SANDRA FREIBERGER AFFONSO

EFEITOS TÓXICOS SOBRE A IMUNIDADE INATA DO PEIXE
***Centropomus parallelus* (POEY, 1860) CAUSADOS POR UM**
HIDROCARBONETO POLICÍCLICO AROMÁTICO (NAFTALENO):
AVALIAÇÃO POR CITOMETRIA DE FLUXO

São Paulo

2006

SANDRA FREIBERGER AFFONSO

Efeitos tóxicos sobre a imunidade inata do peixe *Centropomus parallelus* (Poey, 1860) causados por um hidrocarboneto policíclico aromático (naftaleno): avaliação por citometria de fluxo

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Departamento:
Patologia

Área de concentração:
Patologia Experimental e Comparada

Orientador:
Prof. Dr. Luiz Carlos de Sá-Rocha

São Paulo
2006

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.1646
FMVZ

Affonso, Sandra Freiburger

Efeitos tóxicos sobre a imunidade inata do peixe *Centropomus parallelus* (Poey, 1860) causados por um hidrocarboneto policíclico aromático (naftaleno): avaliação por citometria de fluxo / Sandra Freiburger Affonso. – São Paulo: S. F. Affonso, 2006.
116 f. : il.

Tese (doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia, 2006.

Programa de Pós-graduação: Patologia Experimental e Comparada.
Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos de Sá-Rocha.

1. Peixes. 2. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. 2. Fagocitose.
3. Burst oxidativo. 5. Citometria. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"

Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Avaliação dos efeitos tóxicos da fração solúvel de petróleo em *Mugil platanus* (Günther, 1880) (Perciformes, Mugilidae) *in vivo e in vitro*: estudos neurocomportamentais, bioquímicos, patológicos e imunológicos", Protocolo nº 212/2002, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Luiz Carlos de Sá Rocha, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado pela referida Comissão, em sessão de 25/09/2002.

(We certify that the Research "Fate and effects of water soluble fraction in *Mugil platanus* (Günther, 1880) (Perciformes, Mugilidae) *in vivo* and *in vitro*: neurobehavioral, biochemistry, pathological and immunological studies" protocol number 212/2002, under the responsibility of Prof. Dr. Luiz Carlos de Sá Rocha, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved in 25/09/2002 meeting.

São Paulo, 26 de setembro de 2002

Prof.ª Dr.ª Júlia Maria Materna
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: AFFONSO, Sandra Freiburger

Título: Efeitos tóxicos sobre a imunidade inata do peixe *Centropomus parallelus* (Poey, 1860) causados por um hidrocarboneto policíclico aromático (naftaleno): avaliação por citometria de fluxo

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho ao meu esposo **Renato**,
por seu amor, seu entusiasmo contagiante pela vida e
por todo suporte e compreensão que me dedicou durante a realização
deste doutorado e em todos os dias que convivemos juntos.*

Agradeço a ele o incentivo e a confiança contínuos.

*Dedico também a minha companheirinha **Júlia**, que está para chegar
ao mundo e que já na vida intra-uterina dividiu comigo
absolutamente todos os momentos do final deste trabalho.*

Amo muito vocês!

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais, **Celso e Marinês**. Esta tese não é o bastante
para agradecer toda a vida dedicada a mim e meus irmãos.
Com seus exemplos de pessoas íntegras, amorosas, solidárias e
éticas transmitiram o respeito, o amor, a confiança, a
perseverança e a fé como valores fundamentais.
Muito obrigada por tudo!*

***“Desconfie sempre da sabedoria convencional.
O senso comum precisa ser confrontado com
perguntas, muitas perguntas. Algumas não
levarão a nada. Outras vão produzir respostas
absolutamente surpreendentes.”***

Steven Levitt

***Agradeço humildemente à Deus,
toda a força, sabedoria e conforto nas
horas mais difíceis e necessárias...***

AGRADECIMENTOS

Durante a realização deste trabalho tive o apoio, ajuda, incentivo e amizade de muitas pessoas, gostaria de agradecer a todos, mas sei que sempre ficará faltando alguém importante. Aqui deixo registrada minha gratidão para pelo menos a uma parte destas pessoas tão importantes.

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Luiz Carlos de Sá-Rocha, o Lú, toda sua orientação neste trabalho e seu apoio nos momentos de incerteza e desabafos durante esses quatro anos que convivemos e por ter me mostrado um jeito diferente de fazer e ver a pesquisa.

Agradeço ao Prof. Dr. Phan Van Ngan, meu co-orientador, professor e amigo há mais de dez anos. Agradeço pelo apoio nem sempre direto ao assunto aqui apresentado, mas pelo exemplo de cientista e pesquisador que sempre me transmitiu.

Agradeço a Prof. Dra. Eliana Reiko Matushima, pela ajuda em repassar informações e em solucionar dúvidas. Agradeço também a sala com tanques cedida para manutenção dos peixes, tornando possível o desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço à Vanessa Moura de Sá-Rocha sua ajuda marcante e incansável na parte prática deste trabalho. Por não ter medido esforços e ter repassado seu conhecimento tão útil e sempre aproveitável. Também pela amizade e bom humor.

Agradeço a Monice Flores, sua amizade, sua vontade de ajudar e aprender e todo o apoio na parte prática deste trabalho. À Denise Kinoshita agradeço a ajuda na parte experimental, que com tão boa vontade me acompanhou e tornou possível o desfecho de experimentos com produtos tóxicos.

Agradeço aos meus amigos Ricardo Sado da ESALQ, Arthur Rocha do Instituto Oceanográfico da USP e João Borges do Instituto de Biociências da USP pela ajuda com a coleta e transporte dos peixes, além de suas amizades e toda colaboração com troca de idéias sempre interessantes.

À Marcella Sobral, Silmara Rossi e Igor M. Zimovski pela amizade e ajuda com a parte prática no laboratório e na manutenção dos peixes. Ao Henrique, o Mormaço, pela ajuda na coleta e manutenção dos peixes. Aos colegas de pós-graduação André Rocha, Nato, Adriana, Mônica, Fred, Carol, Luciana e Cris Massoco pelo apoio e troca de informações durante o doutorado.

À Silvia Bracale, secretária da Pós-graduação em Patologia Experimental e Comparada, pela colaboração nas questões burocráticas e pelas conversas amigáveis.

Aos técnicos do laboratório Priscila, Magali e Ricardo pelo apoio durante a realização dos experimentos.

Ao Prof. Dr. Vicente Gomes, à Carolina DiPaolo, Débora Yamane, Rosária Fúria, Thais dos Santos, Maria José C. Rocha, Keyi Usami do Instituto Oceanográfico, pela amizade e colaboração durante todo o desenvolvimento do trabalho.

À Valeria Ruoppolo, Juliana Marigo e Claudia Filoni, amigas e alunas da pós-graduação que me acompanharam nesse período, tornando a vida paulistana mais suave e ajudando da maneira mais simples, significativa e despretenciosa com suas amizades sinceras.

Profa. Dra. Maristela M. C. Camargo e Michele Aline dos Santos do Departamento de Imunologia do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo pela colaboração nas separações celulares com a utilização do citômetro de fluxo modelo Vantage.

À Profa. Dra. Maria Angélica Miglino, pelo apoio no final deste trabalho e a confiança em me receber e incentivar a continuar na vida científica.

Aos meus novos amigos do Setor de Anatomia desta Faculdade, agradeço a compreensão, apoio e amizade no final desta jornada.

Agradeço a toda minha família, Nando, Isa, Duda, Ramona, Nina e Lú, meus irmãos e cunhados, e à Dona Dália e Maria Eduarda pelo incentivo e força durante toda essa jornada.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP pelo apoio financeiro através do projeto numero 99/04228-7 e a Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior – CAPES, pela bolsa de doutoramento concedida.

RESUMO

AFFONSO, S. F. **Efeitos tóxicos sobre a imunidade inata do peixe *Centropomus parallelus* (Poey, 1860) causados por um hidrocarboneto policíclico aromático (naftaleno): avaliação por citometria de fluxo.** [Effects of a polycyclic aromatic hydrocarbon (naphthalene) on innate immunity of *Centropomus parallelus* (Poey, 1860): evaluation by flow cytometry]. 2006. 116 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

A citometria de fluxo é um método preciso, rápido e eficaz na avaliação de múltiplos parâmetros celulares, tanto estruturais como funcionais, propiciando a separação e o estudo de diferentes populações e sub-populações de células. No presente estudo, foram empregados métodos citométricos para caracterização dos diferentes tipos celulares sangüíneos de *Centropomus parallelus*, assim como para verificação da viabilidade celular, avaliação da atividade fagocítica e ativação do *burst* respiratório. Foram identificadas três sub-populações representativas de leucócitos: linfócitos, monócitos e trombócitos. Estas células foram estimuladas, *in vitro*, com *Staphylococcus aureus*, marcado com iodeto de propídeo (SAPI), lipopolissacarídeo de *Escherichia coli* (LPS) e zymosan, partículas de *Saccharomyces cerevisiae*. As respostas frente aos estímulos foram distintas de acordo com o tipo celular e o estímulo apresentado. Os monócitos apresentaram maiores percentuais de fagocitose frente ao estímulo provocado pela SAPI e pelo Zymosan; já a população que continha trombócitos entre outros tipos celulares (por exemplo: linfócitos), apresentou “fagocitose” significativa apenas para SAPI. O *burst* oxidativo detectado pela fluorescência emitida pelo diacetato

2'7'diclorofluoresceína (DCFH) foi significativo apenas quando estimulado com PMA (miristato-acetato de forbol), não apresentando resposta estatisticamente significativa para os estímulos SAPI e LPS. Após a exposição ao naftaleno nas concentrações 10^{-3} , 10^{-6} , 10^{-9} M durante quatro horas, *in vitro*, houve um aumento na fagocitose realizado pelos monócitos e trombócitos, porém uma diminuição no *burst* oxidativo apresentado nas concentrações 10^{-6} e 10^{-9} M de naftaleno. Este resultado reflete, *in vitro*, uma resposta ao contaminante com significado imunológico desfavorável para o peixe, já que as células estão aumentando a atividade fagocítica sem conseguirem, teoricamente, destruir o agente invasor. A partir desses resultados preliminares, podemos avaliar melhor, algumas características da resposta imune inata desta espécie de peixe, presente na costa litorânea brasileira. Estes parâmetros imunofisiológicos podem servir como base para futuros estudos ecotoxicológicos tanto em laboratório mas também a campo. Estudos que utilizam a imunidade inata como indicador biológico de alterações ambientais causadas por poluentes diversos, podem evidenciar o grau de impacto toxicológico sobre esta espécie e agregar valor a sua importância econômica e ecológica.

Palavras-chave: Peixes. Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos. Fagocitose.

Burst Oxidativo. Citometria de fluxo.

ABSTRACT

AFFONSO, S. F. **Toxicological effects of a polycyclic aromatic hydrocarbon (naphthalene) on innate immunity of the fish *Centropomus parallelus* (Poey, 1860)**: evaluation by flow cytometry. [Efeitos tóxicos sobre a imunidade inata do peixe *Centropomus parallelus* (Poey, 1860) causados por um hidrocarboneto policíclico aromático (naftaleno): avaliação por citometria de fluxo]. 2006. 116 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

Flow cytometry is a precise, fast, and effective method for the evaluation of several cellular parameters, both structural and functional, allowing the sorting and analysis of particular populations and sub-populations of cells. In this study, we employed cytometric methods on the characterization of different blood cell types from *Centropomus parallelus*, and also verified cell viability, phagocytic activity and oxidative burst in these cells. Three sub-populations were identified: lymphocytes, monocytes, and trombocytes. These cells were stimulated *in vitro* with propidium iodide-conjugated *Staphylococcus aureus* (SAPI), *Escherichia coli* lipopolysaccharide (LPS), or zymosan (*Saccharomyces cerevisiae* particles). Responses to each individual stimulus differed according to cell type. Monocytes displayed the higher percentages of phagocytosis in presence of SAPI or zymosan; on the other hand, the population that included trombocytes, among other cell types (such as lymphocytes) only performed phagocytosis in a relevant level in the presence of SAPI. The oxidative burst, detected by fluorescence emitted by 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH) was significant only after stimulation with PMA (phorbol myristate-acetate), but not when the stimulus was

SAPI or LPS. Based on these preliminary results, the innate immune response in these animals (ubiquitous coastal waters of the Brazilian shore) can be further evaluated. Immunophysiological parameters in these species can build a solid ground for future ecotoxicological studies. Approaching innate immunity as a biological indicator of environmental changes induced by pollutants may support the degree of toxicological impact over these animals, and aggregate value to its current ecological and economical importance.

Key words: Fishes. Polycyclic Aromatic Hydrocarbon. Phagocytosis. *Burst* Oxidative. Flow cytometry.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DCFH: 2'7' diclorofluoresceína

DCFH-DA: 2'7'diacetato de diclorofluoresceína

DNA: ácido desoxirribonucléico

EDTA: ácido dietilenodiaminotetracético

EROs: espécies reativas de oxigênio

FSC: Foward Scatter Channel

g: grama

HPAs: hidrocarbonetos policíclicos aromáticos

H₂O₂: peróxido de hidrogênio

L: litro

LPS: lipopolissacaríde

μg: micrograma

μL: microlitro

mg: miligrama

mL: mililitro

mM: milimolar

M: mol ou molar

NaCl: cloreto de sódio

NADPH-oxidase: enzima responsável pela produção de ERO

ng: nanograma

nm: nanômetro

¹O₂: oxigênio singlet

O₂⁻: superóxido

OH: radical hidroxila

PBS: solução de tampão fosfato salina

PI: iodeto de propídeo

PMA: miristato-acetato de forbol

q.s.p.: quantidade suficiente para

SAPI: *Staphylococcus aureus* marcado com iodeto de propídeo

SSC: Side Scatter Channel

zym: partículas de zymosan de *Saccharomyces cerevisiae*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação dos componente do citômetro de fluxo	32
Figura 2 – Esquema dos canais que mensuram a intensidade de fluorescência no Citômetro de fluxo	34
Figura 3 - Típico citograma (FSC x SSC) do sangue total de <i>C. parallelus</i>	67
Figura 4 - Citograma (FSC x SSC) do sangue hemolisado de <i>C. parallelus</i>	67
Figura 5 - Gráfico do número de células do sangue total de <i>C. parallelus</i> marcadas com PI	69
Figura 6 - Gráfico do número de células do sangue hemolisado marcadas com PI	69
Figura 7 - Histograma do número de células do sangue total marcadas com PI detectada em FL3	70
Figura 8 - Histograma do número de células do sangue total submetidas ao calor marcadas com PI detectada em FL3	71
Figura 9 - Típico citograma da camada A (hemácias) do sangue total separadas por gradiente de densidade	73
Figura 10 - Típico citograma da camada B (leucócitos) do sangue total separados por gradiente de densidade	73
Figura 11 – Gráfico do número de hemácias do sangue total, após separação por gradiente de densidade, marcadas com PI 10^{-4} e 10^{-5} M submetidas ou não ao calor	74
Figura 12 – Gráfico do número de leucócitos (camada B) do sangue total, após separação por gradiente de densidade, marcados com PI 10^{-4} e 10^{-5} M submetidos ou não ao calor	75
Figura 13 – Gráfico do número de leucócitos (camada C) do sangue total, após separação por gradiente de densidade, marcados com PI 10^{-4} e 10^{-5} M submetidos ou não ao calor	75
Figura 14 – Gráfico com percentual de trombócitos que fagocitaram SAPI ou Zymosan	76
Figura 15 – Gráfico com percentual de monócitos que fagocitaram SAPI ou Zymosan	77
Figura 16 – a) Histograma de células incubadas com DCFH, representando a intensidade de fluorescência detectada no canal FL1-H - <i>burst</i> oxidativo basal	78

<p>b) Histograma de células incubadas com DCFH e estimulados com PMA, representando a intensidade de fluorescência detectada no canal FL1-H - <i>burst</i> oxidativo</p>	78
<p>Figura 17 – Gráfico da fluorescência média emitida por trombócitos e detectada em FL-1 representando o <i>burst</i> oxidativo estimulado pelo PMA, LPS e SAPI</p>	78
<p>Figura 18 – Gráfico da fluorescência média emitida por monócitos e detectada em FL-1 representando o <i>burst</i> oxidativo estimulado pelo PMA, LPS e SAPI</p>	79
<p>Figura 19 – Histograma do número de monócitos que estavam realizando a fagocitose, após exposição ao naftaleno 10^{-9} M, analisados no canal FL2-H.....</p>	80
<p>Figura 20 – Gráfico da fagocitose realizada pelos trombócitos contaminados ou não pelo naftaleno nas concentrações 10^{-3}, 10^{-6}, 10^{-9} M</p>	81
<p>Figura 21 – Gráfico da fagocitose realizada pelos monócitos contaminados ou não pelo naftaleno nas concentrações 10^{-3}, 10^{-6}, 10^{-9} M</p>	81
<p>Figura 22 – Histograma representando o número de monócitos ativados, incubados com PMA, analisado no canal de fluorescência FL1.....</p>	83
<p>Figura 23 – Gráfico da intensidade de fluorescência em FL1 emitida por monócitos expostos ou não ao naftaleno nas concentrações 10^{-6} e 10^{-9} M, apenas com DCFH, sem indução</p>	84
<p>Figura 24 – Efeito da exposição ao etanol e naftaleno nas concentrações 10^{-6} e 10^{-9} M sobre o <i>burst</i> oxidativo nos monócitos, com estímulo do PMA</p>	84
<p>Figura 25 – Efeito da exposição ao etanol e naftaleno nas concentrações 10^{-6} e 10^{-9} M sobre o <i>burst</i> oxidativo nos monócitos, com estímulo do zymosan</p>	85
<p>Figura 26 – Gráfico da intensidade de fluorescência em FL1 emitida por trombócitos expostos ou não ao naftaleno, apenas com DCFH</p>	86
<p>Figura 27 – <i>Burst</i> oxidativo de trombócitos expostos ou não ao naftaleno e estímulo do PMA</p>	86
<p>Figura 28 – <i>Burst</i> oxidativo de trombócitos expostos ou não ao naftaleno e estímulo do zymosan</p>	87

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	21
2	REVISÃO DE LITERATURA	24
2.1	Considerações sobre o Sistema Imune em Peixes	24
2.2	Imunidade Inata.....	26
2.3	Citometria de fluxo	31
2.4	Avaliação da atividade fagocítica e <i>burst</i> oxidativo no citômetro de fluxo	38
2.5	Poluição x Imunidade	41
3	OBJETIVOS	47
3.1	Objetivos Específicos	47
4	MATERIAIS E MÉTODOS	49
4.1	Material biológico.....	49
4.1.1	Obtenção e manutenção dos animais	50
4.1.2	Biometria dos peixes	51
4.2	Reagentes e soluções	51
4.2.1	Preparo das soluções	52
4.3	Obtenção das células sangüíneas	56
4.3.1	Preparo das células sangüíneas para citometria de fluxo	57
4.3.2	Separação dos leucócitos por gradiente de densidade	58
4.4	Fagocitose e <i>burst</i> oxidativo	60
4.5	Fagocitose e <i>burst</i> oxidativo em leucócitos contaminados com naftaleno	62
4.5.1	Preparo dos leucócitos contaminados para avaliação da fagocitose e do <i>burst</i> oxidativo para citometria de fluxo	63
4.6	Análises Estatísticas	65
5	RESULTADOS	66
5.1	Células sangüíneas no citômetro de fluxo	66
5.2	Viabilidade celular.....	68
5.3	Separação das populações de células	71
5.4	Fagocitose e <i>Burst</i> Oxidativo	76
5.5	Fagocitose e <i>Burst</i> Oxidativo após contaminação com naftaleno	80
6	DISCUSSÃO	88
7	CONCLUSÕES	102
	REFERÊNCIAS	104

1 INTRODUÇÃO

Os peixes são os vertebrados mais antigos dentro da escala evolutiva. Seu sistema imune é muito diversificado, sendo que este fato está relacionado com aspectos filogenéticos do grupo (BORYSENKO, 1976).

