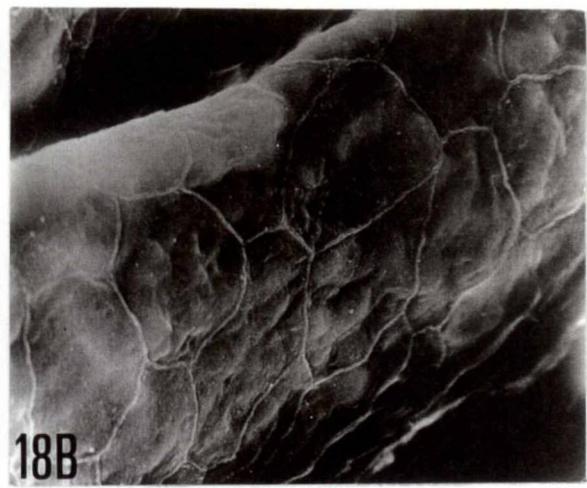
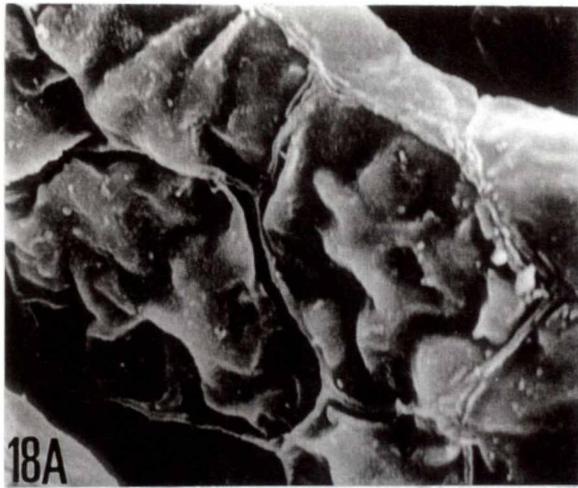
**18A:** tilápia B1 ( $100 \mu\text{g Pb}^{++} \times \text{l}^{-1}$ ); epitélio branquial da lamela alterado (superfície enrugada); Aumento: **X2473**.

**18B:** tilápia A5 ( $300 \mu\text{g Pb}^{++} \times \text{l}^{-1}$ ); epitélio branquial da lamela sem alteração evidente; Aumento: **X1288**.

**18C:** tilápia B1 ( $100 \mu\text{g Pb}^{++} \times \text{l}^{-1}$ ); filamento e lamelas branquiais sem alteração evidente; Aumento: **X618**.

**18D:** tilápia A4 ( $300 \mu\text{g Pb}^{++} \times \text{l}^{-1}$ ); filamento branquial com a superfície epitelial enrugada e espessamento das bases das lamelas branquiais, junto ao filamento; Aumento: **X309**.

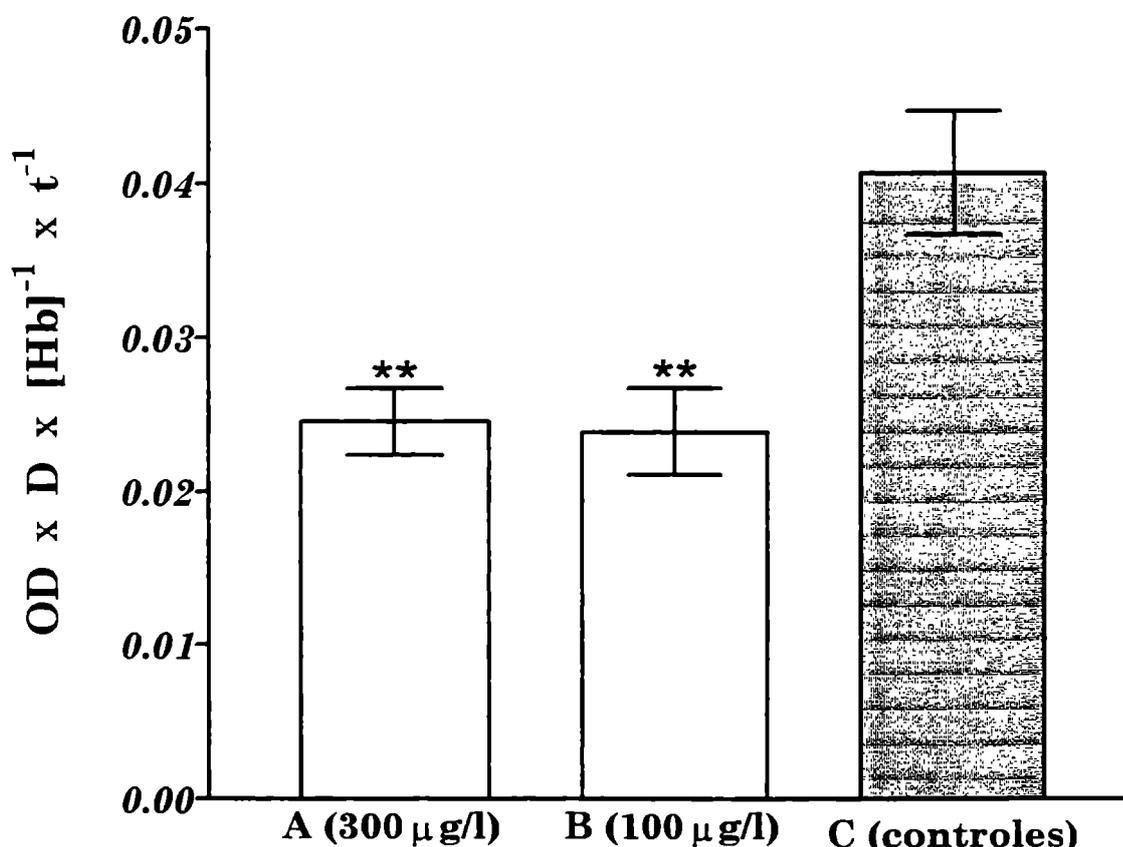
**18E:** tilápia A4 ( $300 \mu\text{g Pb}^{++} \times \text{l}^{-1}$ ); detalhe do filamento branquial com a superfície epitelial enrugada; ausência do espessamento das bases das lamelas branquiais; Aumento: **X1288**.



**Figura 18**

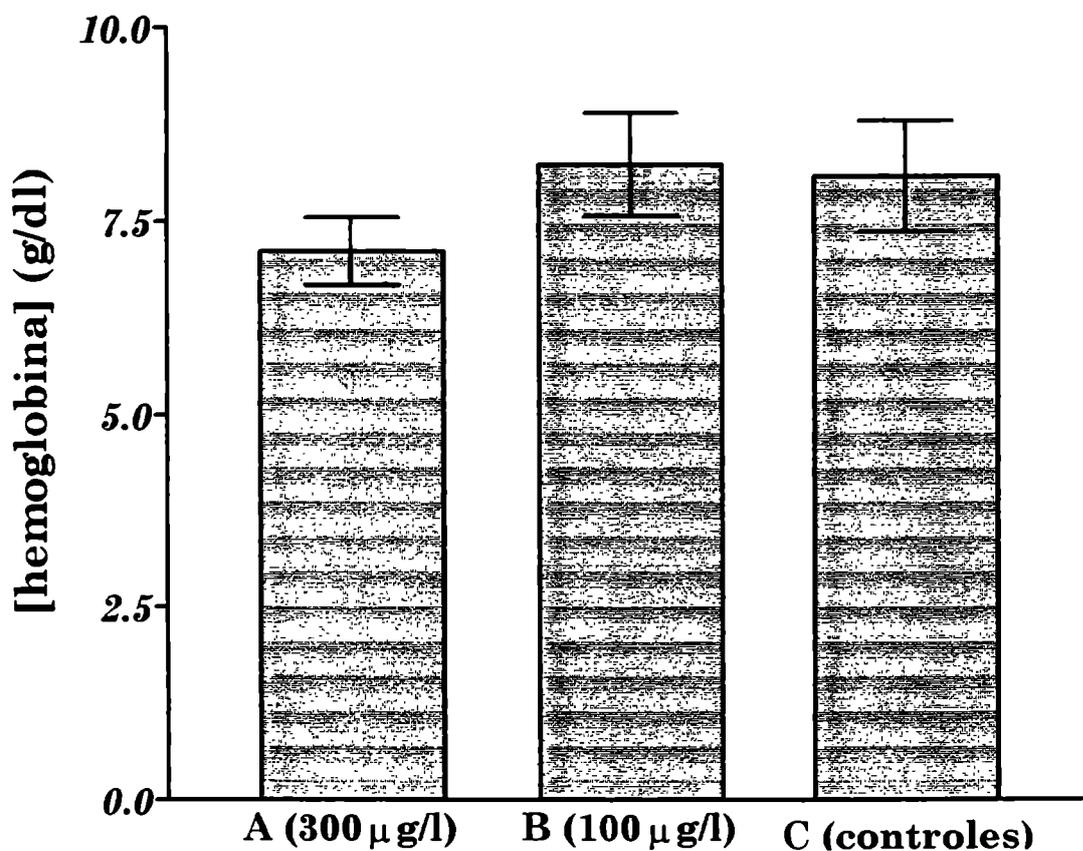
### II.4.2. Inibição da $\delta$ -ALA-d eritrocitária pelo chumbo

O método aqui empregado, para determinação da atividade da  $\delta$ -ALA-d eritrocitária de *Oreochromis niloticus*, mostrou-se eficiente na constatação de inibição enzimática, nas condições controladas do bioensaio laboratorial realizado. O Anexo 3B-D copila as análises estatísticas dos dados desta seção (II.4.2.). Foi constatada uma inibição significativa na atividade da  $\delta$ -ALA-d eritrocitária (cf. Figura 19) para ambas as concentrações testadas. Não houve diferença significativa entre os grupos A e B ( $P > 0,05$ ) ou seja, a inibição não foi dose-dependente, mas cada grupo tratado diferiu do grupo controle ( $P < 0,01$ ).



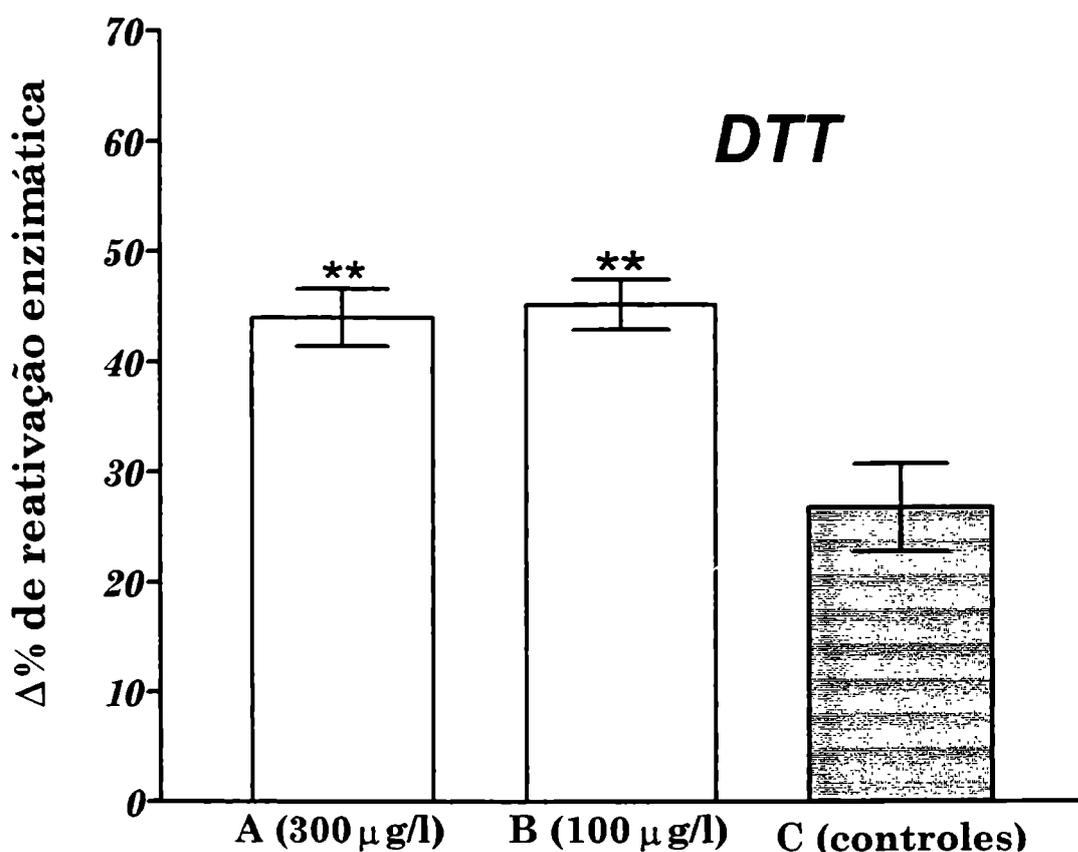
**Figura 19:** Inibição da atividade da  $\delta$ -ALA-d eritrocitária de *Oreochromis niloticus* expostas a duas concentrações de Chumbo (II) por via hídrica, por 96h e em regime semi-estático. Incubação a 37°C; OD: absorvância média de cada ensaio menos absorvância média dos brancos; D: fator de diluição do reagente de Ehrlich (D = 2); [Hb]: concentração de hemoglobina em cada animal (g/dl); t: tempo de incubação (t = 1 h); grupo A (n = 5); grupo B (n = 5); grupo C (n = 4); (\*\*):  $P < 0,01$  em comparação com C; erro padrão médio indicado.

