Thaís da Cruz Alves dos Santos

Estudo sobre efeitos do naftaleno e benzo(a)pireno em *Trachinotus carolinus* (Perciformes, Carangidae) utilizando biomarcadores citogenotóxicos, histopatológicos e bioquímicos

Tese apresentada ao Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências, área de Oceanografia Biológica.

Orientador: Prof. Dr. Phan Van Ngan

São Paulo

2009

Universidade de São Paulo

Instituto Oceanográfico

Estudo sobre efeitos do naftaleno e benzo(a)pireno em *Trachinotus carolinus* (Perciformes, Carangidae) utilizando biomarcadores citogenotóxicos, histopatológicos e bioquímicos

Thaís da Cruz Alves dos Santos

Tese apresentada ao Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências, área de Oceanografia Biológica.

Julgada em ____/___/____

Prof. Dr. Phan Van Ngan Instituto Oceanográfico da USP	Conceito
Prof(a). Dr(a).	Conceito
Prof(a). Dr(a).	Conceito
Prof(a). Dr(a).	Conceito
Prof(a). Dr(a).	Conceito

Agradeço a Deus por este trabalho e mais
esta etapa de minha vida.

Dedico este trabalho ao
meu irmão Thiago

“O que sabemos é uma gota,
o que ignoramos é um oceano”

Isaac Newton

Índice

Índice de Figuras iii

Índice de Tabelas v

Agradecimentos vi

Resumo ix

Abstract x

ABREVIATURAS xi

I. Introdução 1

II. Objetivos 14

III. Material e métodos 15

III.1. Espécie estudada 15

III.2. Coleta dos animais 15

III.3. Manutenção dos animais 16

III.4. Exposição aos poluentes 17

III.5. Coleta de material biológico 18

III.6. Biomarcadores citogenotóxicos: ensaio cometa e estudo de micronúcleos e anormalidades nucleares eritrocitárias 18

III.6.1. Ensaio cometa 18

III.6.1.1. Preparação das lâminas para o ensaio cometa 19
III.6.1.2. Adequação das condições de eletroforese do ensaio cometa às células sanguíneas de pampos 20
III.6.1.3. *Lise* 21
III.6.1.4. Desenrolamento do DNA 21
III.6.1.5. Eletroforese 21
III.6.1.6. Neutralização 22
III.6.1.7. Coloração por prata 22
III.6.1.8. Análise dos cometas 23

III.6.2. Observação de micronúcleos e de outras anormalidades eritrocitárias 23

III.7. Biomarcadores histopatológicos: Análises histopatológicas, histoquímicas, imunohistoquímicas e ultramorfologia 24

III.7.1. Preparação das lâminas 24

III.7.2. Técnicas histopatológicas 25

III.7.2.1. Hematoxilina–Eosina e Hematoxilina–VOF 25

III.7.3. Técnicas histoquímicas 26

III.7.3.1. Azul de bromofenol 26

III.7.3.2. Azul de alcian pH 0.5, 1.0 e 2.5 26
III.7.3.3. PAS e Carmim *the best* 27

III.7.4. Análise imunohistoquímica de atividade do citocromo CYP1A 27

III.7.5. Western blot 28

III.7.6. Microscopia eletrônica de varredura 30

III.8. Biomarcadores bioquímicos: catalase e glutationa-S-transferase 31

III.8.1. Catalase 31

III.8.2. Glutationa-S-transferase 32

III.8.3. Determinação da concentração de proteínas totais 33

III.9. Análises estatísticas 34

IV. Resultados 35

IV.1. Ensaio cometa 35

IV.1.1. Adequação das condições de eletroforese 35

IV.1.2. Efeitos da exposição ao NAP e BAP 36

IV.2. Análise de micronúcleos e de outras anormalidades eritrocitárias 37

IV.3. Análises histopatológicas 39

IV.4. Análises histoquímicas 41

IV.5. Análises imunohistoquímicas 46

IV.6. Western blot 49

IV.7. Ultramorfologia 49

IV.8. Catalase 50

IV.9. Glutationa-S-transferase 51

V. Discussão 53

VI. Conclusões 76

VII. Referências bibliográficas 78

Figuras 102

Tabelas 123

Índice de Figuras

Figura 1. *Trachinotus carolinus* 102
Figura 2. Fotografias invertidas de cometas de pampos utilizadas na análise de imagem 102
Figura 3. Eritrócitos de peixes evidenciando os diferentes tipos de alterações celulares 103
Figura 4. Média dos dados de determinação de curva padrão da atividade enzimática com a sua equação e correlação (R^2) 103
Figura 5. Variação da porcentagem de DNA na cauda dos cometas em função da voltagem de eletroforese e da concentração de peróxido de hidrogênio 104
Figura 6. Cometas observados nas voltagens de 0,72, 0,80 e 0,88 V/cm 104
Figura 7. Porcentagem de DNA na cauda dos cometas após exposições de 12, 24, 48 e 96 horas 105
Figura 8. Momento de cauda (tail moment) obtido dos cometas após exposições de 12, 24, 48 e 96 horas 106
Figura 9. Frequência de micronúcleos e anormalidades nucleares eritrocitárias (ANE) (‰) após exposições por 12 e 24 horas ao naftaleno 107
Figura 10. Frequência de micronúcleos e anormalidades nucleares eritrocitárias (ANE) (‰) após exposições por 48 e 96 horas ao naftaleno 108
Figura 11. Frequência de micronúcleos e anormalidades nucleares eritrocitárias (ANE) (‰) após exposições por 12 e 24 horas ao benzo(a)pireno 109
Figura 12. Frequência de micronúcleos e anormalidades nucleares eritrocitárias (ANE) (‰) após exposições por 48 e 96 horas ao benzo(a)pireno 110
Figura 13. Alterações encontradas em secções de brânquia de *T. carolinus* 111
Figura 14. Secções de fígado de *T. carolinus* demonstrando algumas das alterações encontradas nos tecidos 112

Figura 15. Ocorrência de parasitas nas brânquias de pampos_____113
Figura 16. Freqüência e intensidade de necrose em brânquias de pampos_____113
Figura 17. Freqüência e intensidade de hepatite no fígado de pampos____114
Figura 18. Cortes de brânquias e fígados de pampos ilustrando as diferentes técnicas histoquímicas empregadas_____115
Figura 19. Imunohistoquímica em fígado e brânquia de pampos_____116
Figura 20. Cubas de eletroforese utilizadas no experimento de *western blot*_____117
Figura 21. Membrana fotográfica revelando proteínas separadas após teste de *western blot*_____117
Figura 22. Fotografias obtidas em microscópio eletrônico de varredura_____118
Figura 23. Atividade da enzima catalase, expressa em unidades de catalase por minuto e miligrama de proteína (U CAT/min.mg proteína) para os experimentos de exposição ao naftaleno (NAP) nos diferentes períodos: 12, 24, 48 e 96 horas_____119
Figura 24. Atividade da enzima catalase, expressa em unidades de catalase por minuto e miligrama de proteína (U CAT/min.mg proteína) para os experimentos de exposição ao benzo(a)pireno (BAP) nos diferentes períodos: 12, 24, 48 e 96 horas_____120
Figura 25. Atividade da enzima glutationa-S-transferase, expressa em unidades de glutationa por minuto e miligrama de proteína (U GST/min.mg proteína) para os experimentos de exposição ao naftaleno (NAP) nos diferentes períodos: 12, 24, 48 e 96 horas_____121
Figura 26. Atividade da enzima glutationa-S-transferase, expressa em unidades de glutationa por minuto e miligrama de proteína (U GST/min.mg proteína) para os experimentos de exposição ao benzo(a)pireno (BAP) nos diferentes períodos: 12, 24, 48 e 96 horas_____122

Índice de Tabelas

Tabela 1. Distribuição dos 160 peixes utilizados nos diferentes grupos de exposição aos poluentes naftaleno e benzo(a)pireno e períodos de exposição 123

Tabela 2. Tecidos retirados de cada peixe utilizado nos experimentos de exposição aos HPAs, forma de preservação e finalidade 123

Tabela 3. Freqüência e intensidade de alterações morfológicas em brânquias de *T. carolinus*. HE e H-VOF 124

Tabela 4. Continuação de freqüência e intensidade de alterações morfológicas em brânquias de *T. carolinus*. HE e H-VOF 125

Tabela 5. Freqüência e intensidade de alterações morfológicas em fígados de *T. carolinus.* HE e H-VOF 126

Tabela 6. Continuação de freqüência e intensidade de alterações morfológicas em fígados de *T. carolinus.* HE e H-VOF 127

Tabela 7. Freqüência e intensidade de coloração em fígado e brânquia de *T. carolinus* através da técnica de azul de bromofenol 128

Tabela 8. Freqüência e intensidade de coloração em fígado e brânquia de *T. carolinus* através da técnica de azul alcian pH 0.5 129

Tabela 9. Freqüência e intensidade de coloração em fígado e brânquia de *T. carolinus* através da técnica de azul alcian pH 1.0 130

Tabela 10. Freqüência e intensidade de coloração em fígado e brânquia de *T. carolinus* através da técnica de azul alcian pH 2.5 131

Tabela 11. Freqüência e intensidade de coloração em fígado e brânquia de *T. carolinus* através das técnicas de PAS e Carmin the best 132

Tabela 12. Freqüência e intensidade de reação ao anticorpo CYP1A em fígado e brânquia de *T. carolinus* através do método imunohistoquímico 133

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Phan Van Ngan, meu orientador. Pela confiança, apoio, dedicação, ensinamentos, discussões e amizade nesses 8 anos de convivência.

Às secretárias da pós-graduação: Ana Paula e Silvana, pela paciência, por todos os inúmeros documentos que eu pedi e pela ajuda inestimável em todos os assuntos. Pelas conversas, risadas e apoio psicológico!

À CAPES pela bolsa de doutorado concedida.

Ao CNPq pela bolsa de doutorado sanduíche concedida que possibilitou a minha permanência por 6 meses na Espanha em 2007. Esta bolsa foi essencial para a realização de técnicas histológicas de alta qualidade, vivência em um laboratório de excelência no exterior e o convívio com pessoas incríveis e de culturas muito diferentes: Oli, Juan, Isabel Viaña, Maria, Carina, Meli, Nacho, Assun, Severin, Aourel, Warley e Cristiano. Ao Kaled e Antonio Astola pela ajuda nas análises de Western Blot.

À Dra. Maria Del Carmen Sarasquete pela co-orientação na Espanha e por me receber em seu laboratório no ICMAN.

Ao Vicente e à Zezé pela amizade, preocupação, ensinamentos, confiança, conversas, risadas, por me ajudarem no trabalho de campo, nas burocracias e pelo auxílio na correção da tese. E ao Vicente pelas monitorias!

Ao Júlio por desenvolver o programa Comet Image Converter versão beta para a conversão de fotos do ensaio cometa.

À Pró-reitoria de Pós-graduação da Universidade de São Paulo pela concessão do auxílio para participação no 5th Setac World Congress em Sydney, Austrália, 2008.

À Dra. Sandra Freiberger Affonso pela ajuda nas análises em microscópio eletrônico de varredura e à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP.

Ao IOUSP por todas as facilidades oferecidas.

Aos amigos do laboratório Arthur, Fabio, Rosaria, Deca, Keyi, Carol Di Paolo, Thais Ribas, Natali, Carol Vignardi, Pri, Fabinho, Maysito e Divaldo

pelas conversas sérias, ajuda, amizade e por todos os momentos descontraídos.

Aos amigos: Caia, Cau, Mau, Betina, Déia, Paula, Du, Bica, Andrécito, Paulinha (Thaïs), Marquinhos, Ângelo, Zé Edu, Kenji, Newton, Cássia, Betinho, Pisetta, Xuxu, Ra, Lu, Luis, André, Éder, Iberê, Caio, Josie, Diego, Ana Cecília, Vinícius, Andrécito, Carol (loira), Fanny, Darien, Rodrigo, Michel, Frango, Pedro, Gabriel, Maria, Karen, Cíntia Maria, Pedro Raiz, João, Kika, Fausto, Rafa (Yellow), César, Ju, Letícia, Paulinho e especialmente ao Luciano. Por todo o apoio, amizade, torcida, pelos momentos descontraídos no IO, na Bio, nas baladinhas, por tudo! Muito obrigada gente! Adoro todos vocês!

Às amigas da velha guarda Cíntia cabeçuda, Cacá e minha hermanita Naty e sua família. Não tenho nem palavras pra vocês... pelas conversas, pela amizade de muitos anos e pela preocupação e torcida de vocês em todos os assuntos.

Ao pessoal da base de Ubatuba: Jonathan, Marcos, Fernando, Lincoln, Roberto, Messiana, Luciano, Márcio, Oziel, Manoel, Orlando, Daico, Vânia, Dona Cida, Beth, Celso e Letícia. Pelas conversas, ajuda, amizade e apoio psicológico.

Ao Seu Amaro e ao Jorge por sempre me incentivarem e ajudarem em diversos assuntos.

Aos amigos e funcionários do IO Cidinha, Dona Ruth, Edinho, Mayza, Marlene, Miriam, Samara, Marcelo, Edilson, Valter, Sandrinha, Arthur, Jurandir, Seu Nélson, Seu Pedro, Flávia, Wagner, Dona Rai, Cidinha, Claudinha, Sérgio (museu), Edna, Dona Cida, Sheila, Helcy, pela amizade, pelo bom humor de todos, simpatia e apoio. Em especial às minhas grandes amigas Mayza e Sandrinha.

Ao Santista David pelo bom humor e simpatia com que sempre perguntava: “Como vai o trabalho?”. Pela força e amizade.

Aos grandes e eternos amigos Santistas: Miranda, Cida, Pablo, Rodrigo e Andressa. Vocês foram e sempre serão muito importantes pra mim, nem tenho palavras mesmo!!! Tudo em minha vida não seria o mesmo sem vocês.

Aos amigos antárticos: Luluzinha, Andres, HB, Mari, William, Gabriel, Magno, Bia, Baixinho, Vagner e Comandante Parente. Pela amizade sincera.

À Thalita pelas viagens pela Europa e amizade... A Europa não teria a menor graça sem essa minha amiga. E aos amigos Evandro, Sheila, Tati, Ana Flávia, Cauré, Felipe, Paty, João e Silvia.

Aos docentes do IO: Márcia, Luz Amélia, Lucy, Thaïs, Paulo, Ceci, Patrícia, Turra, Mari, Rosa, Foca, Joseph, Michel, June e Vivian, pelo apoio, conversas e ensinamentos.

Agradeço especialmente ao Prof. Daniel Lemos pela ajuda com a determinação de proteínas totais, pela amizade, conselhos, conversas, confiança e pela oportunidade concedida de realizar a monitoria na disciplina de Aqüicultura junto ao IO.

À Didi e ao Betão pela simpatia e pelas comidinhas da lanchonete.

Aos meus pais pelo apoio incondicional, pela amizade, pelo amor, por entenderem minha ausência em muitos momentos, por tudo... A eles também dedico não só essa tese, mas todos os momentos de minha vida por sempre estarem ao meu lado mesmo que não fisicamente!

Ao meu irmão Thiago, a quem esta tese é dedicada, pelo seu apoio, incentivo incondicional, amor e pelas conversas. À Amanda e sua família pelo apoio e inúmeras conversas.

À toda a minha família: tios, tias, primos e primas, avó (em memória) e ao meu vô pela compreensão de minha ausência, pelo apoio e incentivo. Especialmente agradeço à Vanessa, André, Tia Terezinha, Geraldo, Andréia, Tio Zé, Aline e Amanda por se fazerem sempre muito presentes e pelo imenso carinho. Aos meus tios de Portugal que me acolheram sem nem me conhecer: José e Elza. E aos primos: Rui, João, José e Carlos e suas famílias, em especial à Suzana, André, Carmen e Sabrina.

Ao Mylo e Santini por me receberem sempre com alegria e bom humor.

Aos alunos da graduação pela descontração em alguns momentos, vocês são tantos que nem cabe citar!

Aos membros da banca examinadora pela leitura, sugestões e críticas.

E enfim... a todas as pequenas “pedras” que apareceram no decorrer desses 4 anos de doutorado. Esses empecilhos no meu caminho também contribuíram para minha formação como pesquisadora e processo de aprendizagem na escola da vida.

A você leitor!

Resumo

A exposição dos peixes a poluentes provoca danos nos organismos que podem ser identificados precocemente através de respostas biológicas. O presente estudo visou avaliar os efeitos do naftaleno e benzo(a)pireno em pampos da espécie *Trachinotus carolinus*. Foram avaliados os efeitos citogenotóxicos, histopatológicos e bioquímicos após exposições às concentrações de 0,9 µM; 2,7 µM e 8,1 µM de NAP e BAP por períodos de 12, 24, 48 e 96 horas. O NAP causa quebra no DNA de eritrócitos de pampos em concentrações de 8,1 µM e a partir de 12 horas de exposição. O BAP revelou ser genotóxico a partir da menor concentração e de 24 horas. A mutagenicidade de ambos os poluentes, avaliada através da indução de formação de micronúcleos e anormalidades nucleares eritrocitárias, também ocorre a partir de curtos períodos de exposição e freqüências de MN e ANE estão relacionadas com a duração da exposição. O período de exposição aos HPAs foi determinante na intensidade e severidade das lesões observadas nos tecidos dos peixes. A especificidade de CYP1A, observada segundo análise imunohistoquímica, ocorreu de maneira dose-dependente e evidenciada principalmente nos maiores períodos experimentais. Os poluentes orgânicos, nas condições experimentais utilizadas, não provocaram alteração significativa na atividade das enzimas catalase e GST da espécie. Os biomarcadores, citogenotóxicos e histopatológicos utilizados neste estudo, demonstraram ser ferramentas eficientes para aferir a toxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade de NAP e BAP como também sua relação dose-resposta na espécie *T. carolinus.*

Palavras-chave: benzo(a)pireno, catalase, CYP1A, genotoxicidade, glutationa-S-transferase, histopatologia, naftaleno, *Trachinotus carolinus*.

Abstract

Effects of exposure of fish to pollutants can be identified through stress responses. The present study aims to evaluate the effects of naphthalene and benzo(a)pyrene in Florida pompanos, *Trachinotus carolinus.* Evidences from citogenotoxical, histopathological and biochemical studies showed that alterations caused by exposures to 0.9 μM, 2.7 μM and 8.1 μM of NAP and BAP occurred within 12 to 96 hours. NAP at 8.1 μM induced erythrocyte DNA strand breaks in pompanos since early periods of exposure. Genotoxic effects of BAP at the lowest concentration were documented soon after 24 hours of exposure. Mutagenotoxicity of both pollutants, as seen by the induction of MN and ENA, was revealed since early periods and their frequencies are related to the duration of exposure. Exposures to these PAHs, for longer periods, resulted in increased frequency and severity of lesions observed in fish tissues. Specificity of CYP1A, observed through immunohistochemical analyses, was related to the dose of the pollutants and mainly at longer periods of exposure. These organic pollutants, under the experimental conditions, did not interfere with the activity of liver catalase and GST of the species. The citogenotoxic and histopathologic biomarkers used in this study proved to be efficient tools to ascertain the toxicity, genotoxicity and mutagenesis of NAP and BAP, as well as their dose related response, in the species *T. carolinus*.

Key words: benzo(a)pyrene, catalase, CYP1A, genotoxicity, glutathione-S-transferase, histopathology, naphthalene, *Trachinotus carolinus*.

ABREVIATURAS

ANE: anormalidades nucleares eritrocitárias

BAP: benzo(a)pireno

CAT: catalase

CDNB: 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno

CYP1A: citocromo P450 da família 1A

DMSO: dimetilsulfóxido

DNA: ácido desoxirribonucléico

DP: desvio padrão

EDTA: ácido etileno diaminotetra acético

GSH: glutationa reduzida

GST: glutationa-S-transferase

HE: hematoxilina e eosina

HPA: hidrocarboneto policíclico aromático

H-VOF: hematoxilina e VOF

L: anormalidade nuclear eritrocitária do tipo lobada

MN: micronúcleo

NADH: nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida

NAP: naftaleno

PAS: ácido periódico de schiff

PBS: tampão de fosfato de sódio

PMFS: fluoreto de fenilmetilsulfonil

R: anormalidade nuclear eritrocitária do tipo reniforme

S: anormalidade nuclear eritrocitária do tipo segmentada

H_2O_2: peróxido de hidrogênio

U: unidades

min: minuto

mg: miligrama

I. Introdução

Os oceanos cobrem aproximadamente 71% da superfície do planeta (LEVINTON, 2001) sendo suas áreas costeiras essenciais à vida marinha e à manutenção da biodiversidade, proporcionando locais de reprodução, desenvolvimento e crescimento para muitas espécies. Cerca de 65% das cidades com populações acima de 2,5 milhões de habitantes encontram-se na região costeira.

No ambiente marinho ocorre a contaminação causada por lançamentos de emissários submarinos, extração de petróleo, fluidos de perfuração, atividades portuárias ou de marinas, derramamentos acidentais de vários produtos químicos, etc. (PRÓSPERI; NASCIMENTO, 2006).

De acordo com a convenção das Nações Unidas sobre os Direitos do Mar a “poluição do meio marinho significa a introdução pelo homem, direta ou indiretamente, de substâncias ou de energia no ambiente, incluindo estuários, sempre que as mesmas provoquem ou possam vir a provocar efeitos nocivos, tais como, danos aos recursos vivos e à vida marinha, riscos à saúde do homem, entrave às atividades marítimas, incluindo a pesca e as outras utilizações legítimas do mar, alteração da qualidade da água do mar, no que se refere à sua utilização, e deterioração dos locais de recreio” (CALIXTO, 2000). A prevenção dos acidentes envolvendo contaminação dos ambientes aquáticos é essencial para a sobrevivência de todas as espécies, incluindo a humana.

O petróleo é um dos principais poluentes nos oceanos podendo existir várias formas para a sua introdução. As principais contribuições são de fontes terrestres, como efluentes municipais e industriais, além dos vazamentos acidentais provocados por navios, atividades de exploração em alto mar e

atividades de produção. Segundo NCR (1995), estima-se que o volume de óleo que atinge o ambiente marinho no mundo gira em torno de 3,25 milhões de toneladas por ano.

Os derramamentos de petróleo ocorrem principalmente nas regiões costeiras, biologicamente mais produtivas, ocasionando um sério impacto econômico nas atividades dessas regiões e na exploração dos recursos do mar. As áreas costeiras são fortemente afetadas já que o volume de água disponível para a diluição e degradação dos compostos poluentes é limitado. Deste modo, através da atividade antrópica e, principalmente, por atividades ambientalmente nocivas e projetos de desenvolvimento não-sustentáveis, a poluição das áreas costeiras ocorre em praticamente todos os continentes do planeta (BALSA, 1996). Estas regiões merecem especial atenção por serem áreas de alta produtividade biológica e por abrigarem estágios juvenis de muitas espécies além de serem economicamente importantes pela prática intensiva de aqüicultura em muitos países (GESAMP, 1993).