Os peixes ósseos são derivados de uma linhagem de vertebrados ancestral divergentes e possuem ambos os sistemas imunes, inato e adquirido. São considerados por alguns autores como o modelo ideal para o estudo do sistema imune justamente pela sua posição filogenética e o fato do sistema imune adaptativo não ser tão elaborado como o de mamíferos (MAGOR, B. G.; MAGOR, K. E, 2001).

A imunidade inata nos peixes é possivelmente a defesa mais importante, já que a resposta imune adquirida ou humoral ocorre tardiamente quando comparada com os mamíferos (ALEXANDER; INGRAM, 1992). Possíveis alterações no sistema imune inato dos peixes e na qualidade da sua resposta podem refletir importantes alterações do ambiente aquático, já que estes ocupam a maioria dos diversos nichos aquáticos (ZELIOFF et al., 2000). Além disso, a avaliação da condição de saúde de diferentes espécies de peixes torna-se importante não apenas pelos seus aspectos ecológicos como também econômicos (BOLS et al., 2001).

O processo de fagocitose é um dos principais mecanismos de defesa da chamada imunidade inata. Esta pode ocorrer em leucócitos, em especial: neutrófilos,

monócitos e macrófagos. Em alguns peixes os trombócitos também podem executar esta função (TAVARES-DIAS; MORAES, 2004). Os fagócitos dos teleósteos desempenham um importante papel na defesa contra infecções e participam de vários processos imunorregulatórios. Uma das principais funções destas células é limitar a disseminação dos microorganismos infecciosos pelo organismo do animal e destruí-los, formando uma rede de defesa imune (ELLIS, 1999).

Dentre os diferentes passos que compõem o complexo processo de fagocitose, a ingestão de bactérias, fungos e outras células ou partículas é um dos mais utilizados em estudos ecotoxicológicos. Outra importante etapa deste processo é o *burst* oxidativo ou explosão respiratória também utilizado nestes mesmos estudos.

Os fagócitos quando ativados iniciam uma cascata de reações metabólicas intracelulares, que produzem taxas elevadas de espécies reativas de oxigênio (EROS), processo conhecido como *burst* oxidativo, já bem estudada nos fagócitos de vertebrados (BABIOR, 1984; WEISS et al., 1981) e também dos peixes (BAYNE; LEVY, 1999; LUTTER et al., 1986).

Poluentes de diferentes grupos químicos como, metais pesados, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs), e bifenóis policlorados (PCBs) e surfactantes são capazes de alterar diferentes etapas da resposta imune inata de diferentes espécies de peixes (BOLS et al., 2001). A poluição das águas e contaminação dos indivíduos tem sido relacionada com doenças em populações inteiras de peixes. Uma explicação para essa conexão entre poluição ambiental e

aumento nas doenças pode estar no funcionamento do sistema imune inato. Uma vez compreendido os efeitos de agentes tóxicos na resposta imune inata de peixes pode-se chegar muito próximo da resposta de como agem os poluentes nas populações de peixes.

Recentemente, a técnica de citometria de fluxo tem sido utilizada para quantificar o *burst* respiratório em peixes (CHILMONCZYK; MONGE, 1999; ORTUÑO et al., 1999; ORTUÑO et al., 2000; MORITOMO et al., 2003; NIKOSKELAINEN et al., 2005). Tal metodologia permite mensurar e analisar características de células em suspensão, como tamanho, granulosidade, complexidade interna e fluorescências emitidas por ligantes específicos (anticorpos monoclonais) ou produtos de reações químicas diversas (SILVA et al., 2003).

No presente trabalho procurou-se realizar através da citometria de fluxo, a caracterização dos diferentes tipos celulares, avaliação da atividade fagocítica e o *burst* oxidativo de leucócitos circulantes frente a diferentes estímulos no peixe *Centropomus parallelus* (Perciformes, Centropomidae), cujo nome popular é robalo peva.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Considerações sobre o Sistema Imune em Peixes

O sistema imune dos peixes compartilha similaridades com o de outros vertebrados, porém os peixes não possuem linfonodos ou medula óssea. Nos peixes ósseos os tecidos linfóides encontram-se no timo, rim cefálico, baço, mucosas e tecidos associados com o intestino (PASTORET et al., 1998; POWELL, 2000; ZAPATA; CHIBÀ; VARAS, 1996). Nesses órgãos são formados os linfócitos, monócitos, trombócitos e granulócitos, além dos eritrócitos, porém a intensidade de suas atividades hematopoiéticas difere entre as diversas espécies de teleósteos (TAVARES-DIAS; MORAES, 2004).

A renovação dos macrófagos é feita através da hematopoiese, processo realizado nos mamíferos por uma série de eventos complexos de diferenciação de células-tronco multipotentes em células progenitoras na medula óssea, de acordo com a teoria do sistema fagocitário mononuclear (BARREDA et al., 2000). A hematopoiese de macrófagos de mamíferos é desencadeada em resposta a fatores estimulantes da colônia exógena de macrófagos e outros fatores de crescimento (STAFFORD et al., 2001). Nos peixes a produção de macrófagos se deve a fatores de crescimento endógenos, responsáveis por

regulem sua diferenciação e proliferação (NEUMANN; BARREDA; BELOSEVIC, 1998). Porém ainda pouco se sabe sobre esses eventos em vertebrados inferiores como os teleósteos.

Apesar do interesse em estudos imunológicos de teleósteos devido sua importância para a piscicultura e ecotoxicologia, ainda encontram-se dificuldades básicas na diferenciação, no reconhecimento e na caracterização dos leucócitos nas diversas espécies de peixes, o que interfere não só na área de imunologia, como também na hematologia e patologia.

Segundo Zelikoff (1998), os peixes oferecem inúmeras vantagens como modelo para estudos imunotoxicológicos em relação a modelos mamíferos como ratos e camundongos. Dentre as vantagens enumera: a) espécies de tamanho relativamente grande, proporcionam um bom número de células imunes para estudo; b) os peixes servem como modelo de estudo tanto no laboratório como em campo, podendo ser expostos a poluentes com metodologia bem definida em laboratório como em condições naturais; c) o custo de obtenção e manutenção é mais baixo; d) os peixes têm maior diversidade morfológica, proporcionando maior número de modelos para o estudo; e) os resultados podem fornecer referências evolutivas para estudos com outros vertebrados.

2.2 Imunidade Inata

A imunidade inata, natural ou não específica é comum a todos os organismos multicelulares e representa a primeira linha de defesa. Pode ser definida como o conjunto de mecanismos de defesa que protege o organismo contra infecções, sem depender de uma prévia exposição a nenhum tipo específico de microorganismo (BOLS et al., 2001). É, portanto, de forma geral, uma resposta inespecífica, independente da etiologia da lesão (química, física ou biológica) desencadeando quase sempre da mesma forma os mecanismos de defesa, sem um aprimoramento visando repostas posteriores contra o mesmo agente patogênico.

Quando ocorre a invasão de microorganismos, o sistema imune responde iniciando a ativação e proliferação de leucócitos. Os neutrófilos e monócitos no sangue e macrófagos nos tecidos são os primeiros a serem ativados (KOLLNER et al., 2002). Estas células participam diretamente da fagocitose.

Nos peixes existem mais tipos celulares envolvidos na fagocitose do que em vertebrados superiores: trombócitos, células endoteliais do rim, células parenquimais do fígado, granulócitos e macrófagos (DANNEVIG et al., 1994; SECOMBES; FLETCHER, 1992; STEINHAGEN; JENDRYSEK, 1994). Porém, somente os neutrófilos e os macrófagos estão envolvidos na fagocitose “verdadeira” e no processo inflamatório. Os trombócitos também podem fagocitar

(TAVARES-DIAS; MORAES, 2004), mas a fagocitose é considerada passiva, pois as partículas fagocitadas não estariam internalizadas no citoplasma e sim em canalículos dessas células.

A mensuração da atividade fagocítica, seguida da liberação de espécies reativas de oxigênio são parâmetros importantes para a avaliação da capacidade microbicida e do metabolismo oxidativo destas células.

A fagocitose envolve o reconhecimento do agente invasor pelo leucócito através das opsoninas pelo fenômeno da opsonização, que facilita a fagocitose. Após este processo ocorre a ligação do agente invasor à célula. São então formados prolongamentos citoplasmáticos em torno do agente, englobamento do mesmo, formação do fagolisossoma, ativação dos mecanismos intracelulares de formação de espécies ativas de oxigênio com posterior morte do agente invasor.

Os fagócitos dos vertebrados realizam o *burst* oxidativo ou explosão respiratória como mecanismo de defesa contra infecções bacterianas e produzem uma série de espécies reativas de oxigênio (EROs), como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila (OH), superóxido (O_2^-) e oxigênio singlet (1O_2) que são liberados para destruir os microorganismos (GRINDE, 1989; LAMAS; ELLIS, 1994; OTTINGER, 1999; SECOMBES; FLETCHER, 1992; SERADA et al., 2005; STAVE, 1984; ZELIKKOF, 1998). Este processo é catalisado pela NADPH-oxidase localizada no plasma e nas membranas fagossomais, estimuladas pelos metabólitos da proteína quinase K (BOLS et al., 2001; JENEY et al., 1997;). Os macrófagos dos teleósteos são estimulados e então ativados com a presença de

produtos bacterianos, como lipopolissacarídeos (LPS), citocinas recombinantes, produtos microbianos ou infecções e/ou fatores solúveis derivados do antígeno (GRAHAM; SECOMBES, 1988; JANG; HARDIE; SECOMBES, 1995; NEUMANN; STAFFORD; BELOSEVIC, 1995).

As funções dos macrófagos, incluindo a atividade fagocítica e a produção de espécies reativas de oxigênio, são moduladas *in vivo* por citocinas produzidas por diferentes leucócitos e outros tipos celulares, como fibroblasto e células endoteliais (SARMENTO; GUILHERMINO; AFONSO, 2004).

A maioria dos estudos de *burst* oxidativo em fagócitos de peixes concentra-se na produção do ânion superóxido (O_2^-) (MUÑOZ et al., 1998; NOVOA et al., 1996; SECOMBES, 1996). Este é rapidamente convertido em H_2O_2 e radical hidroxila (OH^-), que desempenham papel microbicida mais potente do que o ânion superóxido no fagolisossomo e no meio extracelular.

De todas as substâncias oxidantes produzidas durante o *burst* respiratório nos fagócitos dos peixes, o H_2O_2 é a mais estável e fácil de mensurar (MOHANTY et al., 1997). Assim, a quantificação dos níveis de produção de H_2O_2 é um dos parâmetros mais utilizados para avaliar a ativação dos fagócitos.

A cascata de reações enzimáticas que ocorrem no processo do *burst* respiratório pode ser simplificada como mostra o esquema a seguir:

Fonte: ORTUÑO, ESTEBAN, MESEGUER (2000)

A reação de redução da superóxido desmutase pode ser avaliada para a mensuração da quantidade de superóxido produzido, já o peróxido de hidrogênio é avaliado por oxidação cromogênica (NAKANO, 1993) como a redução do azul nitro tetrazolium (MUÑOZ et al., 1998), fluorogênica ou luminogênica doadora de prótons, substâncias quimioluminescentes (PIYTYCZ et al., 1989; SHIBASHI; IIDA, 2001) catalisada pela adição de peroxidase externa (PICK; KEISARI, 1980; PICK; MIZEL, 1981) e por citometria de fluxo (ESTEBAN et al., 2000; JONES et al., 2003; LLORENTE et al., 2000; MORITOMO et al., 2003; ROTHE; VALET, 1990).

A fagocitose e o *burst* oxidativo podem ser modulados por fatores endógenos e exógenos como estresse, influências ambientais, patógenos e citocinas (HARFORD, 2006; MILSTON et al., 2003; MUÑOZ et al., 1998; ROBERTSEN et al., 1994; SECOMBES, 1994).

Diferentes métodos podem ser utilizados para a mensuração da atividade de *burst* oxidativo em peixes como já citados. Inúmeros aspectos podem ser analisados para avaliar o mecanismo da fagocitose, dentre eles os mais simples de serem avaliados são: a observação e contagem da quantidade de macrófagos envolvidos na atividade fagocítica, a quantidade de microorganismos que cada célula pôde fagocitar, e destes agentes quantos estavam efetivamente mortos (VEIGA, 2005).

A citometria de fluxo trouxe mais rapidez na avaliação tanto da fagocitose como do *burst* oxidativo. A fagocitose é analisada avaliando-se o número de células que realizam a fagocitose, como também o número de partículas fagocitadas. O *burst* oxidativo pode ser avaliado concomitantemente com a fagocitose, utilizando o 2'7'diacetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA) (SILVA, 2003).

A fagocitose é realizada por todas as espécies de peixes já estudadas (PASTORET et al., 1998), sendo que os teleósteos compreendem a maioria das espécies onde foram estudados a fagocitose e o *burst* oxidativo no grupo Peixes. Mesmo assim, devido a grande diversidade que se encontra nos peixes este ainda é um assunto pouco investigado.

A avaliação da resposta imune inata destes animais é fundamental para o aperfeiçoamento de técnicas de cultivo e manejo para o aumento da produção na piscicultura (POLONIO et al., 2000) assim como a preservação de populações importantes também à cadeia alimentar e ao meio ambiente.

2.3 Citometria de fluxo

A citometria de fluxo é uma técnica utilizada na pesquisa de partículas em suspensão, normalmente células. Todas as células são analisadas individualmente, o que possibilita inúmeras aplicações no campo biológico, como avaliar a dimensão e morfologia celulares, a granulosidade e complexidade interna da célula, quantidade de ácidos nucleicos, ciclo celular, fluxo de cálcio, compostos intracelulares com fluorescência intrínseca ou passíveis de se ligarem a corantes fluorescentes (fluorocromos), permitindo a diferenciação seletiva de sub populações com base na combinação de vários fluorocromos.

O citômetro é um aparelho formado basicamente por cinco componentes: fonte de radiação (lâmpada de mercúrio ou laser), câmara de fluxo, unidades de filtros ópticos que selecionam um comprimento de onda a partir de um espectro mais amplo, fotodiodos ou fotomultiplicadores para detecção sensível e processamento dos sinais com interesse e um processador de dados (Figura1).

Fonte: <http://www.bdbiosciences.com/pdfs/brochures/23-3090-03.pdf>

Figura 1 - Representação dos componentes do citômetro de fluxo.

No citômetro de fluxo uma câmara propicia a passagem individual de células através do feixe de radiação, perpendicular ao fluxo. Esta passagem individual das células é obtida pela focagem hidrodinâmica do fluxo de amostra no centro da solução ou meio de suspensão, que também atravessa a câmara. Um fluxo laminar é formado com a diferença de velocidades entre os dois fluidos. A velocidade de escoamento da solução do citômetro é superior à da amostra, e regulável pelo aparelho, o que permite reduzir e controlar a espessura da solução da amostra de forma a que possa passar uma célula de cada vez. Sendo assim pode-se ajustar a amostra e podem ser detectadas cerca de 10000 células por segundo (SILVA et al. [200-]).

O feixe de radiação de excitação ao interceptar a partícula (célula) na câmara, sofre dispersão nas direções frontal (*forward scattering*) e lateral (*side scattering*). Assim a radiação dispersa é detectada diretamente por fotodiodos

(dispersão frontal) ou pode ser desviada a 90° por lentes, espelhos dicróicos e filtros ópticos e focada em fotomultiplicadores. O canal “forward scatter” (FSC) indica o tamanho da célula e o “side scatter” (SSC) indica a complexidade interna da célula. Os canais FSC e SSC são independentes de fluorescência, esta é detectada por outros canais.

O citômetro de fluxo possibilita também a separação de populações de células de acordo com suas características físicas. O “sorting” existente em alguns modelos de citômetro é o processo capaz de separar as células individualmente e pode ser mecânico ou eletromagnético. As populações de células são separadas em tubos distintos e posteriormente podem ser analisadas ao microscópio.

Dentre as inúmeras aplicações da citometria de fluxo nas áreas de biologia molecular, imunologia, medicina, genética, patologia humanas, também são utilizadas técnicas de citometria tendo como modelo biológico os peixes. Um dos primeiros estudos em peixes foi feito por Thorgaard et al. (1982) caracterizando a triploidia espontânea e induzida em trutas através de técnicas de citometria. Outra aplicação da citometria foi à caracterização de sub-populações de leucócitos do sangue circulante em *Ictalurus punctatus* feita por Bly et al. (1990), Ellsaesser et al. (1985) e Passer et al. (1997); em carpas (ROMBOUT et al., 1996; VERBURG-VAN KEMENADA et al., 1994) e em trutas arco-íris (KFOURY et al., 1999).

Fonte: hoy@cf.ac.uk

Figura. 2: Esquema dos canais que mensuram a intensidade de fluorescência e tamanho (FSC) e granulosidade (SSC) das partículas em suspensão da amostra.

Nestes últimos vinte anos, vários pesquisadores empregaram essa tecnologia para investigação e avaliação de processos biológicos importantes nesse numeroso grupo de animais. Barreda et al. (2000) utilizaram a citometria de fluxo para caracterizar três sub populações de macrófagos do rim cefálico do peixe *Carassius auratus* em cultivo celular com o objetivo de estudar os eventos de proliferação e diferenciação de macrófagos do tecido renal hematopoiético.

Inoue et al. (2002) separaram o sangue de *Cyprinus carpio* em três sub populações: eritrócitos, linfócitos mais trombócitos e neutrófilos, utilizando o citômetro de fluxo. Os leucócitos e trombócitos foram previamente separados com lise hipertônica de eritrócitos, usando 0,1 mL de sangue e 1,9 mL de água destilada. Milston et al. (2003) removeram eritrócitos das amostras de sangue para separação dos leucócitos por lise hipotônica, de acordo com o método descrito para salmonídeos por Crippen et al. (2001).