Não houve decréscimo significativo na concentração de hemoglobina (g/dl) no sangue dos peixes tratados com chumbo (cf. **Figura 20**). Nenhuma distinção significativa ( $P > 0,05$ ) foi observada entre os três grupos de peixes comparados dois a dois. Contudo há uma tendência à diminuição da quantidade de hemoglobina no sangue dos peixes do grupo A.



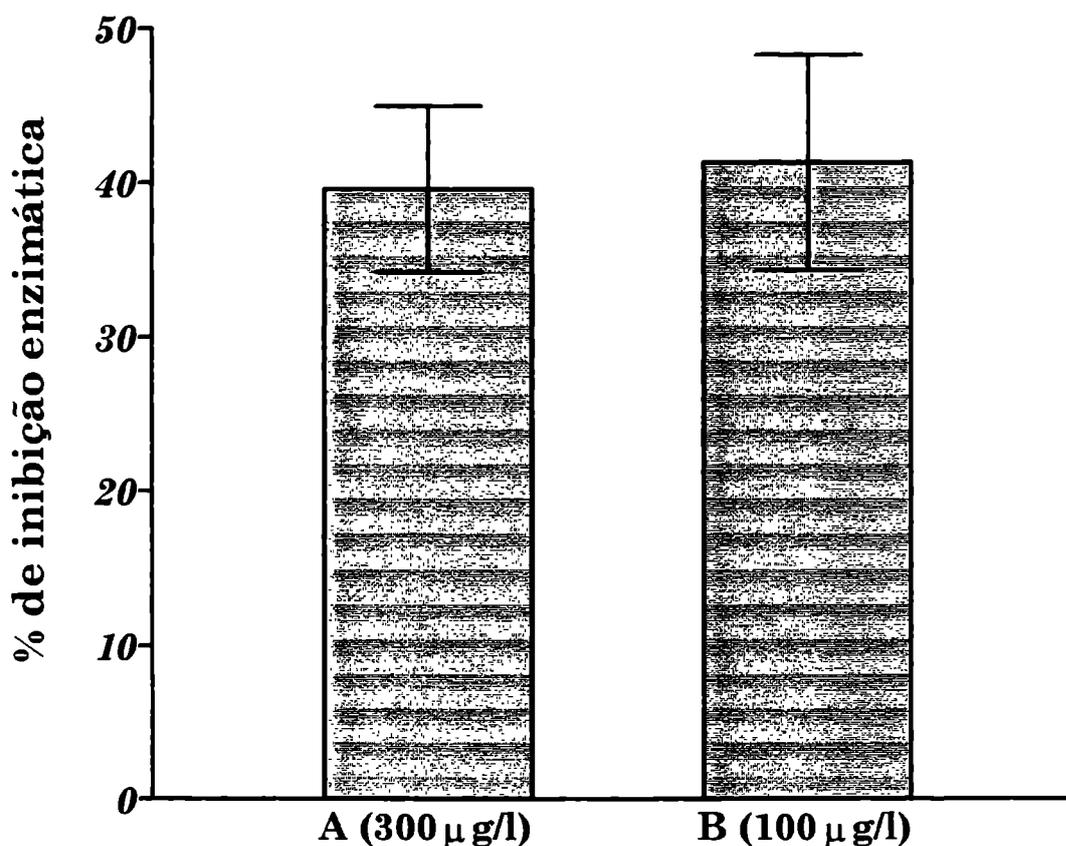
**Figura 20:** Concentração de hemoglobina (g/dl) no sangue de *Oreochromis niloticus* expostas a duas concentrações de Chumbo (II) por via hídrica, por 96h e em regime semi-estático; grupo A (n = 5); grupo B (n = 5); grupo C (n = 4); erro padrão médio indicado.

A reativação com o DTT pode ser ilustrada no gráfico da **Figura 21**. Não houve diferença significativa entre os grupos A e B ( $P > 0,05$ ) mas cada grupo tratado diferiu do grupo controle ( $P < 0,01$ ).



**Figura 21:** Reativação enzimática com DTT na atividade da  $\delta$ -ALA-d eritrocitária de *Oreochromis niloticus* expostas a duas concentrações de Chumbo (II) por via hídrica, por 96h e em regime semi-estático. Incubação a 37°C; grupo A (n = 5); grupo B (n = 5); grupo C (n = 4); (\*\*):  $P < 0,01$  em comparação com C; erro padrão médio indicado.

O gráfico da **Figura 22** ilustra o percentual de inibição da  $\delta$ -ALA-d (nos grupos A e B) em relação a resposta controle, ou seja, a razão percentual da atividade de cada peixe tratado pela atividade média dos controles, cada valor subtraído de 100%. Houve uma inibição média no grupo A de 39,57% e no grupo B, de 41,29%.



**Figura 22:** Percentual de inibição em relação a resposta controle média da atividade da  $\delta$ -ALA-d eritrocitária de *Oreochromis niloticus* expostas a duas concentrações de Chumbo (II) por via hídrica, por 96h e em regime semi-estático. Incubação a 37°C; grupo A (n = 5); grupo B (n = 5); erro padrão médio indicado.

Os valores da **Figura 22** correspondem a:

cada valor =  $100\% - (100 \times \text{atividade de cada A ou B} / \text{atividade média de C})$

## II.5. DISCUSSÃO

Por não ter havido mortalidade, o bioensaio de exposição aguda das tilápias ao Chumbo (II), por via hídrica, mostrou-se satisfatório para constatação de efeitos tóxicos do cátion metálico. Considera-se que as doses empregadas são subletais às tilápias, no tempo de exposição de 96h. A espécie *Oreochromis niloticus* confirmou ser um bom modelo biológico para o estudo de biomarcadores, pois adaptou-se bem às condições laboratoriais e à manipulação.

### **II.5.1. Ensaio para a atividade da $\delta$ -ALA-d eritrocitária de *O. niloticus***

— **Estocagem do sangue** — o sangue deve ser heparinizado para evitar coagulação e pode ser estocado no gelo por 24h sem que a  $\delta$ -ALA-d perca atividade; a estocagem em nitrogênio líquido conserva a atividade indefinidamente (HODSON *et al.*, 1984). RODRIGUES (1987) observou que a enzima de *Pimelodus maculatus* conserva a mesma atividade até 144h, quando o sangue total é estocado a 8°C.

— **Temperatura de incubação** — HODSON (em comunicação pessoal) utiliza 15°C na incubação; em HODSON (1976) e HODSON *et al* (1977) a incubação se deu em torno de 10°C. RODRIGUES (1987) encontrou uma máxima atividade enzimática a 60°C, porém utilizou 37°C na incubação padronizada. Um ensaio prévio foi realizado com 2 tilápias da mesma população que as usadas na exposição ao chumbo, foram testadas as temperaturas de 17, 25 e 36°C. A maior atividade se observou a 36°C. Escolheu-se para a técnica padrão a temperatura de 37°C, a mesma também usada por BAINY (1990).

— **Tempo de incubação** — HODSON *et al* (1977) relatam que a taxa de reação é virtualmente constante durante 2h. HODSON (1976 e em comunicação pessoal) utiliza 2h como tempo de reação. RODRIGUES (1987) observou uma relação linear entre o tempo de incubação e a atividade da  $\delta$ -ALA-d. RODRIGUES

(1987) e BAINY (1990) dispuseram de 1h na incubação, buscando “valores que correspondem à velocidade inicial, condição necessária para uma quantificação correta dos resultados”. A  $\delta$ -ALA-d reagiu por 1h na técnica padrão aqui adotada.

— **pH ótimo de reação** — HODSON *et al* (1977) encontraram a máxima atividade da  $\delta$ -ALA-d de truta arco-íris (*Salmo gairdneri*) com o meio de incubação a pH 6,2. RODRIGUES (1987) encontrou valores máximos para o mandi (*Pimelodus maculatus*) na faixa de pH entre 6,4 e 6,6 e utilizou como padrão o pH 6,4. Neste trabalho utilizou-se pH 6,3 no meio de incubação.

— **Hemólise do sangue** — RODRIGUES (1987) e BAINY (1990) hemolisaram o sangue por diluição 1:4 (v/v) com água deionizada. HODSON *et al.*(1977) fizeram uso do Triton X-100 (detergente) a 0,5% no tampão fosfato. A hemólise com o detergente foi escolhida para a técnica padrão aqui adotada por prescindir da centrifugação refrigerada que sucede a hemólise com água.

— **Concentração de substrato na incubação** — HODSON (1976 e em comunicação pessoal) utiliza o substrato ( $\delta$ -ALA) a 4,257 mM (558,333  $\mu$ g/ml) no meio de incubação. RODRIGUES (1987), usando sangue de *P. maculatus*, plotou a atividade da  $\delta$ -ALA-d em função da variação da concentração de substrato e encontrou uma curva de saturação hiperbólica tipo Henri-Michaelis-Mentel; pôde então calcular uma  $K_m$  de 0,14 mM (concentração de substrato em que a velocidade da catálise corresponde à metade da velocidade máxima). RODRIGUES (1987) e BAINY (1990) utilizaram o substrato a 3,954 mM (518,524  $\mu$ g/ml) no meio de incubação, o que corresponde a 28,24 vezes o valor da  $K_m$  estimada e justificam: esta concentração está na faixa de saturação da enzima, o que assegura uma disponibilidade excessiva de substrato, não havendo interferência na velocidade da catálise. Um ensaio prévio foi realizado com 2 tilápias da mesma população que as usadas na exposição ao chumbo; foram testadas as seguintes concentrações de substrato no meio de incubação: 1, 2, 3, 4, 6 e 9 mM; uma curva semelhante a encontrada por Rodrigues foi observada. Para a técnica padrão aqui adotada usou-

se o substrato ( $\delta$ -ALA) a 4,0 mM (524,525  $\mu$ g/ml) ou 28,57 vezes o valor da  $K_m$  estimada por Rodrigues.

— **Concentração de DTT na incubação** — segundo RODRIGUES (1987), os compostos tiólicos, como o DTT, interferem com a reação de cor que ocorre com o Ehrlich e o PBG, tal interferência é minimizada com os íons  $Hg^{++}$  presentes na solução precipitante (TCA+ $HgCl_2$ ) e no reagente de cor (Ehrlich). Rodrigues observou que o DTT produziu ativação enzimática progressiva até a concentração de 25,4 mM, sem que houvesse interferência na reação de cor e havendo reativação da enzima aos níveis da atividade não inibida (BAINY, 1990). Neste trabalho foi utilizado o DTT a 25,4 mM no meio de incubação.

— **Concentração de TCA e  $HgCl_2$  no precipitante** — Usou-se TCA a 40 mg/ml e  $HgCl_2$  a 99,45 mM, como em HODSON (1976 e comunicação pessoal). RODRIGUES (1987) usa cerca da metade dessa concentração de  $HgCl_2$ , pois realizou testes com as concentrações de 100 e 50 mM, observando que esta última produz maiores valores de absorvância, quando a enzima é incubada com DTT a 25,4 mM. Por outro lado, o  $HgCl_2$  a 100 mM no precipitante eliminou a interferência do DTT na reação colorimétrica até que sua concentração atingisse 41 mM no meio de incubação. Como aqui não foram realizados esses testes, optou-se pela concentração de  $HgCl_2$  usada por Hodson, mais próxima de 100 mM.

— **Reativo de Ehrlich (reagente de cor)** — foi confeccionado de acordo com os títulos empregados por HODSON (1976 e em comunicação pessoal):  $HgCl_2$  a 0,32% (p/v); p-dimetil-amino-benzaldeído a 1,82% (p/v); ácido acético glacial a 76,36% (v/v); ácido perclórico (original a 70%) a 18,18% (v/v) e água destilada e deionizada a 5,45% (v/v).