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) provêm principalmente dos processos de combustão, descartes resultantes da extração e destilação do petróleo, derrames de petróleo e derivados, aporte continental e efluentes domésticos e industriais (ATSDR, 1995; IRWIN et al., 1997; PACHECO; SANTOS, 2001). São compostos hidrofóbicos e sua persistência no meio ambiente é devida, principalmente, à sua baixa solubilidade em água e menor sensibilidade à foto-oxidação. Estes contaminantes ambientais e os resíduos domésticos e industriais são de preocupação mundial devido à sua persistência no meio ambiente e seu potencial mutagênico e carcinogênico (TELES et al., 2003).

O naftaleno, HPA mais simples, é freqüentemente encontrado no solo e nos ambientes aquáticos (IRWIN et al., 1997). Sua estrutura é composta por dois anéis de benzeno e possui baixo peso molecular. O naftaleno e os resíduos contendo naftaleno foram classificados como perigosos pela EPA (1988). O seu impacto em seres humanos e outros mamíferos foi extensivamente estudado desde a década de 80 (LINICK, 1983; KURZ, 1987; NTP, 1992; ORZALESI et al., 1994). Entretanto, um limitado número de

estudos foi conduzido para determinar a toxicidade do naftaleno em espécies aquáticas, principalmente peixes, entre estes os de Seaton e Tjeerdema (1996), Pacheco e Santos (2002), Ahmad e colaboradores (2003), Gesto e colaboradores (2006) e Santos e colaboradores (2006). O total de HPAs absorvidos por humanos com o consumo de peixes foi estimado em 268 ng/dia, entretanto, os efeitos de seu consumo são desconhecidos (DOMINGO et al., 2007a; 2007b

O benzo(a)pireno [B(a)P] é um HPA produto de combustão incompleta presente na fumaça de escapamento de motores a diesel, ar urbano, piche, asfalto e resíduos industriais e domésticos. Sua origem é principalmente pirogênica e sua presença em óleos é muito baixa (LEE; ANDERSON, 2005), entretanto, atinge os ecossistemas aquáticos principalmente através de deposição atmosférica. Esse HPA entra na natureza freqüentemente através de descargas de indústrias de aço, petroquímicas e incêndios florestais. É um HPA de alto peso molecular, com cinco anéis aromáticos. Trata-se de uma substância que pode ser metabolizada, por diversos organismos e as substâncias intermediárias, chamados metabólitos, conferem efeitos carcinogênicos em diversos órgãos e efeitos teratogênicos em animais experimentais (ANNAS et al., 2000).

Nas últimas décadas, as avaliações clássicas dos efeitos de substâncias químicas nos processos biológicos de organismos aquáticos têm se baseado em resultados de testes de toxicidade realizados em laboratório. A padronização destes testes forneceu um meio eficiente e de custo moderado para o monitoramento dos efeitos potencialmente adversos de algumas substâncias químicas (RAND; PETROCELLI, 1985).

A resposta biológica a agressões ambientais pode ser evidenciada em qualquer nível de organização, desde compartimentos subcelulares ou reações bioquímicas intracelulares, a células, sistemas fisiológicos, organismos, populações, comunidades e até ecossistemas (WALKER et al., 1997). Os efeitos dos contaminantes em peixes podem se manifestar em vários níveis de organização biológica, incluindo disfunções fisiológicas, alterações estruturais em órgãos e tecidos, além de modificações comportamentais que levam ao

prejuízo do crescimento e da reprodução (ADAMS et al., 1990). Estas respostas biológicas ao estresse, provocadas pelos poluentes, podem ser utilizadas para identificar sinais iniciais de danos aos organismos e são comumente denominadas biomarcadores.

Os poluentes atuam modificando as propriedades estruturais ou funcionais de moléculas essenciais às atividades celulares (NEWMAN, 1998). Portanto, a utilização de biomarcadores, em baixos níveis de organização molecular, podem servir como ferramentas sensíveis de aviso precoce para a mensuração de efeitos biológicos e no aferimento de qualidade ambiental (CAJARAVILLE et al., 2000).

Biomarcadores são definidos como respostas biológicas adaptativas a estressores, evidenciadas através de alterações bioquímicas, celulares, histológicas, fisiológicas ou comportamentais (DEPLEDGE, 1994; DEPLEDGE et al., 1993). Estes biomarcadores são excelentes ferramentas para avaliar a saúde do ecossistema aquático e têm sido incluídos em vários programas modernos de monitoramento ambiental de países desenvolvidos (WALKER et al., 1996).

Livingstone (1993) considera como biomarcadores os fluídos corpóreos, as células ou os tecidos que indicam, em termos bioquímicos ou celulares, a presença de contaminantes. Também são considerados biomarcadores as respostas fisiológicas, comportamentais ou energéticas dos organismos expostos. Existem assim biomarcadores moleculares, celulares ou sistêmicos, sendo alguns deles específicos para determinados poluentes.

Os biomarcadores podem ser classificados como de exposição, efeito ou suscetibilidade (NASCIMENTO et al., 2006). Um biomarcador de exposição é considerado como qualquer alteração biológica mensurável que evidencie a exposição dos organismos a um poluente. Alguns exemplos deste tipo de marcadores são as atividades de enzimas antioxidantes, a indução do citocromo P-4501A (CYP1A) e a alteração na taxa metabólica dos organismos.

Biomarcadores de efeito, em geral não são específicos em relação aos estressores e não fornecem informações sobre a sua natureza, mas são

característicos da ocorrência de um estresse que poderá ser reversível tão logo o estressor cesse sua atuação, como os danos causados ao DNA. São aqueles que evidenciam efeitos tóxicos associados à exposição do organismo ao poluente e induzem um mecanismo de defesa celular. Alguns desses biomarcadores são órgão-específicos como enzimas indicativas de respostas adaptativas a estressores.

Biomarcadores de suscetibilidade podem ser definidos como indicadores de processos que causam variações de respostas ao longo do tempo e entre exposição e efeito (BARRETT et al., 1997). Os organismos, mesmo da mesma espécie, não respondem igualmente à exposição a xenobióticos. Vários estudos comprovam que há significativas diferenças associadas a esses fatores nos sistemas enzimáticos de bioativação e detoxificação, levando à suscetibilidade ou à resistência.

Os agentes genotóxicos são aqueles que interagem com o DNA alterando a sua estrutura ou função, e quando essas alterações se fixam de forma a poderem ser transmitidas, denominam-se mutações. A genotoxicidade ocorre quando a exposição a um agente tóxico leva à alteração da estrutura ou do conteúdo de cromossomos (clastogenicidade) ou da seqüência de pares de bases do DNA (mutagenicidade). Dentre as diferentes técnicas usadas para detectar danos mutagênicos e genotóxicos, o teste de micronúcleos (MN) e das anormalidades nucleares associadas, assim como a eletroforese em gel de célula única, também chamada de ensaio cometa, estão sendo utilizadas com sucesso para estudar os efeitos de substâncias lançadas no ambiente.

Há vinte e cinco anos atrás, dois cientistas suecos – Östing e Johanson – desenvolveram um novo método de analisar o dano ao DNA para uso em pesquisa biológica, o qual importou a palavra cometa da astronomia para o seu nome (ÖSTLING; JOHANSON, 1984). Esta metáfora da astronomia é visualmente apropriada, pois o resultado da imagem obtida através desta técnica parece um cometa, com uma cabeça distinta constituída de partes maiores de DNA e uma cauda que contém fragmentos de DNA quebrados ou danificados.

O ensaio cometa, ou eletroforese em gel de célula única, foi originalmente desenvolvido por Ostling e Johason (1984) somente para avaliação de quebras de fitas duplas de DNA sob condições neutras. Singh e colaboradores (1988) modificaram este protocolo pela inclusão da etapa de desenrolamento do DNA e eletroforese sob condições alcalinas que detecta um amplo espectro de danos ao DNA como quebras nas fitas simples e duplas, sítios sensíveis a álcalis e sítios com reparação tardia. A maioria dos agentes genotóxicos induz quebras de fitas simples e sítios álcali-lábeis em magnitude muito maior do que as quebras de fitas duplas, portanto, a versão alcalina do ensaio oferece maior sensibilidade para identificar os agentes genotóxicos. Este método foi recomendado como versão ótima do ensaio cometa para identificação de agentes com atividade genotóxica no Workshop Internacional em Procedimentos para testes de Genotoxicidade (TICE et al., 2000).

Este ensaio é cada vez mais utilizado como um teste de genotoxicidade *in vitro* e *in vivo* para uma grande variedade de organismos (TICE, 1995). Em estudos *in vivo*, o ensaio cometa pode indicar efeitos genotóxicos em teleósteos pela exposição a substâncias de diferentes classes e mecanismos de ação. Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) destacam-se pela sua ubiqüidade no ambiente, associados a fontes difusas de poluição crônica, e pela intensidade dos efeitos que provocam. De um modo geral, HPAs apresentam efeitos genotóxicos relacionados a metabólitos formados no próprio organismo que sofreu exposição, em processo que envolve a indução de enzimas como o citocromo P450.

O ensaio cometa é utilizado como teste de genotoxicidade para o biomonitoramento de exposições ocupacionais e ambientais. Em estudos ambientais, este ensaio mostrou-se medida fidedigna de genotoxicidade no ambiente aquático, e sua aplicação foi bem sucedida em diferentes espécies de teleósteos (ANDRADE et al., 2004). Estudos em peixes apresentam a vantagem de estes organismos possuírem eritrócitos tanto imaturos quanto maduros nucleados, havendo grande facilidade de obtenção de suspensão celular numerosa e de qualidade com a coleta de pequena quantidade de sangue, não sendo necessário causar danos adicionais evidenciáveis aos indivíduos.

O teste de micronúcleos detecta pequenas massas de cromatina citoplasmática resultantes de quebras dos cromossomos durante a divisão celular ou de sua não incorporação ao núcleo da célula-filha. Essas massas de cromatina são transformadas em pequenos núcleos ou micronúcleos (KIRSCH-VOLDERS et al., 2000). Trabalhos atuais têm utilizado com sucesso organismos aquáticos em estudos citogenotóxicos através da observação de aberrações nos cromossomos e formação de micronúcleos ou anormalidades nucleares eritrocíticas (PACHECO; SANTOS, 1997; 2002; AYLLÓN; GARCIA-VASQUEZ, 2000; ANDRADE et al., 2004; CAMPOS, 2007; PHAN et al., 2007).

Apesar da exeqüibilidade dos ensaios cometa e do teste de micronúcleo, há poucos estudos utilizando essas técnicas para estudar poluição aquática no Brasil. Há trabalhos com micronúcleos de peixes de água doce (NEPOMUCENO et al., 1997; GRISOLIA; CORDEIRO, 2000; MATSUMOTO; COLUS, 2000; GRISOLIA; STARLING, 2001; PORTO et al., 2005; AMADO et al., 2006; HOSHINA et al., 2008), e poucos trabalhos com a aplicação do ensaio de cometa em peixes, sendo, entre eles, alguns em peixes de água doce (GONTIJO et al., 2003; BARRETO et al., 2007) e outros de água salgada (ANDRADE et al., 2004; AMADO et al., 2006).

As brânquias dos peixes desempenham papel fundamental para as trocas gasosas e regulação osmoiônica. Devido à sua estrutura, as brânquias fornecem uma ampla área superficial para o fluxo de oxigênio, gás carbônico, eletrólitos, água, amônia e íons hidrogênio entre o sangue do peixe e o meio externo (WINKALER et al., 2001). Este órgão atua como interface entre o animal e o meio ambiente e constitui o sítio de tomada e depuração de contaminantes e local onde a detoxificação e metabolismo desses agentes tóxicos pode ocorrer (STAGG et al., 1992). As brânquias dos peixes são o principal alvo de poluição aquática, pois estão continuamente expostas à água contaminada e estão, frequentemente, entre os primeiros órgãos a serem afetados por poluentes (HEATH, 1987).

Entre os diferentes biomarcadores, as análises histológicas de diferentes órgãos e tecidos podem indicar respostas biológicas a uma situação desfavorável porque, geralmente, a exposição prolongada dos organismos aos

agentes tóxicos não provoca morte rápida, mas afeta a estrutura e função dos órgãos vitais, causando danos ao indivíduo e à população (POLEKSIC; MITROVIC-TUTUNDZIC, 1994). As brânquias dos peixes são, geralmente, consideradas bons indicadores da qualidade da água sendo utilizadas em estudos de impacto ambiental (WINKALER et al., 2001; FANTA et al., 2003).

O fígado dos teleósteos é um órgão relativamente grande e possui tanto funções endócrinas como exócrinas, além de realizar conversões metabólicas (VAN DYK et al., 2007). Segundo Stehr e colaboradores (2003), diversos estudos demonstraram uma associação entre lesões hepáticas e exposição a contaminantes químicos. Muitas substâncias não apresentam toxicidade na sua forma original; entretanto, após serem metabolizadas no fígado, transformam-se em subprodutos altamente tóxicos. Dessa forma, o fígado pode sofrer sérias alterações histopatológicas em decorrência da exposição do peixe a algum xenobiótico (FANTA et al., 2003).

Uma grande variedade de alterações histopatológicas ocorre em peixes devido à exposição a contaminantes (HINTON; COUCH, 1984). Apesar de alterações morfológicas poderem ser também resultantes de parasitismo e doenças infecciosas, existem algumas lesões especificamente relacionadas com a contaminação por HPAs, particularmente no fígado (HINTON; LAUREN, 1990).

Trabalhos envolvendo histopatologia de diferentes órgãos de peixes expostos ao naftaleno, benzo(a)pireno ou outros hidrocarbonetos são principalmente realizados com espécies de água doce ou salobra (EL-SAYED et al., 1995; SPIES et al., 1996; DWIVEDI et al., 1997). Os trabalhos encontrados que analisam as alterações nos tecidos de peixes expostos a HPAs foram os de DiMichele e Taylor (1978), Black e colaboradores (1991), Spies e colaboradores (1996), Schirmer e colaboradores (1998), Ahmad e colaboradores (2003), Furia (2005) e Santos (2005).

Os termos histoquímica e citoquímica são usados geralmente, para indicar os métodos para a localização de diferentes substâncias nos cortes de tecidos. Os métodos histoquímicos e citoquímicos têm por base reações químicas, ou a interação macromolecular de alta afinidade. Nos dois casos, o

resultado final é, usualmente, a produção de compostos insolúveis, corados, ou elétron-densos, que possibilitam a localização de substâncias específicas nos cortes de tecidos através do uso do microscópio ótico ou eletrônico. Alterações morfológicas ou da localização e abundância de diversas substâncias em órgãos e tecidos de peixes expostos a HPAs podem indicar efeitos adversos em comparação com estruturas e composição bem conhecidas de peixes em situação de controle laboratorial ou habitantes de uma área ambiental não contaminada. Para o conhecimento da estrutura e composição de um tecido qualquer é essencial a utilização de diversas técnicas histoquímicas (SARASQUETE et al., 2001; ARELLANO et al., 2004).

Em vertebrados a exposição a diversos xenobióticos pode induzir a síntese de enzimas que são utilizadas para metabolizá-los (BLACK; COON, 1987; BUHLER; WILLIAMS, 1988). O sistema enzimático responsável pela maioria das reações de oxidação desses compostos está localizado no interior das células associado ao retículo endoplasmático liso. As enzimas P4501A estão entre as principais enzimas oxidativas induzidas em peixes por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) e hidrocarbonetos aromáticos polihalogenados (HAPHs) (STEGEMAN; HAHN, 1994). Há várias famílias do citocromo P450, das quais a 1, 2, 3 e 4 são importantes para os xenobióticos. É uma superfamília de sistemas enzimáticos ligados às membranas presentes no retículo endoplasmático liso de células que se localizam na fração microssomal obtida após homogeneização e centrifugação.

A família CYP1A é importante no metabolismo de hidrocarbonetos aromáticos e responde a níveis ambientais desses compostos de maneira dose-dependente sendo comumente utilizada em estudos de campo e laboratório como marcador de efeito e exposição a HPAs e HAPHs. Em muitos casos os tipos celulares que apresentam a indução da CYP1A são aparentemente similares em peixes expostos aos contaminantes em laboratório e no ambiente. Tais estudos sugerem que a indução da CYP1A pode ser usada para identificar tecidos-alvo de exposição aos poluentes (VAN VELD et al., 1997).

A localização imunohistoquímica do citocromo P4501A é de grande interesse para a compreensão dos processos patobiológicos. Sabe-se que a localização do P4501A difere entre as espécies. A indução da CYP1A pode ser avaliada imunoquimicamente pelo método de *western blot* ou análise imunohistoquímica de células específicas em secções histológicas de órgãos inteiros (LORENZANA et al., 1988; STEGEMAN et al., 1991; VAN VELD et al., 1992; ORTIZ-DELGADO et al., 2005) ou peixes inteiros (SMOLOWITZ et al., 1992).

O fígado é considerado o principal lugar de expressão de CYP1A em peixes, mas sua expressão e indução também têm sido observadas em outros tecidos (SARASQUETE; SEGNER, 2000) incluindo aqueles em contato direto com o ambiente, como as brânquias (MILLER et al., 1989). A relação de indução enzimática com o contaminante tem sido reportada em muitos órgãos extra-hepáticos, tecidos e células de peixes coletados de ambientes poluídos (STEGEMAN et al., 1991; HUSOY et al., 1996) assim como em peixes expostos a compostos químicos indutores de CYP1A em laboratório (SMOLOWITZ et al., 1991; HUSOY et al., 1994; LINDSTROM-SEPPA et al., 1994; GRINWIS et al., 2000; 2001; ARELLANO et al., 2001; ORTIZ-DELGADO et al., 2002; ORTIZ-DELGADO; SARASQUETE, 2004; ORTIZ-DELGADO et al., 2005).

Os peixes absorvem os contaminantes orgânicos lipofílicos como os HPAs a partir do ambiente e possuem uma variedade de mecanismos celulares para proteção contra os efeitos deletérios de tais compostos (PETERS et al., 1997; TELES et al., 2003). Entre estes mecanismos se pode citar a biotransformação, que converte certos xenobióticos em compostos intermediários, para serem excretados, que podem ser, muitas vezes, mais tóxicos ao organismo do que a molécula original. A biotransformação de xenobióticos ocorre em praticamente todos os tecidos animais, mas o tecido hepático é o que apresenta maior concentração do citocromo P450, sendo o principal responsável por esta função que é realizada por várias enzimas não específicas (COMPORTI, 1989).

Alterações bioquímicas oferecem vantagens distintas como biomarcadores por duas principais razões. Primeiro porque alterações bioquímicas ou moleculares são geralmente as primeiras respostas detectáveis e quantificáveis de mudança ambiental, incluindo alterações no ambiente químico. Segundo, alterações bioquímicas podem servir como marcadores de exposição e efeito. Uma alteração induzida em sistemas bioquímicos pode representar o efeito de um composto químico.

Alterações em sistemas bioquímicos são geralmente indicadores mais sensíveis do que aqueles em níveis mais altos de organização biológica (ADAMS et al., 1990). De fato, mudanças no nível molecular determinam os efeitos em níveis mais altos de organização. Dependendo da função dos sistemas afetados e natureza da resposta, perturbações bioquímicas podem indicar se efeitos adicionais (ao nível de órgãos ou individual) estão predispostos a acontecer. Uma sequência de reações sempre está envolvida na biotransformação de compostos exógenos. Alguns metabólitos de HPAs produzidos por CYP1A podem produzir espécies reativas de oxigênio e, consequentemente, estresse oxidativo (MEYER et al., 2003).

O primeiro passo da biotransformação, chamada fase I, é frequentemente um processo oxidativo no qual um grupo polar, como um grupo hidroxil, é introduzido. Essa reação é comumente catalisada pelo sistema de monoxigenase do citocromo P450. Reações subseqüentes envolvem uma segunda classe de reações catalisadas por enzimas conhecidas como fase II ou reações de conjugação (BUHLER; WILLIAMS, 1988). As enzimas de fase II servem para unir os metabólitos aos vários compostos endógenos solúveis em água presentes em alta concentração nas células. Essas reações geralmente resultam em aumento da solubilidade na água do metabólito e de sua taxa de eliminação, reduzindo a toxicidade do composto exógeno. Entre as enzimas mais extensivamente estudadas e talvez as mais importantes da fase II estão as glutationas transferases que ligam os metabólitos com a glutationa (COLES; KETERRER, 1990).

A catalase é um antioxidante que decompõe a moléucla de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) produzida nas células em oxigênio e água. Faz parte do

mecanismo de defesa antioxidante na fase I de biotransformação dos animais quando expostos a contaminantes orgânicos e metais pesados, ou pode ser ativada quando a concentração de H_2O_2 for alta (SIES, 1991).

As reações na fase II envolvem a biossíntese do xenobiótico e sua ligação com algum componente do tecido normal ou substrato endógeno. Um mecanismo comum de proteção contra os xenobióticos eletrofílicos biotransformados é a conjugação com a glutationa (GSH) na fase II de desintoxicação. Esta reação é catalisada pela glutationa-S-transferase (GST) e é responsável por uma das vias primárias de desintoxicação de HPAs (MITCHELL et al., 2000). Como as enzimas da fase II de biotransformação são geralmente induzidas nos organismos aquáticos, se tem sugerido que sua atividade pode ser um índice utilizado para avaliar a exposição a compostos orgânicos (GALLAGHER et al., 2001).

As glutationas transferases (GST) representam uma importante família de enzimas denominadas por seu papel como catalisadoras na conjugação de vários compostos eletrofílicos com a glutationa tripeptídica. Essas proteínas desempenham papel adicional no processo de detoxificação. As GSTs solúveis aumentam a disponibilidade de compostos tóxicos lipofílicos para enzimas de fase I servindo como transportadoras de proteínas. Tanto em mamíferos (COLES; KETERRER, 1990) como em peixes (VARNASI et al., 1981) a susceptibilidade a diferentes espécies de compostos químicos carcinogênicos pode ser modulada pela atividade de GST.

O fígado é a principal fonte de GST nos vertebrados. Nos fígados de peixes, parece que a GST representa uma grande parte das proteínas solúveis (NIMMO, 1987). As várias isoenzimas exibem ampla e alta especificidade de substrato. Todas as formas identificadas atualmente aparentam ser ativadas pela substância 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB). Por isso o CDNB é geralmente utilizado como substrato de escolha quando a atividade total de GST está sendo mensurada.