Como parte da preparação do material para análise no citômetro, além da hemólise pode ser feita uma pré-separação dos leucócitos do sangue circulante com a utilização de diferentes gradientes de Ficoll-Paque® ou Percoll®, preparando-se suspensões de células brancas, sem hemácias. Para cada espécie deve-se testar as densidades e tempos de rotação específicos, para que as hemácias nucleadas separem-se dos leucócitos. Pettersen, Bjerknes e Wegeland (2000) utilizaram Percoll® nas densidades 1.075 g.mL^{-1} e 1.060 g.mL^{-1} e sangue de salmão (*Salmo salar* L.) diluído 1 : 4 em tampão fosfato, centrifugado por 30 minutos a $400 \times g$ e coletaram os leucócitos na camada de densidade 1.075 g.mL^{-1} e na interface de $1.075 - 1.060 \text{ g.mL}^{-1}$. Kfoury et al. (1999) separaram os leucócitos de truta arco-iris utilizando Percoll® na densidade $1,09 \text{ g.mL}^{-1}$ e ($350 \times g$, 5 min, 4°C).

Leucócitos do sangue periférico de carpas foram separados utilizando-se Lymphoprep® a $1,077 \text{ g/mL}$ de densidade e centrifugado a $800 \times g$ por 30 minutos (SAHA; USAMI; SUZUKI, 2003). Faria (2005) separou leucócitos do

rim cefálico de curimatá (*Prochilodus scrofa*) utilizando gradientes de Peroll[®] e Ficoll[®] na densidade de 1,077 g/mL, centrifugada por 30, 40 e 60 minutos a 16000 x g.

A citometria de fluxo vem sendo empregada em estudos para avaliação da eficiência imunológica em peixes na última década, como apresentado por Milston et al. (2003) que avaliaram a imunocompetência humoral *in vitro* de exemplares jovens de salmão *Oncorhynchus tshawytscha*.

Para a marcação de células ou constituintes celulares são utilizadas substâncias que emitem fluorescência e são detectadas no citômetro. O iodeto de propídeo (PI) é utilizado como marcador de células inviáveis. O PI liga-se à dupla hélice do DNA e emite fluorescência detectada no comprimento de onda acima de 630 nm. O PI atravessa a membrana lesada ganhando acesso ao material genético da célula e cora células inviáveis, mas não atravessa a membrana de células viáveis, marcando assim as células mortas visíveis no detector de luz do citômetro (HÉGARET; WIKFORS; SOUDANT, 2003).

Wigg et al. (2003) validaram a utilização de PI como marcador de viabilidade celular no citômetro de fluxo em seu estudo com hepatócitos de ratos Wistar, estimando a viabilidade celular e correlacionando-a significativamente com todos os indicadores de integridade e funções metabólicas examinadas. A utilização de iodeto de propídeo como marcador para células não viáveis em peixes foi demonstrada por Cuesta, Esteban e Mesequer (1999), examinando a atividade citotóxica não específica de células imunes do rim cefálico de *Spaurus*

aurata. Misumi et al. (2005) também utilizaram o PI para verificar a viabilidade de células do baço e rim cefálico de salmões contaminados com p,p'-DDE, classificando as células PI positivas como células mortas. Em carpas, *Cyprinus carpio* também foi utilizado por Saha, Usami e Suzuki (2003).

A técnica de citometria de fluxo também é empregada para detecção de microorganismos. Endo, Nakayama e Hayashi (2000) analisaram bactérias patogênicas interesse em maricultura. O controle destes microorganismos no ambiente é fundamental para evitar a contaminação descontrolada destes agentes patogênicos que podem acarretar morte ou inviabilidade econômica dos espécimes cultivados. Estes autores examinaram a viabilidade de células de bactérias infectantes, tais como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas fluorescens*, *Shewanella putrefaciens* e *Vibrio* sp.

Estudos com invertebrados também utilizam a citometria de fluxo (RENAULT; XUE; CHILMONCZENAU, 2001). Hégaret, Wikfors e Soudant (2003) examinaram a agregação, viabilidade, fagocitose e *burst* oxidativo de hemócitos de ostras *Crassostrea virginica*. Goedken e De Guise (2004) também avaliaram esses parâmetros para outras duas espécies de ostras comercialmente cultivadas.

Evidencia-se assim a importância e o potencial desta metodologia em diversos tipos de estudos em diferentes grupos de animais.

O advento da citometria de fluxo tem sido atribuída ao Dr. Leonard A. Hersenberg e seus colaboradores.

2.4 Avaliação da atividade fagocítica e *burst* oxidativo no citômetro de fluxo

Os primeiros estudos da atividade fagocítica aplicando técnicas de citometria de fluxo foram realizados em mamíferos. Bassoe et al. (1983 a,b) e Rothe e Valet (1990) estudaram a fagocitose de neutrófilos e macrófagos em humanos e Saad e Hageltorn (1985) em bovinos.

Para avaliar a fagocitose no citômetro, bactérias e fungos são marcados com substâncias fluorescentes. As bactérias marcadas com o iodeto de propídeo, por exemplo, emitem fluorescência no comprimento de luz vermelha, podendo assim ser avaliada juntamente com a detecção do DCFH-DA, possibilitando a análise tanto da fagocitose como do *burst* oxidativo conjuntamente (HERMMAN et al., 2004; SILVA, 2003).

Para a avaliação do *burst* oxidativo por meio da citometria de fluxo, as células são estimuladas com agentes solúveis como partículas de bactérias e fungos incubados juntos à suspensão de leucócitos. Para tanto é utilizado o 2'7' diacetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA), que oxidado pelo peróxido de hidrogênio e pela peroxidase em solução aquosa transforma-se em 2'7'

diclorofluoresceína (DCFH), passando a ser fluorescente e polar, o que o impede de atravessar a membrana da célula (SILVA, 2003). O citômetro capta a fluorescência emitida no comprimento de luz verde e possibilita a análise individual de cada célula positivamente reativa.

A citometria de fluxo tem sido empregada para avaliar a fagocitose e o *burst* oxidativo em peixes, como nos estudos com truta arco-íris (CHILMONCZYK; MONGE, 1999; KÖLLNER et al., 2001) ou em três espécies distintas de peixes *Bidyanus bidyanus*, *Macquaria ambigua* e *Melanotaenia fluviatilis* (HARDFORD; O'HALLORAN; WRIGHT, 2005). Serada et al. (2005) compararam o *burst* oxidativo de duas espécies de peixes *Plecoglossus altivelis* e *Cyprinus carpio*. Faria (2005) avaliou a explosão respiratória em curimatá (*Prochilodus scrofa*) no citômetro, usando fatores estimulantes e inibidores deste processo.

O miristato-acetato de forbol (PMA), o *Staphylococcus aureus* marcado com iodeto de propídeo (SAPI), partículas de zymosan (*Saccharomyces cerevisiae*) e lipopolissacáride de *Escherichia coli* (LPS) são exemplos de alguns estímulos utilizados na citometria de fluxo (CHILMONCZYK; MONGE, 1999; STAFFORD et al., 2001; SERADA et al., 2005; SILVA et al., 2003).

Diferentes concentrações dos reagentes utilizados para a análise do *burst* oxidativo em peixes empregando a citometria de fluxo são encontradas na literatura. Serada et al. (2005) utilizaram 50 µL da solução de PMA (100 ng.mL⁻¹ em solução salina de Hanks) para cada suspensão de células (10⁶ células/ mL) de sangue, rim e cavidade peritoneal de duas espécies de peixes. Esta mesma

concentração foi usada por Moritomo et al. (2003) no estudo do *burst* oxidativo *in vitro* no peixe *Pleucoglossus altivelis*. Em *Cyprinus carpio*, Stosik et al. (2002) incubaram 100 μL de células do sangue em suspensão com 2 μL de PMA (1 mg.mL^{-1}). A concentração final do PMA para estudo do *burst* oxidativo de leucócitos do rim cefálico de *Spaurus aurata* foi de 1 ng.mL^{-1} (ORTUÑO; ESTEBAN; MESEGUER, 2000), enquanto Faria (2005) utilizou a concentração de 200 ng.mL^{-1} de PMA em *Prochilodus scrofa*.

Na literatura consultada o LPS, um lipopolissacáride da parede celular de bactérias gram-negativas, também aparece como uma substancia capaz de ativar o sistema imune em estudos realizados com peixes, podendo aumentar a atividade fagocítica. Faria (2005) incubou os leucócitos da cavidade celomática de *P. scrofa* com 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de LPS durante 60 minutos a 23° C. Já em salmão, um peixe de região temperada, Solem et al. (1995) incubaram os macrófagos com 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de LPS, a 14° C por 72 horas. Stuge et al. (1997) utilizaram 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de LPS de *Salmonella typhimurium* para estimular leucócitos circulantes de *Ictalurus punctatus*. O zymosan, constituinte da parede celular de fungos, foi utilizado por Iliev et al. (2005) como estímulo de fagócitos, misturados em meio de cultura.

2.5. Poluição x Imunidade

O sistema imunológico deve manter a saúde e integridade do indivíduo durante toda sua vida, porém existem fatores que podem afetar essa importante função a ele atribuída, como a interação dos componentes celulares e humorais do sistema imune com xenobióticos (contaminantes ambientais, fármacos e outras substâncias químicas) (BURNS et al., 1996).

Este tipo de interferência no sistema imune deu origem a imunotoxicologia, que é a área de estudo das disfunções causadas no sistema imune como consequência de exposição ocupacional, acidental ou terapêutica à substâncias de origem química, biológica ou física, presentes no meio ambiente, abrangendo tanto o efeito supressivo (imunodeficiência) quanto a exacerbação da resposta imunológica, como alergia (hipersensibilidades) ou auto-imunidades (NRC, 1992; KOLLER¹, 2001 apud VAZ, 2004).

Em estudos ecotoxicológicos tem sido reportado que até mesmo baixos níveis de poluentes aquáticos podem desempenhar um papel de estresse ambiental e causar alterações na imunocompetência nos organismos (BAKIREL et al., 2005) e até alterações genéticas (SANCHEZ; LLORENTE; CASTAÑO, 2000). A ecotoxicologia, como ciência, envolve uma série de áreas de pesquisa em que os mecanismos observados nos ecossistemas resultam de combinações de um infinito número de processos, sendo estes observados desde níveis

¹ KOLLER, L. D. A perspective on the progression of immunotoxicology. *Toxicology*, v. 160, p. 105-110, 2001.

estruturais atômicos e moleculares até níveis mais altos de integração biológica (FERNICOLA; BOHRER-MOREL; BAINY, 2004).

Peixes expostos a contaminantes químicos podem apresentar um aumento na susceptibilidade a doenças e mortalidade de indivíduos devido a imunossupressão e isso pode levar até a declínios populacionais (ARKOOSH et al., 1998). Dentre os inúmeros contaminantes ambientais encontram-se os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs). Os HPAs são integrantes de uma importante classe de poluentes amplamente distribuídos no ambiente aquático e são compostos conhecidos como carcinogênicos e imunotóxicos (CARLSON; LI; ZELIKOFF, 2004; REYNAUD; DUCHIRON; DESCHAUX, 2004; SKUPINSKA; MISIEWICZ; KASPRZYCKA-GUTTMAN, 2004; ZEDECK, 1980) além de poderem ser utilizados como biomarcadores para respostas imunossupressoras (HACON, 2004). Sabe-se que inibem tanto as respostas imunes mediadas por células como as humorais, entretanto seu mecanismo imunossupressor ainda é desconhecido (SMITH, 1998).

O naftaleno é um hidrocarboneto policíclico aromático, componente do petróleo e poluente de solos e ambientes aquáticos. O naftaleno e seus derivados são os mais tóxicos e freqüentes HPAs encontrados em óleo diesel e gasolina (BLOCK; ALLWORTH; BISHOP, 1991; DUNLAP; BECKMANN, 1988). Diferentes fontes antropogênicas de contaminação como vazamento de petróleo, deposições atmosféricas, esgotos domésticos e industriais são responsáveis por sua ampla distribuição (AHMAD; PACHECO; SANTOS, 2003).

Embora seja conhecido que os HPAs causam alterações imunológicas, principalmente em mamíferos, existe falta de informação na literatura especializada a respeito dos possíveis efeitos tóxicos sobre os mecanismos de defesa de organismos aquáticos contaminados com PHAs, em especial com o naftaleno. Para avaliar a possível associação entre o número de fagócitos presentes em diferentes tecidos, a atividade dos mesmos e os possíveis danos teciduais causados em decorrência da peroxidação lipídica oriunda dos produtos liberados durante o *burst* oxidativo, Ahmad, Pacheco e Santos (2003) estudaram, condições laboratoriais, no peixe *Anguilla anguilla*, o efeito da exposição aguda e prolongada ao naftaleno. Estes autores demonstraram que o naftaleno foi capaz de gerar lesões teciduais significativas nas guelras, fígado e rins deste peixe, tanto em exposições agudas como prolongadas (24, 48 e 72 horas). Assim, a alta taxa de peroxidação lipídica, em especial nos rins e nas guelras (entre 8 e 16 horas) mostraram-se capazes de causarem lesões teciduais significativas nestes órgãos.

Trabalhando com outros PHAs, Carlson, Li e Zelikoff (2004) demonstram que o benzo(a)pireno, deprime significativamente a imunidade inata e humoral em peixes da espécie *Oryzias latipes*, tanto em exposições *in vivo* como *in vitro*. Além de demonstrarem este significativo efeito imunossupressor estes autores propuseram que tal efeito era dependente da formação de um metabólito ativo do benzo(a)pireno, pois inibidores do citocromo CYA1A1 (similar ao citocromo P4501A1 em mamíferos) como o alfa-naftoflavona e o diidroepiandrosterona foram capazes de melhorar a resposta imunossupressora

desencadeada pelo benzo(a)pireno. Estas substâncias são competidoras seletivas da via de biotransformação pela indução de CYA1A1.

Já em 1986, trabalhando com animais contaminados com PHAs, em seu meio ambiente natural, qual seja, os estuários, Weeks e Warinner haviam mostrado uma redução significativa na atividade de macrófagos de peixes, em especial no *burst* oxidativo. Este estudo, já apontava naquela época, para a utilização de propriedades imunológicas dos peixes sendo utilizadas como indicadores biológicos funcionais de poluição e contaminação ambiental. Para Sarmiento et al. (2004) a modulação da atividade dos macrófagos em peixes por contaminantes ambientais apresenta uma diversidade de efeitos, dependendo da concentração, da espécie animal e do tipo de químico analisado. Apesar disto, com devidos controles laboratoriais e com o estabelecimento de valores padrões para diferentes espécies alvo, indicadores imunológicos são bons indicadores biológicos na avaliação e no monitoramento de ambientes aquáticos diversos.

Os estudos referentes ao assunto podem ser feitos utilizando-se locais e organismos contaminados, coletados diretamente da natureza ou experimentalmente em laboratórios, expondo à contaminação tanto os animais, em bioensaios, ou células e tecidos coletados dos mesmos.

Testes toxicológicos realizados *in vitro* apresentam vantagens quando comparados aos testes *in vivo*, pois têm um rápido retorno, sensibilidade, simplicidade, especificidade e vantagens em relação ao custo-benefício (ZELIKOFF, 1998; HAHN, 2002).

Hoeger et al. (2004) examinaram trutas arco-íris contaminadas com efluentes de esgoto tratado e com injeção intra-peritoneal de *Aeromonas salmonicida salmonicida* e concluíram que tanto os HPAs, observados em alta concentração na bile, como o estresse agiram como fatores imunossupressores *in vivo*. Entretanto sugerem que a exposição de peixes a efluentes tem um potencial para influenciar adversamente a competência imunológica e subsequente o possível decréscimo da resistência a doenças.

Cerca de 71 % da superfície da Terra é coberta por oceanos e mares e desde os primórdios da humanidade o homem utiliza recursos do mar para sua sobrevivência e lazer. Porém, o rico e diversificado ecossistema marinho vem sofrendo constantes ameaças a sua integridade. Todo o planeta enfrenta esse fato há décadas e mesmo com toda a tecnologia que se desenvolveu ao longo deste período, ainda hoje a poluição e degradação do ambiente são grandes problemas mundiais.

O Brasil apresenta uma extensa região costeira, representando uma importante fonte de alimento, energia e emprego para a população. A riqueza biológica representada pelos diversificados organismos vivos encontrados nos vários ecossistemas marinhos brasileiros forma um imenso patrimônio genético e fontes para avanços biotecnológicos e um grande potencial pesqueiro. Contudo, todo esse ecossistema está sujeito à contaminação por poluentes de diferentes fontes, interferindo na cadeia alimentar e no ciclo de vida de muitos organismos, intoxicados em seus próprios habitats.

Dentre os vários ambientes marinhos, o estuário é particularmente importante, devido ao dinamismo associado à mistura de água doce, oriunda dos rios continentais, e marinha (YÁÑEZ-ARANCÍBIA, 1986) e também importante pelo triste fato de acumular poluentes em suas águas e sedimentos.

A disponibilidade de recursos naturais e a variedade de habitats, oferecendo alimento e proteção, tornam os estuários e manguezais, importantes ambientes para jovens de diversas espécies, bem como zonas de alimentação e de reprodução de indivíduos adultos. Cerca de 80% das espécies de peixes litorâneos, incluindo as de grande valor comercial, utilizam essas regiões em alguma fase de suas vidas (YÁÑEZ-ARANCIBIA, 1986).

Esse rico e diversificado sistema, de grande importância para a atividade pesqueira, está dentre os primeiros a serem atingidos pela poluição de ação antrópica, que inclui metais, pesticidas, policlorados bifenílicos, detergentes e componentes do petróleo (BARBIERI, 2000; KIRBY et al., 2000).

Apesar de existir um crescente interesse na área de imunotoxicologia em peixes, os conhecimentos básicos sobre os possíveis efeitos tóxicos, mecanismos de ação e relevância ambiental de diferentes poluentes sobre o sistema imune de peixes ainda são escassos (HOEGGER et al., 2004), em especial para espécies tipicamente brasileiras.

3 OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo geral analisar a atividade imune inata, fagocitose e *burst* oxidativo, de fagócitos do sangue circulante do peixe *Centropomus parallelus* e compará-la com a atividade de fagócitos contaminados com naftaleno, *in vitro*, através da técnica de citometria de fluxo.

3.1 Objetivos específicos

- a) Separar as células brancas e hemácias do sangue circulante de *Centropomus parallelus* através da citometria de fluxo, conservando-as viáveis.
- b) Estabelecer um marcador de viabilidade celular para as células do sangue circulante de *C. parallelus* analisadas na citometria de fluxo.
- c) Mensurar a fagocitose de microorganismos (bactéria e fungo) realizada por células fagocíticas de *C. parallelus*, *in vitro*.
- d) Mensurar o *burst* oxidativo produzido frente à exposição de microorganismos, *in vitro*.

e) Avaliar a fagocitose e o *burst* oxidativo realizados por monócitos e trombócitos do sangue circulante de *C. parallelus* após quatro horas de exposição, *in vitro*, ao naftaleno nas concentrações 10^{-3} M, 10^{-6} M e 10^{-9} M.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Os materiais e métodos utilizados neste estudo estão especificados a seguir.