— **Concentração de hemoglobina** — HEATH (1995) comenta que em geral existe uma boa correlação entre os valores de hematócrito, os de concentração de hemoglobina e os da contagem de eritrócitos, o que justifica a substituição, na

expressão quantitativa da atividade da  $\delta$ -ALA-d, do hematócrito — usado por HODSON (1976) e BAINY (1990) — pela concentração de hemoglobina.

O uso do DTT permite a estimativa do grau de biodisponibilidade do chumbo, já que uma maior reativação enzimática indica uma maior quantidade de chumbo acumulado no sangue. Contudo os resultados obtidos com o uso do DTT, para a expressão do  $\Delta\%$  de reativação catalítica da  $\delta$ -ALA-d, indicam ressalvas na consideração do método aqui empregado. Isto porque o grupo controle (peixes C) mostrou uma reativação média atípica:  $26,78 \pm 7,96\%$  (cf. **Figura 21**). Presume-se que este valor esteja superestimado, devido ao menor número amostral do grupo controle ( $n = 4$ ) em relação aos outros dois grupos ( $n = 5$ ). Um maior erro padrão médio também foi observado em C (3,9) em relação a A e B ( $< 2,7$ ). Em adição, na **Tabela VI** constam os valores para o  $\Delta\%$  de reativação encontrados por BAINY (1990), para os seus grupos controles e no total de 4 experimentos realizados com *Pimelodus maculatus*.

**Tabela VII:**  $\Delta\%$  de reativação enzimática da  $\delta$ -ALA-d eritrocitária nos grupos controles de BAINY (1990).

<i>Tempo (dias) de experimento</i>	<i><math>\Delta\%</math> de reativ. enzimática</i>	<i>EPM</i>	<i>Número De peixes</i>	<i>[Pb] na água</i>	<i>EPM</i>	<i>N amostras de água</i>
<b>Início</b>	<b>10,3</b>	1,9	5	<b>7,0</b>	0	1
<b>Início</b>	<b>16,3</b>	4,1	5	<b>nd</b>	nd	nd
<b>2</b>	<b>2,8</b>	6,3	5	<b>2,1</b>	0	2
<b>2</b>	<b>6,8</b>	5,0	5	<b>2,6</b>	nd	1
<b>6</b>	<b>14,4</b>	2,3	5	<b>3,5</b>	0,2	4
<b>8</b>	<b>7,1</b>	1,5	5	<b>1,2</b>	1,2	8
<b>8</b>	<b>6,8</b>	1,5	5	<b>nd</b>	nd	nd

**Fonte:** BAINY (1990).

**Legenda:** (EPM), erro padrão médio; ([Pb] na água), concentração real de chumbo na água em  $\mu\text{g/l}$ ; (nd), não determinado.

A média dos valores relatados acima para o  $\Delta\%$  de reativação é de 9,21% e a média das concentrações de chumbo na água dos aquários controle é de 2,35  $\mu\text{g/l}$ . BAINY (1990) considera que a condição de jejum a que foram submetidos os seus peixes pode alterar a atividade, mas não a reativação.

Supõe-se que o alto valor médio do  $\Delta\%$  de reativação, encontrado neste trabalho para os controles ( $26,78 \pm 7,96 \%$ ), possa ser atribuído a um ou vários dos fatores que seguem:

- (i) teores de chumbo na água dos aquários do grupo C, com conseqüente acúmulo pelos peixes, presença de chumbo no sangue e inibição da  $\delta$ -ALA-d eritrocitária;
- (ii) acúmulo de chumbo pelos peixes no *habitat* original, com a liberação de teores de chumbo no sangue, causada pelo jejum em laboratório;
- (iii) deficiência no método empregado para a determinação da atividade ou reativação reais da  $\delta$ -ALA-d eritrocitária da espécie;

O item (ii) supracitado sugere um monitoramento de metais pesados na fazenda Canguiri (UFPR), Pinhais (PR), onde as tilápias foram capturadas. Outros interferentes que possam existir e que seriam intrínsecos à espécie são considerados na próxima seção, com a discussão sobre a toxicidade do chumbo no sangue (cf. **Seção II.5.2.**).

Mesmo assim pôde-se constatar inibição enzimática com o sangue das tilápias expostas ao chumbo no experimento agudo. O percentual de inibição foi expresso em relação a resposta controle (100%) (cf. **Figura 22**).

Não obstante, o uso do DTT é sempre aconselhável, pois como também se determina a atividade sem o DTT no meio de incubação, cada peixe serve de controle para si mesmo. Isto é uma vantagem em estudos de campo, desde que haja uma caracterização prévia da atividade para a espécie considerada, inclusive com a atividade e a reativação sendo determinadas em regiões controle, livres de teores excessivos de chumbo.

Uma outra vantagem com o emprego do reativador é que pode-se calcular o  $\Delta\%$  de reativação somente com os valores de absorbância, sem que se considere a quantidade de hemoglobina ou o volume percentual de eritrócitos no sangue.

## **II.5.2. Efeitos tóxicos do chumbo em *O. niloticus***

### **Brânquias**

Nenhuma alteração na superfície do epitélio branquial (nos filamentos ou lamelas) pôde ser atribuída ao chumbo. Mas a versatilidade desse tecido é muito grande, principalmente quando se considera as diferenças funcionais e morfológicas que podem existir entre peixes de água salgada ou doce e a conhecida transição entre as duas condições em espécies de peixes euri-halinos.

O células pavimentosas do epitélio de revestimento dos filamentos branquiais possuem a superfície apical lembrando impressões digitais, o que aumenta a área de trocas de substâncias entre o animal e o ambiente, além de servir de ancoragem para o muco (PERRY e LAURENT, 1993). Este é um importante quelante de cátions metálicos e responsável pela diminuição das taxas de difusão (influxo) dos metais nas brânquias; as células de muco podem produzir quantidades substanciais de muco, como uma barreira físico-química a vários tipos de metais e em resposta ao estresse químico (MCDONALD e WOOD, 1993). Por outro lado, as células pavimentosas do epitélio de revestimento das lamelas têm a superfície apical com ornamentação pouco desenvolvida ou totalmente ausente (PERRY e LAURENT, 1993), como observado em *Oreochromis niloticus*.

A hipertrofia e fusão de lamelas adjacentes, a ruptura do epitélio e outras alterações histopatológicas são características comuns em epitélios branquiais expostos a metais pesados como, por exemplo, mercúrio, alumínio, cobre, zinco, ferro, níquel ou chumbo (PAIN, 1995; HEATH, 1995; OLIVEIRA RIBEIRO *et al.*, 2000). Contudo, MCDONALD e WOOD (1993) afirmam que alterações fisiológicas em brânquias de peixes de água doce ocorrem quando as concentrações de metais são menores do que as necessárias para a detecção de alterações morfológicas no tecido branquial; e que o limite de concentração para que ocorram tais alterações morfológicas raramente é observado na maioria dos ambientes *in natura*; além

disso, morfológicamente pode haver uma restauração da condição normal do epitélio, após uma fase aguda de exposição (< 2 dias para doses subletais).

O chumbo aderido ao material em suspensão também é biodisponível ao tecido branquial de *Carassius auratus*, o que incrementa o acúmulo a partir de cátiões de chumbo dissolvidos na água. O processo de acúmulo de chumbo particulado envolve dois passos em seqüência: aderência das partículas ao muco branquial e dissociação do chumbo das partículas, no microambiente branquial (TAO *et al.*, 1999).

HEATH (1995) relata que estudos com peixes indicam alterações na regulação osmótica e iônica causadas pelo chumbo e que isto possa ocorrer pela inativação da Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase. McDONALD e WOOD (1993) comentam que exposições crônicas subletais de peixes a metais podem induzir um acréscimo na síntese de ATPases (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase pelo cobre e Ca<sup>++</sup>-ATPase pelo cobre, zinco e cádmio) e que isto é acompanhado por hipertrofia e hiperplasia das células de cloreto do epitélio branquial (dobro de superfície exposta) e pelo aumento da atividade de transporte de íons (Na<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup> e Ca<sup>++</sup>).

Num estudo que se refere ao acúmulo de mercúrio inorgânico em diferentes tecidos e aos danos causados em brânquias, OLIVEIRA RIBEIRO *et al* (2000) demonstraram que *Trichomycterus zonatus*, uma espécie tropical, é mais sensível ao mercúrio que *Salvelinus alpinus*, uma espécie nórdica. Em relação aos estudos já realizados com metais pesados, considera-se que a investigação com espécies de regiões tropicais e subtropicais brasileiras deva ser realizada o quanto antes, para que se possa corroborar ou refutar aquela maior susceptibilidade ao mercúrio e a outros metais como o chumbo.

## Chumbo no sangue

Para peixes, inúmeras situações de estresse podem causar anemia; esta é qualquer condição em que a concentração de hemoglobina no sangue é atipicamente baixa, seja por decréscimo da proteína nos eritrócitos, ou por redução no número de eritrócitos (HEATH, 1995).

Glicoproteínas transmembrana carregadas negativamente (ácido siálico), como as glicoforinas de eritrócitos humanos (ALBERTS *et al.*, 1997), poderiam atrair o chumbo para a superfície externa do eritrócito. BAINY (1990) revisa que o chumbo liga-se a grupos tiólicos e fosfatos da membrana eritrocitária, altera sua permeabilidade e permeia rapidamente para o interior da célula, complexando-se a componentes protéicos.

Não houve diferença significativa na concentração de hemoglobina no sangue dos três grupos de peixes estudados (cf. **Figura 20**).

Tewari *et al.* em 1987, *apud* HEATH (1995), em exposição crônica (mais de 60 dias) de *Barbus* sp. ao chumbo a 47 µg/l, encontraram graves reduções (12 a 31%) na contagem de eritrócitos, hematócrito e concentração de hemoglobina. SIPPEL *et al* (1983) também relatam um incremento na contagem de eritrócitos e um decréscimo em seu volume, na quantidade de ferro e na atividade da δ-ALA-d de *Salmo gairdneri* expostas ao chumbo. GOYER *et al* (1970) observaram uma diminuição no hematócrito de ratos que ingeriram chumbo na água (10 mg/ml) por 10 semanas.

Em relação à média controle do presente trabalho, houve uma redução de 11,99% na média da concentração de hemoglobina das tilápias do grupo A (300 µgPb/litro). Contudo os teores de exposição, o tempo e as espécies consideradas acima são distintas, implicando cuidados na comparação.

Grande parte da quantidade da  $\delta$ -ALA-d eritrocitária de peixes pode ser, como no caso de mamíferos, remanescente da biosíntese de hemoglobina, que ocorreu em células hematopoiéticas. Os dados deste trabalho confirmam este fato: inibição da  $\delta$ -ALA-d sem anemia. Em contrapartida, Speckner *et al.* em 1989, *apud* JENSEN *et al.* (1993) comentam que eritrócitos de peixes são nucleados e capazes de sintetizar hemoglobina por uma boa parte de sua vida útil. Nesse caso a  $\delta$ -ALA-d eritrocitária de peixes estaria cataliticamente ativa.

Segundo Johansson-Sjoberg e Larsson em 1979, *apud* HEATH (1995), relatam anemia em trutas expostas por 30 dias a concentração real de 300  $\mu\text{gPb/l}$ , mas não a 75 ou a 10  $\mu\text{gPb/l}$ ; por outro lado, observaram uma inibição dose dependente da  $\delta$ -ALA-d do baço dos animais e da eritrocitária, esta última com os seguintes valores respectivos de inibição: 86, 74 e 21%. A explicação dada foi que a enzima tem grande capacidade de reserva, já que as suas funções normais são possíveis apenas com 25% de sua capacidade catalítica usual. Por conseqüência a inibição da atividade catalítica pode ocorrer não acompanhada da sintomatologia (anemia) ou de um decréscimo em produção de heme (HODSON *et al.*, 1984; PAIN, 1995).

Outras inibições dose dependentes da  $\delta$ -ALA-d eritrocitária de peixes foram observadas por HODSON *et al.*, (1977) que demonstraram uma inibição consistente (mínimo de 20% em relação a resposta controle) na atividade da  $\delta$ -ALA-d eritrocitária de 4 espécies de peixes expostas ao  $\text{Pb}^{++}$  por via hídrica, por 2 semanas e às concentrações mínimas de 10  $\mu\text{g/l}$  (*Salmo gairdneri*, truta arco-íris), 90  $\mu\text{g/l}$  (*Salvelinus fontinalis*, truta do arroio), 470  $\mu\text{g/l}$  (*Carassius auratus*, peixe-ouro) e 90  $\mu\text{g/l}$  (*Lepomis gibbosus*, *pumpkinseeds*).