O conceito de biomarcador foi desenvolvido para aperfeiçoar a estimativa de exposição e permitir uma avaliação mais exata dos impactos causados por exposições crônicas ou agudas aos poluentes (PEAKALL, 1992).

O monitoramento do impacto dos poluentes na biota é um instrumento de suma importância nos dias atuais, uma vez que a cada dia novos poluentes, e em quantidades cada vez maiores, são introduzidos no ecossistema que pode sofrer com a perda das suas características ambientais (JORGE, 2003).

As espécies utilizadas nos estudos de avaliação de risco devem ser sensíveis, ecologicamente significativas, amplamente distribuídas, preferencialmente de importância econômica, disponíveis durante o ano todo e ter ciclo biológico curto, e as condições de ensaio devem ser representativas do ambiente aquático (USEPA, 1987).

O teleósteo utilizado neste estudo, o pampo, da espécie *Trachinotus carolinus*, foi selecionado por ser um habitante típico e abundante da zona de arrebentação na fase juvenil, e pode ser diretamente afetado por poluentes. Além disso, são peixes com grande potencial econômico, muito apreciados para o consumo e a pesca esportiva, encontrando, também, aplicação na aqüicultura (LAZO et al., 1998; HOOSE; MOORE, 1992).

Na natureza os juvenis de pampos aparentam ser predadores oportunistas, alimentando-se principalmente de invertebrados como pequenos mariscos, anfípodas, poliquetas e camarões, assim como pequenos peixes (BERRY; IVERSEN, 1966; BELLINGER; AVAULT, 1971). Quando adultos indivíduos da espécie *T. carolinus* podem atingir um comprimento total de até 64 cm e pesar até 3,76 Kg. Os adultos migram para águas profundas o que pode acarretar uma transferência de poluentes para outros organismos na cadeia alimentar oceânica.

Muito pouco se conhece sobre a estrutura de tecidos e respostas biológicas a estressores ambientais em peixes da espécie *T. carolinus*. Entre os poucos trabalhos realizados com a espécie para avaliação de efeitos de contaminantes, destacam-se os realizados no mesmo laboratório deste estudo nos quais foram estudadas as respostas bioenergéticas e histológicas após exposições a HPAs (FURIA, 2005; SANTOS, 2005; SANTOS et al., 2006) e o estudo do desempenho de natação de pampos expostos ao etileno glicol, realizado por Hymel e colaboradores (2002).

II. Objetivos

Avaliar os efeitos provocados pela exposição, às diferentes concentrações e tempos de exposição, do naftaleno e benzo(a)pireno em peixes da espécie *Trachinotus carolinus*, através de estudos citogenotóxicos, histopatológicos e bioquímicos.

Objetivos específicos:

- Determinar a genotoxicidade dos compostos orgânicos através da quebra nas fitas duplas, simples e sítios álcali-lábeis no DNA dos peixes;
- Avaliar o potencial mutagênico dos poluentes nos peixes através do estudo da formação de anormalidades nucleares eritrocitárias e micronúcleos;
- Determinar as alterações histopatológicas provocadas nos tecidos de brânquias e fígados dos peixes;
- Avaliar as alterações e localizações de substâncias específicas e do antígeno para o citocromo CYP1A nos tecidos e diferentes tipos celulares de brânquias e fígados dos indivíduos;
- Avaliar a alteração na atividade das enzimas catalase e glutationa-*S*-transferase, participantes do processo de detoxificação de fase I e fase II, no fígado dos pampos.

III. Material e métodos

III.1. Espécie estudada

Os indivíduos utilizados neste estudo foram os da espécie *Trachinotus carolinus* (Figura 1) (LINNAEUS, 1766), popularmente conhecidos como pampo-verdadeiro, pampo ou palometa no Brasil. Esta espécie é característica de regiões subtropicais sendo sua distribuição do Atlântico Oeste a partir de Massachusetts nos Estados Unidos, até a costa das Américas Central e do Sul (HOESE; MOORE, 1977).

Esta espécie foi selecionada por ser um habitante abundante, na fase juvenil, da zona de arrebentação da região da Enseada do Flamengo em Ubatuba (MACIEL, 1995). Giannini (1994) verificou que na região de Ubatuba as cinco espécies de teleósteos mais abundantes encontradas foram *Umbrina coroides, Atherinela brasiliensis, Trachinotus carolinus*, *Anchoa tricolor* e *Trachinotus falcatus,* sendo que as três primeiras mostraram-se também as mais freqüentes.

T. carolinus são encontrados em águas rasas de praias arenosas, com ação das ondas e processos de mistura intensos (MACIEL, 1995). Têm um comportamento extremamente ativo, nadando em altas velocidades. Possuem alta taxa de sobrevivência em cativeiro, são de fácil manuseio e aceitam prontamente alimentos formulados se mostrando, portanto, espécie ideal para manutenção em cativeiro (JORY et al., 1985).

III.2. Coleta dos animais

As coletas foram realizadas nas praias do Lázaro e Enseada em Ubatuba, durante os meses de outono de 2006. Estas praias foram escolhidas por se localizarem próximas às instalações da base norte de pesquisa do

IOUSP e pela abundância de pampos em suas zonas de arrebentação. A proximidade permitia um rápido transporte dos organismos, minimizando o estresse.

Arrastos foram efetuados paralelamente à linha de costa numa profundidade inferior a 1,0 m. Foi utilizada uma rede do tipo picaré com malhagem de 15 mm nas bordas e 10 mm no centro, nó a nó, a fim de se obter juvenis da espécie. Imediatamente após a captura, os peixes eram selecionados através de uma triagem visual para separar os indivíduos da espécie *T. carolinus.* Os indivíduos coletados foram identificados para confirmação da espécie (MENEZES; FIGUEIREDO, 1980) e aqueles não correspondentes foram devolvidos ao seu ambiente natural. Os pampos coletados foram colocados em tanques de cinqüenta litros com água da mesma área de coleta, aerada através de aeradores a pilha portáteis, e em seguida transportados até a base de pesquisa "Clarimundo de Jesus" do IOUSP, em Ubatuba.

III.3. Manutenção dos animais

Na base do IOUSP, os animais coletados foram transferidos para tanques de 500 litros, localizados dentro de galpões vinílicos, com aeração, higienização e renovação diária de água. Juvenis de pampos da espécie *T. carolinus,* com comprimento médio de 58,35 ± 18,00 mm e peso médio de 2,75 ± 3,00 g foram utilizados na avaliação dos efeitos da exposição ao naftaleno e ao benzo(a)pireno, através dos biomarcadores de efeito e exposição selecionados.

A água do mar utilizada para a manutenção foi filtrada em filtros de um micrômetro (1 μm). Medições da temperatura da água, pH e salinidade foram realizadas diariamente. Para redução do estresse de captura e aclimatação às condições de cativeiro os indivíduos permaneceram nos galpões por pelo menos cinco dias antes do início dos experimentos. Durante este período os animais foram alimentados com ração comercial de camarão, de composição 45% proteica, conforme as necessidades do gênero (HEILMAN; SPIELER, 1999).

III.4. Exposição aos poluentes

Os indivíduos mais saudáveis, apresentando coloração normal e nadadeiras intactas foram transferidos para o interior do laboratório com temperatura controlada, para aclimatação às condições experimentais por pelo menos cinco dias, antes do início dos testes. A temperatura foi mantida a 23 ± 2ºC e salinidade 35 durante todo o procedimento experimental. Estes valores foram escolhidos por estarem dentro do intervalo no qual a espécie é encontrada.

Todos os testes foram realizados em aquários de vidro de 40 litros, de forma a garantir 7 litros de água por peixe. Aeração artificial foi mantida fraca e constante durante todo o período de exposição.

Grupos de cinco indivíduos cada foram expostos a três concentrações subletais de benzo(a)pireno (BAP) e de naftaleno (NAP) e um grupo controle em água limpa. Os poluentes naftaleno e benzo(a)pireno foram pesados conforme a concentração a ser utilizada em cada aquário e em seguida dissolvidos em 0,5 mL de solução de dimetil sulfóxido (DMSO). Neste trabalho, outro grupo controle de exposição dos peixes ao DMSO foi utilizado para caracterização dos seus efeitos nos peixes. O DMSO, à 0,001%, foi utilizado como solvente devido à insolubilidade dos poluentes em água do mar. Não são identificados efeitos tóxicos ou citogenéticos em peixes decorrentes da exposição ao DMSO, conforme os estudos realizados por Gravato e Santos (2002a), Pacheco e Santos (2002) e Teles e colaboradores (2003).

As concentrações utilizadas foram de 0,9 µM, 2,7 µM e 8,1 µM de ambos os poluentes. Estas concentrações foram selecionadas com base no estudo realizado por Gravato e Santos (2002a) em ensaios de toxicidade em peixes. Os animais permaneceram expostos aos poluentes por períodos de 12, 24, 48 e 96 horas. Devido à utilização de poluentes orgânicos altamente tóxicos e voláteis, foram empregados curtos períodos de exposição. Nos experimentos com duração de 96 horas a água dos aquários foi trocada e o poluente reposto após 48 horas. Após as exposições, os resíduos químicos e a água utilizada nos aquários foram devidamente descartados na fossa séptica construída para esta finalidade na base do Instituto Oceanográfico em Ubatuba.

A tabela 1 resume as condições experimentais utilizadas e o número de peixes por grupo.

III.5. Coleta de material biológico

Após as exposições aos HPAs o sangue dos animais ainda vivos foi imediatamente coletado por punção cardíaca ou através do ducto de Cuvier, vaso formado pela fusão das veias cardinais anteriores e posteriores e que por sua vez desemboca no seio venoso. Foram utilizadas agulhas e seringas de insulina de 0,5 mL de volume. Não foi utilizado anestésico para que os tecidos branquiais permanecessem inalterados para a análise histológica.

Com o sangue coletado foram feitas duas lâminas de esfregaço por peixe e 10 µL de sangue foi diluído em tampão fosfato conforme descrito na metodologia a seguir para realização do ensaio cometa. Após preparadas, todas as lâminas foram guardadas e levadas para análise em São Paulo. Os indivíduos foram posteriormente espinhalados com conseqüente ruptura do sistema nervoso central e submetidos à biometria, através das medidas de peso total (g) e comprimento total (cm).

Após a biometria, todos os animais tiveram os tecidos do fígado e brânquias coletados e preservados para a realização de análises enzimáticas ou histológicas. Todos os tecidos retirados e a sua forma de preservação encontram-se detalhados na tabela 2 e descritos a seguir.

III.6. Biomarcadores citogenotóxicos: ensaio cometa e estudo de micronúcleos e anormalidades nucleares eritrocitárias

III.6.1. Ensaio cometa

O ensaio cometa foi realizado conforme descrito por Singh e colaboradores (1988). Foi utilizado um protocolo baseado nos de Tice e colaboradores (2000), com as modificações recomendadas por Gontijo e Tice (2003). Anteriormente ao estudo dos organismos expostos aos poluentes, foi realizada uma adequação da metodologia para a suspensão celular da espécie utilizada.

III.6.1.1. Preparação das lâminas para o ensaio cometa

Dez microlitros de sangue foram diluídos em tampão fosfato salino (PBS, pH 7.4) na proporção de 1:1000 e refrigerados, obtendo-se a suspensão celular eritrocitária de cada indivíduo.

Durante os procedimentos de manipulação do material celular, a iluminação natural e de lâmpadas fluorescentes foram evitadas para que não houvesse a radiação de ondas de comprimento ultra-violeta, reconhecidamente genotóxica. Quando necessário, foram utilizadas lâmpadas de luz amarela.

A temperatura do laboratório foi mantida em 20 a 25°C. Toda a suspensão celular foi mantida resfriada a 4 ou 5°C na geladeira, ou sobre gelo durante a manipulação do material. As diferentes soluções utilizadas no procedimento também foram mantidas a 4°C para evitar o descolamento do gel de agarose da lâmina de vidro.

Lâminas de vidro lisas de extremidade fosca foram deixadas por no mínimo duas horas em solução de extran 10% e devidamente limpas com esponja macia, lavadas com água de torneira e água destilada em abundância. Foram então imersas em álcool etílico por alguns minutos e secas com lenços de papel.

Agarose de ponto de fusão normal (Sigma) em solução aquosa 1,5% foi utilizada para preparar a primeira camada de gel e aplicada nas lâminas. A primeira camada é necessária, pois atua como base para melhor adesão da segunda camada nas lâminas, que contém o material celular. Como esta agarose apresenta gelificação total por volta de 37°C, esta solução foi mantida em banho-maria a 60°C.

Para fazer a primeira camada, cada lâmina foi mantida sobre chapa metálica com moderado aquecimento. Alíquotas de 200 µL de agarose foram colocadas sobre cada lâmina e espalhadas ao longo desta com auxílio de outra lâmina de vidro lapidada, formando uma fina camada, como um esfregaço. As lâminas foram deixadas secando sobre superfície plana e horizontal, em temperatura ambiente por pelo menos 12 horas.

Para a composição da solução de segunda camada, 20 µL da suspensão de células sanguíneas foram adicionados em 120 µL de gel de 1%

de agarose de baixo ponto de fusão (Sigma) diluída em PBS. Esta suspensão permanece líquida até cerca de 36°C. Alíquotas de 120 µL, de células sanguíneas em gel, foram espalhadas sobre lâmina contendo a primeira camada através do seu recobrimento com lamínula de vidro de dimensões de 24x60 mm. Duas lâminas foram confeccionadas por peixe. Após a gelificação, cerca de 20 minutos a 4°C, a lamínula foi retirada.

III.6.1.2. Adequação das condições de eletroforese do ensaio cometa às células sanguíneas de pampos

Foram realizados testes com 3 pampos recém-coletados para adequação da metodologia do ensaio cometa.

O peróxido de hidrogênio, que é mais comumente conhecido como solução de água oxigenada, H_2O_2, foi escolhido como substância genotóxica por ser utilizado como substância padrão em experimentos *in vitro*. Também é rotineiramente utilizado em nosso laboratório com essa finalidade.

O peróxido de hidrogênio foi diluído em PBS até concentrações de 5, 10, 20 e 40 µM a partir de solução de peróxido de hidrogênio 30% (Merck). A exposição das células ao peróxido foi feita nas células já incluídas em agarose da segunda camada, diretamente sobre as lâminas de vidro a serem submetidas à eletroforese, metodologia adaptada de Wojewódzka e colaboradores (2002). Cada lâmina recebeu quantidade suficiente de peróxido para cobrir toda a sua superfície e a incubação ocorreu no escuro, em temperatura de 4ºC. Cada grupo de lâminas de mesma concentração de peróxido ficou isolada das demais concentrações para não haver contaminação. Após 30 minutos de exposição, as lâminas foram lavadas por três vezes com PBS em abundância.

Em seguida as lâminas passaram pelas etapas de rompimento das membranas celulares e desenrolamento do DNA e foram então submetidas à eletroforese. As condições de eletroforese para adaptação às células utilizadas foram definidas de forma a ser utilizado 450 mL de tampão alcalino, o suficiente para cobrir por completo todo o material. Foram testados 0,72; 0,80 e 0,88 volts por centímetro, correspondendo a 18, 20 e 22 V na cuba utilizada, e

amperagem de 190, 220 e 240 mA respectivamente. O tempo de corrida de eletroforese foi sempre de 20 minutos.

As amostras dos animais expostos aos poluentes e seus controles não passaram por esta etapa de exposição ao peróxido de hidrogênio, sendo que após a preparação da segunda camada com a suspensão celular, as lâminas foram imediatamente para a etapa de *lise* descrita abaixo.

III.6.1.3. *Lise*

Com o emprego de uma solução de alta concentração de sais, denominada solução de *lise*, as membranas das células, núcleo e organelas foram rompidas; os componentes citoplasmáticos e proteínas nucleares foram dissolvidos e retirados. As lâminas foram dispostas em cubeta vertical e cobertas com solução de *lise* (NaCl 2,5 M, Na_2EDTA 100 mM, Tris 10 mM, pH 10; Triton X-100 e DMSO 10% adicionados logo antes do uso) na qual permaneceram imersas por duas horas, em temperatura de 4°C. Ao término, as lâminas foram retiradas da solução e deixadas escorrendo por um minuto em papel toalha para retirada do excesso de solução. Em seguida, lavadas com água destilada para completa remoção da solução de *lise* e dos componentes celulares indesejáveis para a realização do ensaio.

III.6.1.4. Desenrolamento do DNA

Após a *lise* as lâminas foram dispostas na cuba de eletroforese, imersas por 10 minutos em solução alcalina (NaOH 300 mM, EDTA 1 mM, pH > 13), refrigerada a 4°C e recém-preparada para o desenrolamento, ou relaxamento, do DNA.

III.6.1.5. Eletroforese

As condições de eletroforese foram estabelecidas em voltagem e amperagem de 0,80 V/cm e 240 mA, durante 20 minutos. A eletroforese foi realizada sob corrente elétrica em cuba de acrílico com 25 cm de distância entre os eletrodos. A partir do núcleo, fragmentos de DNA migram no sentido

do anodo; quanto mais intensa for a quebra, menor será o tamanho dos fragmentos e maior a extensão da migração.

III.6.1.6. Neutralização

Ao término da eletroforese as lâminas foram cuidadosamente retiradas da cuba e dispostas em uma bandeja forrada com papel absorvente para que a solução de eletroforese escorresse por cerca de um minuto. A neutralização das lâminas foi feita em seguida com tampão neutro (Tris 0,4 M, pH 7.5), no qual o material foi imerso por 15 minutos de forma a recobrir todo o gel da lâmina. Este procedimento foi realizado por mais duas vezes durante 5 minutos cada. Ao final as lâminas foram imersas em solução de etanol 100% a 4°C e deixadas secar ao ar em temperatura ambiente por duas horas.

III.6.1.7. Coloração por prata

Para a coloração do material genético, foi utilizado o protocolo descrito por García e colaboradores (2004). As lâminas foram banhadas em solução de fixação (ácido tricloroacético 15%, sulfato de zinco heptahidratado 5%, glicerol 5%) durante 10 minutos, lavadas por três vezes com água destilada a 4ºC e colocadas para secar em temperatura ambiente por pelo menos 10 horas.

As lâminas foram hidratadas por imersão em cubeta com água destilada por 5 minutos a 37°C. A solução de trabalho de coloração, preparada imediatamente antes do uso, foi obtida misturando-se duas soluções estoque pré-aquecidas por cerca de 10 minutos em banho-maria a 37°C. A alíquota de 34 mL de solução de carbonato de sódio 5% foi vigorosamente agitada e misturada a 66 mL de solução de nitrato de prata (nitrato de amônio 0,1%, nitrato de prata 0,1%, ácido tungstosílico 0,25%, formaldeído 0,15%). As lâminas foram imediatamente cobertas pela solução de coloração, e mantidas em banho-maria a 37°C, ao abrigo da luz, por cerca de 5 minutos. Em seguida, foram observadas em microscópio até que os cometas se apresentassem corados. Assim que coradas, as lâminas eram colocadas em água destilada a 4°C durante 1 minuto para retirar o excesso de solução de coloração.

Para a interrupção da coloração e obtenção de lâminas permanentes as mesmas foram colocadas em cubetas verticais com solução de ácido acético 1% por 5 minutos, lavadas por três vezes durante 1 minuto com água destilada a 4°C e deixadas secar em temperatura ambiente por pelo menos 24 horas.

III.6.1.8. Análise dos cometas

Foram confeccionadas 30 lâminas de cada indivíduo utilizado no teste da adaptação do ensaio cometa. Para a análise dos cometas dos peixes dos testes de adaptação de metodologia, grupos controle e dos expostos aos poluentes, foram fotografados 100 cometas por lâmina. Os cometas foram fotografados em aumento de 20X em nove regiões distintas da lâmina. Foram evitadas análises nas regiões próximas à margem das lâminas ou cometas junto a bolhas de ar, por serem regiões onde a migração dos fragmentos de DNA durante a eletroforese pode ocorrer de maneira irregular.

Para a análise de imagem as fotografias foram convertidas em formato bitmap, resolução de 8 bit, e a imagem positiva foi invertida para negativa (Figura 2). Este procedimento foi realizado com auxílio do programa Comet Image Converter versão beta, especialmente desenvolvido para esta finalidade. Todas as conversões e alterações realizadas nas fotografias foram necessárias, pois o programa utilizado para a análise de imagem foi desenvolvido para corantes fluorescentes e não permite a análise de fotografias registradas com fundo branco, como as lâminas coradas por prata.

Os cometas foram analisados através do programa de análise de imagem CometScore™ versão 1.5, domínio público, desenvolvido pela TriTek Corporation, para o ensaio cometa, obtido no sítio http://autocomet.com.

Foram obtidas medidas de porcentagem de DNA na cauda e o momento de cauda, expressando esta última o produto do comprimento e da porcentagem de DNA na cauda.

III.6.2. Observação de micronúcleos e de outras anormalidades eritrocitárias

O sangue retirado dos peixes foi espalhado sobre uma lâmina de vidro lisa limpa, com o auxílio de uma lamínula, para obtenção de esfregaços

sangüíneos. As lâminas foram imersas em metanol absoluto por 10 minutos para fixação das células e secas ao ar. Posteriormente as células foram coradas com solução de Giemsa 10% em água destilada por 40 minutos. Para a análise, as lâminas foram codificadas, analisadas aleatoriamente e documentadas sob fotomicroscópio, com um aumento de 1000X. As informações sobre a morfologia nuclear foram identificadas de acordo com a descrição feita por Carrasco e colaboradores (1990) e utilizado por Pacheco e Santos (1997) e Campos (2007). O micronúcleo (MN), que dá nome à técnica, apresenta-se como um pequeno corpo não refringente, de cor e forma semelhante ao do núcleo principal, porém com diâmetro entre 1/16 e 1/3 do mesmo. As outras anormalidades nucleares eritrocitárias (ANE) foram denominadas: Reniforme (R), por apresentar a forma semelhante a um rim; Lobado (L), no qual o núcleo é dividido em lobos e Segmentado (S), que apresenta o núcleo separado por uma constrição, em partes não necessariamente do mesmo tamanho (Figura 3). Foram examinados 1000 eritrócitos em cada lâmina e calculadas as freqüências (‰) de micronúcleos e de anormalidades nucleares encontradas nos diferentes grupos e períodos experimentais.