4.1 Material biológico

O peixe utilizado neste trabalho foi o *Centropomus parallelus* ou robalo peva. *C. parallelus* é um peixe eurihalino e euritérmico, tem seu habitat em estuários e penetra em águas doces nas regiões lagunares litorâneas (MENEZES; FIGUEIREDO, 1980). Existe em águas costeiras desde a Flórida (Estados Unidos) e Golfo do México até Florianópolis (SC – Brasil). É abundante nas regiões sul e sudeste do Brasil, apresenta alto valor comercial (NEIDIG, 2000) além de ser importante na cadeia trófica, transportando energia entre o estuário e o ambiente marinho. Em termos filogenéticos são considerados peixes modernos (GOSLINE, 1971).

Classificação zoológica:

Filo: Chordata

Classe: Actinopterygii (*ray-finned fishes*)

Ordem: Perciformes (*perch-like*s)

Família: Centropomidae (*Snooks*)

Gênero: Centropomus sp.

Espécie: Centropomus parallelus Poey, 1860

4.1.1 Obtenção e manutenção dos animais

Para este estudo foram utilizados quarenta exemplares da espécie *Centropomus parallelus*, coletados com o auxílio de linha e anzol no Canal de Bertioga – São Paulo, litoral sudeste do Brasil. Após a coleta os peixes foram transportados para o Laboratório de Diagnósticos Toxicológicos do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, em caixas plásticas adequadas, contendo água da região da coleta e com aeração constante.

No laboratório foram mantidos em tanques de 500 L, com água doce filtrada reconstituída com sal marinho artificial Tropic Marin®, na salinidade de 20‰, com aeração constante. A retirada do cloro foi feita previamente com o auxílio de tiosulfato de sódio. Para manutenção da qualidade da água foram utilizados filtros e seus fatores abióticos foram monitorados constantemente. A temperatura foi monitorada e controlada entre $21 \pm 1^\circ \text{C}$ e o pH entre $7,2 \pm 0,2$. Para monitoramentos da concentração de uréia e amônia foram utilizados kits comerciais.

Os peixes foram aclimatados por um período de 15 dias, no mínimo. A alimentação foi feita com pequenos peixes vivos e também com filés de peixe.

4.1.2 Biometria dos peixes

Antes dos procedimentos experimentais, os animais foram pesados e medidos, resultando nos seguintes valores:

Comprimento total médio: $32,2 \pm 3,88$ cm;

Comprimento padrão médio: $27,6 \pm 3,53$ cm;

Peso corporal médio: $342,9 \pm 155,5$ g.

4.2 Reagentes e soluções

- Heparina (Liquemine-Roche®);
- Tampão PBS (phosphate-buffered saline) 0,1 M (pH= 7,2-7,4);
- Solução salina NaCl 0,2 % e 1,6%;
- Iodeto de propídeo (PI) (Sigma®) solução estoque 10^{-4} M;
- Ficoll-paque plus (Amersham®) nas densidades 1,055g/ mL e 1,070g/ mL;

- DCFH-DA (diacetato 2'7'diclorofluorisceína) (Molecular Probes®) solução estoque 25 mM;
- EDTA (Sigma®, USA) 3 mM;
- 100 ng miristato-acetato de forbol (PMA) (Calbiochem®)/ tubo;
- 500 ng lipopolissacáride de *Escherichia coli* (LPS)/ tubo;
- *Staphylococcus aureus* conjugada com iodeto de propídeo (SAPI);
- Zymosan de *Saccharomyces cerevisiae* (10⁶ partículas/ tubo);
- Solução corante May-Grunwald-Giemsa (ROSENFELD, 1947);
- Azul de Tripán 0,4% (Sigma ®);
- Naftaleno (Sigma ®);
- Etanol absoluto P.A. (Synth ®).

4.2.1 Preparo das soluções

a) PBS (Phosphate Buffered Saline) pH 7,2 - 7,4

- Solução estoque - 10 x (concentrada):

Na ₂ HPO ₄ .12 H ₂ O (Merck®)	42,96 g
Na H ₂ PO ₄ .1 H ₂ O (Nuclear®)	3,6 g
NaCl (Labsynth®)	82,0 g
H ₂ O destilada q.s.p.	1000 mL
- Solução de uso - 1 x (diluída):

Solução PBS 10 x concentrada	100 mL
H ₂ O destilada q.s.p.	1000 mL

b) Solução salina 0,2 % e 1,6 %:

2 g de NaCl para 1000 mL de H₂O destilada – **0,2 %**

16 g de NaCl para 1000 mL de H₂O destilada – **1,6 %**

c) Iodeto de propídeo (PI) (Sigma®) solução estoque 10⁻² M

Iodeto de Propídeo (PM = 668,4 g)

- Solução estoque (10⁻² M):

Iodeto de propídeo 6,684 g

PBS 1 x 10 mL

- Solução a 10⁻⁴ M:

Solução estoque 1 µL

PBS 1 x 999 µL

d) Ficoll-paque plus® (Amersham) nas densidades 1,055 g/ mL e 1,070 g/ mL;

Para o preparo de 4 mL de Ficoll® em cada densidade:

Densidade 1,055 g/mL: 3,701 mL de Ficoll® + 0,298 mL H₂O ultrapura

Densidade 1,070 g/mL: 3,754 mL de Ficoll® + 0,246 mL H₂O ultrapura

e) DCFH-DA (Molecular Probes®) solução estoque 25 mM

- Solução estoque:

DCFH-DA28,35 mg

Etanol PA 2 mL

Mantida congelada a – 20°C, protegida da luz.

f) EDTA (Sigma®, USA) 3 mM

Solução estoque de EDTA (1 mol/L) 3 mL

PBS 1 x 997 mL

Esta solução foi mantida gelada até o uso.

g) Miristato-acetato de forbol (PMA) (Calbiochem®)

Solução estoque de PMA (100 ng/ 100 µL) 1 µL

PBS 1 x 999 µL

h) Lipopolissacáride de *Escherichia coli* (LPS)

Solução estoque de LPS (100 ng/ 100 µL) 1 µL

PBS 1 x 999 µL

i) *Staphylococcus aureus* conjugada com iodeto de propídeo (SAPI) – Cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

Cepa de Protocolo de conjugação com iodeto de propídeo (PI) segundo HASUI (1989):

- Cultivar as bactérias viáveis em ágar sangue por 48 horas;
- Transferir as colônias de células viáveis para tubos de ensaio, em fluxo laminar, estéril;
- Ressuspendê-las em NaCl 0,85% e centrifugá-las durante 10 minutos a 2500 RPM;
- Causar a morte das bactérias a 60° C por 30 minutos;
- Lavar 3 x em NaCl 0,85% e após cada lavada, centrifugar por 10 minutos a 2500 RPM;
- Ajustar a concentração de bactérias no valor de 2,4 a 2,7 no espectrofotômetro (UV/Visível), absorbância de 620 nm. Para a leitura no citômetro é necessário que as bactérias estejam nessas condições, que corresponde em suspensão à turbidez correspondente ao número 8 da escala de Mc.
- Preparar uma solução de iodeto de propídeo a 5%;
- Centrifugar nas mesmas condições, desprezar o sobrenadante e adicionar 25 µL da solução de iodeto de propídeo a 5%;
- Incubar por 30 minutos, no escuro, temperatura ambiente;
- Lavar a bactéria marcada mais 3 x com NaCl 0,85% e centrifugar novamente (3 x) por 10 minutos a 2500 RPM;
- Ressuspender a bactéria em 5 mL de PBS glicosado (livre de Ca^{++} e Mg^{++});
- Separar em alíquotas de 2 mL, proteger da luz e manter congelado à - 80° C;
- Descongelar imediatamente na hora do uso.

j) Solução corante May-Grünwald-Giemsa (Corante de ROSENFELD)

Giemsa em solução	125,0 mL
May-Grünwald em solução	215,0 mL
Metanol	660,0 mL

k) Azul de Tripan 0,4% (Sigma ®)

Azul de Tripan	4 g
H ₂ O d	96 mL

4.3 Obtenção das células sanguíneas

Foram retirados entre 1 e 2 mL de sangue através da punção da veia caudal, utilizando-se seringa heparinizada (200 µL Liqueimine[®]/ 1 mL de sangue), mantidas no gelo. Das suspensões de células obtidas, 80 µL foram retirados para confecção de extensões sanguíneas que foram fixadas e coradas pela técnica de May-Grunwald-Giemsa modificado (ROSENFELD, 1947) e posterior avaliação por microscopia óptica.

4.3.1 Preparo das células sanguíneas para citometria de fluxo

Para padronização da viabilidade celular utilizando-se a citometria de fluxo e o iodeto de propídeo como marcador, foram preparados tubos com sangue total e sangue hemolisado por choque osmótico (solução hipotônica). Células mortas (mantidas em banho a 60° C por 30 minutos) e células preservadas vivas foram comparadas como descritas a seguir.

a) Sangue total:

Em cada tubo de ensaio foram colocados 20µL de sangue sendo o volume final completado para 1100µL com PBS.

b) Sangue hemolisado:

Em cada tubo de ensaio foram colocados 20µL de sangue e adicionados 2mL de solução salina 0,2% por vinte segundos (hemólise osmótica), seguidos de 2mL de solução salina 1,6% para restabelecer a osmolaridade da célula e tornar a solução isotônica . As amostras foram centrifugadas a $300 \times g$ por 8 minutos à temperatura de 4°C (centrífuga refrigerada Sanyo[®], modelo Harrier 18/80) e ressuspensas em 950µL de PBS.

c) Células mortas pelo calor:

Em cada tubo foram colocados 20 μL de sangue, total ou hemolisado, e PBS q.s.p. 1100 μL . Estes tubos foram levados ao banho térmico por 30 minutos em temperatura de 60° C, para servir de controle positivo de células mortas para a marcação de PI.

Os três procedimentos foram seguidos de marcação por iodeto de propídeo (PI), um agente intercalante de DNA utilizado como marcador de sofrimento e morte celular, nas concentrações de: 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-7} e 10^{-9} M. As melhores marcações foram obtidas utilizando-se as concentrações de 10^{-4} e 10^{-5} M de PI, utilizadas em ensaios subseqüentes.

Para cada tubo de ensaio, foram adicionados 50 μL de PI nas concentrações de 10^{-4} e 10^{-5} M, 5 minutos antes da leitura no citômetro de fluxo (modelo FACs Calibur, Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA, USA) acoplado a um computador Macintosh (G4) da Apple®, utilizando o comprimento de onda de 670 nm (detector FL3). Cada amostra foi passada no citômetro uma única vez e foram contados 50.000 eventos.

4.3.2 Separação dos leucócitos por gradiente de densidade

O sangue coletado foi diluído em PBS (1 mL sangue : 4 mL PBS). Três mililitros de sangue diluído foram colocados em tubo de ensaio tipo Falcon® de 15

mL, contendo 3 mL de Ficoll-Paque Plus[®] nas densidades 1,070 e 1,055 g/ mL. Após centrifugação por 45 minutos a $450 \times g$ a 18°C , as diferentes camadas formadas foram gentilmente coletadas com o auxílio de uma pipeta Pasteur, separadas em tubos Falcon[®] de 50 mL de acordo com as camadas formadas, lavadas e ressuspensas por duas vezes em PBS ($300 \times g$ por 10 minutos à temperatura de 18°C).

As células das diferentes camadas obtidas foram analisadas separadamente em um citômetro de fluxo (modelo FACS Vantage, Becton Dickinson) com sistema de separação eletromagnética, visando a separação e determinação das diferentes populações celulares.

Após a separação, foram coletadas sub-populações celulares processadas por citocentrifugação (centrífuga citológica Fanem[®] – modelo 248) para adesão das células em lâmina de vidro, que foram fixadas e coradas pela técnica de May-Grunwald-Giemsa modificado (ROSENFELD, 1947) e observadas ao microscópio óptico (Olympus, modelo BX50F4). Os diferentes tipos celulares foram identificados, descritos e quantificados.

A verificação da viabilidade celular, após a separação, foi realizada pela marcação com iodeto de propídeo ($50 \mu\text{L}$ / tubo) nas concentrações de 10^{-4} e 10^{-5} M , cinco minutos antes da leitura no citômetro de fluxo.

4.4 Fagocitose e *Burst* Oxidativo

Os leucócitos de cada animal, separados por gradiente de densidade como descrito no item 2.3.2, foram organizados em uma bateria de sete tubos, identificados com letras de “A” a “G”. Para cada tubo as seguintes substâncias foram adicionadas:

Tubo **A**: suspensão de células – controle

Tubo **B**: células + DCFH – avaliação do *burst* oxidativo (valor basal)

Tubo **C**: células + DCFH + PMA – avaliação do *burst* oxidativo

Tubo **D**: células + DCFH + LPS – avaliação do *burst* oxidativo

Tubo **E**: células + DCFH + SAPI – avaliação do *burst* oxidativo

Tubo **F**: células + SAPI – avaliação da fagocitose

Tubo **G**: células + zymosan – avaliação da fagocitose

As suspensões de células foram previamente analisadas em microscópio óptico, para contagem e padronização do número e verificação da viabilidade através do método da incorporação do azul de Tripan.

As suspensões foram ajustadas para $1,8 \times 10^6$ células/ 100 μ L de sangue e utilizaram-se amostras com viabilidade igual ou maior que 90%.

Para cada tubo foram usados:

- 20 μ L das suspensões de células;

- 200 μ L de DCFH;
- 100 μ L de PMA;
- 5 μ L de LPS;
- 10 μ L de SAPI;
- 50 μ L de zymosan;
- PBS q.s.p. 1100 μ L volume final.

Todos os tubos foram incubados à temperatura de 24° C por 30 minutos, com agitação a cada 10 minutos. Após este período a reação foi interrompida com a adição de 2 mL de EDTA 3 mM. As amostras foram então centrifugadas a 300 $\times$ g por 10 minutos ressuspensas em 500 μ L de PBS e procedeu-se a leitura em citômetro de fluxo.

Utilizou-se o comprimento de onda de 530 $\pm$ 30 nm (detector FL1) para mensuração do *burst* oxidativo e de 585 $\pm$ 42nm (FL2) para avaliação da fagocitose das células.

Cada amostra foi passada no citômetro uma única vez e foram coletados 20.000 eventos dentro das áreas selecionadas (*gates*) de acordo com o tipo celular a ser avaliado.

Os dados experimentais coletados foram pré-analisados com o auxílio do programa Cell Quest Pro[®] (Becton Dickinson Immunocytometry Systems) versão para MACINTOSH[®].

Para análise da atividade fagocítica foi verificada a porcentagem de fagocitose realizada pelas células, ou seja, o número de células que fagocitaram a *S. aureus* marcada com PI e as partículas de zymosan. Também foi avaliada a intensidade de fagocitose, quantidade de bactérias fagocitadas pelas células.

4.5 Fagocitose e *Burst* Oxidativo em Leucócitos Contaminados com Naftaleno

Para a avaliação do efeito da exposição de naftaleno na atividade fagocítica e *burst* oxidativo dos leucócitos de *C. parallelus* foi realizado um experimento com contaminação *in vitro* das células. Para tanto, foram utilizadas três concentrações diferentes de naftaleno: 10^{-3} , 10^{-6} e 10^{-9} M diluído em etanol, durante 4 horas de exposição. Para controle do efeito do naftaleno, as células também foram incubadas com etanol na concentração utilizada equivalente a 10^{-3} M.

O sangue dos animais foi coletado em seringas heparinizadas (200 µL Liquevine[®]/ 1mL de sangue), mantidas no gelo, conforme descrito no item 3.5 e a separação dos leucócitos foi feita com sangue diluído (mL sangue : 4 mL PBS) utilizando-se Ficoll Paque Plus[®] nas densidades 1,070 e 1,055 g/mL, mesmo procedimento realizado para células não contaminadas com naftaleno. Após centrifugação por 45 minutos a $450 \times g$ a $18^{\circ}C$, a camada contendo leucócitos foi

coletada com o auxílio de uma pipeta de Pasteur, transferida para um tubo Falcon® de 50 mL, lavada e ressuspendida por duas vezes em PBS (300 × g por 10 minutos à temperatura de 18° C).

4.5.1 Preparo dos leucócitos contaminados para avaliação da fagocitose e do *burst* oxidativo para citometria de fluxo

Após a separação dos leucócitos, seguiu-se a contaminação dos leucócitos com etanol e naftaleno. O etanol foi utilizado como diluente do naftaleno e serviu como controle da contaminação.

As suspensões de células foram previamente analisadas em microscópio óptico, para contagem e padronização do número e verificação da viabilidade através do método da incorporação do azul de Tripan. A concentração das células em suspensões foi ajustada para aproximadamente $1,5 \times 10^6$ células e utilizaram-se amostras com viabilidade igual ou maior que 90%.

Os leucócitos em suspensão de PBS foram transferidos para tubos de citometria, denominados e organizados para serem adicionadas as seguintes substâncias:

- Tubos **1 A** a **1 E** – controle (PBS)
- Tubos **2 A** a **2 E** – expostos ao etanol – 100µL
- Tubos **3 A** a **3 E** – expostos ao naftaleno 10^{-3} M – 100µL

- Tubos **4 A** a **4 E** – expostos ao naftaleno 10^{-6} M – 100 μ L
- Tubos **5 A** a **5 E** – expostos ao naftaleno 10^{-9} M – 100 μ L

Os tubos foram protegidos da luz, tampados para evitar evaporação e incubados a temperatura ambiente por 4 horas. Após o período de exposição ao naftaleno e ao etanol, os tubos receberam acréscimo dos seguintes estímulos e soluções:

Tubos	Suspensão de células	DCFH-DA	PMA	Zymosan	PBS
A	20 μ L	–	–	–	1100 μ L
B	20 μ L	200 μ L	–	–	800 μ L
C	20 μ L	200 μ L	100 μ L	–	700 μ L
D	20 μ L	200 μ L	–	25 μ L	775 μ L
E	20 μ L	–	–	25 μ L	975 μ L

Todos os tubos foram incubados à temperatura de 24° C por 30 minutos, com agitação a cada 10 minutos. As reações foram interrompidas com a adição de mL de EDTA 3 mM gelado. Todas as amostras foram centrifugadas a 300 $\times$ g por 10 minutos e ressuspensas em 500 μ L de PBS. Após este procedimento os tubos foram levados ao citômetro de fluxo para leitura e posterior análise.

As leituras foram feitas com o comprimento de onda de $530 \pm 30\text{nm}$ (detector FL1) para mensuração do *burst* oxidativo e de $585 \pm 42\text{nm}$ (FL2) para avaliação da fagocitose das células.

Cada amostra foi passada no citômetro uma única vez e foram coletados 10.000 eventos dentro das áreas selecionadas (*gates*) de acordo com o tipo celular a ser avaliado.

Os dados experimentais coletados foram pré-analisados com o auxílio do programa Cell Quest Pro[®] (Becton Dickinson Immunocytometry Systems) versão para MACINTOSH[®].