BAINY (1990), em 2 dias de exposição de *Pimelodus maculatus* ao chumbo inorgânico, constatou uma inibição de 78,76% a uma concentração nominal de 165,76  $\mu\text{g/l}$  (ou real, de 86,8  $\mu\text{g/l}$ ) e de 85,84% a uma concentração nominal de 331,52  $\mu\text{g/l}$  (ou real, de 160,3  $\mu\text{g/l}$ ), em relação à resposta controle.

No presente trabalho não se pôde determinar a concentração real de chumbo na água do experimento. Também não houve a relação de dose dependência e a inibição no grupo B (41,29% a 100 µgPb/l) foi maior que no grupo A (39,57% a 300 µgPb/l), em relação à resposta controle. Os dados sugerem *a priori*, que para a atividade da  $\delta$ -ALA-d eritrócitária como parâmetro, *Oreochromis niloticus* seja uma espécie menos vulnerável ao chumbo que as outras aqui citadas. Contudo um estudo mais aprofundado, para a caracterização precisa da atividade e inibição da enzima em *O. niloticus*, deve ainda suportar aquela hipótese e preencher a lacuna existente na literatura, para o uso desse biomarcador em peixes de climas tropicais.

A inibição da  $\delta$ -ALA-d eritrócitária de peixes foi considerada como uma rápida, consistente, específica e sensível estimativa para concentrações de chumbo causando danos subletais; além disso o método serviria à identificação de fontes deste metal, por estimar graus de exposição de populações *in natura* (HODSON, 1976; HODSON *et al.*, 1977). Nesse último trabalho estão evidenciadas correlações lineares significativas entre o *log* de concentrações de chumbo na água e no sangue e a atividade mensurável da enzima dos eritrócitos. Constatam ainda que diferentes espécies podem ter diferentes concentrações efetivas mínimas para uma inibição consistente na atividade da  $\delta$ -ALA-d eritrócitária.

O substrato  $\delta$ -ALA aumenta em concentração quando a  $\delta$ -ALA-d está inibida. Isto é intensificado pela inibição causada pelo chumbo na ferro-quelatase, pois um decréscimo em concentração de heme na mitocôndria aumenta a biosíntese de  $\delta$ -ALA, em retroalimentação negativa sobre a  $\delta$ -ALA-s. A  $\delta$ -ALA catalisa a auto-oxidação da oxi-hemoglobina, produzindo  $O_2^-$  e  $H_2O_2$ ; estes compostos parcialmente reduzidos possuem efeitos tóxicos na célula e podem levá-la a uma resposta defensiva que se revela com o aumento da atividade eritrócitária da superóxido dismutase e da glutathiona peroxidase; essa relação entre o acúmulo de precursores do grupo heme e a produção de espécies reativas de oxigênio (esta inferida

pelo aumento em atividade anti-oxidante) foi observada por MONTEIRO *et al* (1985) em trabalhadores expostos ao chumbo numa fábrica em Diadema (SP).

O gene que codifica a  $\delta$ -ALA-d em humanos possui dois alelos codominantes. Variantes fenotípicas parecem estar associadas à cinética de toxicidade do chumbo, influenciando a susceptibilidade de indivíduos à contaminação. Duas pesquisas com pessoas expostas ocupacionalmente ao chumbo demonstram isso.

ALEXANDER *et al* (1998) relataram que certas composições genotípicas modificam a relação linear crescente que existe entre concentrações de chumbo e de zinco-protoporfirina no sangue. Altos teores desse último composto são usados como resposta indicativa de contaminação, pois com a presença do chumbo na mitocôndria o zinco é incorporado no anel porfirínico, ao invés do ferro. Eles identificaram que os homozigotos analisados (114 em um  $n = 134$ ) revelavam uma maior inclinação da curva comentada. Em adição, SITHISARANKUL *et al* (1997) demonstraram que a concentração plasmática do substrato  $\delta$ -ALA foi maior em indivíduos homozigotos (44) que naqueles heterozigotos (21); sugerem ainda que os indivíduos homozigotos são mais susceptíveis à exposição por chumbo.

A  $\delta$ -ALA-d exerce um papel crucial na vida de qualquer célula eucariótica. Devido a grande ocorrência dentre as espécies e a diversidade de processos em que o grupo heme participa, supõe-se que o aparato molecular responsável por sua síntese venha sendo muito bem conservado ao longo da evolução.

Ao longo de gerações de indivíduos e células, somente alterações numa faixa muito estreita de variação seriam permitidas para a expressão de todas as enzimas envolvidas com a produção do grupo heme. Contudo, polimorfismos genéticos que não comprometam totalmente a produção do heme podem estar associados com a distribuição dos genes variantes, que expressam o aparato de biosíntese, em uma população de peixes.

Vertebrados pisciformes existem pelo menos a 500 milhões de anos. Este valor pode ser ainda maior, para a origem do heme, como indica a semelhança do heme com a clorofila e o fato de “peixe” não ser uma classe que corresponda a um grupo natural, com seus integrantes podendo ter tido várias origens evolutivas desde o Cambriano.

## II.6. CONCLUSÕES PARCIAIS

- ✓ Chumbo (II) dissolvido na água não provocou nenhuma alteração consistente na estrutura superficial das branquias de *Oreochromis niloticus* após 96 horas de exposição.
- ✓ A inibição da atividade da  $\delta$ -ALA-d eritrocitária em *Oreochromis niloticus*, confirmou ser um biomarcador eficiente do efeito do Chumbo (II) sobre o funcionamento desta enzima, nas condições experimentais propostas para este trabalho.
- ✓ Chumbo (II) dissolvido na água é biodisponível a *O. niloticus*, nas duas concentrações testadas e os exemplares expostos acumularam este metal no sangue, após 96 horas de exposição.
- ✓ A atividade da  $\delta$ -ALA-d eritrocitária de *O. niloticus* pode ser usada como um biomarcador de exposição ao chumbo, fornecendo dados que possam ser utilizados em regiões subtropicais impactadas pelo metal, por exemplo, através de experimentos *in situ* com a espécie.

## CONCLUSÕES FINAIS

- ✓ Os dados obtidos mostram que a traíra (*Hoplias malabaricus*) demonstrou ser um bom bioindicador de contaminação ambiental para climas tropicais e subtropicais e que, quando associados com outros, obtidos de diferentes espécies, fornecem subsídios para se discutir acerca da necessidade de padronização de metodologias que possam ser utilizadas em estudos de toxicologia e monitoramento ambiental.
  
- ✓ Os resultados obtidos com os experimentos de laboratório utilizando a espécie *Oreochromis niloticus* foram satisfatórios, ao ponto de permitirem uma aplicação experimental *in situ* na mesma região selecionada para o estudo de caso preliminar deste trabalho, constituindo assim um próximo passo para a conclusão do segundo capítulo desta dissertação.
  
- ✓ A atividade da  $\delta$ -ALA-d eritrocitária de *O. niloticus* é aqui considerada o biomarcador mais eficiente dentre os parâmetros testados neste trabalho.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS PARA O RIO RIBEIRA

A divisão da área de drenagem da bacia do rio Ribeira por um limite político-administrativo (São Paulo - Paraná) ocasiona dificuldades na busca de dados que dá subsídios à pesquisa científica. De outra forma, o interesse de que o desenvolvimento econômico da região ocorra de forma planejada deve ser comum aos dois estados mencionados. Isso pois o domínio legislativo das águas de um rio que atravesse duas ou mais unidades federativas deve caber à federação. Um dos maiores óbices que se pode observar ao planejamento de um desenvolvimento econômico, que leve em conta a manutenção dos recursos naturais, é o fato de os divisores de água da bacia do Ribeira não coincidirem com os limites políticos da mesma. Isso divide a fonte de esforços técnicos e intelectuais que devam ser alocados, para que não se cometam medidas prejudiciais ao próprio desenvolvimento

(SÃO PAULO, 1992). No “Programa de educação ambiental do vale do Ribeira” realizado por vários profissionais (SÃO PAULO, 1992), constata-se que a região ainda não era considerada poluída, mas que os critérios adotados para definição de poluição e desequilíbrio ambiental e as medidas para suas prevenções devessem ser discutidos mais profundamente e para aquela região específica.

A presença de metais pesados na bacia do Ribeira já vem sendo aferida há duas décadas em monitoramento ambiental realizado periodicamente pela CETESB (1978-97; 1991a) e mais recentemente por EYSINK *et al* (1988) e MORAES (1997). Metais pesados foram detectados no estuário receptor das águas do Ribeira. Na série de eventos de análise, por vezes se observou teores de metais pesados (cobre, zinco, chumbo e cádmio) acima do permitido pela legislação brasileira, em sedimentos, água e organismos aquáticos do rio Ribeira. Porém, não se sabe ao certo de uma distribuição temporal e espacial dos metais, em compartimentos ecossistêmicos do vale do Ribeira, que seja satisfatória.

A drenagem do ribeirão do Rocha contribuía, em novembro de 1998, com a dispersão de metais na bacia do Ribeira (cf. **Tabela II**) e, muito provavelmente, ainda contribui já que o local do depósito está sujeito a lixiviação e a enchentes periódicas. Atribui-se a existência em excesso dos metais, no sedimento local, às atividades pretéritas da mineradora Rocha (cf. **Figura 2A-E**). Ressalta-se que no sedimento do ribeirão do Rocha e do rio Ribeira, junto à foz daquele, mesmo com a mina desativada ainda haviam concentrações muito altas de metais. O depósito de rejeitos do Rocha está na área a ser inundada pelo reservatório Tijuco Alto e segundo recomendações feitas no EIA da CBA (1991) será dali retirado, recolocado nas galerias da mina e estas serão lacradas. Caso isso não seja feito, a qualidade da água do reservatório pode não permitir o seu pretendido uso múltiplo.

Certamente um estudo da comunidade de peixes da bacia do Ribeira, se fosse hoje realizado, não poderia descrever o operar de um sistema original, ou seja, sem grande interferência humana. Contudo poderia, se associado a testes de

toxicidade, predizer algo do potencial uso das águas da bacia para uma futura produção pesqueira, mesmo que artesanal. Se esse ambiente é recuperável e quais os custos em investigação científica que devam onerar tal processo, é a pergunta que permanece.

O comprometimento do complexo lagunar-estuarino Iguape-Paranaguá é outro fator que sugere estudos mais aprofundados sobre a compartimentalização dos poluentes em setores dos ecossistemas locais. O recrutamento nas distintas populações de peixes deste ambiente, bem como outros fatores bióticos e abióticos, se alterados, podem levar a conseqüências que fugiriam do controle, devido localização geográfica do complexo.

Sugere-se que além da quantificação de metais, que já é feita na região, sejam realizados estudos que visem o efeito *in vivo* destes metais, através de bioensaios *in situ*. Isso complementaria as informações necessárias para uso dos recursos naturais associados ao ambiente aquático da região.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M. ROBERTS, K. e WATSON, J. D.. ***Biologia molecular da célula***. 3.ed. Porto Alegre : Artes Médicas, 1997.
- ALEXANDER, B. H.; HARVEY, C.; COSTA, M. P.; FAUSTMAN, E. M.; WOODS, J.; KELSEY, K. T.; VAN-NETTEN, C. e COSTA, L. G. Interaction of blood lead and delta-aminolevulinic acid dehydratase genotype on markers of heme synthesis and sperm production in lead smelter workers. ***Environmental Health Perspectives***. v.106, n.4, p.213-16. 1998. Resumo.
- BAATRUP, E. Structural and functional effects of heavy metals on the nervous system, including sense organs, of fish. ***Comp. Biochem. Physiol.*** v. 100C, n.1/2, p.253-257. 1991.
- BAINY, A. C. D. ***Assimilação de cádmio e chumbo no sangue e tecidos de Pimelodus maculatus (Pisces, Pimelodidae) e seus efeitos sobre a  $\delta$ -aminolevulinato desidratase (E.C.:4.2.1.24) eritrocitária***. Porto Alegre : [s.n.], 1990. Dissertação de mestrado, Departamento de Bioquímica, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- BELL, G. R.; SLIND, D. e BAGSHAW, J. W. Pictorial atlas of histology of the sablefish (*Anoplopoma fimbria*). ***Canadian Spec. Publ. Fish. Aquat. Sci.*** v. 94, Ottawa. 1986.
- BENEDITO-CECÍLIO, E. e AGOSTINHO, A. A.. ***Estrutura das populações de peixes do reservatório de segredo***. In: AGOSTINHO, A. A. e GOMES, L. C (Eds.). ***Reservatório de Segredo: bases ecológicas para o manejo***. Maringá : EDUEM, 1997. p.113-39.
- BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. ***Anal. Biochem.*** v. 72, p.248-254. 1976.
- BURDEN, V. M.; SANDHEINRICH, M. B. e CALDWELL, C. A. Effects of lead on growth and  $\delta$ -aminolevulinic acid dehydratase activity of juvenile rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. ***Environmental Pollution***. v.101, p.285-289. 1998.
- CETESB (COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL). ***Qualidade das águas interiores do Estado de São Paulo***. São Paulo : Relatórios anuais CETESB, 1978-97.
- CETESB. ***Avaliação da qualidade das águas do rio Ribeira de Iguape: considerações preliminares***. São Paulo : Relatório CETESB, 1991a.