III.7. Biomarcadores histopatológicos: Análises histopatológicas, histoquímicas, imunohistoquímicas e ultramorfologia

III.7.1. Preparação das lâminas

Os primeiros arcos branquiais esquerdos e um segmento do fígado de cada peixe foram fixados em formol diluído em tampão fosfato salino 0,1 M, pH 7.4 por um período de 24 horas. O material foi desidratado em concentrações crescentes de solução de etanol. Os tecidos foram incluídos em parafina e cortados em secções de 4 µm em Micrótomo Leica RM 2025. As secções foram colocadas sobre lâminas histológicas de vidro recobertas com solução de polilisina para as análises histopatológicas e histoquímicas. Para a realização das diferentes técnicas, as lâminas foram desparafinadas no aparelho de auto-coloração Autostainer XL por aquecimento a 60ºC durante 10 minutos, seguido de um banho em xilol, dois banhos em álcool, um banho em

água destilada e imediatamente coradas. Duas lâminas desparafinadas dos tecidos de cada peixe foram utilizadas em cada uma das diferentes técnicas descritas abaixo. Estes procedimentos foram executados no estágio de doutoramento sanduíche, no exterior, realizado no *Instituto de Ciencias Marinas de Andalucía* (ICMAN), na Espanha. Após as colorações, todas as lâminas foram desidratadas no mesmo aparelho sendo banhadas em água destilada, concentrações crescentes de álcool e diafanizadas em xilol. Para o preparo de lâminas permanentes, estas foram cobertas com a solução Eukit® (Sigma) e lamínulas de vidro.

III.7.2. Técnicas histopatológicas

A ocorrência, freqüência, de células coradas ou com reação positiva às diferentes técnicas histopatológicas e imunohistoquímicas empregadas foi registrada utilizando o seguinte código: "-" nenhuma célula corada, "+" escassas células coradas, "++" coloração multifocal, "+++" excessivo número de células coradas e "++++" praticamente todas as células coradas. A intensidade de coloração nas células ou tecidos foi registrada como "+/–" para células levemente coradas, "+" células fracamente coradas, "++" células moderadamente coradas, "+++" células fortemente coradas e "++++" para células intensivamente coradas.

As análises foram registradas utilizando o código ocorrência/intensidade. Para representação gráfica dos dados, os códigos acima foram substituídos por valores de 1 a 4 para a freqüência e por valores de 1 a 5 para intensidade de coloração.

III.7.2.1. Hematoxilina–Eosina e Hematoxilina–VOF

Duas lâminas de cada peixe, com ambos os tecidos de brânquia e fígado incluídos no mesmo bloco de parafina, foram coradas com hematoxilina e eosina (HE) e hematoxilina-VOF (H-VOF) (GUTIÉRREZ, 1967). Esta técnica foi empregada para estudos morfológicos e de identificação de patologias nos tecidos, conforme descrito por Arellano e colaboradores (2004).

A técnica de hematoxilina-eosina consiste na coloração dos tecidos desparafinados por 5 minutos com o corante hematoxilina de Harris em solução aquosa seguido do corante eosina durante 7 minutos. A técnica hematoxilina-VOF consiste da coloração dos cortes também por 5 minutos em solução aquosa de hematoxilina de Harris seguido de coloração por 6 minutos no corante VOF. O corante VOF foi preparado com a utilização das substâncias *fast Green* 0,1%*, metyl blue* 0,02%*, Orange G* 0,14%*,* fucsina ácida 0,2%, ácido fosfotúngstico 0,5%, ácido acético glacial 1% e etanol absoluto 65% em água destilada. Esta coloração bem contrastada confere boa nitidez às lâminas permitindo identificar com facilidade alterações morfológicas e patológicas quando comparadas à coloração HE.

III.7.3. Técnicas histoquímicas

Técnicas de histoquímica foram selecionadas para observação das alterações nas freqüências e intensidades de coloração de diferentes substâncias presentes nos tecidos.

III.7.3.1. Azul de bromofenol

Para determinação de proteínas inespecíficas nas células dos tecidos, as lâminas desparafinadas foram coradas com solução de azul de bromofenol, à temperatura ambiente, durante 15 minutos. Em seguida, as mesmas foram lavadas em solução aquosa de ácido acético 2%, por 5 minutos e em água destilada por mais 5 minutos, desidratadas e recobertas por lamínula de vidro.

III.7.3.2. Azul de alcian pH 0.5, 1.0 e 2.5

Para a evidenciação de mucosubstâncias ácidas foi utilizada a coloração azul de alcian em pH 2.5. Além da determinação específica de mucopolissacarídeos ácidos carboxilados revelada pelo pH 2.5, também foram utilizados o pH 0.5, que cora de azul os mucopolissacarídeos sulfatados fortemente ionizados e pH 1.0 para mucopolissacarídeos pouco ionizados.

Os cortes foram banhados inicialmente em tampão apropriado conforme o pH da coloração durante 5 minutos. Em seguida duas lâminas de cada peixe permaneceram em solução de azul de alcian nos pHs 0.5, 1.0 e 2.5 por 20 minutos, foram secas em papel de filtro, desidratadas e recobertas por lamínula.

III.7.3.3. PAS e Carmim *the best*

A técnica do PAS (Ácido periódico de Schiff) é utilizada para evidenciar glicoconjugados neutros com agrupamentos 1,2 glicol e glicoconjugados ácidos (JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 1983). Portanto, foi estudada a freqüência e intensidade de coloração de glicoproteínas, dos tipos acima citados, presentes principalmente nas células mucosas dos tecidos branquiais e no citoplasma de hepatócitos. As lâminas foram oxidadas com ácido periódico 0,5% durante 15 minutos, lavadas em água de torneira e água destilada. No escuro foram tratadas com o reativo de Schiff durante 30 minutos a 4ºC. Em seguida, as lâminas foram lavadas em água corrente durante 10 minutos, lavadas com água destilada por 20 segundos, desidratadas e recobertas por lamínula.

Além da técnica de PAS também foi utilizada a coloração Carmin *the Best* (MARTOJA; MARTOJA-PIERSON, 1970) para coloração do glicogênio do citoplasma dos hepatócitos. Apesar de sua especificidade não ser total, pois cora o galactógeno e às vezes as mucinas, e não ser um método sensível, suas preparações são notavelmente sugestivas e bem contrastadas. As lâminas foram coradas com solução de hemalumbre (fórmula de Masson) durante 3 minutos e lavadas com água corrente em abundância. Em seguida foram coradas com a solução de Carmim, durante 5 minutos, e diferenciadas com solução composta de álcool metílico, álcool etílico absoluto e água destilada. Em seguida, as lâminas foram desidratadas diretamente em álcool absoluto por tempo prolongado, sendo seguido o procedimento padrão de desidratação e confecção de lâminas permanentes.

III.7.4. Análise imunohistoquímica de atividade do citocromo CYP1A

A técnica de imunohistoquímica foi empregada para a detecção de antígenos através da aplicação direta do anticorpo específico do citocromo

CYP1A sobre as lâminas histológicas. Em imunocitoquímica o anticorpo que reage com o antígeno é um anticorpo primário.

Para a análise imunohistoquímica, as secções de tecidos foram tratadas com H_2O_2 3% em água mili-Q durante 15 minutos em temperatura ambiente para bloquear as peroxidases endógenas (POLAK; VAN NOORDEN, 1983). As lâminas foram saturadas com solução tamponada de fosfato (PBS) pH 7.4 e Triton X-100 (T). A seguir foram imersas em albumina 3% por 30 minutos para bloquear sítios de ligações não específicas. As secções de brânquias foram então incubadas durante uma noite, *overnight,* sob refrigeração com o anticorpo monoclonal primário CYP1A C10-7 diluído 1:200 e as secções de fígado com o anticorpo primário policlonal CYP1A CP-226 diluído 1:350, ambos produzidos pela Biosense Laboratories AS (Bergen, Noruega). A diferença entre os anticorpos empregados se deve à especificidade de cada tecido, comprovada em testes iniciais. Após a imersão em anticorpo primário, as lâminas foram lavadas em PBS por três vezes para aplicação do secundário. O anticorpo secundário específico para cada anticorpo primário utilizado, anti-*mouse* IgG diluído 1:50 em tecidos de brânquia e anti-*rabbit* IgG diluído 1:50 em fígado, foi empregado durante 1 hora e para a coloração foi utilizado o kit ABC® (Vectastain, USA), conforme metodologia utilizada e descrita por Ortiz-Delgado e colaboradores (2005). A peroxidase foi então revelada por imersão das lâminas durante 10 minutos com uma solução composta de 3-3' diaminobenzidina tetramidrocloride (DAB), tampão Tris-HCl pH 7.6 e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) para observação em microscópio ótico. O anticorpo primário se une com a enzima peroxidase, que reage com a diaminobenzidina em presença de H_2O_2 sendo possível visualizar uma reação colorida nas lâminas.

Após a realização de todas as técnicas acima descritas os tecidos foram analisados e fotografados em fotomicroscópio.

III.7.5. *Western blot*

Os tecidos de brânquia e fígado, preservados em nitrogênio líquido, foram processados, para separação das proteínas microssomais, mediante eletroforese em gel de poliacrilamida, o que permitiu a identificação da enzima

CYP1A segundo a técnica de *western blot*. Os tecidos foram homogeneizados e os microssomas preparados conforme descrito por Ortiz-Delgado (2001) e utilizado por Ortiz-Delgado e colaboradores (2005). Os diferentes grupos de exposição, utilizados neste estudo, tiveram os seus tecidos agrupados em um *pool* para cada grupo, brânquias e fígados separados. As amostras foram homogeneizadas em tampão adequado (50 mM Tris-HCl; 0.25 M sacarose; 2 mM EDTA-Na_2; 150 mM KCl, 1 mM DTT; 0.25 mM PMSF) em razão de 4 mL/g de tecido, com o auxílio de um homogeneizador de ultrassom. O homogeneizado resultante foi centrifugado a 800 X g durante 10 minutos, a 4ºC, para eliminar núcleos e restos celulares. O sobrenadante foi centrifugado a 15.000 X g, a 4ºC durante 20 minutos, para sedimentar as mitocôndrias e parcialmente os lisossomas e peroxissomas. O sobrenadante resultante foi recolhido com uma pipeta Pasteur, evitando-se recolher a capa lipídica superficial e centrifugado a 100.000 x g durante 60 minutos a 4ºC em ultracentrífuga Beckman, modelo L8-55M. O precipitado, contendo a fração microssomal, foi ressuspendido com o tampão de homogeneização, na razão de 200 µL por grama de tecido, evitando diluições excessivas, uma vez que poderiam ser esperados valores baixos.

A concentração de proteínas totais nas amostras foi determinada a 562 nm de absorbância em espectofotômetro com leitor de microplacas, segundo método de BCA (ácido bicinconínico), utilizando-se o kit comercial para ensaio de proteínas BCA® da Pierce, conforme instruções do fabricante. Determinada a quantidade de proteína em cada amostra, foi possível utilizar na eletroforese sempre a mesma quantidade de proteínas totais, ou seja, 10 µg de proteína, para todas as amostras.

Aos microssomas, em tampão de ressuspensão, foi adicionado um corante composto de azul de bromofenol e beta-mercaptoetanol, este último utilizado para reduzir as pontes dissulfeto e prevenir a oxidação das proteínas. Essa solução foi colocada nas faixas feitas em gel de poliacrilamida e, junto com um padrão de proteínas de pesos moleculares conhecidos, foi realizada a eletroforese em voltagem de 120 V por 2 horas. As proteínas separadas no gel foram transferidas para membranas de nitrocelulose através de eletroforese com amperagem regulada em 250 mA durante 2 horas em tampão 25 mM Tris, 0,2 M Glicina e 20% de metanol em água destilada. O sistema de transferência

foi montado intercalando-se uma esponja fina, um filtro de papel, o gel e a membrana de nitrocelulose. As folhas de nitrocelulose com as proteínas transferidas foram mergulhadas em solução de tampão PBS e leite 5% para bloqueio da atividade endógena. Em seguida foram mergulhadas em solução de anticorpo primário, monoclonal C10-7 para brânquias, diluído 1:200 e policlonal CP-226 para fígado, diluído 1:350. As membranas de nitrocelulose foram mantidas em agitação contínua por aproximadamente 12 horas. Os mesmos anticorpos secundários dos ensaios imunohistoquímicos foram empregados nessa análise, anticorpo anti-mouse IgG diluído 1:3000 para brânquias e anticorpo anti-rabbit IgG diluído 1:3000 para as amostras de fígado. A imunoreação foi observada através de revelação com o kit *Western Blotting analysis system*® da Amersham Biosciences em membranas fotográficas. O tempo de revelação variou de 5 a 30 segundos, dependendo do necessário para cada folha de nitrocelulose. Os pesos moleculares das proteínas separadas foram comparados com o padrão utilizado. Identificou-se a presença ou ausência de proteínas de peso molecular de 60 KDa, peso da enzima CYP1A. Devido ao número de amostras e variação do tempo de revelação das membranas, a atividade de CYP1A foi analisada somente como ausente ou presente. A quantificação da enzima não foi determinada ou comparada entre os diferentes grupos expostos ou não aos poluentes.

III.7.6. Microscopia eletrônica de varredura

O segundo arco branquial esquerdo de alguns indivíduos escolhidos aleatoriamente de todos os grupos controle, naftaleno e benzo(a)pireno foram observados em microscópio eletrônico de varredura. Os tecidos fixados em glutaraldeído 3% e diluídos em tampão fosfato 0,1 M, pH 7.2–7.4, foram desidratados em concentrações crescentes de solução de etanol. Após a desidratação o material foi pós-fixado em tetróxido de ósmio e levado ao ponto crítico em CO_2 líquido, para completa desidratação. Em seguida o material foi metalizado em ouro e observado em microscópio eletrônico de varredura modelo LEO 435VP da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP. A superfície das brânquias foi fotografada e as alterações encontradas

analisadas e comparadas com as lesões registradas segundo análise em microscópio ótico.

III.8. Biomarcadores bioquímicos: catalase e glutationa-*S*-transferase

Os fígados dos peixes dissecados e preservados em nitrogênio líquido no trabalho de campo foram transferidos para o laboratório em São Paulo onde foram realizadas as análises enzimáticas dos biomarcadores bioquímicos. Amostras do tecido hepático de cada indivíduo foram homogeneizadas em solução tampão de pH 7.6 [Tris Base 20 mM, EDTA 1 mM, Ditiotreitol (DTT) 1 mM, Sacarose 0,5 M, KCl 0,15 M e Fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF) 0,1 mM] numa proporção de 1:6 (tecido:tampão), em homogeneizador ultrassônico Microson^{TM}. O material foi centrifugado a 9000 X g e 4ºC por meia hora e o sobrenadante recolhido e separado, em alíquotas, para a determinação da atividade da catalase, glutationa-*S*-transferase e dosagem de proteínas totais.

III.8.1. Catalase

A atividade da catalase foi determinada conforme metodologia de Aebi (1974) que quantifica a velocidade de decomposição do H_2O_2 pela enzima, através do decréscimo da absorbância a 240 nm, 30ºC, por 1 minuto. A reação é linear somente nos primeiros 3 a 4 minutos. Portanto, o registro da densidade ótica começou imediatamente após a adição dos hemolizados. O comprimento de onda utilizado é o comprimento de absorção de luz do peróxido de hidrogênio. O coeficiente molar de extinção do H_2O_2 é 0,071 mM^{-1} cm^{-1}. As leituras foram obtidas em espectrofotômetro Cintra 10e da GBC Scientific Equipment Pty. Ltd.

Para a leitura em espectrofotômetro foi preparado um tampão à base de Tris-HCl (0,2 M) e EDTA (1 mM) pH 8.0 em água mili-Q. Em 100 mL de água mili-Q foram adicionados 5 mL deste tampão e solução de H_2O_2 até atingir a concentração de 10 mM. Para o ensaio, foram adicionados 990 µL da solução de reação acima descrita e 10 µL de amostra de tecido em uma cubeta de

quartzo. O decréscimo da absorbância em espectrofotômetro foi registrado por 1 minuto a cada 15 segundos.

Os intervalos da absorbância (Δ ABS) foram obtidos para os tempos de 0-15, 15-30, 30-45 e 45-60 s. Logo após foi calculado o decréscimo da absorbância por minuto. A atividade enzimática foi calculada segundo a equação: AE = (ΔABS/minuto X diluição da amostra)/(0,071 X volume da amostra em mL X concentração de proteínas na amostra em mg/mL).

A atividade enzimática foi então expressa em unidades de catalase por minuto e miligrama de proteínas (SALVO, 2003).

III.8.2. Glutationa-*S*-transferase

A atividade da glutationa-*S*-transferase foi determinada de acordo com as metodologias descritas por Habig e colaboradores (1974) e Habig e Jakoby (1981). Foram preparadas 3 soluções para utilização no ensaio enzimático:

- Tampão fosfato de reação 0,1 M e pH 7.0 à base de fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4) e fosfato de potássio dibásico (K_2HPO_4) diluídos em água mili-Q;
- Solução 0,1 M de 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) em 1 mL de etanol 100%;
- Solução de glutationa reduzida (GSH) 0,1 M dissolvida em tampão de reação 0,1 M.

Todas as soluções foram mantidas a 0°C até o momento de leitura em espectrofotômetro. Para a leitura da absorbância foram adicionados 980 µL de tampão de reação, 10 µL de CDNB e 10 µL de GSH na cubeta de quartzo utilizada como referência. Na cubeta de amostra foram adicionados 960 µL de tampão de reação, 10 µL de CDNB, 10 µL de GSH e 20 µL de amostra. O conteúdo das cubetas foi homogeneizado por inversão, cobrindo-se a cubeta com filme plástico. A leitura foi obtida em espectrofotômetro Cintra 10e a 340 nm e a 25ºC, durante 1 minuto a cada 15 segundos.

O aumento da absorbância por minuto para os intervalos de tempo de 0-15, 15-30, 30-45 e 45-60 s foi utilizado para o cálculo de ΔABS/minuto. A atividade enzimática foi então calculada segundo a equação: AE =

(ΔABS/minuto X diluição da amostra)/(9,6 X volume da amostra em mL X concentração de poteínas amostra em mg/mL). O coeficiente de extinção molar do CDNB é de 9,6 $mM^{-1}cm^{-1}$. A atividade enzimática foi então expressa em unidades de GST por minuto e miligramas de proteínas.

III.8.3. Determinação da concentração de proteínas totais

A concentração de proteína nos fígados dos peixes foi determinada com a utilização de um kit denominado *Coomassie® Plus Protein Assay Reagent kit, Pierce biotechnology.* Trata-se de um método colorimétrico rápido através da ligação do azul brilhante de Comassie às proteínas e a comparação desta ligação com diferentes concentrações de uma proteína padrão, geralmente albumina sérica bovina. O corante se liga com os grupos funcionais básicos ou aromáticos das proteínas. A ligação ocorre em dois minutos e dura aproximadamente duas horas. Este método é uma modificação do conhecido método de Bradford (1976). Em meio ácido, o corante se liga às proteínas e ocorre um máximo de absorbância em 595 nm e uma concomitante alteração da cor da amostra de marrom para azul. O teste foi realizado em espectrofotômetro com leitor de microplacas Spectra Count, Packard, no Laboratório de Aqüicultura Marinha do IOUSP.

De maneira simples e resumida este teste se baseia na combinação de pequena quantidade das amostras de proteínas com o reagente do kit, mistura adequada dos componentes, rápida incubação e leitura da absorbância em 595 nm.

Para obtenção de um padrão de proteínas foi utilizada uma ampola de padrão de albumina sérica bovina, Sigma, de concentração 2.000 µg/mL. A partir desta solução mãe foram feitas diluições em água mili-Q para obter as concentrações de 1.500 µg/mL, 1.000 µg/mL, 750 µg/mL, 500 µg/mL, 250 µg/mL, 125 µg/mL, 25 µg/mL e 0 µg/mL (branco). Cada solução foi preparada diretamente nos poços da microplaca e os padrões foram sempre colocados juntos com as amostras para a leitura em espectrofotômetro.

A partir da relação entre a concentração dos padrões conhecidos e a sua absorbância foi construída uma curva padrão e foi determinada a equação da curva e a correlação dos dados (R^2) (Figura 4). A equação da curva padrão

foi utilizada para determinar a concentração de proteínas totais nas amostras desconhecidas.

Para a determinação das proteínas totais nas amostras desconhecidas foram pipetados 10 µL de cada amostra diretamente nos poços da microplaca. Em seguida, foram adicionados 300 µL do reagente *Comassie® Plus*. Este procedimento foi realizado em todos os poços livres da microplaca com exceção dos 9 poços utilizados com soluções de proteínas para determinação da curva padrão. As placas permaneceram por repouso durante alguns minutos e foram agitadas por 30 segundos antes da leitura. A absorbância foi medida a 595 nm. O valor da absorbância do branco foi subtraído de todas as demais amostras e calculada a concentração de proteína nas amostras conforme a equação da curva padrão.

III.9. Análises estatísticas

Para o ensaio cometa foram calculadas as médias de porcentagem de DNA na cauda e momento de cauda, para os peixes de cada grupo experimental. Diferenças entre todos os grupos foram verificadas através de teste de variância não paramétrico Kruskal-Wallis e as diferenças entre os grupos experimentais e o controle foram determinadas segundo o teste de Mann-Whitney.

Da mesma maneira, as freqüências de micronúcleos e das anormalidades nucleares eritrocitárias tiveram as médias dos grupos comparadas segundo o teste Kruskal-Wallis e teste posterior de Mann-Whitney.

Os dados histopatológicos foram agrupados em planilhas e as alterações histopatológicas, identificadas nas brânquias e nos fígados dos indivíduos, foram analisadas com os mesmos testes.

Os dados de atividade das enzimas catalase e glutationa-*S*-transferase foram testados para normalidade e homogeneidade segundo os testes de Shapiro-Wilks e Levene. As diferenças significativas foram analisadas com base no teste de ANOVA seguido do teste de Duncan.

As análises estatísticas foram realizadas no programa Statistica 7.0 ao nível de significância de $p<0,05$.

IV. Resultados

IV.1. Ensaio cometa

No ensaio cometa, para a interpretação dos resultados, o “cometa” é dividido em duas partes: cabeça e cauda. As células sem ou com pouco dano no DNA se transformam em cometas sem cauda permanecendo similares aos nucleóides. Células com mais danos originam cometas com caudas bem definidas.

Não foram constatados cometas de células mortas ou com ausência de núcleo nas lâminas analisadas.

IV.1.1. Adequação das condições de eletroforese

As variações de médias de porcentagem de DNA na cauda dos cometas em controle PBS e em grupos tratados com diferentes concentrações de H_2O_2 nas diferentes voltagens testadas estão representadas na figura 5. Conforme o aumento de voltagens utilizadas na eletroforese, os cometas apresentaram maior porcentagem de DNA na cauda.