4.6 Análises Estatísticas

A análise estatística dos dados foi feita através da análise de variância (ANOVA) de uma via, utilizando-se para tal o programa INSTAT[®] para WINDOWS[®]. Também foi utilizado o Teste de Múltiplas Comparações de Bonferroni.

Os dados estão apresentados em valores de médias $\pm$ erro padrão da média. $P < 0,05$ foi considerado capaz de evidenciar diferenças significantes para todas as comparações realizadas.

5 RESULTADOS

5.1 Células sangüíneas no citômetro de fluxo

A representação das células do sangue total de *Centropomus parallelus* mostrado no citômetro de fluxo pode ser observada na figura 3, que mostra um típico citograma SSC x FSC (Side Scatter Channel x Forward Scatter Channel) obtido com auxílio do programa Cell Quest Pro[®] (Becton Dickinson Immunocytometry Systems) versão para MACINTOSH[®]. Neste citograma observa-se graficamente a representação da complexidade interna e do tamanho das células (SSC x FSC), respectivamente, em escalas aleatórias. Cada ponto representa uma célula.

Como as hemácias dos teleósteos são nucleadas, observou-se uma distribuição heterogênea no gráfico com células de tamanhos bastante variados, mascarando a população de leucócitos e suas sub-populações. Esta distribuição se deve ao fato de existirem hemácias em diferentes estágios de maturação, e conseqüentemente de diferentes tamanhos no sangue circulante.

Figura 3 - Típico citograma (side scatter-SSC e forward scatter-FSC) do sangue total de *C. parallelus*. Foram coletados 5×10^4 células analisadas quanto ao seu tamanho e granulosidade

Para remoção das hemácias da população total de células, foi primeiramente utilizado o choque osmótico, causando hemólise nas células vermelhas como mostra a figura 4.

Figura 4 - Citograma (side scatter-SSC e forward scatter-FSC) do sangue hemolisado de *C. parallelus*. Foram coletados 5×10^4 células analisadas quanto ao seu tamanho e granulosidade

5.2 Viabilidade celular

As células intactas e as hemolisadas foram submetidas a padronização de viabilidade celular analisada no citômetro de fluxo, com auxílio do iodeto de propídeo (PI) como marcador de sofrimento e morte celular.

A concentração ideal do PI a ser utilizada nos experimentos, foi escolhida após a análise da marcação do PI em células normais e submetidas ao calor de 60⁰ C, marcadas com PI nas concentrações: 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵, 10⁻⁷ e 10⁻⁹ M. A concentração 10⁻⁵ foi a que apresentou melhor resultado, marcando as células mortas e não apresentando toxicidade para as vivas.

As figuras 5 e 6 mostram histogramas típicos da marcação pelo iodeto de propídeo em amostras de células vivas e mortas pelo calor. Foi evidenciada uma fluorescência média maior, detectada em FL-3, naquelas mantidas a 60°C por 30 minutos.

Os tubos preparados para padronização da viabilidade celular utilizando-se a citometria de fluxo e o iodeto de propídeo como marcador, foram divididos em: células normais e células hemolisadas e ambos os grupos foram subdivididos em tubos com exposição ao calor de 60⁰ C, causando a morte celular para servir como controle positivo do PI como marcador de sofrimento ou morte.

Figura 5 - O gráfico mostra o número de células do sangue total de *C. parallelus* (média $\pm$ SEM), marcadas com PI 10^{-5} M, submetidas ou não ao calor de 60° C por 30 minutos, após análise no citômetro de fluxo (FL3). *** $P < 0,001$

Figura 6 - O gráfico mostra o número de células do sangue hemolisado de *C. parallelus* (média $\pm$ SEM), marcadas com PI 10^{-5} M, submetidas ou não ao calor de 60° C por 30 minutos, após análise no citômetro de fluxo (FL3). *** $P < 0,001$

Os resultados deste estudo de viabilidade das células por citometria de fluxo, com marcação pelo PI permitiram estabelecer a concentração mais apropriada deste marcador utilizada em outros experimentos. As figuras 7 e 8

mostram as marcações com PI na concentração de 10^{-5} M. Os resultados, apresentados em número de células marcadas positivamente para PI mostram que o calor foi capaz de matar entre 75 e 80% das células do sangue total e hemolisado respectivamente.

No sangue hemolisado a marcação positiva para PI (aproximadamente 30%) nas células não submetidas ao calor evidenciou a persistência de células mortas na amostra provocada pelo próprio procedimento de hemólise osmótica, dificultando a utilização deste procedimento rotineiramente. Buscou-se então um método de separação das hemácias das amostras.

Figura 7 – O histograma padrão acima mostra o número de células do sangue total de *C. parallelus*, (counts) versus a intensidade de fluorescência detectada no canal FL3 (escala logarítmica), antes da marcação com PI 10^{-5} M. M1 é a faixa de análise onde a fluorescência detectada foi maior que 10 (considerada baixa e desprezível)

Figura 8 - O histograma padrão acima mostra o número de células do sangue total de *C. parallelus*, (*counts*) versus a intensidade de fluorescência detectada no canal FL3 (escala logarítmica), após a marcação com PI 10^{-5} M, em células submetidas ao calor de 60° C por 30 minutos. M1 é a faixa de análise onde a fluorescência detectada foi maior que 10 (considerada baixa e desprezível)

5.3 Separação das populações de células

Para a remoção das células vermelhas do sangue e visualização das populações de leucócitos, foi feito um tratamento com solução hipotônica visando a hemólise, porém o resultado obtido no citômetro não foi o esperado. As populações de leucócitos continuavam mascaradas pela intensa presença e hemácias.

Com a utilização de Ficoll-Paque Plus® nas densidades 1,055g/ mL e 1,070g/ mL foi possível separar de maneira mais eficiente as hemácias dos leucócitos. Esta foi considerada a primeira separação de células, mostrando um

resultado melhor do que a hemólise osmótica. A segunda separação foi feita no citômetro de fluxo.

A camada inferior do tubo com Ficoll-Paque Plus[®], continha células vermelhas e foi denominada de camada **A**; acima desta camada formou-se um anel esbranquiçado (contendo leucócitos), bem evidente denominada camada **B**, seguida de outra camada superior transparente, visivelmente distinta de **B**, denominada **C**.

Estas camadas foram coletadas e diluídas em PBS e procedendo-se então, a leitura e separação no citômetro de fluxo (FACs Vantage[®]) e a confirmação dos diferentes tipos celulares foi feita com o auxílio de um microscópio óptico (Olympus modelo BX50F4). A camada **A** continha predomínio absoluto de hemácias como pode ser visto no citograma da figura 9. As camadas **B** e **C** continham predomínio de leucócitos. A figura 10 mostra o citograma das células da camada **B** subdividida em populações distintas, a saber: R1 - predomínio de linfócitos e com a presença de trombócitos e R2 - predomínio de monócitos.

A figura 11 mostra o número de hemácias marcadas por PI nas concentrações de 10^{-4} e 10^{-5} M submetidas ou não ao calor. Verifica-se que o PI foi um bom marcador para a morte celular nas duas concentrações utilizadas, porém na maior concentração o PI (10^{-4} M) também foi capaz de matar células que não foram submetidas ao calor evidenciando assim uma possível citotoxicidade do próprio PI.

Figura 9 - Citograma padrão (side scatter-SSC e forward scatter-FSC), exemplar da camada **A** (predominância absoluta de hemácias) do sangue total de *C. parallelus*, separadas por gradiente de densidade. Foram coletados 5×10^4 células, analisadas em citômetro de fluxo, quanto ao seu tamanho e complexidade

Figura 10 – Citograma padrão (side scatter-SSC e forward scatter-FSC), exemplar da camada **B** do sangue total de *C. parallelus*, separadas por gradiente de densidade. Foram coletados 5×10^4 células, analisadas em citômetro de fluxo, quanto ao seu tamanho e complexidade. Foram evidenciadas duas populações celulares distintas: R1 – formada predominantemente por linfócitos e trombócitos, à esquerda e R2 – formada predominantemente por monócitos, à direita

Na figura 12 são mostrados os resultados de marcação pelo PI em leucócitos obtidos na camada **B** (linfócitos, trombócitos e monócitos). Tanto a concentração de 10^{-4} como a de 10^{-5} M de PI marcaram de maneira eficiente leucócitos mortos pelo calor, porém aqui também a maior concentração de PI evidenciou um efeito de citotoxicidade. O mesmo padrão pode ser observado nos resultados da figura 13, para camada **C**.

Figura 11 - O gráfico mostra o número de células marcadas (média $\pm$ SEM) da camada **A** (predominantemente hemácias) do sangue total de *C. parallelus*, após separação por gradiente de densidade. As células foram marcadas com PI nas concentrações de 10^{-4} (colunas cinzas) e 10^{-5} M (colunas pretas), submetidas ou não ao calor de 60° C por 30 minutos. *** $P < 0,001$ mostra significância entre as células marcadas com PI na concentração de 10^{-4} M, submetidas ou não ao calor; ### $P < 0,001$ mostra a significância entre células marcadas com PI na concentração de 10^{-5} M, submetidas ou não ao calor; e +++ $P < 0,001$ mostra a significância entre células não submetidas ao calor, marcadas com PI nas concentrações de 10^{-4} e 10^{-5} M

Figura 12 - O gráfico mostra o número de células marcadas (média $\pm$ SEM) da camada **B** (predominantemente leucócitos) do sangue total de *C. parallelus*, após separação por gradiente de densidade. As células foram marcadas com PI nas concentrações de 10^{-4} (colunas cinzas) e 10^{-5} M (colunas pretas), submetidas ou não ao calor de 60° C por 30 minutos. *** $P < 0,001$ mostra significância entre as células marcadas com PI na concentração de 10^{-4} M, submetidas ou não ao calor; ### $P < 0,001$ mostra a significância entre células marcadas com PI na concentração de 10^{-5} M, submetidas ou não ao calor; e + $P < 0,05$ mostra a significância entre células não submetidas ao calor, marcadas com PI nas concentrações de 10^{-4} e 10^{-5} M

Figura 13 - O gráfico mostra o número de células marcadas (média $\pm$ SEM) da camada **C** (predominantemente leucócitos) do sangue total de *C. parallelus*, após separação por gradiente de densidade. As células foram marcadas com PI nas concentrações de 10^{-4} (colunas cinzas) e 10^{-5} M (colunas pretas), submetidas ou não ao calor de 60° C por 30 minutos. *** $P < 0,001$ mostra significância entre as células marcadas com PI na concentração de 10^{-4} M, submetidas ou não ao calor e ### $P < 0,001$ mostra a significância entre células marcadas com PI na concentração de 10^{-5} M, submetidas ou não ao calor

5.4 Fagocitose e *Burst* Oxidativo

A fagocitose e o *burst* oxidativo de leucócitos foram avaliados nas células das camadas **B** e **C** juntas, após a primeira separação pelo Ficoll-Paque®. O número de leucócitos positivos, evidenciando o número de células que fagocitaram, foi detectado no canal FL2. Já a intensidade do *burst* oxidativo foi mensurada em histograma do número de eventos pela fluorescência detectada no canal FL1. A SAPI foi fagocitada pela população localizada em R1 (trombócitos) e esta realizada por um número significativo de células ($p < 0,05$) sendo que o mesmo não aconteceu para as partículas de zymosan, como mostra a figura 14.

Figura 14 - O gráfico mostra o percentual de células em R1 (trombócitos) que fagocitaram (média $\pm$ SEM) quando estimuladas com SAPI (coluna branca) ou Zymosan (coluna preta). *** $P < 0,001$ mostra a significância entre células que fagocitaram SAPI comparadas com Zymosan

Figura 15 - O gráfico mostra o percentual de células em R2 (monócitos) que fagocitaram (média $\pm$ SEM) quando estimuladas com SAPI (coluna branca); Zymosan-M1, sub-população celular expressando baixa taxa de fluorescência (coluna cinza) e Zymosan-M2, sub-população celular expressando alta taxa de fluorescência (coluna preta). ** $P < 0,01$ mostra a significância entre células que fagocitaram SAPI e Zymosan com alta taxa de fluorescência (M2) e # $P < 0,05$ entre as sub-populações que fagocitaram Zymosan com baixa (M1) e com alta (M2) taxa de fluorescência em FL2

Na população R2 (monócitos) a fagocitose da SAPI também foi significativa. Já a fagocitose das partículas de zymosan evidenciaram duas sub-populações celulares distintas: uma com baixa intensidade de fluorescência média (M1), porém significativa em número de células positivas e outra com alta fluorescência média (M2), mas sem significância estatística (Figura 15).

A atividade celular basal (Figura 16) e a atividade estimulada pelo PMA, LPS ou SAPI foram observadas por meio da emissão de fluorescência verde pelo DCFH, tanto para as populações de trombócitos (R1) como para a população de monócitos (R2). O PMA foi um estímulo capaz de aumentar o *burst* oxidativo das células (Figura 16) de forma significativa ($p < 0,001$) enquanto que os estímulos LPS e SAPI não foram eficientes nesta função (Figura 17).

Figura 16 – Histogramas padrão, exemplares, mostrando o número de células (*counts*) pela intensidade de fluorescência detectada no canal FL1-H. A - Monócitos incubados com DCFH (*burst* oxidativo basal), B – Monócitos incubados com DCFH e estimulados com PMA. **Notar o número de eventos embaixo das respectivas faixas M1 de cada gráfico.**

Dentre os estímulos utilizados, apenas o PMA funcionou efetivamente na indução do *burst* oxidativo nos trombócitos. Tanto LPS como SAPI não foram estímulos efetivos para *burst* oxidativo neste tipo celular. As figuras 17 e 18 mostram os resultados obtidos para as médias de intensidade de fluorescência média detectada no canal FL1.

Figura 17 - O gráfico mostra a média de fluorescência emitida por células presentes em R1 (trombócitos) e detectada em FL-1 (média $\pm$ SEM). *** $P < 0,001$ mostra a significância entre o *burst* oxidativo estimulado pelo PMA em relação ao basal (DCFH) ou àqueles estimulados por LPS e SAPI

Figura 18 - O gráfico mostra a média da fluorescência emitida por células presentes em R2 c(monócitos) e detectada em FL-1 (média $\pm$ SEM). *** $P < 0,001$ mostra a significância entre o *burst* oxidativo estimulado pelo PMA em relação ao basal (DCFH) ou àqueles estimulados por LPS e SAPI

Na população de monócitos novamente foi observado que apenas o PMA funcionou efetivamente na indução do *burst* oxidativo, os outros estímulos LPS e SAPI não foram efetivos nesta indução. A fluorescência média basal foi considerada aquela emitida apenas pelo DCFH (grupo controle) e as células foram estimuladas com PMA, LPS ou SAPI (Figura 18).

5.5 Fagocitose e *Burst* Oxidativo após contaminação com naftaleno

A fagocitose e o *burst* oxidativo foram avaliados como descrito no item 5.4, sendo a fagocitose analisada no canal de fluorescência FL2 e o *burst* no canal FL1.

A porcentagem de fagocitose, ou seja, a porcentagem do número de leucócitos positivos evidenciando o número de células que fagocitaram as partículas de zymosan, detectado no canal FL2 foi analisada em histogramas como mostra a figura 19.

Figura 19 – Histograma padrão e exemplar mostrando a fluorescência emitida por monócitos incubados com zymosan, após exposição por 4 horas ao naftaleno 10^{-9} M (canal FL2-H de fluorescência). O histograma mostra o número de eventos observados com fluorescência maior que 1000 e que representam células realizando fagocitose

Após quatro horas de exposição ao etanol, concentração equivalente a 10^{-3} M, e ao naftaleno nas concentrações de 10^{-3} , 10^{-6} e 10^{-9} M, os leucócitos

estimulados à fagocitose com zymosan apresentaram os seguintes resultados, apresentados nas figuras 20 e 21.

Figura 20 – O gráfico mostra o percentual de “fagocitose” realizada pelos trombócitos que foram contaminados ou não com naftaleno nas concentrações 10^{-3} , 10^{-6} , 10^{-9} M. As concentrações 10^{-3} e 10^{-6} M de naftaleno produziram um aumento significativo ($p < 0,05$) no percentual de trombócitos “fagocitando” quando o estímulo foi o zymosan, em relação aos trombócitos que não foram expostos ao naftaleno ou expostos na concentração de 10^{-9} M

Figura 21 - O gráfico mostra o percentual de fagocitose realizada pelos monócitos que foram contaminados ou não com naftaleno nas concentrações 10^{-3} , 10^{-6} , 10^{-9} M. A concentração de 10^{-6} M de naftaleno produziu um aumento significativo ($p < 0,01$) no percentual de monócitos fagocitando quando o estímulo foi o zymosan, em relação aos monócitos que não foram expostos ao naftaleno ou expostos na concentração de 10^{-3} e 10^{-9} M

As concentrações 10^{-3} e 10^{-6} M de naftaleno causaram um significativo aumento na fagocitose das partículas de zymosan realizada pelos trombócitos, porém o mesmo não aconteceu após a exposição à concentração de 10^{-9} M de naftaleno.

Na população de monócitos a concentração de 10^{-6} M de naftaleno foi à única que mostrou um aumento significativo na fagocitose das partículas de zymosan quando comparado com o controle sem contaminante, o controle com etanol (o diluente) e as concentrações 10^{-3} e 10^{-9} M de naftaleno.

A população de monócitos mostrou em todos os grupos um maior número de células fagocitando o zymosan quando comparada com a população de trombócitos.

A intensidade do *burst* oxidativo foi mensurada em histograma do número de eventos pela fluorescência detectada no canal FL1. A atividade espontânea ou basal das células e a atividade de células estimuladas pelo PMA e zymosan foram observadas com a emissão de fluorescência verde pelo DCFH para as populações de monócitos e trombócitos e analisadas em histograma como o representado na figura 22.

Figura 22 – Histograma padrão e exemplar representando o número de monócitos ativados, incubados com PMA, analisado no canal de fluorescência FL1-H

A concentração de 10^{-3} M de naftaleno causou interferência na leitura da fluorescência quando esta foi analisada no canal FL1, em todas as situações, basal (DCFH), estimulada com PMA (DCFH+PMA) e zymosan (DCFH+zym), aumentando muito a intensidade de fluorescência tanto na população de monócitos como em trombócitos e gerando inúmeros eventos possivelmente falsos positivos. Por esta razão, este dados não foram incluídos nos gráficos.

Os gráficos da média de fluorescência emitida em FL1 em monócitos e trombócitos após a exposição ao etanol e naftaleno e estimulados com PMA e zymosan (zym) estão representado nas figuras 23 à 25 – para população de monócitos e figuras 26 à 28 – para a população de trombócitos.

Os resultados da fluorescência do DCFH espontâneo ou basal para os monócitos analisados no canal FL1 estão representados na figura 23.