- CETESB. *Métodos de avaliação da toxicidade de poluentes a organismos aquáticos*. São Paulo : CETESB, 1991b.
- CONAMA. Resolução nº. 20, de 18 de junho de 1986. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, p.72-89. 30 jun., 1986.
- COOPER, G. P. e STEINBERG, D. Effects of cadmium and lead on adrenergic neuromuscular transmission in the rabbit. *Am. J. Physiol.* v.232, n.3, p.C128-31. 1977.
- DAEE (DEPARTAMENTO DE ÁGUAS E ENERGIA ELÉTRICA; SECRETARIA DE RECURSOS HÍDRICOS, SANEAMENTO E OBRAS; GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO). *Bacia hidrográfica do Ribeira de Iguape: relatório síntese do plano de ação*. 1998.
- DAGGETT, D. A.; OBERLEY, T. D.; NELSON, S. A.; WRIGHT, L. S.; KORNGUTH, S. E. e SIEGEL, F. L. Effects of lead on rat kidney and liver: GST expression and oxidative stress. *Toxicology*. v.128, p.191-206. 1988.
- DEVLIN, T. M (Ed.). *Textbook of biochemistry*. 3.ed. New York : Wiley-Liss, 1992.
- ELLMAN, G. L.; COURTNEY, K. D.; ANDRES JR, V. e FEATHERSTONE, R. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharm.* v. 7, p.88-95. 1961.
- EYSINK, G. G. J.; PÁDUA, H. B.; PIVA-BERTOLETTI, S. A. E.; MARTINS, M. C. e NAVAS-PEREIRA, D. *Metais pesados no vale do Ribeira e em Iguape-Cananéia. Ambiente*, São Paulo, v.2, n.1, p.6-13. 1988.
- EYSINK, G. G. J.; MARTINS, M. C.; VARGAS-BOLDRINI, C.; e NAVAS-PEREIRA, D. *Metais pesados em organismos aquáticos do rio Ribeira de Iguape e do complexo estuarino-lagunar Iguape-Cananéia: avaliação preliminar*. In: SIMPÓSIO DE ECOSISTEMAS DA COSTA SUL E SUDESTE BRASILEIRA: estrutura, função e manejo (2. : 1990 : Águas de Lindóia). *Anais*, v.2, p.417-43. São Paulo : ACIESP, 1990.
- EWERS, U. e SCHLIPKÖTER, H.-W.. *Lead*. In: MERIAN, E (Ed.). *Metals and their compounds in the environment: occurrence, analysis, and biological relevance*. New York : VCH, 1991. p.971-1014.
- FERGUSON, H. W. *Systemic pathology of fish*. Iowa : Ames, 1989.

- FONTOURA-DA-SILVA, S. E. e CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E. A. Butyrylcholinesterase variants (BCHE and CHE2 loci) associated with erythrocyte acetylcholinesterase inhibition in farmers exposed to pesticides. *Human Heredity*. v.46, p.142-147. 1996.
- GIBSON, K. D.; NEUBERGER, A. e SCOTT, J. J. The purification and properties of  $\delta$ -aminolaevulinic acid dehydrase. *Biochemistry*. v.61, p.618-29. 1955.
- GILL, T. S.; TEWARI, H. e PANDE, J. *In vivo* and *in vitro* effects of cadmium on selected enzymes in different organs of the fish *Barbus conchoniuis* ham (rosy barb). *Comp. Biochem. Physiol.* v. 100C, n.3, p.501-505. 1991.
- GORELL, J. M.; JOHNSON, C. C.; RYBICKI, B. A.; PETERSON, E. L.; KORTSHA, G. X.; BROWN, G. G. e RICHARDSON, R. J. Occupational exposure to manganese, copper, lead, iron, mercury and zinc and the risk of Parkinson's disease. *NeuroToxicology*. v.20, p.239-248. 1999.
- GOYER, R. A. e LEONARD, D. L.; MOORE, J. F.; RHYNE, B. e KRIGMAN, M. R. Lead dosage and the role of the intranuclear inclusion body: an experimental study. *Arch. Environ. Health*. v.20, p.705-11. 1970.
- GOYER, R. A. e MOORE, J. F. Cellular effects of lead. *Adv. Exp. Med. Biol.* v.48, p.447-462. 1974.
- GROMAN, D. B. *Histology of the striped bass*. Bethesda : AFS, 1982.
- HEATH, A. G.. *Water pollution and fish physiology*. 2ed. Boca Raton : CRC, 1995.
- HILDEBRAND, M. *Análise da estrutura dos vertebrados*. São Paulo : Atheneu, 1995.
- HODSON, P. V.  $\delta$ -Amino levulinic acid dehydratase activity of fish blood as an indicator of a harmful exposure to lead. *Journal Fisheries Research Board of Canada*. v.33, 268-271. 1976.
- HODSON, P. V.; BLUNT, B. R.; SPRY, D. J. e AUSTEN, K. Evaluation of erythrocyte  $\delta$ -amino levulinic acid dehydratase activity as a short-term indicator in fish of a harmful exposure to lead. *Journal Fisheries Research Board of Canada*. v.34, p.501-08. 1977.
- HODSON, P. V.; BLUNT, B. R. e WHITTLE, D, M.. *Monitoring lead exposure of fish*. In; CAIRNS, V. W.; HODSON, P. V. e NRIAGU, J. O (Eds.). *Offprints from contaminant effects on fisheries*. [s.l.] : John Wiley e Sons, 1984. p.88-98.
- HULL, D. L. *Filosofia da ciência biológica*. Rio de Janeiro : Zahar, 1975.

- JENSEN, F. B.; NIKINMAA, M. e WEBER, R. E. *Environmental perturbations of oxygen transport in teleost fishes: causes, consequences and compensations*. In: RANKIN, J. C. e JENSEN, F. B (Eds.). ***Fish ecophysiology***. New York : Chapman e Hall, 1993. p.161-79.
- KARMAKAR, N.; SAXENA, R. e ANAND, S. Histopathological changes induced in rat tissues by oral intake of lead acetate. ***Environmental Research***. v.41, p.23-28. 1986.
- KOBER, T. E. e COOPER, G. P.. Lead competitively inhibits calcium-dependent synaptic transmission in the bullfrog sympathetic ganglion. ***Nature***, v.262, p.704-05. 1976.
- KRISTENSEN, P.; EILERTSEN, E.; EINARSDÓTTIR, E.; ØVREBø, S. e HAUGEN A. Effect modification by inorganic lead in the dominant lethal assay. ***Mutation Research***. v.302, p.33-38. 1993.
- LANPHEAR, B. P. The paradox of lead poisoning prevention. ***Science***. v.281, n.5383. 1998.
- LANDIS, W. G. e YU, MING-HO. ***Introduction to environmental toxicology: impacts of chemicals upon ecological systems***. Boca Raton : LEWIS, 1995.
- LEMOS, P. M. M. ***Estudos citogenéticos básicos e efeitos do chumbo no complexo cariotípico de Hoplias aff. malabaricus (Pisces, Characiformes, Erythrinidae)***. Curitiba : [s.n.], 2000. Monografia de conclusão de bacharelado em Ciências Biológicas, DEPARTAMENTO DE GENÉTICA, UFPR.
- LOPEZ, P. A.; FENOCCHIO, A. S. Confirmation of two different cytotypes for the neotropical fish *Hoplias malabaricus* (Gill, 1903) (Characiformes). ***Cytobios***, v.80, 217-221, 1994.
- LOUREIRO, V. E. *Dieta e atividade alimentar de Hoplias malabaricus (Bloch, 1794) (Osteichthyes, Erythrinidae) do reservatório da UHE de Segredo, PR, no primeiro ano de sua formação*. In: ENCONTRO BRASILEIRO DE ICTIOLOGIA (XI. : 1995 : Campinas). ***Resumos***. Campinas : PUC, 6-10 fev., 1995. L4, p.12.
- LOWE-MCCONNELL, R. H. ***Estudos ecológicos de comunidades de peixes Neotropicais***. São Paulo: EDUSP, 1999.
- MANAHAN, S. E.. ***Environmental chemistry***. 7.ed. Boca Raton : LEWIS, 2000.
- MANALIS, R. S. e COOPER, G. P.. Presynaptic and postsynaptic effects of lead at the frog neuromuscular junction. ***Nature***, v.243, p.354-55. 1973.

- MASON, A. Z. e JENKINS, K. D.. *Metal toxicity and detoxification in aquatic organisms*. In: TESSIER, A. e TURNER, D. R (Eds.). ***Metal speciation and bioavailability in aquatic systems***. IUPAC: John Wiley e Sons Ltd, 1995.
- MATHEWS, C. K. e HOLDE, K. E. van. ***Biochemistry***. Redwood City : Benjamin/Cummings, 1990.
- MCDONALD, D. G. e WOOD, C. M. *Branchial mechanisms of acclimation to metals in freshwater fish*. In: RANKIN, J. C. e JENSEN, F. B (Eds.). ***Fish ecophysiology***. New York : Chapman e Hall, 1993. p.297-321.
- MELANCON, M. J. *Bioindicators used in aquatic and terrestrial monitoring*. In: HOFFMAN, D. J.; RATTNER, B. A.; BURTON, G. A.; CAIRNS, J (Eds.). ***Handbook of ecotoxicology***. Boca Raton : LEWIS, 1995. p.220-40.
- MONTEIRO, H. P.; ABDALLA, D. S. P.; ARCURI, A. S. e BECHARA, E. J. H. Oxygen toxicity related to exposure to lead. ***Clin. Chem.*** v.31, n.10, p.1673-76. 1985.
- MORAES, Roberto Padula de. ***Transporte de chumbo e metais associados no Rio Ribeira de Iguape, São Paulo, Brasil***. Campinas : [s.n.], 1997. Dissertação de mestrado, INSTITUTO DE GEOCIÊNCIAS, UNICAMP.
- MORRISON, C. M. Histology of the atlantic cod, *Gadus morhua*: an atlas. ***Canadian Spec. Publ. Fish. Aquat. Sci.*** v. 98, part one, Ottawa. 1987.
- NICHOLLS, D. McE.; TEICHERT-KULISZEWSKA, K. e GIRGIS, G. R. Effect of chronic Hg chloride exposure on liver and muscle enzymes in fish. ***Comp. Biochem. Physiol.*** v. 94C, n.1, p.265-270. 1989.
- OLIVEIRA RIBEIRO, C. A.; PELLETIER, E.; PFEIFFER, W. C. e ROULEAU, C. Comparative uptake, bioaccumulation, and gill damages of inorganic mercury in tropical and nordic freshwater fish. ***Environmental Research***. v.83, p.286-292. 2000.
- PAIN, D. J.. *Lead in the environment*. In: HOFFMAN, D. J.; RATTNER, B. A.; BURTON, G. A.; CAIRNS, J (Eds.). ***Handbook of ecotoxicology***. Boca Raton : LEWIS, 1995. p.356-91.
- PELLETIER, E.. *Environmental organometallic chemistry of mercury, tin, and lead: present status and perspectives*. In: TESSIER, A. e TURNER, D. R (Eds.). ***Metal speciation and bioavailability in aquatic systems***. IUPAC: John Wiley e Sons Ltd, 1995. cap 3.
- PERRY, S. F. e MCDONALD, G. *Gas exchange*. In: Evans, D. H (Ed.). ***The physiology of fishes***. Boca Raton : CRC, 1993. p.251-78.