A observação dos cometas e a análise segundo o programa Comet Score permitiu quantificar a migração e analisar a distribuição do material genético. Foi observado em eletroforese com voltagem de 0,72 V/cm que as células apresentavam-se muito arredondadas, às vezes não caracterizando o formato de cometas, característico do método (Figura 6A).

Ocorreu uma pequena diferença na proporção de DNA na cauda dos cometas entre as voltagens de 0,80 e 0,88 V/cm conforme o aumento da concentração de H_2O_2. A voltagem mais alta, 0,88 V/cm, apresentou porcentagem de DNA na cauda maior que a voltagem de 0,80 V/cm em todas as concentrações testadas (Figura 5). Nesta voltagem os cometas se

apresentaram muito extensos, mesmo nas menores concentrações de H_2O_2, em relação à 0,80 V/cm. A figura 6 ilustra cometas de lâminas submetidas à concentração de 10 µM de H_2O_2 após a eletroforese de 0,80 V/cm (Figura 6B) e 0,88 V/cm (Figura 6C).

IV.1.2. Efeitos da exposição ao NAP e BAP

As médias de porcentagem de DNA na cauda, momento de cauda e os desvios padrões dos grupos controles e aqueles expostos ao naftaleno e benzo(a)pireno e seus desvios padrões estão apresentadas nas figuras 7 e 8, respectivamente.

Considerando a porcentagem de DNA na cauda dos cometas, os controles em água limpa apresentaram valor reduzido, atingindo médias sempre menores que 10% em todos os períodos de exposição (Figura 7). Os grupos em DMSO também revelaram baixo dano ao DNA, sendo significativa somente a diferença deste grupo em 96 horas e em relação aos demais grupos controles.

Como pode ser observado na figura 7A, o dano ao material genético das células foi significativo nas exposições ao naftaleno somente na maior concentração de 8,1 µM e não foram observadas diferenças de dano ao DNA entre os diferentes períodos experimentais. Apesar de não apresentarem diferença significativa em relação ao grupo controle, os grupos expostos à concentração de 8,1 µM de naftaleno apresentam uma tendência ao aumento de dano conforme o aumento do período de exposição.

Observando os resultados da exposição à menor concentração de benzo(a)pireno de 0,9 µM, nota-se diferença significativa em relação ao grupo controle em água limpa, da porcentagem de DNA na cauda, somente no maior período de exposição de 96 horas (Figura 7B).

Os grupos expostos ao benzo(a)pireno nas concentrações de 2,7 µM e 8,1 µM revelaram dano significativo em relação aos seus respectivos controles e a partir do período de exposição de 12 horas. Quando comparados os grupos expostos a uma mesma concentração, em função dos diferentes períodos de exposição, não ocorrem diferenças significativas. Somente para a mais alta concentração de 8,1 µM de BAP se nota uma tendência ao aumento de

porcentagem de DNA na cauda dos cometas em função do aumento do tempo de exposição, chegando a até 70% de DNA na cauda dos cometas deste grupo no mais longo período de exposição. Entre os diferentes tempos de exposição o resultado é significativo somente quando são comparados os períodos de 12 e 96 horas na concentração mais elevada.

O naftaleno também revelou dano genotóxico, significativo em relação ao grupo controle, somente na exposição de maior concentração de 8,1 µM, segundo a análise do momento de cauda (Figura 8A), já a partir do período de exposição de 12 horas. Apesar de não haver diferença significativa quando comparados os diferentes períodos de exposição a 8,1 µM NAP, ocorre uma tendência ao aumento do momento de cauda conforme aumenta o tempo de exposição ao poluente.

Segundo a análise do momento de cauda, o benzo(a)pireno foi genotóxico às células dos peixes a partir da concentração de 0,9 µM BAP e do período de 24 horas de exposição. Apesar de não ser significativo, ocorre uma tendência ao aumento do momento de cauda conforme aumenta o período experimental. Nota-se esta tendência quando são comparados os diferentes períodos de exposição à concentração de 8,1 µM de BAP (Figura 8B).

O naftaleno confere genotoxicidade significativa somente na concentração de 8,1 µM independente do período de exposição, enquanto o benzo(a)pireno demonstra ser genotóxico a partir da concentração mais baixa utilizada, 0,9 µM, e do período de 24 horas de exposição.

IV.2. Análise de micronúcleos e de outras anormalidades eritrocitárias

Lâminas de todos os tratamentos foram analisadas para constatação de lesões nucleares, inclusive os controles, apesar de estes apresentarem escassas anormalidades nucleares. Não foram observadas células apresentando micronúcleos ou anormalidades nucleares eritrocitárias em freqüência maior que 1,5‰ nos peixes dos grupos controle em água limpa ou DMSO (Figuras 9 a 12).

A frequência de anormalidades nucleares eritrocitárias e micronúcleos apresentada pelos grupos expostos aos poluentes se revelou em sua grande

maioria, significativamente mais elevada quando comparada às freqüências dos grupos controle.

Micronúcleos foram observados após a exposição de 12 horas, ao naftaleno e benzo(a)pireno, nas concentrações de 2,7 μM e 8,1 μM (Figuras 9 e 11). Apesar de não ser significativo, nota-se uma tendência ao aumento da frequência de micronúcleos em função do aumento da concentração de poluente utilizada nos diferentes períodos de exposição. No período de exposição mais longo, houve diferença significativa da frequência de micronúcleos do grupo 8,1 μM BAP em relação a todos os demais grupos.

Analisando cada parâmetro de forma isolada, a lesão do tipo reniforme foi a que apresentou a maior freqüência nos experimentos, enquanto que a lesão do tipo segmentada foi a menos freqüente (Figuras 9 a 12).

As anormalidades nucleares do tipo reniforme atingiram uma frequência média máxima de 9‰ na concentração de 8,1 μM BAP após 96 horas de exposição (Figura 12). Em todas as concentrações utilizadas e em todos os períodos, inclusive em ambos os grupos controle, foram observadas anormalidades do tipo reniforme. Entretanto, quando comparadas as diferentes concentrações, somente aquelas mais altas (2,7 μM e 8,1 μM de NAP e BAP) apresentam diferença significativamente mais elevada, em relação ao grupo controle em água, para todos os períodos de exposição.

O naftaleno causou maior frequência de anormalidades nucleares do tipo lobadas após o período de 96 horas de exposição nas concentrações de 2,7 μM e 8,1 μM (Figura 10). Os grupos expostos ao benzo(a)pireno apresentaram crescente número de lesões do tipo lobada conforme o aumento de concentrações para cada período experimental.

A anormalidade do tipo segmentada foi observada muito raramente em todos os grupos apresentando uma frequência média máxima de 1,6‰ no grupo em 8,1 μM de BAP após 96 horas de exposição (Figura 12). Os grupos com freqüência média mais elevada em relação aos demais foram os de 2,7 μM e 8,1 μM expostos ao benzo(a)pireno e após 96 horas.

IV.3. Análises histopatológicas

As alterações nos tecidos branquiais foram analisadas em relação às concentrações de poluentes utilizadas e os períodos de exposição. Foram fotografadas as principais alterações celulares e teciduais observadas nos peixes.

O resultado de alterações em cada indivíduo foi registrado em uma tabela conforme freqüência/intensidade. As médias de freqüência e intensidade de coloração em cada grupo experimental, de todas as técnicas realizadas, foram agrupadas nas tabelas 3 a 12. As principais alterações observadas em brânquias encontram-se representadas na figura 13 e as alterações em fígado na figura 14.

Nenhuma alteração patológica severa foi encontrada nos tecidos de brânquias e fígados dos pampos nos grupos controle e DMSO em todos os períodos experimentais (Figura 13A). Foram observados pequenos deslocamentos de células epiteliais, de fraca intensidade, em alguns animais controle e em DMSO, de diferença não significativa segundo análise estatística entre estes grupos.

Foram constatadas algumas alterações de fraca intensidade significativas no grupo DMSO em relação ao grupo controle. Nas brânquias dos indivíduos do grupo DMSO ocorreu fusão completa de lamelas secundárias (Figura 13E) e telangiectasia de lamelas nas brânquias (Tabelas 3 e 4). Em fígado foi significativo, porém de fraca intensidade, entre alguns grupos DMSO e controle, o incremento de vacúolos lipídicos (Figura 14D), dilatação dos sinusóides e pequena infiltração de sangue nos sinusóides (Tabelas 5 e 6).

A ocorrência de parasitas nas brânquias dos peixes controle e DMSO foi observada, porém esta se revelou muito inferior aos grupos expostos aos poluentes. A ocorrência destes organismos foi registrada conforme escala 0 ou "–" para nenhum parasita até 4 ou "++++" para tecidos com inúmeros parasitas ao seu redor, segundo uma análise comparativa entre as lâminas de brânquias.

Observa-se um aumento na ocorrência de parasitas nas brânquias conforme aumenta o período de exposição até 96 horas. A partir de 24 horas, observa-se um aumento significativo na presença de parasitas somente na concentração mais elevada de NAP. Somente 2,7 μM e 8,1 μM de BAP

revelaram significativo aumento na ocorrência de parasitas no período de 48 horas e todos os grupos se revelaram diferentes do controle em água limpa após maior período de 96 horas, inclusive o grupo DMSO (Figura 15).

As lesões nos tecidos foram observadas em todos os grupos e relacionadas com a concentração de ambos os poluentes utilizados. Observando-se as tabelas de 3 a 6 se nota um maior número de ocorrência e intensidade de lesões nos períodos experimentais de 24, 48 e 96 horas em relação ao experimento de 12 horas e independente da concentração de poluentes utilizada. Nenhuma fibrose de tecido foi encontrada nas brânquias ou fígados dos peixes e em nenhum indivíduo foi observada a formação de tumores ou colanginomas no fígado (Tabela 6).

Quando comparadas as freqüências e intensidades de lesões de grupos de mesma concentração de poluentes, em relação ao tempo em que os animais permaneceram expostos, nota-se um aumento significativo de dano nos tecidos dependente do tempo de exposição. As lesões começam a ser significativas, em relação ao período de 12 horas, a partir do período de 24 horas de exposição.

As alterações que apresentaram esse aumento significativo em brânquias foram: hipertrofia do epitélio respiratório, deslocamento de células epiteliais (Figura 13C), espessamento de tecido interlamelar (Figura 13D), infiltração de leucócitos no epitélio, estreitamento do epitélio respiratório, hiperplasia caótica de células epiteliais, fusão de extremidades de lamela secundária, telangiectasia de lamelas, hemorragia com ruptura de vasos sangüíneos, aneurismas (Figuras 13B e 13F) e necrose (Figuras 13C e 13G).

As lesões no fígado dos peixes, relacionadas com o tempo de exposição, foram: hiperemia de capilares, resposta inflamatória, infiltração de sangue nos sinusóides (Figura 14B), diminuição do tamanho dos hepatócitos, anisocitose e anisocariose dos hepatócitos, aumento de eosinofilia citoplasmática, necrose (Figura 14C), cariólise (Figura 14A), hepatite, cirrose (Figura 14E) e dilatação de sinusóides.

Necrose do tecido branquial, lesão irreversível, ou seja, irreparável e extremamente prejudicial, significativa em relação ao grupo controle, foi observada desde o período de 24 horas de exposição na concentração de 2,7

µM de naftaleno apesar de pouco freqüente e de moderada intensidade (Figura 16).

Os períodos de 48 e 96 horas apresentaram diferença significativa na ocorrência e intensidade de tecido necrosado nas brânquias dos grupos expostos às maiores concentrações de NAP e BAP, em relação aos seus grupos controles e DMSO e quando comparados com a concentração de 0,9 µM. Houve uma tendência ao aumento de severidade desta lesão relacionada à concentração de poluente utilizada.

As lesões mais severas encontradas nos fígados dos peixes foram hepatite e cirrose. A cirrose nem sempre foi de grande intensidade, sendo significativa somente no período de 96 horas e concentrações 8,1 µM de NAP e 2,7 µM e 8,1 µM de BAP. Hepatite do tecido hepático, significativamente presente em alguns indivíduos quando comparados àqueles dos grupos controle, foi observada nos grupos em 8,1 µM de BAP em 24 horas e em peixes expostos a ambos os poluentes nos períodos de 48 horas e 96 horas (Figura 17).

Apesar de as lesões serem progressivas em freqüência e intensidade, nem sempre houve relação com a concentração dos poluentes. Como por exemplo, pode-se observar na figura 17 que na concentração de 2,7 µM de BAP em 24 horas, nenhum peixe deste grupo apresentou hepatite.

IV.4. Análises histoquímicas

A coloração de proteínas não específicas em brânquias por azul de bromofenol não revelou diferença significativa entre os grupos nas células de cloro, células mucosas e cartilagem dos peixes (Tabela 7). A coloração das células pilares não foi intensa na maioria dos grupos, apresentando-se pouco frequente e de baixa intensidade. Os indivíduos expostos à concentração de 8,1 µM de BAP nos períodos de 12, 24 e 96 horas e em 8,1 µM de NAP em 48 horas e 0,9 µM de NAP em 96 horas apresentaram forte coloração em algumas células pilares (Figura 18A).

As células epiteliais dos grupos 8,1 µM de BAP e 8,1 µM de NAP, no período de 24 horas, apresentaram forte coloração e significativa em relação aos demais grupos. Escassas células epiteliais em outros grupos expostos ao

BAP e à concentração de 8,1 µM de NAP coraram no maior período de 96 horas, apesar desta alteração não ser significativa.

A coloração por azul de bromofenol não revelou qualquer relação entre freqüência e intensidade de coloração de células sangüíneas das brânquias em relação ao período de exposição. Não houve diferença significativa de coloração nestas células entre todos os grupos no período de 12 horas. Neste período foram observadas, na maioria dos grupos, escassas células sangüíneas coradas moderamente.

Comparando-se os grupos controle e DMSO não são notadas diferenças significativas na ocorrência de proteínas inespecíficas exceto no período de 96 horas, em que o grupo DMSO apresentou algumas células sangüíneas moderadamente coradas. Em 24 horas de exposição foi significativa, em relação ao grupo controle, a presença de proteínas inespecíficas detectadas pelo método de azul de bromofenol na concentração de 0,9 µM de NAP. Os grupos expostos ao BAP apresentaram progressivo aumento na ocorrência de proteínas, relacionado à concentração do poluente.

No período de 48 horas, o grupo em 0,9 µM de NAP e os grupos expostos nas maiores concentrações 8,1 µM de NAP e BAP, apresentaram um aumento significativo da ocorrência de células sanguíneas coradas por azul de bromofenol em comparação ao grupo controle. A ocorrência destas proteínas, em células sanguíneas nos grupos 0,9 µM de NAP, 2,7 µM de BAP e 8,1 µM de BAP, em 96 horas, foram diferentes do controle, sem haver, no entanto, diferença significativa entre eles (Tabela 7).

Nos cortes de fígado as proteínas inespecíficas foram coradas com intensidade forte nos núcleos dos hepatócitos, auxiliando a visualização de núcleos picnóticos (Figura 18B). Entretanto, observando-se todos os tipos celulares, esta técnica somente revelou diferença significativa em grupos isolados (Tabela 7). A diferença apresentada não demonstrou relação com a concentração do poluente ou período de exposição.

Comparando-se todos os grupos entre os diferentes períodos, as células sanguíneas do grupo 8,1 µM de NAP, em 48 horas de exposição, apresentaram diferenças em comparação aos demais grupos, assim como o grupo 0,9 µM de NAP em 96 horas apresentou o endotélio de alguns vasos

moderadamente corados e o grupo 8,1 µM de BAP em 24 horas apresentou o endotélio de alguns canalículos biliares fracamente corados.

A técnica de azul alcian não apresentou reação positiva para os diferentes tipos celulares de brânquias nos pHs 0.5 e 1.0, somente o tecido cartilaginoso corou em todos os grupos e em ambos pHs (Figura 18D). Grupos isolados, e sem diferença entre os demais, apresentaram reação positiva e moderada ao azul alcian em escassas células de brânquia e fígado (Tabelas 8 e 9).

O corante azul alcian em pH 2.5 corou intensamente a cartilagem da brânquia dos animais, porém sem diferença significativa entre os grupos e períodos experimentais e, de maneira geral, corou moderadamente todos os tipos celulares analisados (Figura 18C). Não houve relação entre o padrão de coloração das células analisadas e o período de exposição aos poluentes.

Analisando a reação das células pilares, dentro de cada período experimental, também não foram significativas as diferenças entre os grupos controle, DMSO e grupos expostos aos contaminantes nos períodos de 12 e 24 horas. Os indivíduos do grupo controle em água, do período de 48 horas, apresentaram muitas células pilares coradas, apesar de serem de intensidade moderada, e diferente significativamente de todos os demais grupos neste mesmo período experimental. Os grupos controle em 24 e 96 horas apresentaram escassas ou nenhuma célula pilar corada por esta técnica (Tabela 10). No período de 96 horas os grupos controle, 2,7 µM e 8,1 µM de NAP não apresentaram células pilares coradas. Todos os grupos em BAP apresentaram o mesmo padrão de coloração sem diferença significativa entre os grupos.

As células epiteliais branquiais mantiveram o mesmo padrão apresentando, em média, poucas células coradas e de moderada intensidade em todos os grupos nos períodos de 12 e 24 horas, com exceção do grupo 2,7 µM de NAP que não apresentou nenhuma célula corada (Tabela 10). O grupo controle em 48 horas de exposição apresentou elevado número de células epiteliais coradas, sendo esta ocorrência significativamente maior em relação à maioria dos demais grupos em todos os períodos. Entre os demais grupos do período de 48 horas somente a concentração de 2,7 µM de BAP se mostrou diferente por não apresentar nenhuma célula corada.

No período de 96 horas o grupo controle apresentou escassas células epiteliais coradas e sem diferença significativa em comparação aos grupos 0,9µM de NAP, 2,7 µM de NAP e 2,7 µM de BAP. Os demais grupos não apresentaram diferença em relação ao controle DMSO. Houve uma tendência ao aumento de freqüência de células coradas relacionado às concentrações de NAP nos períodos de 12 e 96 horas e de BAP nos períodos de 24 e 48 horas.

As células sangüíneas das brânquias dos peixes em todos os grupos, apesar de apresentarem elevada ocorrência de células coradas por azul alcian pH 2.5, não mostraram diferenças significativas entre as diferentes concentrações dos grupos em um mesmo período de exposição ou diferentes períodos de exposição. O mesmo resultado foi observado nas células de cloro e células mucosas das brânquias. Para estes dois tipos celulares houve uma grande variação de freqüência de células coradas. Houve muitos grupos sem resposta à técnica e também muitos grupos com alguma resposta, porém, quando comparados, não apresentam relação com o período de exposição ou a concentração de poluente.

Poucos grupos apresentaram o endotélio de vasos sanguíneos corados, foram somente células escassas e em fraca intensidade, sem diferença significativa entre os grupos. Os grupos controle 12 horas, 0,9 µM de NAP 24 horas, 0,9 µM de BAP 48 horas e 8,1 µM de NAP e 2,7 µM de BAP em 96 horas, apresentaram coloração significativa no citoplasma dos hepatócitos em relação aos seus grupos controle.

Nos grupos controle foram observadas colorações de fraca intensidade no citoplasma de todos os hepatócitos. Não foram observadas colorações nas células do endotélio de canalículos biliares, células acinares pancreáticas e endotélio dos sinusóides nas secções de fígado observadas no pH 2.5 (Figura 18E, Tabela 10).

As células sanguíneas do fígado de alguns grupos coraram moderadamente, apresentando diferença significativa em relação aos demais. No entanto, não houve relação com o poluente ou com o período de exposição. A coloração do citoplasma dos hepatócitos também não revelou diferença significativa entre os grupos expostos aos poluentes e os grupos controles.

O método histoquímico do PAS foi utilizado para observar células mucosas de brânquias e citoplasma dos hepatócitos. Por ser mais específica

ao glicogênio, a técnica do Carmin *the best* foi empregada somente para observação do citoplasma dos hepatócitos (Tabela 11).

Nas secções de brânquias (Figuras 18F e 18G), a técnica PAS se revelou positiva em muitas células mucosas dos grupos controles nos diferentes períodos experimentais, exceto no grupo em 96 horas que apresentou resposta negativa à técnica.

No período de 12 horas, não foram observadas coradas por PAS as células mucosas nas concentrações de 0,9 µM e 8,1 µM de NAP e 2,7 µM e 8,1 µM de BAP. Os demais grupos não apresentaram diferença significativa em relação aos grupos controle. Em 24 horas de exposição houve uma redução de ocorrência de células mucosas positivas ao PAS nas duas maiores concentrações de NAP.

Os grupos expostos ao BAP não apresentaram resposta positivas à técnica nas duas concentrações mais baixas e a resposta foi semelhante ao controle na maior concentração. Em 48 horas a maioria dos grupos não apresentaram diferença significativa, com exceção do DMSO e 8,1 µM de BAP que não foram positivas ao PAS.

No período de 96 horas houve uma tendência ao aumento de ocorrência e intensidade de coloração em células mucosas de brânquias em praticamente todos os grupos quando comparados ao grupo controle. Entretanto, todas as concentrações dos poluentes não apresentaram diferença significativa quando comparadas entre si. Não ocorreu alteração de resposta positiva ao PAS quando se compara uma mesma concentração, para cada um dos poluentes, entre os diferentes períodos de exposição de 12 até 96 horas.

O citoplasma dos hepatócitos revelou coloração intensa segundo a técnica de PAS (Figura 18H). Não apresentaram resposta positiva alguns grupos, entre eles, os controles dos períodos de 24 e 96 horas. No período de 12 horas, a maior concentração de NAP e as duas maiores de BAP se revelaram diferentes do controle, não apresentando coloração nos hepatócitos. Todos os demais grupos deste período não apresentam diferença significativa quando comparados entre si.

No período de 24 horas a maior concentração de ambos os poluentes também não apresentaram reações positivas ao PAS no citoplasma dos hepatócitos e as concentrações de 2,7 µM de NAP, 0,9 µM de BAP e 2,7 µM de

BAP tiveram resposta positiva significativamente mais elevada do que os grupos controle e DMSO.

A exposição durante 48 horas não revelou diferença entre os grupos, com exceção à concentração de 8,1 µM de BAP que não foi positiva à técnica. Em 96 horas somente os grupos DMSO, 8,1 µM de NAP e 0,9 µM de BAP apresentaram algumas células moderadamente coradas.