Figura 23 – Gráfico da intensidade de fluorescência em FL1 emitida por monócitos expostos ou não ao naftaleno nas concentrações 10^{-6} e 10^{-9} M, apenas com DCFH, sem indução, apenas apresentando o *burst* oxidativo basal, detectado com a presença de DCFH, no canal FL1

Figura 24 – Efeito da exposição ao etanol e naftaleno nas concentrações 10^{-6} e 10^{-9} M sobre o *burst* oxidativo nos monócitos, com estímulo do PMA, detectado com a presença de DCFH, analisados no canal FL1-H. *** $p < 0.001$ todos os grupos em relação ao grupo controle com DCFH; + $p < 0,05$ quando comparado o grupo com etanol (+DCFH+PMA) com Naftaleno 10^{-6} M (+DCFH+PMA) e também com naftaleno 10^{-9} M (+DCFH+PMA)

Figura 25 – Efeito da exposição ao etanol e naftaleno nas concentrações 10^{-6} e 10^{-9} M sobre o *burst* oxidativo nos monócitos, com estímulo do zymosan (zym), detectado com a presença de DCFH, no canal FL1-H. Significância estatística *** $p < 0.001$ em relação ao grupo controle, somente com DCFH+zymosan, apresentado pelos grupos expostos ao etanol e ao naftaleno na concentração de 10^{-9} M; e * $p < 0,05$ apresentado após a exposição ao naftaleno 10^{-6} M. As diferenças entre grupo etanol com naftaleno 10^{-6} M e 10^{-9} M não foram significativas

A exposição dos monócitos ao naftaleno nas concentrações 10^{-6} e 10^{-9} M causou diminuição da intensidade da produção de *burst* oxidativo quando o estímulo foi o PMA e quando comparado com o seu respectivo controle (DCFH + etanol + PMA). Essas duas concentrações de naftaleno diminuíram significativamente o *burst* oxidativo nos monócitos (Figura 24).

Quando o estímulo foi o zymosan, os monócitos produziram um menor *burst* basal, porém não houve diferença estatística significativa entre as células contaminadas com naftaleno e o controle (DCFH + etanol) para a população de monócitos (Figura 25).

Figura 26 – Gráfico da intensidade de fluorescência em FL1 emitida por trombócitos expostos ou não ao naftaleno, apenas com DCFH, basal da célula. Quando comparados os grupos expostos ao etanol (controle) e ao naftaleno nas não se observa diferença estatística significativa

Figura 27 – *Burst* oxidativo de trombócitos expostos ou não ao naftaleno e estímulo do PMA.
 *** p<0,01 DCFH x Etanol (+DCFH+PMA); DCFH x Naftaleno 10⁻⁶M (+DCFH+PMA);
 DCFH x Naftaleno 10⁻⁹M (+DCFH+PMA); ### p<0,01 Etanol (+DCFH+PMA) x Naf 10⁻⁶M (+DCFH+PMA)

Figura 28 – *Burst* oxidativo de trombócitos expostos ou não ao naftaleno e estímulo do zymosan (zym). *** $p < 0,01$ DCFH +zym x Etanol (+DCFH+zym) e DCFH (+zym) x naftaleno 10^{-9} M (+DCFH+zym); ### etanol (+DCFH+zym) x naftaleno 10^{-6} M (+DCFH +zym)

O *burst* oxidativo produzido pelos trombócitos diminuiu significativamente na concentração de naftaleno mais alta utilizada, qual seja: 10^{-6} M por quatro horas. Essa diminuição não foi observada na concentração mais baixa (10^{-9} M) tanto no estímulo causado pelo PMA (Figura 27) como pelo zymosan (Figura 28).

O zymosan mostrou-se um bom estímulo para o *burst*, já que os outros estímulos testados anteriormente, SAPI e LPS não estimularam o *burst* oxidativo em monócitos e trombócitos de *Centropomus parallelus*, como descrito no item 5.4 e apresentado nas figuras 17 e 18.

6 DISCUSSÃO

A utilização da citometria de fluxo nos estudos que avaliam aspectos da imunidade inata de peixes tem um histórico razoavelmente recente já que a metodologia, citometria de fluxo, vem sendo desenvolvida e aperfeiçoada nas duas últimas décadas (CHILMONCZYK et al., 1997). Análises *in vitro* empregando esta metodologia com o objetivo de avaliar a qualidade da resposta imune podem e devem ser utilizadas em estudos de monitoramento ambiental, tendo como modelo biológico peixes, entre outras espécies aquáticas.

A saúde do ambiente e dos seres vivos que nele habitam pode ser mensurada através do emprego da imunologia aplicada à ecologia, tendência moderna e inovadora nos estudos ecotoxicológicos atuais (SERADA et al., 2005). A citometria vem somar neste contexto, com a possibilidade de aproveitamento de pequenas amostras de material biológico gerando possibilidades infinitas de avaliação de parâmetros de toxicidade celular. Nesse caso, em animais vivos, pode-se coletar pequenas amostras de sangue, que no laboratório geram múltiplas possibilidades experimentais, viabilizando a avaliação de diferentes parâmetros funcionais e/ou de marcação de moléculas de superfície celular simultaneamente (imunofenotipagem). O mesmo pode ser feito com células em cultura, ou seja, toxicologia *in vitro*.

Citômetros mais modernos podem registrar até 9 parâmetros imunofluorescentes (9 canais de cores distintas) e 2 parâmetros físicos tradicionais (tamanho e complexidade interna da célula), num total de 11 parâmetros a serem quantificados em uma mesma célula (TUNG et al., 2004). Assim a citometria de fluxo apresenta-se como uma potente ferramenta para o estudo toxicológico celular.

Em estudo realizado em carpas, *Cyprinos carpio*, um peixe dulcícola Inoue e colaboradores (2002) descreveram a hemólise osmótica como melhor forma de separar as hemácias dos leucócitos dos peixes quando comparada com a separação por gradientes de densidades. Tal separação inicial é fundamental em estudos citométricos com sangue de peixes, pois estes apresentam hemácias nucleadas que se misturam e confundem com os leucócitos em um citograma inicial que avalia tamanho celular e complexidade interna, dificultando muito a separação destas células apenas com o uso da citometria de fluxo. Este problema não existe em estudos com roedores ou outros mamíferos onde as hemácias anucleadas posicionam-se em locais distintos dos leucócitos no citograma (SILVA et al., 2003). Na realidade, em algumas espécies como os cavalos, é possível separar-se até mesmo diferentes tipos de leucócitos (linfócitos, neutrófilos e monócitos) apenas utilizando estes dois parâmetros básicos da citometria. Pode-se assim, junto com as hemácias, estudar funções e estruturas presentes nos leucócitos destes animais sem separações prévias, seja por hemólise osmótica ou gradientes de densidade, técnicas estas que podem alterar funções leucocitárias quando mal realizadas (MASSOCO, 2003). Mesmo após a hemólise, obtida por diferentes técnicas, o núcleo das hemácias, que é razoavelmente grande,

continua atrapalhando a separação dos diferentes leucócitos utilizando apenas o citômetro de fluxo.

Para o *C. parallelus*, que é um peixe eurihalino, capaz de suportar amplas variações de salinidade no ambiente, a hemólise hipotônica não foi suficiente para lisar todas as hemácias, que se mostraram muito resistentes a este procedimento. Períodos de tempo de hemólise hipotônica mais elevados lisavam também leucócitos, diminuindo muito o número de células obtidas para os estudos funcionais. Além disso, o núcleo das hemácias, exposto mas ainda íntegro, concentravam-se em áreas próximas a dos leucócitos confundindo a leitura funcional.

O melhor método encontrado para separação dos leucócitos foi a utilização de diferentes gradientes de densidade, como empregado por outros autores com outras espécies de peixes (MODEL; KUKURUGA; TODD, 1997; PETTERSEN; BJERKNES; WERGELAND, 2000). Dentre as densidades de Ficoll-Paque® testadas para sangue de *C. parallelus*, as melhores foram 1,055 e 1,070 g/ml, centrifugadas durante 45 minutos a $450 \times g$.

A separação das populações de trombócitos e linfócitos (R1) e monócitos (R2) encontrada neste estudo, assemelham-se com as populações descritas por Ortuño, Esteban e Meseguer (2000) em leucócitos do rim cefálico de *Spaurus auratus*. Estes autores descreveram três populações de células: a população de fagócitos, a de linfócitos e trombócitos além de uma área onde pode

ser visto um acúmulo de debris celulares (e núcleos) semelhante àquele representado no citograma básico deste trabalho (Figura 10).

A utilização de iodeto de propídeo, um agente intercalante de material genético, como marcador de sofrimento e morte celular foi bastante eficiente. Este tipo de marcação tem sido muito utilizado em estudos por citometria de fluxo tanto em mamíferos (ratos, camundongos, etc.) como em diferentes espécies de peixes (CHILMONCZYK; MONGE, 1999; ILIEV et al, 2005). Nas nossas condições laboratoriais, na espécie animal estudada, entre diferentes concentrações utilizadas, a que apresentou melhor resultado foi a concentração de 10^{-5} M de PI. Nesta concentração mesmo após a separação dos leucócitos, obteve-se uma boa marcação, como pode ser visto nas figuras 5 e 6 em células que foram previamente encubadas e mortas pelo calor (60° C por 30 minutos).

As três sub-populações celulares estudadas, linfócitos, trombócitos e monócitos apresentaram resultados semelhantes para a marcação com PI, mostrando a capacidade deste marcador em evidenciar sofrimento e a morte em diferentes tipos celulares (SERADA, 2005; ZELIKOFF, 1998).

A fagocitose é um dos principais eventos celulares ligados a resposta imune inata. O comprometimento da eficiência do processo de fagocitose pode comprometer não apenas os demais passos da resposta imune inata, mas também a imunidade adquirida (BOLS et al., 2001). Estudos relacionando a ação de poluentes e/ou substâncias imunotóxicas com ação sobre o processo de fagocitose de peixes apresentam importância ambiental, pois podem

comprometer a vida dos animais de forma lenta e insidiosa e até mesmo da espécie como um todo (REYNAUD; DUCHIRON; DESCHAUX, 2001).

A imunoincompetência manifesta, frente a estímulos naturais e comuns, pode comprometer a vida dos animais, tanto de forma isolada como também populações inteiras destes mesmos animais, ao prejudicar a resposta imune inata básica, em peixes ou qualquer outra espécie animal. Quando esta imunoincompetência decorre da presença ambiental de um poluente ou contaminante qualquer, a utilização deste parâmetro imunológico passa a ter valor ecotoxicológico em especial no monitoramento contínuo de ambientes aquáticos diversos (BOLS et al., 2001; ZELIKOFF, 1998).

Assim, os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (*PAHs*), por exemplo, entre os mais estudados o benzo[a]pireno e o 3-metilcolantreno, atuam como potentes agentes imunotóxicos em roedores capazes de interferirem tanto na fagocitose como no *burst* oxidativo (TEWARI; BALINT; BROWN, 1979). Estas substâncias químicas, sub-produtos de diferentes processos químicos industriais, principalmente ligados à indústria do petróleo, podem chegar ao meio ambiente natural ou modificado ao redor de áreas industriais. Nestes arredores, pode-se encontrar animais domésticos ou selvagens e até mesmo seres humanos passíveis de sofrerem exposição a estas substâncias químicas, tanto de forma aguda (geralmente nos acidentes graves), como também de forma crônica (nas contaminações insidiosas).

Neste contexto, buscam-se indicadores biológicos sensíveis capazes de evidenciar a exposição a estes diferentes produtos ou classes de produtos químicos relevantes para determinados processos industriais específicos, na tentativa de monitorar o meio ambiente ao redor destas plantas industriais.

O estabelecimento de indicadores de contaminação ambiental para sub-produtos da indústria petrolífera tem focado a utilização de peixes como animais capazes de cumprir esta função. Vários motivos podem ser enumerados para justificar a utilização destes animais: 1- São razoavelmente grandes para fornecerem material biológico em boas quantidades para análises laboratoriais (o sangue, por exemplo); 2- Disponibilidade de coleta de exemplares nos arredores das plantas industriais; 3- Fácil manutenção em condições de laboratório para testes que visem padronização de técnicas e métodos e 4- Valor econômico, ecológico e alimentar dependendo da espécie escolhida gerando resultados úteis para outros campos de aplicação do conhecimento.

A utilização de diferentes funções imunes na tentativa de estabelecimento de indicadores biológicos capazes de monitorar contaminações ambientais por diferentes substâncias químicas decorre da importância biológica deste sistema na manutenção da vida dos animais e na razoável facilidade para obtenção de células imunes, através do sangue, por exemplo, sem comprometimento da vida dos mesmos. Assim, inúmeros trabalhos científicos têm utilizado diferentes espécies de peixes buscando o estabelecimento de possíveis indicadores biológicos para contaminações por diferentes produtos químicos. Por exemplo, macrófagos expostos à concentração de 0,4mg/L de sulfonato de

alquilbenzeno (LAS) por um período de 54 dias evidenciaram uma diminuição da capacidade de fagocitose de macrófagos de truta arco-íris (BAKIREL et al., 2005). Neste trabalho os autores buscaram os valores padrão de atividade fagocitária para trutas e mostraram que este poluente foi capaz de diminuir a fagocitose após uma exposição prolongada ao produto durante 54 dias. Estes dados ressaltam a importância de se conhecer aspectos fisiológicos do processo de fagocitose de diferentes tipos celulares em espécies animais distintas visando verificar a possível ação de poluentes e agentes tóxicos diversos sobre esta resposta. Desta forma também procedemos.

A “fagocitose” realizada tanto pelos trombócitos (considerada por alguns autores como uma fagocitose atípica ou também denominada de falsa fagocitose) como pelos monócitos sangüíneos do *C. parallelus* e estimulada, *in vitro*, por *S. aureus* foi significativa. Cerca de 65% dos trombócitos e 80% dos monócitos fagocitaram quando estimulados pela SAPI. Já quando o estímulo foi dado pela adição de zymosan ao meio de cultura, a resposta dos trombócitos não passou de 5%. Nos monócitos a estimulação com zymosan foi capaz de evidenciar duas sub-populações distintas. Uma sub-população que apresentava médias de fluorescência média bastante altas (na casa de 1000 a 10000) onde cerca de 60% das células encontravam-se fagocitando e outra sub-população cuja fluorescência média foi baixa (entre 10 e 100), com aproximadamente 30% das células fagocitando (Figura 15). Vale a pena destacar que estes diferentes tipos celulares apresentavam-se viáveis durante a análise da capacidade fagocítica, viabilidade esta testada pela marcação pelo iodeto de propídeo (Figuras 12 e 13).

De fato, Chilmonczyk e Monge (1999) também observaram uma resposta similar em leucócitos circulantes de truta arco íris. Estes autores mostraram que leucócitos retirados do rim cefálico apresentavam fagocitose mais intensa quando comparada com leucócitos do sangue circulante após uma infecção viral. Muito provavelmente, nossos resultados evidenciaram duas populações de monócitos com maturidades diferentes. No campo especulativo, uma destas sub-populações seria mais facilmente ativada pelo zymosan, provavelmente por ser mais madura e capaz de migrar para o tecido em condições patológicas que necessitem de macrófagos ativados nos tecidos. Outra sub-população não tão ativa seria uma possível reserva estratégica temporal, caso a resolução da infecção no tecido exigisse tempo maior ou caso a infecção tecidual não debelada causasse uma invasão do agente agressor para a circulação. Como Chilmonczyk e Monge (1999) mostraram, a capacidade fagocítica destas células varia segundo sua localização no organismo do peixe. O estímulo utilizado por estes autores, qual seja, uma infecção viral, teve a capacidade de acionar seletivamente a capacidade de fagocitose destas células segundo sua posição em determinado compartimento orgânico naquele momento.

Nossos resultados mostraram também a incapacidade do zymosan em aumentar o percentual de trombócitos em atividade fagocítica. Este resultado poderia indicar uma especificidade maior destas células em reagirem frente a um estímulo bacteriano como o SAPI, mas não a um estímulo fúngico (zymosan). Já os monócitos foram capazes de elevar o seu percentual de células em atividade fagocítica tanto na presença de zymosan quanto na presença de SAPI.

O processo de fagocitose é considerado chave na organização da resposta imune tanto inata quanto adaptativa (KOLLNER et al., 2000). Assim sendo, respostas diferentes são esperadas para diferentes agentes biológicos. Os processos de reconhecimento, por parte dos fagócitos, dos diferentes agentes patogênicos sejam de origem viral, bacteriano ou fúngico tem em seus mecanismos moleculares uma das áreas mais desafiadoras da pesquisa científica atual (MEANS; GOLENBOCK; FENTON, 2000). A descoberta dos *Toll Like Receptors* (TLRs) primeiramente em *Drosophila* sp. e posteriormente em mamíferos e peixes (MEDZHITOV, R.; JANEWAY, C. A. Jr, 1997; 1998) abriu um enorme campo de investigação nos padrões de reconhecimento de agentes patogênicos diversos pelos macrófagos. O início de respostas imunes específicas para determinados agentes pode residir na diversidade de receptores tipo *Toll*, hoje em número aproximado de nove subtipos (GOLENBOCK, 2004).

Os resultados citométricos da avaliação do *burst* oxidativo mostraram uma estimativa da capacidade de resposta dos leucócitos frente a diferentes substâncias ativadoras adicionadas à suspensão de células, entre elas o PMA, LPS e SAPI.

A resposta gerada pelo PMA foi a de maior magnitude tanto para os trombócitos (Figura 17) como para monócitos (Figura 18). Estudos mostram que neutrófilos que foram estimulados com PMA, após serem recrutados pela administração de lisado de bactérias na cavidade peritoneal de carpa, também mostraram maior intensidade de fluorescência, decorrente do aumento do *burst* respiratório (SERADA et al., 2005; STOSIK et al., 2002). A capacidade

estimulante do PMA, em fagócitos de diferentes espécies animais, é bem conhecida (SILVA et al., 2003). Ortuño; Esteban; Meseguer (1999), por exemplo, observando macrófagos e trombócitos oriundos do pró-néfron do peixe *Spaurus aurata* verificaram o efeito estimulante do PMA sobre o *burst* oxidativo nesta espécie.

Por outro lado, em *C. parallelus* a resposta de *burst* oxidativo decorrente da estimulação pelo LPS foi discreta, quase inexistente. Este fato pode estar relacionado à ausência da proteína ligante de LPS (*LBP*) no soro de peixes (ILIEV et al, 2005), proteína esta que sensibilizaria os fagócitos para ação do LPS estimulando assim um maior *burst* oxidativo. Estes mesmos autores (ILIEV et al., 2005) mostraram que LPS de *E. coli* (EC-LPS) e LPS de *Pseudomonas aeruginosas* (PA-LPS) possuem a capacidade de produzir diferentes concentrações de TNF- α e seu respectivo RNA mensageiro. Mostraram ainda que o EC-LPS foi capaz de aumentar mais a produção de TNF- α quando comparado com PA-LPS em cultura de macrófagos. Especificidades moleculares como estas, apresentadas no trabalho de Iliev e seu grupo, poderiam explicar a baixa estimulação obtida em nosso modelo animal tanto pelo o LPS como pela SAPI em comparação com a resposta frente ao PMA. O LPS utilizado por nós é oriundo de *E. coli*, porém as respostas obtidas para *C. parallelus* foram diferentes daquelas obtidas por Iliev. Vale ressaltar que este autor utilizou trutas, uma espécie animal diferente e, portanto um modelo experimental também diferente daquele que utilizamos. Tal fato evidencia a necessidade de um bom conhecimento básico prévio do modelo celular e animal em estudo.