- PERRY, S. F. e LAURENT, P. *Environmental effects on fish gill structure and function*. In: RANKIN, J. C. e JENSEN, F. B (Eds.). ***Fish ecophysiology***. New York : Chapman e Hall, 1993. p. 231-64.
- POUGH, H. F.; HEISSER B. J. e MCFARLAND, W. N.. ***A vida dos vertebrados***. 2.ed. São Paulo : Atheneu, 1999.
- RIBEIRO, S. C. e CAETANO-FILHO, M. *Monocultivo de Oreochromis niloticus com alta densidade e estocagem*. In: ENCONTRO BRASILEIRO DE ICTIOLOGIA (XI. : 1995 : Campinas). ***Resumos***. Campinas : PUC, 6-10 fev., 1995.
- RODRIGUES, A. L. S.  ***$\delta$ -aminolevulinato desidratase (E.C.:4.2.1.24) em sangue de Pimelodus maculatus (Pisces, Pimelodidae): características bioquímicas e efeito de metais pesados***. Porto Alegre : [s.n.], 1987. Dissertação de mestrado, Departamento de Bioquímica, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- SÃO PAULO (Estado). SECRETARIA DE ESTADO DO MEIO AMBIENTE (SMA). ***Programa de educação ambiental do vale do Ribeira***. 2.ed. São Paulo : SMA, 1992.
- SIMKISS e TAYLOR. *Transport of metals across membranes*. In: TESSIER, A. e TURNER, D. R (Eds.). ***Metal speciation and bioavailability in aquatic systems***. IUPAC: John Wiley e Sons Ltd, 1995. cap.1.
- SIPPEL, A. J. A.; GERACI, J. R. e HODSON, P. V. Histopathological and physiological responses of rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson) to sublethal levels of lead. ***Water Research***. v.17, p.1115-1118. 1983.
- SITHISARANKUL, P.; SCHWARTZ, B. S.; LEE, B. K.; KELSEY, K. T. e STRICKLAND, T. Aminolevulinic acid dehydratase genotype mediates plasma levels of the neurotoxin, 5-aminolevulinic acid, in lead-exposed workers. ***Am. J. Ind. Med.*** v.32, n.1, p.15-20. 1997. Resumo.
- SOUZA, W (Ed.). ***Técnicas básicas de microscopia eletrônica aplicadas às ciências biológicas***. Rio de Janeiro : Sociedade Brasileira de Microscopia, 1998.
- STENESH, J. ***Biochemistry***. New York : Plenum, 1998.
- STURM, A.; SILVA DE ASSIS, H. C. e HANSEN, P.-D. Cholinesterase of marine teleost fish: enzymological characterization and potential use in the monitoring of neurotoxic contamination. ***Marine Environmental Research***. v.47, p.389-398. 1999.

- TAKASHIMA, F. e HIBIYA, T. *An atlas of fish histology: normal and pathological features*. 2.ed. New York : 1995.
- TAO, S.; LIU, C.; DAWSON, R.; CAO, J. e LI, B. Uptake of particulate lead via the gills of fish (*Carassius auratus*). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* v.37, p.352-357. 1999.
- VIGHI, M. Lead uptake and release in a experimental trophic chain. *Ecotoxicology and environmental safety*. v.5, p.177-93. 1981.
- VOET, D. e VOET J. G. *Biochemistry*. 2.ed. New York : John Wiley e Sons, 1995.
- WELSCH, U. *Sobotta, Histologia: atlas colorido de citologia, histologia e anatomia microscópica humana*. 5.ed. Rio de Janeiro : Guanabara, 1999.
- YASUTAKE, W. T. e WALES, J. H. *Microscopic anatomy of salmonids: an atlas*. Washington D.C. : U.S. Department of the interior, fish and wildlife service, 1983.
- ZUBAY, G. *Biochemistry*. 3.ed. Dubuque : Wm. C. Brown, 1993.

### Para a confecção do mapa

CBA (COMPANHIA BRASILEIRA DE ALUMÍNIO, GRUPO VOTORANTIN). **Aproveitamento Hidrelétrico Tijuco Alto, rio Ribeira de Iguape: estudo de impacto ambiental.** Consórcio: INTERTECHNE CONSULTORES ASSOCIADOS S/C LTDA.; ENGEMIN, ENGENHARIA E GEOLOGIA LTDA. e IPEC COMÉRCIO, PLANEJ., ESTUDOS, CONSULTORIA E PARTICIP. LTDA. 1991. Figura 6.2 (a).

DAEE (DEPARTAMENTO DE ÁGUAS E ENERGIA ELÉTRICA; SECRETARIA DE RECURSOS HÍDRICOS, SANEAMENTO E OBRAS; GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO). **Bacia hidrográfica do Ribeira de Iguape: relatório síntese do plano de ação.** 1998. p.11.

FUNDAÇÃO DO INSTITUTO BRASILEIRO DE CARTOGRAFIA. **Atlas geográfico.** Rio de Janeiro : FAE, 1984.

IBGE-Diretoria de Geodésia e Cartografia, 1987. Município de Apiaí-SP (MI-2827-1) (1 : 50000).

MORAES, Roberto Padula de. **Transporte de chumbo e metais associados no Rio Ribeira de Iguape, São Paulo, Brasil.** Campinas : [s.n.], 1997. Dissertação de mestrado, INSTITUTO DE GEOCIÊNCIAS, UNICAMP. p.19.

SÃO PAULO (Estado). SECRETARIA DE ESTADO DO MEIO AMBIENTE (SMA). **Programa de educação ambiental do vale do Ribeira.** 2.ed. São Paulo : SMA, 1992. p. 122 e 133.

SUDERHSA. **Atlas de Recursos Hídricos do Estado do Paraná.** Curitiba, 1998.

SUREHMA (SUPERINTENDÊNCIA DE RECURSOS HÍDRICOS E MEIO AMBIENTE). **Qualidade das águas interiores do estado do Paraná.** Curitiba, 1987.

**ANEXO 1:** 35 elementos quantificados no *Institut des Sciences de La Mer - Université du Québec à Rimouski* (cf. **seção 7, Introdução Geral**).

*CPM*

ISO 9001  
CENTRE DE RECHERCHE  
MINÉRALE

DATE: 99/04/26

A:

Monsieur Ghislain Canuel  
Univ. du Québec à Rimouski  
Institut Sciences de la Mer  
310, allée des Ursulines  
RIMOUSKI (Québec)  
G5L 3A1

Télécopieur : 418-723-7234

Numéro de dossier: 7163  
Numéro de projet : F.O.53126  
Numéro de demande: 99 03 30 009

Centre de recherche minérale  
Direction du laboratoire d'analyse  
2700, rue Einstein  
SAINTÉ-FOY, (Québec), G1P 3W8  
Téléphone : (418) 643-4540  
Télécopieur: (418) 646-6080

\*\*\*\*\* R E S U L T A T \*\*\*\*\*

*BALSA*

*ILHA*

-----  
DESIGN: ARR 1                      ARR 2                      ARR 3                      ARR 4                      ARR 5  
NO. LAB: 98 035643                      98 035644                      98 035645                      98 035646                      98 035647  
-----

*fine sand*

*medium sand*

	ARR 1	ARR 2	ARR 3	ARR 4	ARR 5
* C01 Ag				<400 ppb	<400 ppb
* Al				2,13 %	0,86 %
* B				6 ppm	4 ppm
* Ba				140 ppm	86 ppm
* Be				<2 ppm	<2 ppm
* Bi				5 ppm	<3 ppm
* Ca				0,18 %	0,18 %
* Cd				<200 ppb	<200 ppb
* Ce				52 ppm	28 ppm
* Co				10 ppm	6 ppm
* Cr				21 ppm	15 ppm
* Cu				17 ppm	8 ppm
* Eu				<100 ppb	<100 ppb
* Fe				1,98 %	1,05 %
* Ga				7 ppm	3 ppm
* Ge				4 ppm	<4 ppm
* K				0,15 %	0,08 %
* La				30 ppm	17 ppm
* Li				11 ppm	5 ppm
* Mg				0,18 %	0,14 %
* Mn				570 ppm	270 ppm
* Mo				<3 ppm	<3 ppm
* Na				0,01 %	<0,01 %
* Ni				15 ppm	11 ppm
* P				540 ppm	530 ppm
* Pb				29 ppm	13 ppm
* Sc				4 ppm	2 ppm
* Sm				6 ppm	3 ppm
* Sr				25 ppm	20 ppm
* Th				5 ppm	5 ppm
* Ti				0,02 %	0,02 %
* V				30 ppm	18 ppm
* Y				9 ppm	4 ppm
* Zn				63 ppm	45 ppm
* Zr				2 ppm	2 ppm

*next page*

*u*



DATE: 99/04/26

A:

Monsieur Ghislain Canuel  
 Univ. du Québec à Rimouski  
 Institut Sciences de la Mer  
 310, allée des Ursulines  
 RIMOUSKI (Québec)  
 G5L 3A1

Télécopieur : 418-723-7234

Numéro de dossier: 7163  
 Numéro de projet: P.O.53126  
 Numéro de demande: 99 03 30 009

*1% = 10 000 ppm*

Centre de recherche minérale  
 Direction du Laboratoire d'analyse  
 2700, rue Einstein  
 BAINTE-FOY, (Québec), G1P 3W8  
 Téléphone : (418) 643-4540  
 Télécopieur: (418) 646-6080

*CHÂO REJ. F.M. de Carde. Julio Sampa*  
*LALAGADO REJ. PROX. ANAL. EST. QUANTIT. me l'item base*  
*MAQUINAS*  
*OMAGS*  
*pronto*

	DESIGN: ARR 6 NO.LAB: 98 035648	ARR 7 98 035649	ARR 8 98 035650	ARR 9 98 035651	ARR 10 98 035652
* C01 Ag	19 ppm	11 ppm	24 ppm	8 ppm	14 ppm
* Al	0,24 %	0,06 %	0,06 %	0,08 %	0,07 %
* B	<4 ppm	<4 ppm	<4 ppm	<4 ppm	<4 ppm
* Ba	190 ppm	120 ppm	84 ppm	96 ppm	95 ppm
* Be	<2 ppm	<2 ppm	<2 ppm	<2 ppm	<2 ppm
* Bi	9 ppm	7 ppm	6 ppm	6 ppm	7 ppm
* Ca	16,4 %	15,3 %	13,6 %	15,4 %	14,9 %
* Cd	<200 ppb	<200 ppb	<200 ppb	<200 ppb	<200 ppb
* Ce	12 ppm	8 ppm	8 ppm	9 ppm	8 ppm
* Co	2 ppm	3 ppm	3 ppm	2 ppm	3 ppm
* Cr	57 ppm	10 ppm	11 ppm	11 ppm	13 ppm
* Cu	490 ppm	240 ppm	570 ppm	210 ppm	350 ppm
* Eu	<100 ppb	<100 ppb	<100 ppb	<100 ppb	<100 ppb
* Fe	0,91 %	0,74 %	0,76 %	0,76 %	0,75 %
* Ga	<3 ppm	<3 ppm	<3 ppm	<3 ppm	<3 ppm
* Ge	<4 ppm	<4 ppm	<4 ppm	<4 ppm	<4 ppm
* K	0,20 %	0,10 %	0,06 %	0,06 %	0,04 %
* La	7 ppm	5 ppm	4 ppm	5 ppm	5 ppm
* Li	3 ppm	2 ppm	2 ppm	2 ppm	2 ppm
* Mg	8,81 %	8,60 %	7,50 %	8,34 %	8,27 %
* Mn	940 ppm	840 ppm	840 ppm	840 ppm	840 ppm
* Mo	7 ppm	9 ppm	30 ppm	5 ppm	7 ppm
* Na	0,03 %	0,03 %	0,02 %	0,02 %	0,02 %
* Ni	13 ppm	5 ppm	4 ppm	5 ppm	5 ppm
* F	270 ppm	230 ppm	280 ppm	250 ppm	240 ppm
* Fb	1,37 %	0,97 %	2,34 %	0,63 %	1,11 %
* Sc	1 ppm	<1 ppm	1 ppm	1 ppm	1 ppm
* Sm	3 ppm	2 ppm	2 ppm	2 ppm	2 ppm
* Sr	270 ppm	230 ppm	240 ppm	220 ppm	220 ppm
* Th	7 ppm	4 ppm	2 ppm	5 ppm	4 ppm
* Ti	<0,01 %	<0,01 %	<0,01 %	<0,01 %	<0,01 %
* V	9 ppm	7 ppm	5 ppm	9 ppm	7 ppm
* Y	14 ppm	11 ppm	8 ppm	11 ppm	11 ppm
* Zn	340 ppm	440 ppm	450 ppm	440 ppm	420 ppm
* Zr	6 ppm	3 ppm	3 ppm	3 ppm	3 ppm



ISO 9001  
CENTRE DE RECHERCHE  
MINÉRALE

DATE: 99/04/26

A:

Monsieur Ghislain Canuel  
Univ. du Québec à Rimouski  
Institut Sciences de la Mer  
310, allée des Ursulines  
RIMOUSKI (Québec)  
G5L 3A1

Télécopieur : 418-723-7234

Numéro de dossier: 7163  
Numéro de projet : P.O.53126  
Numéro de demande: 99 03 30 009

Centre de recherche minérale  
Direction du laboratoire d'analyse  
2700, rue Einstein  
SAINTE-FOY, (Québec), G1P 3W8  
Téléphone : (418) 643-4540  
Télécopieur: (418) 646-6080