Comparando-se os períodos experimentais se nota que, com o aumento do tempo de exposição, há uma tendência de aumento da resposta positiva ao PAS na maior concentração de NAP. Entretanto, o grupo 8,1 µM de BAP não apresentou resposta positiva em nenhum dos períodos de exposição.

A coloração por Carmin *the best* no citoplasma dos hepatócitos (Figura 18l) não apresentou diferença significativa em relação às concentrações crescentes de poluentes nos períodos de exposição de 12 e 96 horas. Na exposição de 24 horas, entretanto, o grupo controle não apresentou resposta positiva se mostrando diferente dos grupos 0,9 µM e 2,7 µM de BAP.

A concentração de 8,1 µM de BAP revelou escassos hepatócitos com o citoplasma suavemente corado por esta técnica, sendo o padrão de coloração apresentado semelhante ao revelado pelo grupo DMSO. Não houveram diferenças significativas no período de 48 horas entre os grupos controle, DMSO, 0,9 µM de NAP e 8,1 µM de BAP. Comparando-se as respostas, de uma mesma concentração de poluente, em função dos diferentes períodos experimentais, não se nota diferença significativa entre os grupos.

IV.5. Análises imunohistoquímicas

Para a realização do método imunohistoquímico, nos tecidos de brânquia e fígado de pampos, foi necessário testar a especificidade dos anticorpos. Por haver reação não específica em muitas células de brânquia ao se utilizar do anticorpo policlonal, foi escolhido o anticorpo monoclonal para as secções de brânquia. O contrário foi verificado nas secções de fígado: as células deste tecido não apresentavam resposta positiva ao anticorpo monoclonal e por isso foi utilizado o anticorpo policlonal (Figura 19).

As células mucosas dos grupos 2,7 µM e 8,1 µM de BAP no período de 96 horas apresentaram algumas células moderada e significativamente

coradas em relação aos demais grupos (Tabela 12). Os grupos controles e DMSO não apresentaram resposta positiva de reação aos anticorpos empregados nos diferentes tipos celulares da brânquia.

As células de cloro dos diferentes grupos também não apresentaram reação positiva aos anticorpos. O período de 96 horas se mostrou diferente dos demais apresentando células pilares, epiteliais e sangüíneas com resposta intensa em relação aos demais períodos.

Em células pilares se observa em 12 horas a maior resposta nas duas maiores concentrações de NAP e em 24 horas nas duas maiores concentrações de BAP. Na exposição de 48 horas houve diferença significativa entre os grupos contaminados e os controles. Entretanto, não são reveladas diferenças significativas entre os grupos expostos aos poluentes.

Em 96 horas são registradas as maiores freqüências e intensidades de células pilares positivas à técnica. O poluente BAP foi responsável por uma maior freqüência de células coradas em relação ao NAP. Entre as diferentes concentrações de contaminantes é observada uma tendência ao aumento da coloração conforme aumenta a concentração.

As células epiteliais das brânquias mostraram respostas significativas no período de 96 horas, no entanto, não houve relação com a concentração de poluente utilizada.

No período de 12 horas se observa uma maior resposta positiva ao anticorpo nas células sanguíneas relacionada ao aumento da concentração de NAP. Nos demais períodos, apesar de haver intensidade forte de coloração das células sanguíneas em alguns grupos, não houve qualquer relação com a concentração de poluente utilizada. A resposta ao anticorpo nas células sanguíneas revelou diferenças significativas nos grupos expostos ao BAP em comparação ao grupo controle nos períodos de 12, 24, 48 e 96 horas. Ocorre uma tendência ao aumento de resposta positiva relacionada à concentração de contaminante, apesar de esta não ser significativa.

Nas secções de fígado somente alguns grupos isolados revelaram resposta positiva em células acinares pancreáticas ao anticorpo utilizado (Tabela 12). Esta resposta, apesar de não se apresentar em todos os grupos, está sempre associada à exposição aos contaminantes e nas concentrações

mais altas, com exceção da concentração de 0,9 µM de BAP no período de 96 horas.

O mesmo padrão foi observado no endotélio de canalículos biliares (Figura 19A). As maiores concentrações desde o período de 12 horas revelaram alguma resposta a esta técnica imunohistoquímica no endotélio dos canalículos biliares. No entanto, o endotélio do fígado de peixes na concentração de 8,1 µM de BAP não apresentou reação específica ao anticorpo no período de 96 horas.

O citoplasma dos hepatócitos não apresentou diferença significativa quando comparados os grupos expostos aos poluentes nos períodos de 12, 24 e 48 horas. No entanto, a exposição de 96 horas apresentou diferença e uma tendência ao aumento de ocorrência e intensidade de células coradas na maior concentração de BAP.

O endotélio dos sinusóides dos animais expostos ao BAP apresentou resposta intensa ao anticorpo policlonal somente nos períodos de 48 e 96 horas. No período de 48 horas a reação ao anticorpo foi relacionada à concentração de BAP. No período de 96 horas todos os grupos em BAP não revelaram diferença significativa entre si.

As células sangüíneas do fígado apresentaram resultados progressivos conforme o período experimental até o período de 48 horas. No período de 96 horas houve uma redução da resposta em relação ao período de 48 horas, porém semelhante ao período de 24 horas. Desde o período de 12 horas as células sangüíneas já apresentaram reação positiva significativa nos grupos expostos aos poluentes. O grupo em 8,1 µM de BAP apresentou uma maior ocorrência e intensidade de células coradas. Em 24 horas, apesar de não haver diferença significativa entre as diversas concentrações de um mesmo poluente utilizado, o BAP revelou maior ocorrência e intensidade de reação ao anticorpo.

Em 48 e 96 horas, foram reveladas as maiores intensidades de coloração e, de maneira geral, parece haver alguma relação entre a resposta e a concentração de contaminante. Em alguns grupos de ambos os períodos, como no grupo exposto ao NAP em 48 horas e o grupo exposto ao BAP em 96 horas, ocorre um aumento de freqüência ou intensidade de células sangüíneas com reação positiva conforme aumenta a concentração de poluente utilizada.

Os grupos expostos ao BAP em 48 horas e ao NAP em 96 horas não mostraram diferenças significativas de resposta entre os grupos.

O endotélio dos vasos sanguíneos no fígado, em resposta ao anticorpo empregado no método imunohistoquímico, apresentou um aumento na reação positiva ao anticorpo do período de 12 horas até o de 96 horas, principalmente nos indivíduos expostos ao BAP. Não houve um aumento de resposta conforme o período experimental quando comparados os períodos de 24, 48 e 96 horas entre os grupos expostos ao BAP.

IV.6. Western blot

A técnica de *western blot* revelou a presença de proteínas do peso molecular de 60KDa nas amostras de grupos de peixes que foram expostos aos poluentes (Figura 20). A determinação desta proteína de peso molecular conhecido foi possível pela comparação de uma faixa no gel onde foi introduzido um padrão de proteínas com pesos conhecidos. Foi, portanto, possível verificar a presença ou ausência da enzima CYP1A nas amostras.

A eletroforese das proteínas nas diferentes amostras não revelou em grupos controle e DMSO a presença da enzima CYP1A, no entanto esta foi observada nas amostras de todos os grupos expostos aos contaminantes. A figura 21 mostra a eletroforese com diferentes amostras de brânquia e fígado do pool de indivíduos expostos ao BAP e NAP. As amostras nas faixas 3, 4, 6 e 7 correspondem aos grupos controle 12 horas, controle 48 horas, DMSO 12 horas, DMSO 48 horas e DMSO 96 horas. Os grupos controle e DMSO não revelaram a presença de proteínas deste peso molecular nas amostras.

IV.7. Ultramorfologia

A análise de microscopia eletrônica de varredura (MEV) permitiu observar algumas alterações na superfície do tecido branquial. Poucas alterações foram observadas na superfície do tecido segundo MEV.

A alteração frequentemente observada foi um inchaço ou espessamento da lamela secundária de indivíduos expostos às maiores concentrações de benzo(a)pireno (Figura 22), 2,7 μM e 8,1 μM de BAP após 48 e 96 horas de

exposição, respectivamente. Nenhuma outra alteração foi observada na superfície dos tecidos analisados.

IV.8. Catalase

A atividade da enzima catalase não apresentou nenhum padrão de relação com a concentração de poluentes utilizada dentro de um mesmo período experimental ou conforme o aumento do período de exposição aos poluentes. Alguns grupos apresentaram uma tendência não significativa de redução da atividade de catalase em relação ao controle mantido em água limpa.

No período de 12 horas foi observada uma menor atividade de catalase na concentração de 0,9 µM de NAP (Figura 23A). No período de 24 horas houve uma redução da atividade de catalase na maior concentração de 8,1 µM de NAP atingindo este grupo valor médio de 992 U CAT/min.mg de proteína (Figura 23B). Alguns grupos apresentaram tendência ao aumento da atividade nos dois maiores períodos de exposição, apesar deste aumento não ser significativo.

Em 48 horas a atividade de catalase, na maior concentração de 8,1 µM de NAP, apresentou média levemente elevada em relação ao grupo controle. A média deste grupo foi de 2372 U CAT/min.mg de proteína enquanto o grupo controle apresentou média de 2054 U CAT/min.mg de proteína (Figura 23C). No período de 96 horas somente o grupo exposto ao DMSO apresentou média de atividade de catalase maior em relação ao controle. Apesar de este resultado não ser significativo segundo análise estatística, o grupo DMSO apresentou média de 2959 U CAT/min.mg de proteína enquanto a atividade média do grupo controle foi de 1358 U CAT/min.mg de proteína (Figura 23D).

Nas exposições ao benzo(a)pireno por 12 horas, os grupos nas duas maiores concentrações de 2,7 µM e 8,1 µM de BAP apresentaram atividade moderadamente reduzida em relação ao controle água (Figura 24A). A redução de atividade enzimática na maior concentração de BAP também foi observada na exposição de 24 horas, apresentando este grupo média de atividade de 1525 U CAT/min.mg de proteína e o grupo controle em água 2567 U CAT/min.mg de proteína (Figura 24B).

A atividade em todos os grupos do período de exposição de 48 horas foi muito semelhante, não apresentando qualquer tendência de variação em relação ao grupo controle (Figura 24C). No maior período de exposição de 96 horas os grupos DMSO e 0,9 µM de BAP apresentaram médias de atividade um pouco mais elevadas em relação ao controle sendo 2958 U CAT/min.mg de proteína para o grupo DMSO e 2348 U CAT/min.mg de proteína para o grupo 0,9 µM de BAP. O grupo controle 96 horas apresentou média de atividade de catalase de 1358 U CAT/min.mg de proteína (Figura 24D).

Quando comparados os grupos controle, é possível observar que a atividade média reduz de 2770 em 12 horas para 1360 U CAT/min.mg de proteína após 96 horas, ocorrendo portanto, uma tendência à redução de atividade de catalase conforme o período experimental. Comparando as mesmas condições de exposição, ou seja, entre os grupos DMSO e diferentes concentrações de poluentes entre si, nos diferentes períodos, não foram observadas diferenças estatísticas entre as médias de atividade mensuradas conforme o aumento de período de exposição.

IV.9. Glutationa-*S*-transferase

Assim como a atividade de catalase, a atividade de glutationa-*S*-transferase não revelou diferença significativa entre os grupos de todos os períodos experimentais e seus respectivos grupos controle.

A exposição ao naftaleno por 12 horas revelou uma leve redução, apesar de não significativa, na atividade de glutationa na concentração de 0,9 µM de NAP apresentando média de 8,00 U GST/min.mg de proteína. Os grupos expostos a 2,7 µM e 8,1 µM de NAP apresentaram médias de 19,05 e 19,23 U GST/min.mg de proteína, respectivamente. Estas médias demonstraram atividade levemente superior à média do grupo controle de 15,65 U GST/min.mg de proteína (Figura 25A). A exposição por 24 horas ao naftaleno não apresentou qualquer tendência entre os diferentes grupos quanto à alteração de atividade da enzima glutationa-*S*-transferase (Figura 25B).

Na figura 25C podemos observar que os grupos expostos por 48 horas às duas maiores concentrações de naftaleno apresentaram média de atividade moderadamente superior à do grupo controle. O grupo controle apresentou

média de atividade de 6,60 U GST/min.mg de proteína enquanto os grupos expostos aos 2,7 µM e 8,1 µM de NAP apresentaram médias de 10,60 e 13,15 U GST/min.mg de proteína, respectivamente. A atividade de glutationa nos peixes expostos ao NAP após o período de 96 horas apresentou médias superiores à do grupo controle, inclusive o grupo DMSO. O grupo controle apresentou atividade média de 6,87 U GST/min.mg de proteína e os demais grupos apresentaram valores superiores a 9,67 U GST/min.mg de proteína que foi a média apresentada pelo grupo em 2,7 µM de NAP.

A exposição ao benzo(a)pireno não revelou diferença significativa de atividade de glutationa-S-transferase em nenhum dos períodos de exposição, apesar de ser observada uma tendência à diminuição da sua atividade relacionada ao aumento da concentração de BAP após a exposição de 12 horas (Figura 26A). A maior concentração de 8,1 µM de BAP após a exposição de 24 horas também revelou uma atividade média reduzida de 7,50 U GST/min.mg de proteína em relação ao grupo controle que apresentou média de 10,30 U GST/min.mg de proteína (Figura 26B).

Após o período de exposição de 48 horas todos os grupos, inclusive o grupo em DMSO, apresentaram média de atividade de glutationa elevada em relação ao grupo controle no qual foi observada média de 6,60 U GST/min.mg de proteína. Apesar de não ser significativo, o resultado dos outros grupos para esse período foram superiores a 8,33 U GST/min.mg de proteína, média apresentada pelo grupo 2,7 µM de BAP (Figura 26C). A exposição por 96 horas mostrou tendência ao aumento da atividade enzimática somente nos grupos DMSO e 0,9 µM de BAP em relação ao grupo controle. As médias observadas foram de 14,43 e 10,97 U GST/min.mg de proteína para os grupos DMSO e 0,9 µM de BAP, respectivamente, enquanto a média apresentada pelo grupo controle foi de 6,87 U GST/min.mg de proteína (Figura 26D).

Não houve diferenças significativas, em relação às atividades da enzima, entre os grupos expostos por 12 a 96 horas nas mesmas concentrações de poluentes.

V. Discussão

As atividades humanas têm provocado, ao longo dos anos, grandes impactos ambientais. O crescente desenvolvimento industrial, urbano e agrícola tem levado a um aumento considerável da produção de resíduos que são dispostos no ambiente, expondo os seres vivos a ações de numerosos agentes potencialmente tóxicos, que podem provocar efeitos fisiológicos, bioquímicos, patológicos e genéticos (ARNAIZ, 1995).

A vantagem de utilizar peixes para a avaliação da toxicidade de diferentes substâncias é a facilidade com a qual os teleósteos, especialmente peixes de pequeno porte, podem ser manuseados e expostos a compostos químicos tóxicos, em laboratório. Os peixes respondem aos poluentes de maneira similar aos vertebrados superiores, portanto, eles podem ser utilizados para investigar compostos químicos que têm o potencial de causar efeitos teratogênicos e carcinogênicos em seres humanos (AL-SABTI; METCALFE, 1995).

Os critérios de escolha das espécies mais adequadas para testes ecotoxicológicos são: o conhecimento da biologia da espécie como os mecanismos de reprodução, ciclo de vida, metabolismo, alimentação, comportamento e sensibilidade a fatores bióticos e abióticos. As espécies também devem ter ampla ocorrência, distribuição e abundância. Devem ser de fácil manuseio e coleta, apresentar respostas claras, estarem disponível ao longo do ano, ter importância ecológica e econômica e homogeneidade tanto morfológica quanto fisiológica dos organismos. Os testes utilizados com os organismos devem ser de fácil realização, não onerosos e que necessitem de poucos equipamentos (ZAMBONI, 1993; MASTROTI, 1997).

O naftaleno e o benzo(a)pireno têm importantes diferenças estruturais e moleculares – NAP possui 2 anéis de benzeno e BAP possui 5 – determinantes dos seus efeitos biológicos. HPAs de baixo peso molecular, com dois ou três anéis de benzeno, possuem em geral menor portencial tóxico do que HPAs de alto peso molecular, com quatro ou mais anéis, mas a sua solubilidade, e como resultado, sua biodisponibilidade, é usualmente muito maior (GESTO et al., 2009). NAP e BAP possuem efeitos genotóxicos e carcinogênicos (BAGCHI et al., 1998; REYNAUD; DESCHAUX, 2006) e podem induzir estresse oxidativo causando a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) (BAGCHI et al., 2002).

As respostas biológicas a contaminantes ambientais podem se manifestar em vários níveis de organização, desde o molecular, no qual a integridade genética e os processos subcelulares são avaliados, até o ecossistêmico, no qual a dinâmica e estrutura das cadeias alimentares podem ser afetadas (ADAMS et al., 1990).

Agentes físicos, como por exemplo, a radiação solar, raios-X, e uma variedade de compostos químicos, como os diversos poluentes orgânicos e inorgânicos, podem causar danos ao DNA de células vivas. Caso estas lesões ao DNA não sejam reparadas elas podem iniciar uma cascata de conseqüências biológicas ao nível celular, dos órgãos, o animal por inteiro e finalmente ao nível de população e comunidade (LEE; STEINERT, 2003).

Cinco peixes por grupo foram utilizados para estudar os efeitos dos poluentes orgânicos como resultado do balanço entre os requesitos estatísticos e o menor número de animais sacrificados necessários para atingir os objetivos propostos. Este número amostral para estudos em peixes é recomendado por inúmeros pesquisadores (AHMAD et al., 2005).

No ensaio cometa, para a interpretação dos resultados, o “cometa” é dividido em duas partes: cabeça e cauda. Assim, células sem ou com pouco dano no DNA, após a eletroforese, tornam-se cometas sem cauda e o material genético tem formato arredondado, permanecendo similares aos nucleóides, enquanto células com mais danos apresentam caudas maiores e o material genético mais disperso, como um cometa. As vantagens do ensaio cometa

incluem a rapidez e simplicidade de execução, a análise dos dados ao nível de células individuais, o uso de pequena quantidade de células e sua aplicabilidade a praticamente qualquer população de células de organismos eucariotos.

A eletroforese é a parte crucial do teste, pois pode modular a quantidade do DNA na cauda de cada cometa. Baseando-se em outros testes do laboratório com peixes como o robalo (DI PAOLO, 2006) e peixes antárticos (GOMES et al., dados não publicados), foram pré-selecionadas, para adaptação da metodologia do ensaio cometa para eritrócitos de pampos, as voltagens de 0,72, 0,80 e 0,88 V/cm.

A presença de cometas muito arredondados após a eletroforese de 0,72 V/cm pode indicar baixa voltagem, não suficiente para formar cometas conforme o dano ao DNA. Quanto maior a voltagem utilizada, o DNA das células pode ser carregado pela corrente o que induz cometas maiores. Cometas com caudas muito extensas foram observados na voltagem de 0,88 V/cm.

Acredita-se que a capacidade que o DNA tem de migrar é função tanto do tamanho dos seus fragmentos como da quantidade de extremidades livres (quebras, por exemplo) que, mesmo ligadas a segmentos maiores, migram numa distância pequena do corpo do cometa. O tamanho da cauda inicialmente aumenta de maneira proporcional à quantidade de danos, mas a migração máxima é determinada pelas condições da eletroforese, não pelo tamanho dos fragmentos. A cauda em relação ao corpo do cometa fornece informações sobre a quantidade de quebras do DNA. Assim, pode-se avaliar o dano genético tanto através da medida do comprimento da cauda do cometa como pela quantidade de DNA presente, estando ambas relacionadas com as doses de exposição (SINGH et al., 1988; FAIRBAIRN et al., 1995).

O benzo(a)pireno é considerado genotóxico, mutagênico, carcinogênico e teratogênico para muitas espécies (AL-SABTI, 1986; METCALFE, 1988; ANNAS et al., 2000). A genotoxicidade do naftaleno é questionável, apesar de terem sido observadas algumas alterações genotóxicas induzidas por este HPA em peixes (PACHECO; SANTOS, 2001; GRAVATO; SANTOS, 2002a; TELES

et al., 2003). Muitos estudos reportam a toxicidade do naftaleno, entretanto, poucos trabalhos estudaram a genotoxicidade deste composto (GRAVATO; SANTOS, 2002a). Concentrações de 0,005 a 66.000 µg/mL são detectadas em ambientes aquáticos segundo a ATSDR (1995). Sturchio e colaboradores (2006) detectaram a genotoxicidade de amostras de solo contendo NAP segundo o ensaio cometa e teste de micronúcleo em células de raízes de uma planta leguminosa. Pacheco e Santos (2002) não constataram potencial genotóxico de NAP em exposições de longo prazo, de 3 a 9 dias, e recomendaram estudos de toxicidade/genotoxicidade desta substância com duração inferior a 3 dias para aferir tal potencial em peixes.

A coloração por prata para análise de cometas é utilizada como uma boa alternativa e demonstra alta sensibilidade para o ensaio cometa, ao invés da técnica tradicionalmente usada com brometo de etídio. Algumas vantagens são: a análise é feita em microscópio óptico comum, o método apresenta baixo custo, o composto utilizado é menos tóxico para o manipulador e a coloração do material mantém-se estável por período prolongado (NADIN et al., 2001).

A maioria dos programas de análise de imagem, disponíveis para análise de cometas, foram desenvolvidos para a coloração com compostos fluorescentes como o brometo de etídio. O desenvolvimento de novos protocolos de coloração ofereceu novas oportunidades para desenvolvimento do ensaio cometa sem a necessidade da utilização de microscópios fluorescentes (GARCIA et al., 2007). Os mesmos autores modificaram o protocolo de coloração por prata para obter um bom contraste entre a cabeça e a cauda do cometa. As adaptações da metodologia de coloração, como modificação do tempo de coloração também adaptado neste estudo, possibilitaram o reconhecimento pelos softwares das duas partes do cometa para mensuração dos diferentes parâmetros como porcentagem de DNA na cabeça e cauda, momento de cauda, momento de Olive e comprimento da cauda.

A análise de dano genotóxico utilizando o parâmetro de momento de cauda e comprimento de cauda são as mais comumente relatadas por diversos autores, mas também é recomendada a análise de porcentagem de DNA na

cauda. A porcentagem de DNA na cauda dos cometas é considerada eficiente para a análise, pois apresenta maior amplitude de detecção que o comprimento da cauda, ou seja, pode continuar a aumentar mesmo depois que o comprimento da cauda atinge o seu valor máximo (OLIVE et al., 1990). A porcentagem de DNA fornece uma clara indicação da aparência dos cometas além de estar linearmente relacionada com a freqüência de quebra do DNA (HARTMANN et al., 2003).