Padronizações e validações são necessárias para capacitar o laboratório no bom uso de um determinado modelo experimental ou sistema teste em análises que visam a formação de indicadores biológicos capazes de evidenciar contaminações ambientais importantes (BOLS et al., 2001).

O estudo da imunidade inata de espécies de peixes com importância ecológica e econômica, como o *C. parallelus*, podem contribuir para o estabelecimento destes indicadores biológicos sensíveis às variações ambientais aos quais estes animais estão sujeitos. Assim, o impacto toxicológico decorrente da exposição a diferentes poluentes ambientais pode ser quantificado através das alterações imunológicas (BOLS et al., 2001). Para tal, valores fisiológicos devem ser estabelecidos previamente, em condições laboratoriais adequadas, utilizando-se metodologias reprodutíveis que permitam avaliar com qualidade a resposta imune inata destes peixes frente à poluição ambiental (MUÑOZ et al., 1998; NOVOA et al., 1996).

Os resultados obtidos com a avaliação da fagocitose de partículas de zymosan após trombócitos e monócitos serem expostos ao naftaleno demonstraram um aumento significativo desta função celular (Figuras 20 e 21). Porém no que diz respeito ao *burst* oxidativo houve um decréscimo desta função celular em especial nas concentrações 10^{-6} M de naftaleno, tanto para trombócitos como para monócitos, mas também na concentração de 10^{-9} M de naftaleno apenas em monócitos. A utilização de diferentes estímulos para a indução do *burst* oxidativo também evidenciou respostas diferenciadas. O PMA foi novamente mais eficaz em induzir o *burst* oxidativo em especial para os monócitos. Estes

resultados refletem, *in vitro*, uma resposta frente ao contaminante com significado imunológico pouco favorável ao organismo do peixe, já que as células estudadas estão aumentando a atividade fagocítica e diminuindo, de forma geral, a capacidade de destruição de um possível agente invasor através do *burst* oxidativo. Em termos fisio-patológicos, uma situação inusitada e desacoplada da seqüência lógica dos fatos.

Trabalhos da literatura apontam para situações similares e possíveis explicações. A primeira questiona o método utilizado (PIYTYCZ et al., 1989). A quantificação, por citometria de fluxo, da formação das diferentes espécies reativas de oxigênio se dá de maneira indireta através da medida da atividade das esterases citoplasmáticas capazes de quebrar o DCFH-DA (diacetato de 2'7'diclorfluoresceína) em DCFH (2'7'diclorfluoresceína) que é o fluorocromo detectado pelo citômetro e que não consegue mais sair do interior da célula. A atividade desta enzima possui correlação positiva com outras enzimas capazes de gerar espécies reativas de oxigênio. Uma das críticas seriam possíveis diferenças enzimáticas existentes em peixes visto que este método foi desenvolvido para mamíferos, gerando assim falsos negativos. Assim, variações na atividade basal ou induzida de *burst* oxidativo em peixes poderiam ser inespecíficas e aleatórias (mais ligadas a temperatura, por exemplo), não representativa portanto do verdadeiro *burst* respiratório (PIYTYCZ et al., 1989).

Por outro lado, inúmeros trabalhos científicos tem utilizado esta metodologia para a avaliação do *burst* respiratório basal ou induzido, por diferentes agentes, em diferentes animais e também em diferentes espécies de

peixes. Os resultados obtidos têm sido aceitos por revistas conceituadas (HARFORD, 2006; MILSTON et al., 2003; ROBERTSEN et al. 1994; SILVA, 2003). Porém os métodos tradicionais que quantificavam o *burst* oxidativo antes do advento da citometria de fluxo, ELISA principalmente, avaliavam um pequeno número de células, com sensibilidade menor e também de forma indireta. Assim sendo, a citometria conferiu a esta mensuração sensibilidade maior e avaliação de um número de células impensável pelos métodos tradicionais. Nos nossos resultados, utilizamos cerca de 10000 células para avaliação tanto da atividade fagocitária como do *burst* oxidativo. A maior vantagem dos estudos funcionais por citometria de fluxo estão relacionados à velocidade de obtenção e análise dos resultados. Uma amostra já preparada com cerca de 10000 eventos a serem contados, não leva mais do que um minuto para ser realizada. Uma vantagem insuperável pelos métodos tradicionais. As diversas possibilidades de análise também impressionam.

Assim, a diminuição do *burst* oxidativo, *in vitro*, tanto de trombócitos como monócitos induzida pelo naftaleno, em especial na concentração de 10^{-6} M, poderia ser explicada pela capacidade desta substância química em inibir de maneira inespecífica enzimas celulares, entre elas a NADPH-oxidase enzima responsável primeira etapa de formação de H_2O_2 um dos principais e mais importantes reativos de oxigênio tanto para peixes como para mamíferos. A inibição de uma quinase específica (PKC), capaz de metabolizar fragmentos de lipídeos de membrana que forneceria diferentes substratos para que outras enzimas produzissem diferentes espécies reativas de oxigênio, apresenta-se também como possível mecanismo de ação tóxico do naftaleno. De fato este

resultado foi obtido em camundongos e necessita de comprovação específica para peixes (BABIOR, 1984; WEISS et al., 1981).

Uma análise conjunta dos resultados obtidos neste trabalho mostra um efeito imunotóxico do naftaleno sobre a fagocitose e também na indução do *burst* oxidativo de diferentes fagócitos de robalos peva. Além de padronizar e quantificar estas importantes funções imunes para esta espécie de larga ocorrência no litoral brasileiro, acreditamos que estas funções imunes, nesta espécie de peixe, possam vir a ser utilizadas como indicadores ambientais importantes na avaliação dos arredores de plantas industriais ligadas ao uso racional e responsável do petróleo. Estaremos contribuindo assim, para a melhoria das condições ambientais nos ambientes próximos a estas áreas e também para o meio ambiente como um todo.

7 CONCLUSÕES

- A separação dos leucócitos e das hemácias do sangue circulante de *Centropomus parallelus* foi realizada com maior eficiência utilizando-se o Ficoll-Paque Plus® nas densidades 1,055g/mL e 1,070g/mL, após centrifugação a 450 x g , durante 45 minutos. A hemólise hipotônica do sangue não apresentou bons resultados neste sistema teste.
- O iodeto de propídeo (PI) mostrou-se um bom indicador da viabilidade celular na técnica de citometria de fluxo, sendo que a concentração de 10⁻⁵ M apresentou os melhores resultados, marcando as células mortas e não apresentando citotoxicidade aparente. Concentrações maiores que esta evidenciaram citotoxicidade.
- A separação das populações de leucócitos feitas no citômetro revelou duas populações distintas do sangue circulante de *C. parallelus*, uma composta predominantemente por trombócitos e linfócitos e outra por monócitos.
- A SAPI (*Staphylococcus. aureus* marcado com PI) estimulou a fagocitose realizada tanto pelos trombócitos (fagocitose atípica) como pelos monócitos sangüíneos do *C. parallelus*.

- As partículas de zymosan adicionadas *in vitro* estimularam apenas a fagocitose dos monócitos.
- Os resultados da avaliação do *burst* oxidativo, mensurados por citometria de fluxo, mostraram que o PMA apresentou maior capacidade de resposta quando comparada com LPS e SAPI.
- Monócitos e trombócitos, exposto *in vitro*, durante quatro horas, às concentrações de 10^{-3} M, 10^{-6} M e 10^{-9} M de naftaleno, apresentaram aumento significativo da fagocitose.
- Monócitos e trombócitos, expostos *in vitro*, durante quatro horas, às concentrações de 10^{-6} M e 10^{-9} M de naftaleno apresentaram diminuição significativa no *burst* oxidativo em especial na maior concentração utilizada (10^{-6} M).

REFERÊNCIAS

ALEXANDER, J. B.; INGRAM, J. A. Noncellular nonspecific defence mechanisms of fish. **Annual Review of Fish Diseases**, v. 2, p. 249-279, 1992.

AHMAD, I.; PACHECO, M.; SANTOS, M. A. Naphthalene-induced differential tissue damage association with circulating fish phagocyte induction. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 54, p. 7-15, 2003.

ARKOOSH, M. R.; CASILLAS, E.; CLEMONS, E.; KAGLEY, A. N.; OLSON, R.; RENO, P. et al. Effect of pollution on fish diseases: potential impacts on salmonid populations. **Journal of Aquatic Animal Health**, v. 98, p.182-190, 1998.

BABIOR, B. M. The respiratory burst of phagocytes. **Journal of Clinical Investigation**, v. 73, p. 599–605, 1984.

BAKIREL, T.; KELES, O.; KARATAS, S.; ÖZCAN M.; TÜRKMEN, G.; CANDAN, A. Effect of linear alkylbenzene sulphonate (LAS) on non-specific defence mechanisms in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquatic Toxicology**, v. 71, p.175–181, 2005.

BARBIERI, E. **Efeitos do LAS-C12 (Dodecil Benzeno Sulfonato de Sódio) no metabolismo e na capacidade de natação da tainha, *Mugil platanus* (Günther, 1880) (Perciformes, Mugilidae)**. 2000. 232 f. Tese (Doutorado em Oceanografia Biológica). Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo, São Paulo.

BARREDA, D. R.; NEUMANN, N. F.; BELOSEVIC, M. Flow cytometric analysis of PKH26-labeled goldfish kidney-derived macrophages. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 24, p. 395-406, 2000.

BASSOE, C. F.; LAERUM, O. D.; GLETTE, F.; HOPEN, G.; HANEBERG, B.; SOLBERG, C. O. Simultaneous measurement of Phagocytosis and phagosomal pH by flow cytometry: role of polymorphonuclear neutrophilic leukocyte granules in phagosome acidification. **Cytometry**, v. 4, p. 254-262, 1983a.

BASSOE, C. F.; LAERUM, O. D.; SOLBERG, C. O.; HANEBERG, B. Phagocytosis of bacteria by human leucocytes measured by flow cytometry. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v. 174, p. 182-186, 1983b.

BAYNE, C. J.; LEVY, S. Modulation of the oxidative burst in trout myeloid cells by adrenocorticotrophic hormone and catecholamines: mechanisms of action. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 50, p. 554–560, 1999.

BLOCK, R. N.; ALLWORTH, N.; BISHOP, M. Assessment of diesel contamination in soil. In: CALABRESE, E. J.; KOSTECKI, P. T. (Ed.) **Hydrocarbons contaminated soils**, Lewis, Chelsea. 1991. v. 1, p. 135-148.

BLY, J.; MILLER, N. W.; CLEM, L. W. A monoclonal anti-body specific for neutrophils in normal and stressed channel catfish. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 14, p. 211-221, 1990.

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

BORYSENKO, M. Phylogeny of immunity: an overview. **Immunogenetics**, v. 3, p. 305-321, 1976.

BURNS, L. A.; MEADE, B. J.; MUNSON, A. E. Toxic responses of the immune system. In: CASARETT, L. J.; KLAASSEN, C. D.; AMDUR, M. O.; DOULL, J. **Casarett and doull's toxicology: the basis science of poisons**. New York: McGraw-Hill, 1996. p. 355-402.

CARLSON, E. A.; LI, Y.; ZELIKOFF, J. T. Suppressive effects of benzo[a]pyrene upon fish immune function: evolutionarily conserved cellular mechanisms of immunotoxicity. **Marine Environmental Research**, v. 58, p. 731–734, 2004.

CHILMONCZYK, S.; MONGE, D. Flow cytometry as a tool for assessment of the fish cellular immune response to pathogens. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 9, p. 319-333, 1999. CHILMONCZYK, S.; VOCCIA, I.; TARAZONA, J. V.; MONGE, D. Flow cytometric analysis of fish leucocyte populations exposed to pollutants and pathogens: modulatory effects induced by experimental procedures. In: Zelikoff J. T. (Ed.). **Ecotoxicology: responses, biomarkers and risk assessment**. Fair Haven, NJ: SOS Publications, 1997. p. 171-184.

CRIPPEN, T.; BOOTLAND, L.; LEONG, J.; FITZPATRICK, M.; SCHRECK, C.; VELLA, A. Analysis of salmonid leucocytes purified by hypotonic lysis of erythrocytes. **Journal of Aquatic Animal Health**, v. 13, p. 234–235, 2001.

CUESTA, A.; ESTEBAN M. A.; MESEGUER, J. Natural cytotoxic activity of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) leucocytes Assessment by flow cytometry and microscopy. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 71, p. 161-171, 1999.

DANNEVIG, B. H.; LAUVE, A., M. C. L.; PRESS, C.; LANDSVERK, T. Receptor-mediated endocytosis and phagocytosis by rainbow trout head kidney sinusoidal cells. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 4, p. 3–18, 1994.

DUNLAP, L. E.; BECKMANN, D. D. Soluble hydrocarbons analysis from kerosene/diesel type hydrocarbons In: **Proceedings of the Conference on Petroleum Hydrocarbons and Organic Chemicals in ground water: Prevention, Detection and Restoration**, p. 37-45. The Westin Galleria, Houston, TX, Dublin, OH, National Water Well Association, 9-11 November, 1988.

ENDO, H.; NAKAYAMA, J.; HAYASHI, T. Application of flow cytometry to environmental control in marine aquaculture. **Materials Science and Engineering C**, v. 12, p. 83–88, 2000.

ELLIS, A. E. Immunity to bacteria in fish. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 9, p. 291-308, 1999.

ELLSAESSER, C. F.; MILLER, N. W.; CUCHENS, M. A.; LOBB, C. J.; CLEM, L. W. Analysis of channel catfish peripheral blood leucocytes by bright-field microscopy and flow cytometry. **Trans. Am. Fish. Soc.**, v. 114, p. 279-285, 1985.

ESTEBAN, M. A.; MULERO, V.; CUESTA, A.; ORTUÑO, J.; MESEGUER, J. Effects of injecting chitin particles on the innate immune response of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). **Fish and Shellfish Immunology**, v. 10, n. 6, p. 543-554, 2000.

FARIA, M. T. **A explosão respiratória em leucócitos de curimatá (*Prochilodus scrofa*)**. 2005. 79 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

FERNICOLA, N. A. G. G.; BOHRER-MOREL, M. B. C.; BAINY, A. C. D. Ecotoxicologia. In: AZEVEDO, F. A.; CHASIN, A. A. M. **As bases toxicológicas da ecotoxicologia**. São Carlos: RiMa editora; São Paulo: Inter Tox. 2004, p. 221-243.

GOEDKEN, M.; DE GUISE, S. Flow cytometry as a tool to quantify oyster defence mechanisms. **Fish and Shellfish Immunology**, v.16, p. 539-552, 2004.

GOLENBOCK, D. T. Introduction: Toll receptors come of age. **Microbes and Infection**, v. 6, p. 1349-1350, 2004.

GOSLINE, W. A. **Functional morphology and classification of teleostean fishes**. Honolulu: The University Press of Hawaii, 1971. 208 p.

GRAHAM, S.; SECOMBES, C. J. The production of a macrophage-activating factor from rainbow trout *Salmo gairdneri* leucocytes. **Immunology**, v. 65, p. 293–297, 1988.

GRAVATO, C.; SANTOS, M. A. Juvenile Sea Bass Liver P450, EROD Induction, and Erythrocytic Genotoxic Responses to PAH and PAH-like Compounds. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 51, p. 115-127, 2002.

GRINDE, B. Lysozyme from rainbow trout, *Salmo gairdneri*, Richardson, as an antibacterial agent against fish pathogens. **Journal of Fish Disease**, v. 12, 95–104, 1989.

HACON, S. S. Avaliação e gestão do risco ecotoxicológico à saúde humana. In: AZEVEDO, F. A.; CHASIN, A. A. M. **As bases toxicológicas da ecotoxicologia**. São Carlos: RiMa editora; São Paulo: Inter Tox. 2004, p. 245-322.

HAHN, M. E. Biomarkers and bioassays for detecting dioxinlike compounds in the marine environment. **Science of Total Environment**, v. 289, p. 49–69, 2002.

HARFORD, A. J.; O'HALLORAN, K.; WRIGHT, P. F. A. Flow cytometric analysis and optimisation for measuring phagocytosis in three Australian freshwater fish. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 20, n. 4, p. 562-573, 2006.

HASUI, M.; HIRABAYASHI, Y.; KOBAYASHI, Y. Simultaneous measurement by flow cytometry of phagocytosis and hydrogen peroxide production of neutrophils in whole blood. **Journal of Immunological Methods**, v. 117, p. 53-58, 1989.

HÉGARET, H.; WIKFORS, G. H.; SOUDANT, P. Flow cytometric analysis of haemocytes from eastern oysters, *Crassostrea virginica*, subjected to a sudden

temperature elevation II. Haemocyte functions: aggregation, viability, phagocytosis, and respiratory burst. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 293, p. 249–265, 2003.

HERMANN, A. C.; MILLARD, P. J.; BLAKE, S. L.; KIM, C. H. Development of a respiratory burst assay using zebrafish kidneys and embryos. **Journal of Immunological Methods**, v. 292, p. 119-129, 2004.

HOEGER, B.; VAN DEN HEUVEL, M. R.; HITZFELD, B. C.; DIETRICH, D. R. Effects of treated sewage effluent on immune function in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquatic Toxicology**, v. 70, p. 345–355, 2004.

ILIEV, D. B.; LIARTE, C. Q.; MACKENZIE, S.; GOETZ, F. W. Activation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) mononuclear phagocytes by different pathogen associated molecular pattern (PAMP) bearing agents. **Molecular Immunology**, v. 42, p. 1215–1223, 2005.

INOUE, T.; MORITOMO, T.; TAMURA, Y.; MAMIYA, S.; FUJINO, H.; NAKANISHI, T. A new method for fish leucocyte counting and partial differentiation by flow cytometry. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 13, p. 370-390, 2002.

JANG, S. I.; HARDIE, L. J. SECOMBES, C. J. Elevation of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* macrophage respiratory burst activity with macrophage-derived supernatants. **Journal of Leuk. Biol**, v. 57, p. 943-947, 1995.

JENEY, G.; GALEOTTI, M.; VOLPATTI, D.; JENEY, Z.; ANDERSON, D. P. Prevention of stress in rainbow (*Oncorhynchus mykiss*) fed diets containing different doses of glucan. **Aquaculture**, v. 154, p. 1–15, 1997.

JONES, D. C.; PRABHAKARAN, K.; LI, L.; GUNASEKAR, P. G.; SHOU, Y.; BOROWITZ, J. L.; ISOM, G. E. Cyanide enhancement of dopamini-induced apoptosis in mesencephalic cells involves mitochondrial dysfunction and oxidative stress. **Neurotoxicology**, v. 24, n. 3, p. 333-334, 2003.

KFOURY JR. J. R.; KURODA, A.; NAKAYSU, C.; FUKUDA, H.; OKAMOTO, N. Analysis of rainbow trout peripheral blood leukocytes separated by flow cytometry cell sorting. **Fish Pathology**, v. 34, p. 1–6, 1999.