Vautour ponton  
FRET

Foz de Rocha

Rocha

OUT

OUT

		R E S U L T A T									
		m.p.		granul		fine sand		fine sand		fine sand	
		ARR, 11		ARR 12		ARR 13		ARR 14		ARR 15	
		NO. LAB: 98 035653		98 035654		98 035655		98 035656		98 035657	
* C01	Ag	36	PPM	900	PPB	6	PPM	2	PPM	400	PPB
	Al	0,07	%	0,42	%	0,55	%	0,61	%	1,00	%
	B	<4	PPM	5	PPM	5	PPM	5	PPM	<4	PPM
	Ba	93	PPM	68	PPM	100	PPM	81	PPM	96	PPM
	Be	<2	PPM	<2	PPM	<2	PPM	<2	PPM	<2	PPM
	Bi	6	PPM	<3	PPM	4	PPM	<3	PPM	<3	PPM
	Ca	13,9	%	1,49	%	3,62	%	2,00	%	0,23	%
	Cd	<200	PPB	<200	PPB	<200	PPB	<200	PPB	<200	PPB
	Ce	9	PPM	14	PPM	13	PPM	12	PPM	33	PPM
	Co	3	PPM	11	PPM	18	PPM	19	PPM	6	PPM
	Cr	14	PPM	15	PPM	16	PPM	15	PPM	14	PPM
	Cu	520	PPM	79	PPM	290	PPM	160	PPM	8	PPM
	Eu	<100	PPB	<100	PPB	<100	PPB	<100	PPB	<100	PPB
	Fe	0,78	%	1,85	%	1,88	%	1,81	%	1,08	%
	Ga	<3	PPM	<3	PPM	<3	PPM	<3	PPM	4	PPM
	Ge	<4	PPM	<4	PPM	<4	PPM	<4	PPM	<4	PPM
	K	0,03	%	0,07	%	0,10	%	0,11	%	0,08	%
	La	6	PPM	8	PPM	7	PPM	6	PPM	26	PPM
	Li	2	PPM	11	PPM	14	PPM	13	PPM	5	PPM
	Mg	7,70	%	0,77	%	1,46	%	0,78	%	0,16	%
	Mn	850	PPM	920	PPM	0,15	%	0,10	%	330	PPM
	Mo	29	PPM	<3	PPM	<3	PPM	<3	PPM	<3	PPM
	Na	0,01	%	0,29	%	0,03	%	0,09	%	0,19	%
	Ni	5	PPM	24	PPM	25	PPM	24	PPM	9	PPM
	P	290	PPM	220	PPM	240	PPM	220	PPM	600	PPM
	Pb	3,12	%	570	PPM	0,20	%	860	PPM	22	PPM
	Sc	1	PPM	1	PPM	1	PPM	1	PPM	2	PPM
	Sm	2	PPM	3	PPM	3	PPM	3	PPM	4	PPM
	Sr	290	PPM	40	PPM	73	PPM	51	PPM	23	PPM
	Th	4	PPM	4	PPM	5	PPM	4	PPM	5	PPM
	Ti	<0,01	%	<0,01	%	<0,01	%	<0,01	%	0,01	%
	V	6	PPM	9	PPM	9	PPM	9	PPM	19	PPM
	Y	10	PPM	5	PPM	7	PPM	6	PPM	6	PPM
	Zn	600	PPM	140	PPM	670	PPM	470	PPM	61	PPM
	Zr	3	PPM	91	PPM	11	PPM	25	PPM	30	PPM



ISO 9001

CENTRE DE RECHERCHE MINÉRALE

DATE: 99/04/26

A:

Monsieur Ghislain Canuel  
Univ. du Québec à Rimouski  
Institut Sciences de la Mer  
310, allée des Ursulines  
RIMOUSKI (Québec)  
G5L 3A1

Télécopieur : 418-723-7234

Numéro de dossier: 7163  
Numéro de projet : F.O.53126  
Numéro de demande: 99 03 30 009

Centre de recherche minérale  
Direction du laboratoire d'analyse  
2700, rue Einstein  
SAINTE-FOY, (Québec), G1P 3W8  
Téléphone : (418) 643-4540  
Télécopieur: (418) 646-6080

Foz do

Rocha

Granul

RESULTAT

DESIGN:	ARR 16	ARR 17	ARR 18
NO. LAB:	98 035658	98 035659	98 035660
CO1 Ag	1 ppm	348 ppm	596 ppm
Al	0,46 %	0,08 %	<0,02 %
B	5 ppm	<4 ppm	<4 ppm
Ba	110 ppm	<1 ppm	3 ppm
Be	<2 ppm	<2 ppm	<2 ppm
Bi	<3 ppm	14 ppm	<3 ppm
Ca	1,06 %	3,03 %	0,04 %
Cd	<200 ppb	14 ppm	1 ppm
Ce	16 ppm	10 ppm	<2 ppm
Co	15 ppm	8 ppm	8 ppm
Cr	14 ppm	<1 ppm	<1 ppm
Cu	89 ppm	[9,93 %]	(3,18 %)
Eu	<100 ppb	440 ppb	<100 ppb
Fe	1,70 %	1,22 %	1,30 %
Ga	<3 ppm	<3 ppm	<3 ppm
Ge	<4 ppm	36 ppm	20 ppm
K	0,08 %	<0,02 %	<0,02 %
La	6 ppm	7 ppm	<3 ppm
Li	10 ppm	1 ppm	<1 ppm
Mg	0,51 %	1,65 %	0,02 %
Mn	0,10 %	390 ppm	5 ppm
Mo	<3 ppm	5 ppm	<3 ppm
Na	0,22 %	0,12 %	<0,01 %
Ni	24 ppm	7 ppm	2 ppm
P	210 ppm	250 ppm	35 ppm
Pb	430 ppm	[4,47 %]	[10,50 %]
Sc	1 ppm	<1 ppm	<1 ppm
Sm	3 ppm	1 ppm	<1 ppm
Sr	42 ppm	87 ppm	120 ppm
Th	3 ppm	11 ppm	<2 ppm
Ti	<0,01 %	<0,01 %	<0,01 %
V	8 ppm	5 ppm	<2 ppm
Y	4 ppm	14 ppm	<1 ppm
Zn	160 ppm	0,37 %	49 ppm
Zr	77 ppm	54 ppm	1 ppm

small rock - small rock with felsic inclusions

Metals in yellow show very high positive anomalies i.e. samples rich in these metals when compared to normal soils

**ANEXO 2:** Protocolo seguido no processamento das peças de fígado até emblocação, para observação por microscopia de luz visível e eletrônica de transmissão.

**FIXADOR  
PARA  
MICROSCOPIA  
DE LUZ**

**SOLUÇÃO ALCOÓLICA  
DE  
BOUIN**

solução saturada de ÁCIDO PÍCRICO: em Erlenmeyer sobre agitador magnético, colocar o ácido sobre a água até que cesse a dissolução; filtrar e estocar (geladeira).

75ml solução saturada de ÁCIDO PÍCRICO,  
25ml de FORMOL 40% e  
5ml de ÁCIDO ACÉTICO GLACIAL (CH<sub>3</sub>.COOH) pouco antes da fixação.

**FIXADOR PARA MET: KARNOVSKY (modificado)**

**Soluções aquosas necessárias:**

- **GLUTARALDEÍDO 25%**
- **PARAFORMALDEÍDO 10%**: após a mistura em D-H<sub>2</sub>O aquecida (60-70°C), adicionar agitando gotas de NaOH 1N até a viragem de opaco a quase translúcido.
- Tampão **CACODILATO 0,2M** (pH 7,2 a 7,4 para mamíferos): usar o sal hidratado cacodilato de sódio (Na(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>.AsO<sub>2</sub>.3H<sub>2</sub>O); preparar em excesso, para a lavagem: **4,28g de sal em 100ml**.
- **CaCl<sub>2</sub> 0,5M**: 2,77g em 50 ml; **CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O 0,5M**: 3,67g em 50 ml

**Para 10 ml de solução final (x=1):**

KARNOVSKY	C <sub>i</sub>	V <sub>i</sub> (ml)	C <sub>f</sub>	V <sub>f</sub> (ml)
GLUTARALDEÍDO	25%	x	2,5%	10x
PARAFORMALDEÍDO	10%	3,95x	≅ 4%	10x
CACODILATO	0,2M	5,00x	0,1M	10x
CaCl <sub>2</sub>	0,5M	0,05x	0,0025M	10x

O volume final pode variar de acordo com o n.º de amostras (0,5ml/vidro), sempre em função de x (tabelado) e na seguinte proporção:

$$f(x) = V_f \Leftrightarrow x = V_f/10$$

**FIXAÇÃO DE MATERIAL BIOLÓGICO**

MICROSCOPIA DE LUZ	MET
<b>TEMPO E MODO DE FIXAÇÃO</b>	
encher os vidros com as peças e <b>BOUIN: 12 h</b>	cobrir as peças (0,5ml/vidro) com <b>KARNOVSKY: 2 h</b>
<b>LAVAGEM DO FIXADOR</b>	
5 "banhos" ou trocas sucessivas: com D-H <sub>2</sub> O. estocar em etanol 70% a 4°C ou lavar <b>OVERNIGHT</b> com água corrente	<ul style="list-style-type: none"> <li>• desprezar as peças grudadas;</li> <li>• retirar o fixador;</li> <li>• lavar com CACODILATO por 10 minutos</li> <li>• repetir a lavagem (3X ao total).</li> </ul> <p style="text-align: center;">OBS.: atenção e muito critério.</p>

OBS.: Todas as substâncias deste quadro são tóxicas e devem ser manipuladas sob capela e desprezadas em recipientes para lixo tóxico (LIXOTOX).

**PÓS-FIXAÇÕES PARA MET**

**OSMÍO: OSO<sub>4</sub> 2% EM ÁGUA DESTILADA**

- **RETIRAR O TAMPÃO CACODILATO** (passo anterior) com uma pipeta
- **DILUIR o OsO<sub>4</sub> 2%** (1:1) com gotas do tampão CACODILATO 0,2 M (no fim: 1% e 0,1M) até cobrir as peças (**TEMPO DE FIXAÇÃO É DE 1H** ou até o PRETO)
- **DESPREZAR AS PEÇAS GRUDADAS**
- **RETIRAR o fixador e LAVAR o material 3 vezes com D-H<sub>2</sub>O** (10' cada)

OBS.: a lavagem (trocas) deve ser feita com muita atenção, principalmente se o próximo passo for realizado, já que o CACODILATO pode precipitar a URANILA gerando artefatos. O ósmio é um metal pesado, tóxico (LIXOTOX).

**URANILA EM BLOCO (ACETATO DE URANILA)**

- **RETIRAR A ÁGUA** da lavagem anterior com uma pipeta
- **DILUIR a URANILA à 0,2%**.
- fixação pela URANILA é facultativa e pode variar de 2 a 24h (**OVERNIGHT**)
- **DESPREZAR AS PEÇAS GRUDADAS**,
- **RETIRAR a URANILA e LAVAR o material 3 vezes com D-H<sub>2</sub>O** (5' cada) com muita atenção

OBS.: a uranila é tóxica (LIXOTOX).

## DESIDRATAÇÃO

MICROSCOPIA DE LUZ		MET	
ETANOL (%):	TEMPO	ETANOL MERCK (%):	TEMPO
80⇒90⇒95⇒	1h30' cada	30⇒50⇒70⇒95⇒	10' cada
⇒100⇒100⇒100	30' cada	⇒100⇒100	20' cada

OBS.: para MO, a etapa de etanol 95% permite *OVERNIGHT* e aquelas de 100%, podem endurecer a peça caso o tempo total exceda 1h30' (variável para o tamanho da peça e tipo de tecido). Desprezar sempre as peças não imersas. LIXOTOX para o etanol de MET.

## PREPARO DAS PEÇAS À INCLUSÃO

MICROSCOPIA DE LUZ: DIAFANIZAÇÃO	MET
XILOL 1:1 ETANOL ABSOLUTO    1h	<b>ÓXIDO DE PROPILENO</b>
XILOL puro                            1h	(3 trocas, 10' cada banho)
XILOL puro                            15'	<b>(LIXOTOX)</b>

OBS.: desprezar sempre as peças não imersas; o XILOL e o ÓXIDO DE PROPILENO são tóxicos (LIXOTOX).