O momento de cauda é um parâmetro calculado pela maioria dos softwares de análise de imagem disponíveis para avaliação do ensaio cometa. Esta avaliação não se restringe a cometas com morfologia regular e bordas contíguas e, portanto, trata-se de um parâmetro robusto para análise (KENT et al., 1995).

As condições da técnica foram adaptadas, inclusive o tempo de relaxamento das moléculas de DNA. Quanto maior o tempo de exposição à solução alcalina (pH > 13), maior será o relaxamento e a expressão de sítios álcali-lábeis do DNA. A adequação do ensaio é necessária para que um mínimo de DNA migre da cabeça para a cauda do cometa nos controles em PBS e nas menores concentrações de peróxido de hidrogênio. Conforme recomendado por Tice e colaboradores (2000), é necessário o estabelecimento de condições ótimas de eletroforese de tal modo que cometas de controles apresentem mínima migração, facilitando que as informações geradas possibilitem a avaliação de variabilidade entre experimentos de um laboratório.

O peróxido de hidrogênio é comumente utilizado como substância genotóxica padrão em exposições *in vitro*. As exposições *in vitro* ao peróxido de hidrogênio nos permitem definir o protocolo ideal a ser aplicado ao ensaio cometa de eritrócitos de pampos. Esta substância provoca danos oxidativos ao DNA, que compreendem danos a bases e grupos de açúcar-fosfato; e quebras de fita dupla e de fita simples. A exposição do DNA a estresse oxidativo leva a mais de 20 tipos de danos de bases de nitrogênio (SLUPPHAUG et al., 2003).

Os resultados obtidos permitiram definir como adequados, para a avaliação do potencial genotóxico de NAP e BAP em *T. carolinus* nas condições experimentais testadas, um tempo de relaxamento de 10 minutos e

eletroforese de 0,80 volts por centímetro durante 20 minutos. A coloração por prata, baseada no método descrito por García e colaboradores (2004), também se mostrou eficaz para a análise do dano provocado no DNA dos cometas de eritrócitos.

O grupo exposto ao DMSO, após o maior período de exposição de 96 horas, apresenta maior dano no DNA em relação ao controle, apesar de este não ser significativo segundo análise do momento de cauda. O aumento do momento de cauda neste grupo indica uma ação prejudicial nas células do composto utilizado como solvente, devido à exposição prolongada. Outros trabalhos realizados no laboratório com o emprego de DMSO como solvente também revelaram danos ao material genético de robalos da espécie *Centropomus parallelus* expostos a este solvente (DI PAOLO, 2006). O momento de cauda dos cometas de algas *Dunaliella tertiolecta* expostas ao DMSO foi significativamente mais alto que o momento de cauda dos controles nas exposições mais longas realizadas por Ussami (2007). Apesar de conferir algum efeito genotóxico aos eritrócitos, diversos estudos de genotoxicidade utilizaram o DMSO como solvente de compostos derivados de petróleo e não observaram genotoxicidade devido à utilização deste composto (NIGRO et al., 2002; PACHECO; SANTOS, 2002; GRAVATO; SANTOS, 2002a; 2002b; TELES et al., 2003; 2004; AHMAD et al., 2006; GRAVATO et al., 2006).

Gravato e Santos (2002b) reportaram que o DMSO dissolvido em água em concentração de 0,0014%, concentração semelhante à utilizada neste trabalho, não possui efeitos citogenotóxicos ou tóxicos em peixes da espécie *Dicentrarchus labrax*. Devido a resultados que evidenciam a ausência de toxicidade do DMSO, muitos autores passaram a utilizar grupos controle sempre expostos a este solvente, sem comparar os resultados com um grupo controle em água limpa como, por exemplo, os trabalhos de Gravato e Santos (2002a; 2002b) e Teles e colaboradores (2003). Os resultados obtidos neste estudo, sobre os efeitos do DMSO, segundo a análise realizada com diferentes biomarcadores, indica que são necessários estudos sobre a toxicidade deste composto nas diferentes espécies de peixes. Apesar de muitos resultados não serem significativos, o DMSO pode ser o responsável por alterações em processos biológicos de *T. carolinus.*

A maior concentração de NAP de 8,1 µM foi a única que revelou ser genotóxica para os pampos e a partir de curtos períodos de exposição, como o de 12 horas. A genotoxicidade conferida pelo composto pode estar relacionada com o baixo peso molecular do poluente que entra mais facilmente nas células, causando dano ao DNA.

O parâmetro do momento de cauda, ou tail moment, revelou ser mais sensível para avaliação da genotoxicidade do BAP nos eritrócitos, conferindo resultados significativos de dano desde a menor concentração utilizada de 0,9 µM. O BAP causou dano significativo ao DNA das células a partir do período de 24 horas. Provavelmente a concentração de BAP empregada tenha sido elevada para a espécie e por isso o grau de dano detectado foi, de maneira geral, alto em todas as concentrações utilizadas não revelando diferenças significativas quando comparadas as diferentes concentrações. Gravato e Santos (2002a) também observaram efeitos tóxicos e mutagênicos em peixes da espécie *Dicentrarchus labrax* quando testadas concentrações entre 0,1 µM e 2,7 µM de BAP e em curtos períodos de exposição de 2 a até 8 horas.

Cinqüenta porcento do dano no DNA revelado pelo ensaio cometa pode ser eficientemente repado em 15 minutos e completamente reparado em cerca de uma a duas horas (SINGH et al., 1994). Devido ao eficiente mecanismo de reparo do DNA, as lesões detectadas pelo ensaio cometa não são permanentes. Muitos estudos utilizam a análise de dano ao DNA através do ensaio cometa junto com o teste de micronúcleos para avaliação de efeitos genotóxicos utilizando peixes como bioindicadores (BELPAEME et al., 1996). O teste de micronúcleos é uma técnica relativamente simples que detecta o resultado de quebras cromossômicas e é utilizado para avaliar o efeito citogenotóxico e, principalmente, mutagênico de compostos químicos. Micronúcleos são formados, durante a divisão celular, pela condensação de fragmentos de cromossomos ou cromossomos inteiros que não são incluídos no núcleo principal (AL-SABTI; METCALFE, 1995).

Buschini e colaboradores (2004) observaram um aumento na freqüência de micronúcleos em carpas da espécie *Cyprinus carpio* em função do aumento do tempo de exposição dos peixes em águas tratadas com desinfetantes para

potabilidade. Em estudos realizados por Vanzella e colaboradores (2007) as maiores freqüências de micronúcleos foram observadas após períodos de exposição de 24 e 96 horas. Considerando o ciclo celular dos peixes, os mesmos autores recomendaram estudos do potencial mutagênico de poluentes em períodos de 24 horas, pois neste perído as lesões celulares que ocorrem não serão mais reparadas, apresentando estas, portanto, micronúcleos.

A freqüência de micronúcleos em exposições subcrônicas e crônicas de peixes a poluentes tende a diminuir após períodos de 15 ou 21 dias (CAMPANA et al., 1999; LEMOS et al., 2001; ÇAVAS; ERGENE-GOZUKARA, 2005). Após períodos prolongados de exposição a substâncias tóxicas, alta proporção de células apoptóticas são reportadas em peixes expostos a efluentes de indústrias de refinaria de petróleo (FRENZILLI et al., 2004) e ocorre a contínua renovação de eritrócitos, eliminando rapidamente as células danificadas do organismo (FLORA et al., 1993).

Embora originalmente desenvolvido para aplicação em mamíferos, o método foi posteriormente modificado para utilização em peixes por Hooftman e de Raat (1982). Estudos foram realizados com diferentes espécies de peixes como, *Anguilla Anguilla* (PACHECO; SANTOS, 1997; 2001), *Dicentrarchus labrax* (GRAVATO; SANTOS, 2002a) e *Oncorhynchus mykiss* (AYLLON; GARCIA VAZQUEZ, 2001).

Uma de suas vantagens é que ele pode ser aplicado a qualquer população de célula proliferativa e uma vez que os eritrócitos dos teleósteos são nucleados, estas células têm sido muito utilizadas como material para este ensaio. Além dos micronúcleos, alguns autores observam também outras anormalidades nucleares eritrocitárias para avaliar efeitos de exposição a poluentes. Em peixes, há vários tipos de lesões nucleares cuja origem ainda não foi compreendida. Basicamente, elas foram classificadas como reniformes, lobadas e segmentadas, em adição ao micronúcleo típico.

A anormalidade nuclear eritrocitária mais freqüentemente observada neste estudo, do tipo reniforme, e a menos freqüente em pampos, do tipo segmentada, também foram observadas nos estudos de monitoramento

ambiental realizado na Antártica por nosso grupo (PHAN et al., 2007; Campos, 2007).

Diversos estudos descreveram a presença de anormalidades nucleares, além do micronúcleo, em células de peixes expostos a substâncias genotóxicas e mutagênicas (CARRASCO et al., 1990; PACHECO; SANTOS, 1996; GRAVATO; SANTOS, 2002a). A contagem destas anormalidades nucleares passaram a ser utilizadas para complementar a contagem de micronúcleos em estudos de mutagenicidade (ÇAVAS; ERGENE-GOZUKARA, 2005). Embora os mecanismos envolvidos na formação dessas anormalidades não estejam completamente compreendidos, vários trabalhos indicam a sua indução em resposta à exposição a agentes genotóxicos. Ayllon e Garcia-Vazquez (2000) observaram anormalidades eritrocitárias em *Phoxinus phoxinus* após tratamento com colchicina, mitomycin-C e ciclofosfamida. O teste de micronúcleos também foi amplamente utilizado para estudos de toxicidade/mutagenicidade em diversas espécies de peixes como, por exemplo: *Phoxinus phoxinus* (AYLLON; GARCIA-VAZQUEZ, 2000), *Oncorhynchus mykiss* (AYLLON; GARCIA-VAZQUEZ, 2001), *Anguilla Anguilla* (PACHECO; SANTOS; 2002), *Dicentrarchus labrax* (GRAVATO; SANTOS, 2002a), *Cyprinus carpio* (BUSCHINI et al., 2004), *Trematomus newnesi* (PHAN et al., 2007), *Prochilodus lineatus* (VANZELLA et al., 2007) e *Oreochromis niloticus* (HOSHINA et al., 2008).

Muitos trabalhos relataram a indução de micronúcleos e de anormalidades nucleares eritrocitárias por HPAs em peixes. Alguns agentes mutagênicos-clastogênicos reconhecidamente induzem a formação de micronúcleos como benzo(a)pireno, mitomycin C, DDTs e PCBs, mercúrio e outros (METCALFE, 1988; CARRASCO et al., 1990; WILLIANS; METCLAFE, 1992; AL-SABTI, 1994).

Neste estudo, assim como os resultados de citogenotoxicidade obtidos no ensaio cometa, além do BAP, composto reconhecidamente mutagênico, o NAP causou a formação de micronúcleos, demonstrando ser mutagênico para a espécie *Trachinotus carolinus*. O NAP, na maior concentração utilizada, causou a formação significativa de micronúcleos nos eritrócitos desde o menor

período de exposição de 12 horas. Conforme o maior período de exposição, aumentam as freqüências de anormalidades nucleares eritrocitárias observadas, evidenciando a atuação do composto como mutagênico dependendo da concentração e do período de exposição.

A alta mutagenicidade do BAP foi constatada pelas maiores freqüências de micronúcleos e anormalidades nucleares eritrocitárias desde curtos períodos de exposição aumentando significativamente até o período de 96 horas. Assim como o NAP, a exposição ao BAP provocou alterações cromossômicas relacionadas com o período de exposição.

As alterações morfológicas nos tecidos de brânquias e fígados dos peixes demonstram ser um excelente biomarcador dos efeitos dos contaminantes e períodos de exposição aos mesmos. Foi identificada uma grande variedade de lesões nos peixes, principalmente naqueles expostos aos poluentes, porém, nem todos os danos provocados nos tecidos se mostraram severos.

A diferença significativa de alterações morfológicas entre os grupos controle e DMSO revelou que, apesar de não serem lesões severas e ocorrerem em baixa intensidade, o DMSO pode causar pequenas alterações nos tecidos de *T. carolinus*.

A presença de parasitas mesmo em grupos controle e DMSO demonstra a ocorrência destes organismos nos animais selvagens e a exposição ao poluente revela um aumento da susceptibilidade à esta infestação, proporcional ao período das exposições. Nas maiores concentrações de poluente ocorre um aumento da infestação por parasitas, a partir de 24 horas de exposição. No maior período de exposição, todas as concentrações de poluentes e o grupo DMSO, apresentam brânquias infestadas por parasitas, evidenciando novamente, o possível efeito do tempo de exposição e do DMSO. A exposição de peixes a poluentes causa a diminuição na atividade fagocitária celular e suprime o sistema imunológico, aumentando significativamente a abundância e prevalência de ectoparasitas (MOLES; WADE, 2001). Schreck (1996) observou que a exposição crônica a contaminantes resulta em uma excessiva secreção de muco, o que também ocorreu neste estudo, provendo um habitat adequado

para a reprodução de parasitas e provavelmente suprimindo a resposta imune simultaneamente.

Khan (2004) observou o aumento em ocorrência e abundância de parasitas em peixes associado a longos períodos de exposição a poluentes em ambientes contaminados, coincidindo com o aumento de alterações patológicas nos tecidos de peixes. Este autor relatou que existe uma forte evidência de que mudanças na infestação por parasitas nos tecidos podem ser usadas como um biomarcador adicional para observação de efeitos relacionados ao estresse em peixes expostos a contaminantes.

O período de exposição aos contaminantes foi determinante, de maneira geral, na intensidade e severidade das lesões observadas nos pampos. A exposição por tempos maiores aos poluentes é responsável pelo aumento da severidade ou ocorrência de patologias nos tecidos principalmente com o aparecimento de lesões severas como a necrose de tecido branquial.

Alterações leves nos tecidos, proporcionais em intensidade e ocorrência à concentração do poluente e do tempo experimental, podem ser consideradas medidas compensatórias nos tecidos dos organismos para minimizar o contato direto com o poluente. O deslocamento de células epiteliais é conhecido como um mecanismo de defesa que aumenta a distância entre o sangue e a água contaminada (SCHWAIGER et al., 2004). Outros mecanismos de defesa para redução da área superficial em contato com os poluentes foram observados proporcionalmente ao aumento da concentração e tempo de exposição como a hiperplasia do epitélio respiratório e a fusão de lamelas secundárias. Apesar dessas alterações não serem respostas específicas de exposição a poluentes orgânicos (SCHWAIGER et al., 1997; MARTINEZ et al., 2004), podem afetar a saúde do animal por causar também uma redução nas trocas gasosas devido à redução da área superficial.

O BAP se revelou prejudicial aos organismos conferindo maior ocorrência de necrose no tecido branquial dos indivíduos no maior período de exposição. A necrose é um efeito tóxico direto do poluente ao organismo que leva a degeneração celular, ao contrário de outras histopatologias consideradas como um efeito compensatório (MALLATT, 1985; BHAGWANT;

ELAHEE, 2002). Alterações degenerativas em brânquias e fígados de peixes estão fortemente relacionadas com exposição a hidrocarbonetos derivados de petróleo (MYERS et al., 1987) e são reconhecidas como biomarcadores sensíveis de exposição a contaminantes (HINTON; LAUREN, 1990). Ortiz-Delgado e Sarasquete (2004) constataram alterações degenerativas como picnose nuclear, vacualização e necrose em tecidos de larvas de *Sparus aurata* tratadas com BAP. Larvas da mesma espécie expostas a concentrações de BAP de 0,56 e 1,0 µg l^{-1} apresentaram várias desordens histopatológicas, as quais aumentaram progressivamente durante o desenvolvimento larval.

Apesar de não ser progressivo em relação ao período de exposição, o NAP mostrou um dano intenso nas brânquias dos animais desde o período de 24 horas. Provavelmente as alterações causadas nos tecidos estão relacionadas com o baixo peso molecular da substância em comparação ao BAP possuindo, portanto, maior facilidade de ultrapassar as membranas celulares e causar danos precocemente.

Estudos realizados com brânquias de *Prochilodus lineatus* expostos a fração de diesel solúvel em água demonstraram a ocorrência de diversificadas alterações histopatológicas (SIMONATO et al., 2008). Algumas dessas alterações foram consideradas adaptativas, uma vez que estas protegem o organismo da entrada de xenobióticos. Aneurisma, entretanto, representa uma lesão que resulta da ruptura de células pilares e, portanto, corresponde a um efeito deletério no tecido branquial. Khan (2000) também encontrou hiperplasia lamelar e interlamelar e deslocamento epitelial nas brânquias de linguados coletados próximos a uma refinaria de petróleo. Este autor sugeriu que as lesões encontradas estavam relacionadas com derrames de óleo. Devido à presença de poluentes orgânicos, o mesmo autor observou nas brânquias alterações como hiperplasia e hipertrofia do epitélio lamelar resultando em fusão e aumento na produção de muco.

As lesões severas em fígado de pampos no maior período de exposição também refletem o efeito das exposições crônicas aos poluentes nas alterações provocadas nos tecidos. A presença de leucócitos em muitos animais expostos a poluentes claramente indica uma reação inflamatória,

refletindo uma resposta imunológica de peixes aos contaminantes (TAO et al., 2000).

Numerosos linfócitos e leucócitos observados ao redor de vasos sangüíneos no fígado, além de diversas alterações degenerativas em hepatócitos caracterizaram a hepatite em muitos indivíduos expostos aos contaminantes. A hepatite se revelou extremamente associada à concentração de poluente com danos progressivos e proporcionais ao aumento da dose e tempo de exposição. A cirrose, resultante de proliferação de tecido conectivo no estroma, foi observada principalmente nos tecidos de peixes expostos às maiores concentrações de NAP e BAP e no maior período de 96 horas. A presença dessas lesões, hepatite e cirrose hepática, caracterizou a toxicidade dos poluentes nas maiores concentrações e após a exposição mais prolongada. Resultados de estudos histopatológicos em peixes selvagens demonstraram uma boa relação entre exposição crônica e subletal a HPAs e a ocorrência de tumores no fígado e outras lesões neoplásicas neste órgão (MYERS et al., 1987; 1988; SCHIEWE et al., 1991; ARCAND; METCALFE, 1995).

O presente estudo, entretanto, avaliou os efeitos de exposições agudas e altas doses de poluentes. As alterações histopatológicas no tecido do fígado aparentam ser de natureza não específica. Alterações hepáticas similares foram reportadas em tratamentos agudos de peixes com vários tipos de estressores incluindo exposição a pesticidas (BHATTACHARYA et al., 1975; WALSH; RIBELIN, 1975; DUTTA et al., 1993), variações de temperatura (BRAUNBECK et al., 1987), inanição (SEGNER et al., 1994) ou nutrição inadequada (DEPLANO et al., 1989; BRAUNBECK; SEGNER, 1992). Estas alterações inespecíficas podem resultar parcialmente de estresse relacionado às alterações na circulação ou metabolismo, porém, alguns fatores específicos de exposição a HPAs e sua bioativação podem estar envolvidos (ORTIZ-DELGADO et al., 2007).

O fígado pode ser considerado órgão-alvo e de grande importância para os peixes, devido à sua participação nos processos de transformação e excreção de xenobióticos. Portanto, o fígado pode ser estudado em

monitoramentos ambientais devido à sua alta sensibilidade a contaminantes (THOPHON et al., 2003). Alterações em sua estrutura podem ser significativas na avaliação da saúde de peixes (MYERS et al., 1987).

No estudo de Simonato e colaboradores (2008) os peixes expostos à fração solúvel de diesel apresentaram diversas alterações hepáticas como aumento no volume celular e nuclear, indicativas de respostas aos agentes agressores, uma vez que implicam ativação funcional deste órgão. Outras lesões como degeneração celular e nuclear representam lesões que podem culminar no compromisso do órgão, correspondendo ao dano no tecido, causado pela exposição a xenobióticos. Análise quantitativa de lesões hepáticas demonstraram que animais expostos a compostos derivados de petróleo apresentam o fígado extremamente afetado por alterações severas.

As técnicas de histoquímica empregadas revelaram alterações nos grupos expostos ao DMSO em relação aos grupos controle em água limpa e após todos os períodos de exposição. Apesar de nem sempre serem significativas, o grupo em DMSO apresentou diferenças quanto à reação da coloração por azul de bromofenol, revelando pequena alteração protéica nas células sangüíneas de brânquia de alguns indivíduos.

O grupo DMSO, em 48 horas de experimento, apresentou redução de glicogênio no citoplasma dos hepatócitos e alterações na ocorrência e intensidade de células mucosas das brânquias em relação ao grupo controle, indicando uma ação levemente tóxica do DMSO nos tecidos dos indivíduos neste período. A toxicidade deste diluente pode ser evidenciada pela inibição da atividade das células mucosas e o incremento de vacúolos lipídicos no mesmo grupo. Apesar de não ser significativo em relação ao grupo controle, o acúmulo de lipídios e a diminuição do glicogênio no fígado podem prejudicar as atividades metabólicas desempenhadas pelos hepatócitos (SANTOS et al., 2004).

O azul alcian pH 2.5 cora mucosubstâncias ácidas e mucinas acéticas. Certas quantidades de mucosubstâncias ácidas não fosfatadas ocorrem normalmente na parede dos vasos sanguíneos, mas normalmente aumentam em regiões de arteriosclerose precoce (BANCROFT; STEVENS, 1982). Neste

estudo nenhuma alteração significativa de coloração por azul alcian foi detectada e, portanto, nenhuma patologia associada ao tecido revelada por esta técnica e provocada pela exposição aos poluentes, seja em relação à dose ou período.

Considerando o tempo de experimento e seus efeitos em grupos controle, podemos notar que houve fraca reação ao PAS e Carmin the best nos grupos do período de 96 horas para a coloração de células mucosas de brânquia e citoplasma dos hepatócitos. Esta redução de reação positiva às técnicas no maior período experimental pode indicar um efeito do estresse do cativeiro aos organismos com a diminuição de atividade das células mucosas, tendo em vista que lesões não foram identificadas segundo análise morfológica.

A partir do menor período de exposição de 12 horas e nas maiores concentrações de ambos os poluentes, o citoplasma dos hepatócitos não apresentou resposta ao PAS revelando a diminuição do glicogênio no fígado. São comumente relatadas proliferações de células mucosas e epiteliais basais em brânquias de organismos expostos a poluentes orgânicos (SPIES et al., 1996), entretanto a alta proporção de células em processo degenerativo identificadas neste estudo pode ser a causa de redução de resposta positiva à técnica do PAS e Carmin the best nas maiores concentrações de poluentes.