KIRBY, M. F.; BLACKBURN, M. A.; THAIN, J. E.; WALDOCK, M. J. Assessment of water quality in estuarine and coastal waters of England and Wales using a

contaminant concentration technique. **Marine Pollution Bulletin**, v. 36, n. 8, p. 631-642, 1998.

KÖLLNER, B.; BLOHM, U.; KOTTERBA, G.; FISCHER, U. A monoclonal antibody recognising a surface marker on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) monocytes. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 11, p. 127–142, 2001.

KOLLNER, B.; WASSERRAB, B.; KOTTERBA, G.; FISHER, U. Evaluation of immune functions of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) – how can environmental influences be detected? **Toxicology Letters**, v. 131, p. 83-95, 2002.

LAMAS, J.; ELLIS, A. E. Atlantic salmon (*Salmo salar*) neutrophil responses to *Aeromonas salmonicida*. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 4, n. 3, p. 201–219, 1994.

LLORENTE, L.; FUENTEM H.; RICHAUD PAUTIN, Y.; BARRERA, C. A.; DIAZ-BORJON, A.; LOPEZ-PONCE, A.; LERMAN-GARBER, I.; JAKEZ-OCAMPO, J. Innate immune response mechanisms in noninsulin diabetes mellitus patients assessed by flow cytometry. **Immunology Letters**, v. 74, p. 239-244, 2000.

LUTTER, R.; VAN SCHAIK, M. L. J.; VAN ZWIETEN, R.; WEVER, R.; ALBRACHT, S. P. J.; MEERHOF, L. J.; HARMERS, M. N.; ROOS, D. Characterization of Cytochrome b558, the protein involved in the production of superoxide by neutrophilic granulocytes. In: Rotilio G, editor. **Superoxide and Superoxide Dismutase in Chemistry, Biology and Medicine**. Amsterdam: Elsevier Science, 1986. p. 128–150.

MAGOR, B. G.; MAGOR, K. E. Evolution of effectors and receptors of innate immunity. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 25, p. 651-682, 2001.

MASSOCO, C. O. **Receptores benzodiazepínicos periféricos e a resposta imune inata de eqüinos: efeitos do midazolam**. 2003. 125 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

MEANS, T. K.; GOLENBOCK, D. T.; FENTON, M. J. The biology of Toll-like receptors. **Cytokine and Growth Factor Reviews**, v.11, p. 219-232, 2000.

MEDZHITOV, R.; JANEWAY, C. A. Jr. Innate Immunity: The Virtues of a Nonclonal System of Recognition **Cell**, v. 91, n. 3, p. 295-298, 1997.

MEDZHITOV, R.; JANEWAY, C. A. Jr. An ancient system of host defense • **Current Opinion in Immunology**, v. 10, n. 1, p.12-15, 1998.

MENEZES, N. A.; FIGUEIREDO, J. L. Manual de peixes marinhos do sudeste do Brasil. IV: Teleostei (3). São Paulo: Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo, 1980. 47 p.

MILSTON, R. H.; VELLA, A. T.; TAWNI, L.; CRIPPEN, T. L.; FITZPATRICK, M. S.; LEONG, J. C.; SCHRECK, C. B. *In vitro* detection of functional humoral immunocompetence in juvenile chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) using flow cytometry. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 15, p. 145–158, 2003.

MISUMI, I.; VELLA, A. T.; JO-ANN C. LEONG, J. C.; NAKANISHI, T.; SCHRECK, C. B. p,p'-DDE depresses the immune competence of Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) leukocytes. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 19, p. 97-114, 2005.

MODEL, M. A.; KUKURUGA, M. A.; TODD III, R. F. A sensitive flow cytometric method for measuring the oxidative burst. **Journal of Immunology Methods**, v. 202, p.105-111, 1997.

MOHANTY, J. G.; JAFFE, J. S.; SCHULMAN E. S.; RAIBLE, D. G. A highly sensitive fluorescent micro-assay of H₂O₂ release from activated human leukocytes using a dihydroxyphenoxazine derivative. **Journal of Immunology Methods** 1997; 202:133-41.

MORITOMO, T.; SERATA, K.; TESHIROGI, K.; AIKAWA, H.; INOUE, Y.; ITOU, T.; NAKANISHI, T. Flow cytometric analysis of the neutrophil respiratory burst of ayu, *Plecoglossus altivelis*: comparison with other fresh water fish. **Fish and Shellfish Immunology**, v.15, p. 29-38, 2003.

MUÑOZ, P.; CALDUCH-GINER, J. A.; SITJÀ-BOBADILLA, A.; ALVAREZ-PELLITERO, P.; PÉREZ-SÁNCHEZ, J. Modulation of the respiratory burst activity of Mediterranean sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) phagocytes by growth hormone and parasitic status. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 8, p. 25-36, 1998.

NAKANO, M. **Active oxygen, lipid peroxides and antioxidants**, Boca Raton: Ed. Press, 1993.

NCR National Research Council. **Biological markers in immunotoxicology**. Washington, D. C.: National Research Council, National Academic Press, 1992.

NEIDIG, C. L.; SKAPURA, D. P.; GRIER, H. J.; DENNIS, C. W. Techniques for spawning common snook: broodstock handling, oocyte staging, and egg quality. **North American Journal of Aquaculture**, v. 62, p. 103-113, 2000.

NEUMANN, N. F.; BARREDA, D.; BELOSEVIC, M. Production of a macrophage growth factor(s) by a goldfish macrophage cell line and macrophages derived from goldfish kidney leukocytes. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 4, p. 417-432, 1998.

NEUMANN, N. F.; FAGAN, D.; BELOSEVIC, M. Macrophage activating factor(s) secreted by nitrogen stimulated goldfish kidney leukocytes synergize with bacterial lipopolysaccharide to induce nitric oxide production in teleost macrophages. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 19, p. 473-482, 1995.

NOVOA, B.; FIGUERAS, A.; ASHTON, I.; SECOMBES, C. J. In vitro studies on the regulation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) macrophage respiratory burst activity. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 20, n. 3, p. 207-226, 1996.

ORTUÑO, J.; ESTEBAN, M. A.; MESEGUER, J. Effect of high dietary intake of vitamin C on non-specific immune response of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). **Fish and Shellfish Immunology**, v. 9, p. 429-443, 1999.

ORTUÑO, J.; ESTEBAN, M. A.; MESEGUER, J. Kinetics of hydrogen peroxide production during *in vitro* respiratory burst of seabream (*Sparus aurata* L.) head-kidney leucocytes, as measured by a flow cytometric method. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 10, p. 725-729, 2000.

OTTINGER, C. A.; JOHNSON, S. C.; EWART, K. V.; BROWN, L. L.; ROSS, N. W. Enhancement of anti- *Aeromonas salmonicida* activity in Atlantic salmon (*Salmo salar*) macrophages by a mannose-binding lectin. **Comparative Biochemistry Physiology C**, v. 123, n. 1, p. 53-59, 1999.

PASSER, B. J.; CHEN, C. H. MILLER, N. W.; COOPER, M. D. Catfish thrombocytes express an integrin-like CD41/CD61 Complex. **Experimental Cell Research**, v. 234, p. 347-353, 1997.

PASTORET, P. P.; GRIEBEL, P.; BAZIN, H.; GOVAERTS, A. Immunology of fishes. In: ----- **Handbook of vertebrate immunology**, San Diego: Academic Press. 1998. p. 3-62.

PETTERSEN, E. F.; BJERKNES, R.; WERGELAND, H. I. Studies of atlantic salmon (*Salmo salar* L.) blood, spleen and head kidney leucocytes using specific monoclonal antibodies, immunohistochemistry and flow cytometry. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 10, p. 695-710, 2000.

PICK, E.; KEISARI, Y. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced cells in culture. **Journal of Immunological Methods**, v. 38, p. 161-170, 1980.

PICK, K.; MIZEL, D. Rapid microassays for the measurement of superoxide and hydrogen peroxide produced by cells in culture. **Journal of Immunological Methods**, v. 46, p. 211-226, 1981.

POWELL, D. B. Immune system. In: OSTRANDER, G. K. **The laboratory fish**. San Diego, USA: Academic Press, 2000, p. 441-448.

PIYTYCZ, B.; FLORY, C. M.; GALVAN, I.; BAYNE, C. J. Leukocytes of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) pharynx: Cell types producing superoxide anion. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 13, p. 217-224, 1989.

RENAULT, T.; XUE, Q. G.; CHILMONCZYK, S. Flow cytometric analysis of European flat oyster, *Ostrea edulis*, haemocytes using a monoclonal antibody specific for granulocytes. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 11, p. 269-274, 2001.

REYNAUD, S.; DUCHIRON, C.; DESCHAUX, P. 3-Methylcholanthrene increases phorbol 12-myristate 13-acetate-induced respiratory burst activity and intracellular calcium levels in common carp (*Cyprinus carpio* L) macrophages. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 175, p.1-9, 2001.

ROBERTSEN, B.; ENGSTAD, R. E.; JORGENSEN, J. B. β -Glycans as immunostimulants in fish. **Modulation of Fish Immune Responses**, v. 1, 83-99, 1994.

ROMBOUT, J. H. W. M.; KOUMANS-VAN DIEPEN, J. C. E.; EMMER, P. M.; TAVERNE-THIELE, J. J.; TAVERNE, N. Characterisation of carp thrombocytes with specific monoclonal antibodies. **Journal of Fish Biology**, v. 49, p. 521-531, 1996.

ROSENFELD G. Método rápido de coloração de esfregaços de sangue: noções práticas sobre corantes pancrômicos e estudo de diversos fatores. **Memorias do Instituto Butantan**, v. 20, p. 315-328, 1947.

ROSS, P. S.; DE SWART, R. L.; VAN LOVEREN, H.; OSTERHAUS, A. D. M. E.; VOS, J. G. The immunotoxicity of environmental contaminants to marine wildlife: A review. **Annual Review of Fish Diseases**, v. 6, p. 151-165, 1996.

ROTHER, G.; VALET, G. Flow cytometric analysis of respiratory burst activity in phagocytes with hydroethidine and 2'7'-dichlorofluorescein. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 47, p. 440-448, 1990.

SAAD, A. M.; HAGELTORN, M. Flow cytometry characterization of bovine blood neutrophil Phagocytosis of fluorescent bacteria and zymosan particles. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 26, p. 289-307, 1985.

SAHA, N. R.; USAMI, T.; SUZUKI, Y. A double staining flow cytometric assay for the detection of steroid induced apoptotic leucocytes in common carp (*Cyprinus carpio*). **Developmental and Comparative Immunology**, v. 27, p. 351-363, 2003.

SÁNCHEZ, P.; LLORENTE, M. T.; CASTAÑO, A. Flow cytometric detection of micronuclei and cell cycle alterations in fish-derived cells after exposure to three model genotoxic agents: mitomycin C, vincristine sulfate and benzo(a)pyrene. **Mutation Research**, v. 465, p. 113-122, 2000.

SARMENTO, A.; GUILHERMINO, L.; AFONSO A. Mercury chloride effects on the function and cellular integrity of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) head kidney macrophages. **Fish and Shellfish Immunology**, v.17, p. 489-498, 2004.

SARMENTO, A.; MARQUES, F.; ELLIS, A. E.; AFONSO, A. Modulation of the activity of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) head-kidney macrophages by macrophage activating factor(s) and lipopolysaccharide. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 16, p. 79-92, 2004.

SECOMBES, C. J. The nonspecific immune system: cellular defences. In: IWAMA G; NAKANISHI, T. (Ed.). **The fish immune system: organism, pathogen, environment**. USA: Academic Press, 1996. p. 63-103.

SECOMBES, C. J.; FLETCHER, T. C. The role of phagocytes in the protective mechanisms of fish. **Annual Review of Fish Disease**, v. 2, 53-71, 1992.

SERADA, K.; MORITOMO, T.; TESHIROGI, K.; ITOU, T.; SHIBASHI, T.; INOUE, Y.; NAKANISHI, T. Comparison of respiratory burst activity of inflammatory neutrophils in ayu (*Plecoglossus altivelis*) and carp (*Cyprinus carpio*). **Fish and Shellfish Immunology**, v. 19, p. 363-373, 2005.

SHIIBASHI, T.; IIDA, T. NADPH and NADH serve as electron donor for the superoxide-generating enzyme in tilapia (*Oreochromis niloticus*) neutrophils. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 25, p. 461-465, 2001.

SILVA, F. R. **Efeitos de benzodiazepínicos sobre a atividade de neutrófilos de ratos avaliados por citometria de fluxo**. 2003. 179 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

SILVA, F. R.; LAZZARIN, I. R.; SÁ-ROCHA, L. C.; MORGULIS, M. S. F. A.; MASSOCO, C. O.; PALERMO-NETO, J. Effects of acute and long-term diazepam administrations on neutrophil activity: a flow cytometric study. **European Journal of Pharmacology**, v. 478, p. 97-104, 2003.

SILVA, T. L.; REIS, A.; HEWITT, C.; ROSEIRO, J. C. Citometria de fluxo - Funcionalidade celular on-line em bioprocessos [200-]. Disponível em: <<http://dequim.ist.utl.pt/bbio/77/pdf/citometria2.pdf>>. Acesso em 15 nov. 2005.

SKUPINSKA, K., MISIEWICZ, I., KASPRZYCKA-GUTTMAN, T. Polycyclic aromatic hydrocarbons: physicochemical properties, environmental appearance and impact on living organisms. **Acta Pol. Pharmacol**, v. 61, n. 3, p. 233-240, 2004.

SMITH, D. A. The development and application of a hemolytic plaque forming cell assay (PFC) and a cytotoxic t-lymphocyte assay (CTL) in tilapia (*Oreochromis niloticus*) for immunotoxicity risk assessment of environmental contaminants. Master's Thesis, Master of Science, Veterinary Medicine, 1998. Disponível em <<http://scholar.lib.vt.edu/theses/available/etd-7398-175815>>. Acesso em: 07 nov. 2005.

SOLEM, S. T.; JØRGENSEN, J. B.; ROBERTSEN, B. Stimulation of respiratory burst and phagocytic activity in atlantic salmon (*Salmo salar* L.) macrophages by lipopolysaccharide. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 5, p. 475-491, 1995.

STAFFORD, J. L.; MCLAUCHLAN, P. E.; SECOMBES, C. J.; ELLIS, A. E.; BELOSEVIC, M. Generation of primary monocyte-like cultures from rainbow trout head kidney leukocytes. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 25, n. 5-6, p. 447-459, 2001.

STAVE J. W.; ROBERSON B. S.; HETRICK F. M. Factors affecting the chemiluminescent response of fish phagocytes. **Journal of Fish Biology**; v. 25, n. 2, p. 197–206, 1984.

STEINHAGEN, D.; JENDRYSEK, S. Phagocytosis by carp granulocytes; *in vivo* and *in vitro* observations. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 4, 521–524, 1994.

STOSIK, M.; DEPTULA, W.; WIKTOROWICZ, K.; TRAVNICEK, M.; BALDY-CHUDZIK, K. Respiratory burst in neutrophilic granulocytes of carps (*Cyprinus carpio*): cytometric studies. **Veterinary Medicine Czech.**, v. 47, n.1, p. 17-20, 2002.

STUGE, T. B.; YOSHIDA, S. H.; CHINCHAR, V. G.; MILLER, N. W.; CLEM, L. W. Cytotoxic activity generated from channel catfish peripheral blood leukocytes in mixed leukocyte cultures. **Cellular Immunology**, v. 177, p.154–161, 1997.

TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F. R. **Hematologia de Peixes Teleósteos**. Ribeirão Preto: Villimpress Complexo Gráfico, 2004. 144 p.

TEWARI, R. P.; BALINT, J. P.; BROWN, K. A. Suppressive effect of 3-methylcholanthrene on phagocytic activity of mouse peritoneal macrophages for *Torulopsis glabrata*. **Journal of National Cancer Institute**, v. 62, p. 983–988, 1979.

THORGAARD, G. H.; RABINOVITCH, P. S.; SHEN, M. W.; GALL, G. A. E.; PROPP, J.; UTTER, F. M. Triploid rainbow trout identified by flow cytometry. **Aquaculture**, v. 29, n. 3-4, p. 305-309, 1982.

TUNG, J. W.; PARK, D. R.; MOORE, W. A.; HERZENBERG, L. A.; HERZENBERG, L. A. New approaches to fluorescence compensation and visualization of FACS data • **Clinical Immunology**, v. 110, pages 277-283, 2004.

VAZ, A. J. Sistema Imunológico e Toxicologia. In: AZEVEDO, F. A.; CHASIN, A. A. M. **As bases toxicológicas da ecotoxicologia**. São Carlos: RiMa; São Paulo: Inter Tox (Ed.) Brasil. 2004, p. 115-126.

VEIGA, M. L. **Estudo comparativo da atividade fagocítica de macrófagos do rim-cefálico e cavidade peritoneal e morfo-citoquímica de leucócitos do rim-cefálico, sangue e cavidade peritoneal de Prochilodus scrofa (Valenciennes, 1836)**. 2005. 125 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

VERBURG-VAN KEMENADA, B. M. L.; GROENEVELD, A.; VAN RENS, B. T. T. M.; ROMBOUT, J. H. W. M. Characterization of macrophages and neutrophilic granulocytes from the pronephros of carp (*Cyprinus carpio*). **Journal of Experimental Biology**, v. 187, p. 143-158, 1994.

YÁÑEZ-ARANCIBIA, A. **Ecología de la zona costera: análisis de siete tópicos**. México, DF: AGT (Ed.) 1986. 189 p.

ZAPATA, A.; CHIBÀ, A.; VARAS, A.; Cell tissues of the immune system of fish. In Iwama, Q.; Nakanishi, T. editors. *The fish immune system: organism, pathogen and environment*. San Diego: Academic Press, p.1-62, 1996.

ZEDECK, M. S. Polycyclic aromatic hydrocarbons. A review. **Journal of Environmental Pathology and Toxicology**, v. 3, p. 537–567, 1980.

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

ZELIOFF, J. T.; RAYMOND, A.; CARLSON, E.; LI, Y.; BEAMAN, J. R.; ANDERSON, M. Biomarkers of immunotoxicity in fish: from the lab to the ocean. **Toxicology Letters**, v. 112/113, p. 325-331, 2000.

WEEKS, B. A.; WARINNER, J. E. Functional evaluation of macrophages in fish from a polluted estuary. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 12, p. 313-320, 1986.

WEISS S. J.; YOUNG J.; LOBUGIO, A. F.; SLIVKA, A.; NIMEH, N. F. Role of hydrogen peroxide in neutrophil-mediated destruction of cultured endothelial cells. **Journal of Clinical Investigation**, v. 68, p. 714-720, 1981.

WIGG, A. J.; PHILLIPS, J. W.; WHEATLAND, L.; BERRY, M. N. Assessment of cell concentration and viability of isolated hepatocytes using flow cytometry. **Analytical Biochemistry**, v. 317, p. 19–25, 2003.