## INCLUSÃO

MICROSCOPIA DE LUZ: PARAPLAST	MET: POLYBED
<p><i>Processo realizado em estufa a 56-58°C</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• derreter a resina (iniciar no dia anterior);</li> <li>• colocar a resina em cadinhos (1 cadinho por peça);</li> <li>• imergir as peças nos cadinhos com resina</li> <li>• tempo de inclusão: 2h</li> </ul> <p>OBS.: os cadinhos devem ser identificados com os dados que constavam nos vidros. Um tempo excessivo de inclusão pode danificar o material ("cozinhá-lo"). A temperatura da estufa não pode variar.</p>	<p style="text-align: center;"><i>PREPARO DA RESINA</i></p> <p style="text-align: center;">Usar recipiente de vidro descartável, bem lavado e seco:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 48 ml (50 g) de polybed 812;</li> <li>• 31 ml (25 g) de DDSA;</li> <li>• 21 ml (25 g) de NMA;</li> <li>• 2 ml de DMP-30 (pouco antes do uso).</li> </ul> <p style="text-align: center;">A resina deve ser estocada em seringas (facilidade de uso) bem vedadas com PARAFILME (ausência de ar) e guardadas em congelador.</p> <p style="text-align: center;"><i>INCLUSÃO</i></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>i. retirar o ÓXIDO DE PROPILENO dos vidros;</li> <li>ii. cobrir as peças com:             <ul style="list-style-type: none"> <li>• <u>RESINA 1:1 ÓXIDO DE PROPILENO</u> por 1h (mexer ocasionalmente);</li> <li>• <u>RESINA 2:1 ÓXIDO DE PROPILENO</u> por 1h ou <i>OVERNIGHT</i> (vidros abertos);</li> <li>• <u>RESINA PURA (30')</u>.</li> </ul> </li> </ol> <p>OBS.: desprezar sempre as peças não imersas. A resina é tóxica (LIXOTOX).</p>

## EMBLOCAGEM

MICROSCOPIA DE LUZ	MET
<p style="text-align: center;">Processo realizado em bancada próxima à estufa e com lamparina acesa:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• colocar a resina no molde;</li> <li>• colocar a peça com a face que se quer cortar primeiro para baixo;</li> <li>• eliminar bolhas com uma pinça aquecida;</li> <li>• repetir para as outras peças;</li> <li>• deixar esfriar (polimerizar) ao ar.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• colocar um pouco de resina na extremidade da fôrma onde será depositada a peça;</li> <li>• colocar a peça, sem encostá-la na fôrma, mas também não muito longe da extremidade;</li> <li>• completar o molde com a resina;</li> <li>• repetir para as outras peças;</li> <li>• polimerizar em estufa a 60°C por 24h.</li> </ul> <p>OBS.: a resina é tóxica.</p>

**ANEXO 3:** Análises estatísticas realizadas com o programa GraphPad Prism®, v.3.00, © 1994-1999, para os resultados de:

- A: atividade colinesterásica no músculo de *Hoplias malabaricus*;
- B: atividade da  $\delta$ -ALA-d eritrocitária de *Oreochromis niloticus*;
- C: concentração de hemoglobina no sangue de *Oreochromis niloticus*;
- D:  $\Delta\%$  de rativação da  $\delta$ -ALA-d com DTT com sangue de *O. niloticus*;

X Labels		A	B	C
X Labels		controles	Pb (18 dias)	Pb (41 dias)
X		Y	Y	Y
1	Number of values	3	3	3
2				
3	Minimum	160.5	154.4	115.8
4	25% Percentile			
5	Median	191.4	186.7	131.3
6	75% Percentile			
7	Maximum	267.5	203.8	152.7
8				
9	Mean	206.4	181.6	133.2
10	Std Deviation	55.04	25.06	18.52
11	Std Error	31.78	14.47	10.69
12				
13	Lower 95% CI	69.72	119.4	87.23
14	Upper 95% CI	343.2	243.9	179.2
15				
16	Coefficient of variation	26.66%	13.80%	13.90%
17	Geometric mean	201.8	180.4	132.4

		A	B	C
		controles	Pb (18 dias)	Pb (41 dias)
		Y	Y	Y
1		191.350	154.420	115.770
2		160.520	203.770	152.650
3		267.450	186.710	131.280

X Labels		A	B	C	D
Parameter		Value	Data Set-B	Data Set-C	Data Set-D
X		Y	Y	Y	Y
1	Table Analyzed				
2	atividadeChE				
3	One-way analysis of variance				
4	P value	0.1179			
5	P value summary	ns			
6	Are means signif. different? (P < 0.05)	No			
7	Number of groups	3			
8	F	3.119			
9	R squared	0.5097			
10					
11	ANOVA Table	SS	df	MS	
12	Treatment (between columns)	8317	2	4159	
13	Residual (within columns)	8001	6	1333	
14	Total	16320	8		
15					
16	Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	P value	95% CI of diff
17	controles vs Pb (18 dias)	24.81	1.177	P > 0.05	-66.67 to 116.3
18	controles vs Pb (41 dias)	73.21	3.472	P > 0.05	-18.27 to 164.7
19	Pb (18 dias) vs Pb (41 dias)	48.40	2.296	P > 0.05	-43.08 to 139.9

	<b>X Labels</b>	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>
	X Labels	A (300µg/l)	B (100µg/l)	C (controles)
	X	Y	Y	Y
1	Number of values	5	5	4
2				
3	Minimum	0.0180	0.0150	0.0329
4	25% Percentile			
5	Median	0.0240	0.0236	0.03925
6	75% Percentile			
7	Maximum	0.0314	0.0319	0.0514
8				
9	Mean	0.02458	0.02392	0.0407
10	Std. Deviation	0.004844	0.006332	0.008102
11	Std. Error	0.002166	0.002832	0.004051
12				
13	Lower 95% CI	0.01857	0.01606	0.02781
14	Upper 95% CI	0.03059	0.03178	0.05359
15				
16	Normality Test			
17	KS distance	0.2038	0.1630	N too small
18	P value	P > 0.10	P > 0.10	
19	Passed normality test (*=0.05)?	Yes	Yes	
20	P value summary	ns	ns	
21				
22	One sample t test			
23	Theoretical mean	0.0	0.0	0.0
24	Actual mean	0.02458	0.02392	0.0407
25	Discrepancy	-0.02458	-0.02392	-0.0407
26	95% CI of discrepancy	0.01857 to 0.03059	0.01606 to 0.03178	0.02781 to 0.05359
27	t, df	t=11.35 df=4	t=8.447 df=4	t=10.05 df=3
28	P value (two tailed)	0.0003	0.0011	0.0021
29	Significant (alpha=0.05)?	Yes	Yes	Yes
30				
31	Coefficient of variation	19.71%	26.47%	19.91%
32	Geometric mean	0.02419	0.02320	0.04012

	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>
	A (300µg/l)	B (100µg/l)	C (controles)
	Y	Y	Y
1	0.023	0.015	0.051
2	0.031	0.022	0.042
3	0.018	0.024	0.033
4	0.026	0.027	0.036
5	0.024	0.032	

B

X Labels		A	B	C
Parameter		Value	Data Set-B	Data Set-C
X		Y	Y	Y
1	Table Analyzed			
2	ATIVIDADE			
3	Kruskal-Wallis test			
4	P value	0.0183		
5	Exact or approximate P value?	Gaussian Approximation		
6	P value summary	*		
7	Do the medians vary signif. (P < 0.05)	Yes		
8	Number of groups	3		
9	Kruskal-Wallis statistic	8.006		
10				
11	Dunn's Multiple Comparison Test	Difference in rank sum	P value	Summary
12	A (300mg/l) vs B (100mg/l)	0.2000	P > 0.05	ns
13	A (300mg/l) vs C (controles)	-6.900	P < 0.05	*
14	B (100mg/l) vs C (controles)	-7.100	P < 0.05	*

X Labels		A	B	C
Parameter		Value	Data Set-B	Data Set-C
X		Y	Y	Y
1	Table Analyzed			
2	ATIVIDADE			
3	One-way analysis of variance			
4	P value	0.0041		
5	P value summary	**		
6	Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes		
7	Number of groups	3		
8	F	9.438		
9	R squared	0.6318		
10				
11	ANOVA Table	SS	df	MS
12	Treatment (between columns)	0.0007742	2	0.0003871
13	Residual (within columns)	0.0004512	11	0.00004102
14	Total	0.001225	13	
15				
16	Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	P value 95% CI of diff
17	A (300mg/l) vs B (100mg/l)	0.0006600	0.2304	P > 0.05 :-0.01028 to 0.0116
18	A (300mg/l) vs C (controles)	-0.01612	5.306	P < 0.01 :-0.02772 to -0.0045
19	B (100mg/l) vs C (controles)	-0.01678	5.524	P < 0.01 :-0.02838 to -0.0052

X Labels		A	B	C
X Labels		A (300 $\mu$ g/l)	B (100 $\mu$ g/l)	C (controles)
X		Y	Y	Y
1	Number of values	5	5	4
2				
3	Minimum	5.860	5.650	6.070
4	25% Percentile			
5	Median	6.810	8.720	8.420
6	75% Percentile			
7	Maximum	8.420	9.350	9.430
8				
9	Mean	7.116	8.234	8.085
10	Std. Deviation	0.9819	1.489	1.430
11	Std. Error	0.4391	0.6658	0.7149
12				
13	Lower 95% CI	5.897	6.385	5.810
14	Upper 95% CI	8.335	10.08	10.36
15				
16	Coefficient of variation	13.80%	18.08%	17.68%
17	Geometric mean	7.062	8.107	7.981

		A	B	C
		A (300 $\mu$ g/l)	B (100 $\mu$ g/l)	C (controles)
		Y	Y	Y
1		5.860	9.060	8.280
2		6.810	9.350	8.560
3		8.420	8.390	6.070
4		6.770	8.720	9.430
5		7.720	5.650	

ALA-D.PZM:Results-5:One-way ANOVA (and nonparametric):Tabular results - Fri Jan 19 01:39:55 2001

X Labels		A	B	C	D
Parameter		Value	Data Set-B	Data Set-C	Data Set-D
X		Y	Y	Y	Y
1	Table Analyzed				
2	hemoglobina				
3	One-way analysis of variance				
4	P value	0.3820			
5	P value summary	ns			
6	Are means signif. different? (P < 0.05)	No			
7	Number of groups	3			
8	F	1.052			
9	R squared	0.1605			
10					
11	ANOVA Table	SS	df	MS	
12	Treatment (between columns)	3.605	2	1.803	
13	Residual (within columns)	18.85	11	1.714	
14	Total	22.46	13		
15					
16	Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	P value	95% CI of diff
17	A (300mg/l) vs B (100mg/l)	-1.118	1.909	P > 0.05	-3.355 to 1.119
18	A (300mg/l) vs C (controles)	-0.9690	1.560	P > 0.05	-3.341 to 1.403
19	B (100mg/l) vs C (controles)	0.1490	0.2399	P > 0.05	-2.223 to 2.521

	X Labels	A	B	C
	X Labels	A (300mg/l)	B (100mg/l)	controles
	X	Y	Y	Y
1	Number of values	5	5	4
2				
3	Minimum	35.35	36.94	18.92
4	25% Percentile			
5	Median	43.53	45.39	25.29
6	75% Percentile			
7	Maximum	51.42	50.37	37.60
8				
9	Mean	43.99	45.17	26.78
10	Std. Deviation	5.828	5.094	7.967
11	Std. Error	2.607	2.278	3.984
12				
13	Lower 95% CI	36.75	38.84	14.10
14	Upper 95% CI	51.23	51.49	39.45

	A	B	C
	A (300µg/l)	B (100µg/l)	C (controles)
	Y	Y	Y
1	51.415090	50.366300	18.920640
2	46.321070	48.170210	23.411020
3	35.349000	36.942680	37.604170
4	43.329780	45.392230	27.169680
5	43.531200	44.954130	

ALA-D.PZM:%reat.:One-way ANOVA (and nonparametric):Tabular results - Fri Jan 19 01:34:00 2001

	X Labels	A	B	C	D
	Parameter	Value	Data Set-B	Data Set-C	Data Set-D
	X	Y	Y	Y	Y
1	Table Analyzed				
2	delta%reativação				
3	One-way analysis of variance				
4	P value	0.0019			
5	P value summary	**			
6	Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes			
7	Number of groups	3			
8	F	11.62			
9	R squared	0.6788			
10					
11	ANOVA Table	SS	df	MS	
12	Treatment (between columns)	908.8	2	454.4	
13	Residual (within columns)	430.1	11	39.10	
14	Total	1339	13		
15					
16	Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	P value	95% CI of diff
17	A (300mg/l) vs B (100mg/l)	-1.176	0.4205	P > 0.05	-11.86 to 9.506
18	A (300mg/l) vs C (controles)	17.21	5.803	P < 0.01	5.883 to 28.54
19	B (100mg/l) vs C (controles)	18.39	6.200	P < 0.01	7.058 to 29.72