Os poluentes demonstraram alterar a freqüência de células mucosas de brânquias coradas por PAS e Carmin *the best* e a coloração ou freqüência de glicogênio no fígado desde o menor tempo de exposição. Entretanto, conforme o aumento do período de exposição aos poluentes não foram reveladas diferenças nas freqüências e intensidade de coloração destes tipos celulares. Este resultado pode evidenciar a alta toxicidade dos poluentes mesmo em exposições de curta duração, ou a utilização de concentrações elevadas para a espécie. Desde o período de 24 horas as duas menores concentrações de ambos os poluentes revelaram um aumento na ocorrência de glicogênio no fígado e de células mucosas de brânquias nos peixes expostos ao NAP. A hipersecreção de muco é considerada uma resposta de defesa a contaminantes (MALLATT, 1985). As células mucosas contêm mucinas, e

compostos com glicoproteínas que capturam os poluentes e auxiliam a prevenir a entrada do composto tóxico no epitélio respiratório (PERRY; LAURENT, 1993). Apesar de a proliferação de células mucosas ser benéfica para reduzir a entrada dos poluentes, aumenta a distância para as trocas gasosas nas lamelas secundárias.

A atividade de CYP1A foi previamente detectada, segundo análise imunohistoquímica, em brânquias e fígados de peixes coletados em áreas com predominância de compostos com características químicas semelhantes ao naftaleno (SPIES et al., 1996) e em estudos realizados com exposição de peixes ao BAP (VAN VELD et al., 1997; ORTIZ-DELGADO et al., 2005). Os estudos realizados com a espécie *T. carolinus* corroboram com os realizados por Ortiz-Delgado e colaboradores (2005) que observaram em peixes de zona de arrebentação expostos em laboratório ao BAP um aumento de reação de anticorpos específicos ao citocromo CYP1A, segundo análises imunohistoquímicas.

O método imunohistoquímico tem a vantagem de identificar a indução de CYP1A em diferentes tipos celulares de órgãos específicos e essa informação pode ser crucial revelando a rota de incorporação, acumulação, distribuição, metabolismo e ação tóxica dos compostos poluentes (SARASQUETE; SEGNER, 2000).

Uma clara resposta de indução de CYP1A, determinada pelo método de imunohistoquímica, foi observada nos pampos tratados com NAP e BAP. Nem sempre houve relação de resposta conforme o tempo de exposição, porém no maior período é observada a atividade de CYP1A em praticamente todos os tipos celulares de brânquias. Em vasos sangüíneos, principalmente em exposição ao BAP, a especificidade revela-se elevada desde os menores períodos de exposição assim como no trabalho de Ortiz-Delgado e Sarasquete (2004) que identificaram imunoreatividade de CYP1A no sistema vascular hepático de larvas de peixes expostas ao BAP. A especificidade imunohistoquímica de CYP1A neste estudo foi dose-dependente e evidenciada principalmente nos maiores períodos experimentais.

A localização e indução de CYP1A em endotélio vascular têm sido reportadas para um considerável número de espécies de teleósteos (MILLER et al., 1988; STEGEMAN et al., 1991; LINDSTROM-SEPPA et al., 1994; HUSOY et al., 1994; SMOLOWITZ et al., 1997; SCHLEZINGER; STEGEMAN, 2000; ORTIZ-DELGADO et al., 2005). Como em muitos casos o endotélio é um tecido reduzido, a imunohistoquímica parece ser uma ferramenta mais apropriada do que as medidas bioquímicas ou moleculares de homogenados de um tecido inteiro para se estudar resposta específica de CYP1A e a revelação do xenobiótico como seu indutor no órgão de estudo.

Apesar de nem sempre significativa, foi identificada, neste estudo, uma relação entre a imunoreatividade de CYP1A e a concentração de poluentes dentro de um mesmo período experimental. Em uma revisão sobre o uso de CYP1A como biomarcadores de exposição a poluentes em peixes, a indução do citocromo foi significativamente relacionada com o nível de contaminação na maioria dos estudos na natureza (BUCHELI; FENT, 1995).

O *western blot* é uma técnica que confere informações não somente sobre a ligação antígeno-anticorpo, mas também sobre a migração em eletroforese dos diferentes antígenos em uma amostra. A técnica de *western blot* evidenciou a presença de proteínas com o peso molecular característico de CYP1A nos diferentes tecidos dos organismos expostos a ambos os contaminantes. Em geral, CYP1A é um biomarcador útil em estudos ecotoxicológicos, podendo detectar se um determinado composto xenobiótico está biodisponível para os organismos (ANDERSON; FÖRLIN, 1992).

Em pesquisa bibliográfica realizada não foram encontrados trabalhos utilizando imunohistoquímica ou a técnica de *western blot* como ferramenta de investigação dos efeitos de poluentes orgânicos, principalmente, naftaleno e benzo(a)pireno em peixes marinhos de zona de arrebentação do Brasil. Portanto, o uso de tais ferramentas e sua interpretação em peixes marinhos auxiliou na complementação das técnicas utilizadas com a fauna marinha brasileira.

Inicialmente a histologia estava cerceada pela limitada capacidade do microscópio ótico para revelar minúcias dos tecidos. O microscópio eletrônico

ampliou consideravelmente o campo de estudo da histologia, porque é aproximadamente 1000 vezes mais poderoso do que o microscópio ótico. O microscópio eletrônico tem alta resolução e as imagens obtidas mostram riqueza de detalhes (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999).

Segundo a análise em MEV o aumento do volume do tecido ou inflamação deste, revelou a hipertrofia ou hiperplasia das células do tecido, com conseqüente aumento de seu volume ou inflamação. Esta anomalia pode representar um conhecido mecanismo de defesa utilizado para redução do contato direto do tecido com o meio aquático contaminado (SCHWAIGER et al., 2004). Apesar de alterações morfológicas no tecido não afetarem a homeostase osmo-iônica, podem comprometer as várias funções das brânquias e causar distúrbios funcionais nos peixes.

A determinação da atividade enzimática foi estabelecida como parte do diagnóstico clínico há muitas décadas. Em algumas condições patológicas as enzimas secretadas podem estar claramente associadas com a sua origem. O aumento da atividade de catalase induzida por HPAs foi reportado em hepatócitos de trutas por Strmac e colaboradores (2002) e em brânquias de enguias *Anguilla anguilla* expostas por 48 horas à B-naftoflavona por Ahmad e colaboradores (2005).

HPAs têm sido reportados como indutores de estresse oxidativo em várias espécies de peixes (ORBEA et al., 2002; REID; MACFARLANE, 2003; AMADO et al., 2006; JIFA et al., 2006; GRAVATO; GUILERMINO, 2009). Entretanto, os mecanismos de toxicidade e detoxificação de compostos derivados de petróleo e HPAs não são completamente compreendidos e muitas vezes apresentam efeitos distintos ou até mesmo contraditórios em enzimas anti-oxidantes. Por exemplo, foi constatado um aumento na atividade de catalase na espécie *D. labrax* exposta ao BAP (GRAVATO; GUILHERMINO, 2009) e para a espécie *Ictalurus punctatus* coletada em região sujeita a efluentes de indústria de papel (MATHER-MIHAICH; DI GIULIO, 1991), mas não foram observadas alterações em *D. labrax* exposta ao 3-metilcloranteno (3MC) (LEMAIRE et al., 1996).

Neste estudo a atividade da enzima catalase nos pampos, apesar de não ser significativa, demonstrou uma tendência ao seu decréscimo em alguns grupos devido à exposição aos poluentes em relação ao grupo controle. A partir de curto período de exposição como o de 12 horas e na menor concentração de NAP já se nota esse decréscimo indicando uma leve ação do poluente nos processos enzimáticos em baixas dosagens de naftaleno. Um efeito contraditório foi observado em aguns grupos expostos ao NAP nos maiores períodos de exposição e relacionadas às maiores concentrações do poluente.

O período de exposição só teve influência no grupo controle, indicando alterações nos organismos devido ao tempo de confinamento com a redução da atividade de catalase conforme o aumento do período. O grupo em DMSO após 96 horas de exposição, apesar de não apresentar resposta significativa em relação ao grupo controle, revelou elevada atividade enzimática, mais uma vez revelando uma possível influência do composto utilizado como solvente nos processos biológicos dos pampos. A média de atividade de catalase obtida por Salvo (2003) para peixes da espécie *Cyprinus carpio* foi de 307 U CAT/mg de proteína no grupo controle e 238 U CAT/mg de proteína no grupo DMSO. O efeito de aumento da atividade enzimática causado pelo DMSO nos peixes neste estudo pode revelar as diferenças de respostas características de cada espécie.

A ausência de atividade significativa em enzimas anti-oxidativas, incluindo a catalase, também foi observada em *S. senegalensis* expostas à fração solúvel em água de compostos derivados de petróleo (SOLÉ et al., 2008). As diferenças de resposta enzimática relatada por diversos autores pode ser devido à variação de HPAs estudados, que podem responder de maneira contraditória, e as diferenças nos mecanismos de toxicidade e detoxificação entre diferentes espécies de peixes (VIEIRA et al., 2008).

Apesar da tendência de redução da atividade de catalase para *T. carolinus* os dados não mostraram diferenças significativas o que implica que, nas condições experimentais utilizadas, o NAP e BAP não provocaram nenhuma interferência detectável nesta atividade enzimática da espécie.

A conjugação da glutationa provavelmente é uma importante rota de detoxificação do BAP, pelo menos em algumas espécies, pois uma indução da atividade de GST foi observada em peixes expostos a este xenobiótico, incluindo as espécies *Lateolabrax japonicus* (JIFA et al., 2006) e *Dicentrarchus labrax* (GRAVATO; GUILHERMINO, 2009). Entretanto, uma inibição da atividade de GST após exposição ao BAP foi encontrada, por exemplo, em peixes da espécie *Sebasticus marmoratus* (WANG et al., 2006). O papel desta enzima no processo de detoxificação em peixes merece ser melhor estudado comparando as diferentes espécies e diferentes atividades enzimáticas do processo de detoxificação.

Neste estudo, assim como os resultados de determinação da atividade de catalase, a atividade de glutationa-*S*-transferase não revelou diferenças significativas entre os grupos em todos os períodos experimentais e seus respectivos grupos controle. Somente as maiores concentrações de NAP apresentaram uma tendência ao aumento da atividade em relação à do grupo controle.

A indução significativa de GST deveria ser esperada neste estudo devido ao seu envolvimento no processo de detoxificação de xenobióticos orgânicos, principalmente HPAs. Tais resultados foram demonstrados por Teles e colaboradores (2003) em fígado de *A. Anguilla*, por Ahmad e colaboradores (2005) em brânquias de indivíduos da mesma espécie e por Vieira e colaboradores (2008) causada por exposição ao BAP em peixes da espécie *Pomatoschistus microps*.

A exposição ao BAP também não revelou diferença significativa de atividade enzimática em nenhum dos períodos de exposição. Os maiores períodos de exposição apresentaram tendência ao aumento da atividade enzimática em alguns grupos, indicando uma possível indução da enzima de biotransformação somente a partir de períodos mais longos de exposição, superiores a 48 horas.

De maneira geral, a maioria dos peixes de água doce produz urina abundante e diluída de maneira a osmorregular em um ambiente hipo-osmótico, enquanto peixes marinhos tendem a produzir pequenas quantidades

de urina para conservar água em um ambiente hiperosmótico. As diferenças no volume de urina em peixes de água doce e marinhos pode levar à hipótese de que peixes de água doce conseguem depurar maiores quantidades de xenobióticos simplesmente devido ao volume de urina produzido (SEATON; TJEERDEMA, 1996).

Ao nível bioquímico, Simonato e colaboradores (2008), relataram uma ativação de enzimas de biotransformação de fase II em peixes da espécie *Prochilodus lineatus* expostos à fração solúvel em água de diesel, através de um aumento de GST tempo-dependente. Os autores também notaram que as ocorrências de lesões nas brânquias mais severas que no fígado, poderiam levar ao dano funcional de ambos os órgãos, interferindo, portanto diretamente nos processos fundamentais para manutenção da homeostase nos peixes. (SIMONATO et al., 2008). As análises histopatológicas realizadas neste estudo evidenciaram dano severo nos organismos expostos aos poluentes. Os danos ao fígado provocados pelos poluentes podem justificar a ausência de diferença signficativa nas enzimas de biotransformação analisadas.

Amado e colaboradores (2006) também não encontraram diferenças significativas na atividade enzimática de catalase e GST em peixes da espécie *Micropogonias furnieri* coletados em lugares poluídos e não poluídos do estuário da Lagoa dos Patos, no Sul do Brasil. Os outros biomarcadores utilizados pelos autores, como o ensaio cometa e o teste de micronúcleos revelaram diferenças significativas entre os peixes das áreas poluídas e não poluídas e, portanto, demonstraram ser excelentes biomarcadores para o estudo de monitoramento do efeito de poluentes em peixes.

Gowland e colaboradores (2002) observaram que os HPAs com alto peso molecular contendo 5 ou 6 anéis de benzeno em sua molécula possuem papel mais pronunciado do que compostos de baixo peso molecular com 2 a 4 anéis na indução da atividade de GST. Os poluentes orgânicos podem se ligar diretamente à glutationa causando sua inibição. Vieira e colaboradores (2008) observaram, que o antraceno aumenta a atividade de glutationa peroxidase, requerendo glutationa para a reação. Os níveis da molécula de glutationa podem, portanto, não estarem disponíveis o suficiente para a função da GST,

inibindo a enzima por deficiência de glutationa que está sendo usada nos processos de estresse oxidativo.

As concentrações de BAP utilizadas neste estudo podem ser consideradas ecologicamente relevantes, pois concentrações similares foram encontradas em sedimentos, na coluna d'água e organismos de estuários poluídos com produtos petroquímicos. Concentrações de BAP de 667 µg/g foram encontradas em sedimentos na baía de Santander na Espanha (VIGURI et al., 2002). Concentrações de BAP da amplitude de 12,2 a 96,8 µg/L foram encontradas em água intersticial do estuário do rio Jiulong na China (Maskaoui, 2002). Para muitos peixes de águas temperadas são utilizadas as concentrações de 0,1; 0,3; 0,9 e 2,7 µM de NAP e BAP como no trabalho realizado por Gravato e Santos (2002a). Baseado neste trabalho, foram selecionadas as concentrações utilizadas neste estudo que se mostraram ideais para aferir o potencial genotóxico, mutagênico e as alterações provocadas por sua exposição nos tecidos de brânquias e fígados segundo análise histopatológica. Mais estudos são necessários para determinar as concentrações e tempos de exposição em que o NAP e BAP causam estresse oxidativo e ativam as enzimas de biotransformação de forma significativa em peixes da espécie *T. carolinus*.

Trata-se de uma prioridade para as nações em desenvolvimento, o uso de técnicas rápidas de avaliação de poluição para identificação de áreas em risco, onde maiores recursos deveriam ser empregados para melhor detalhamento e solução dos problemas ambientais. Entre essas técnicas estão os biomarcadores, indicados como possíveis mecanismos de avaliação, diagnóstico, controle e prevenção.

O princípio da abordagem de biomarcadores é a análise fisiológica dos organismos ou a resposta bioquímica, quando estes são expostos aos diferentes poluentes. Assim sendo, os biomarcadores representam as alterações biológicas, resultantes das modificações metabólicas celulares, que expressam a exposição e/ou os efeitos tóxicos dos poluentes presentes no ambiente e são usados como indicadores devido a sua sensibilidade. Geralmente mostram os primeiros sinais sub-letais que são detectáveis nesta

situação (KLUMPP et al., 2002; PRINTES; CALLAGHAN, 2002). O uso e análise desses parâmetros em programas de monitoramento são importantes, pois apresentam boa sensibilidade, relativa especificidade e baixo custo de análise (BAINY, 1993; NIYOGI et al., 2001).

Apesar de algumas dificuldades técnicas, os biomarcadores são indicados como instrumentos básicos para avaliação de riscos, em vista de muitas vantagens decorrentes de seu uso na avaliação de poluição ambiental. A identificação de respostas biológicas é possível após exposições agudas, os custos de análise são muito baixos em relação a técnicas convencionais e fornecem informações a respeito do efeito metabólico de contaminantes. São respostas bastante sensíveis à presença de determinados poluentes permitindo, na maioria dos casos, o uso de técnicas não invasivas, tornando possível seguir a evolução de um determinado efeito em um mesmo indivíduo. A utilização de um mesmo indivíduo também assegura a ausência de interferências genéticas ou fenotípicas que representam as variações individuais. A utilização de biomarcadores pode ser extremamente eficiente para o macrozoneamento de regiões sob impacto crônico, cujos efeitos ainda não são perceptíveis.

A utilização de vários biomarcadores como os citogenotóxicos, histopatológicos e bioquímicos utilizados neste estudo com a espécie *T. carolinus,* são uma boa estratégia de biomonitoramento facilitando o entendimento dos mecanismos envolvidos nas respostas tóxicas iniciais em peixes. Para medir os efeitos ecológicos de um poluente é preciso ter em mente dois fatores principais. O primeiro deles é o antecipativo, ou seja, prever como um poluente causará impacto no ambiente, pelo seu destino final e por efeitos biológicos. O segundo é avaliar quais mudanças ocorreram no ecossistema sob a influência da liberação dessas substâncias tóxicas, não somente considerando a fonte de poluição, mas também as propriedades físico-químicas das substâncias tóxicas e determinando as vias de transporte e deposição (CALOW, 1993).

VI. Conclusões

- Foram definidas como ideais, para a avaliação do potencial genotóxico de NAP e BAP nos peixes *T. carolinus* utilizados neste estudo, as condições de ensaio cometa com tempo de relaxamento de 10 minutos e eletroforese de 0,80 volts por centímetro durante 20 minutos.
- O NAP causa dano ao DNA de eritrócitos de pampos em concentrações de 8,1 µM até em curtos períodos de exposição como o de 12 horas. O BAP revelou genotoxicidade a partir da menor concentração utilizada e da exposição de 24 horas.
- O BAP e o NAP induziram a formação de MN e ANE demonstrando, ambos, serem mutagênicos para a espécie *Trachinotus carolinus*. A mutagenicidade é revelada mesmo em curtos períodos de exposição e os poluentes provocam alterações cromossômicas relacionadas com a duração da exposição.
- A diferença significativa de lesões nos tecidos entre os grupos controle e DMSO revelou que, apesar de não ser prejudicial aos peixes, por não serem lesões severas e ocorrerem em baixa intensidade, o DMSO provoca pequenas alterações nas brânquias e fígados de *T. carolinus*.
- O período de exposição aos contaminantes foi determinante, de maneira geral, para a intensidade, a severidade das lesões histológicas e alterações observadas segundo métodos histoquímicos empregados nos tecidos dos peixes. A exposição aos poluentes por tempos prolongados causa aumento da severidade ou da ocorrência de patologias nos tecidos dos peixes, principalmente com o aparecimento de lesões severas como a necrose de tecido branquial.
- A especificidade de CYP1A, observada segundo análise imunohistoquímica, ocorreu de maneira dose-dependente e foi

evidenciada principalmente nos maiores períodos experimentais de exposição aos poluentes.

- Apesar da tendência de redução de atividade da catalase e o aumento da atividade de GST em *T. carolinus,* os dados não mostraram diferenças significativas o que implica que, nas condições experimentais utilizadas o NAP e BAP não provocaram nenhuma interferência detectável nas atividades enzimáticas mensuradas.
- Os biomarcadores citogenotóxicos e histopatológicos utilizados neste estudo demonstraram ser ferramentas eficientes para aferir a toxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade bem como sua relação dose-período na espécie *T. carolinus.*

VII. Referências bibliográficas

ADAMS, S. M.; SHUGART, L. R.; SOUTHWORTH, G. R.; HINTON, D. E. Application of bioindicators in assessing the health of fish populations experiencing contaminant stress. In: MCCARTHY, J. F.; SHUGART, L.R. (Eds.). **Biomarkers of environmental contamination.** Boca Raton: Lewis Publishers, 1990. p. 333-353.

AEBI, H. Catalase. In: BERGMEYER, H. U.; WEINHEIM, V. C. (Eds.). **Methods of enzymatic analysis.** New York, London: Academic Press, 1974. p. 673-683.

AHMAD, I.; MARIA, V. L.; OLIVEIRA, M.; PACHECO, M.; SANTOS, M. A. Oxidative stress and genotoxic effects in gill and kidney of *Anguilla anguilla* L. exposed to chromium with or without pre-exposure to ß-naphthoflavone. **Mutat. Res.,** v. 608(1), p. 16-28, 2006.

AHMAD, I.; OLIVEIRA, M.; PACHECO, M.; SANTOS, M. A. *Anguilla anguilla* L. oxidative stress biomarkers responses to copper exposure with or without – naphthoflavone pre-exposure. **Chemosphere,** v. 61, p. 267-275, 2005.

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

AL-SABTI, K. Comparative micronucleated erythrocyte cell induction in three cyprinids by five carcinogenic-mutagenic chemicals. **Cytobios,** v. 47, p. 147-154, 1986.

AL-SABTI, K. Micronuclei induced by selenium, mercury, methylmercury and their mixtures in binucleated blocked fish erythrocyte cells. **Mutat. Res.,** v. 320, p. 157-163, 1994.

AL-SABTI, K.; METCALFE, C. D. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. **Mutat. Res.,** v. 343, p. 121-135, 1995.

AMADO, L. L.; DA ROSA, C. E.; LEITE, A. M.; MORAES, L.; PIRES, W. V.; PINHO, G. L.; MARTINS, C. M. G.; ROBALDO, R. B.; NERY, L. E. M.; MONSERRAT, J. M.; BIANCHINI, A.; MARTINEZ, P. E.; GERACITANO, L. A. Biomarkers in croakers *Micropogonias furnieri* (Teleostei: Scianidae) from polluted and non-polluted areas from the Patos Lagoon estuary (Southern Brazil): Evidences of genotoxic and immunological effects. **Mar. Pollut. Bull.,** v. 52(2), p. 99-206, 2006.

ANDERSON, T.; FÖRLIN, L. Regulation of the cytochrome P450 enzyme system in fish. **Aquat. Toxicol.,** v. 24, p. 1-20, 1992.

ANDRADE, V. M.; FREITAS, T. R.; SILVA, J. Comet assay using mullet (*Mugil* sp.) and sea catfish (*Netuma* sp.) erythrocytes for the detection of genotoxic pollutants in aquatic environment. **Mutat. Res.,** v. 560, p. 57-67, 2004.

ANNAS, A.; BRITTERBO, E.; HELLMAN, B. Evaluation of benzo(a)pyrene-induced DNA damage in human endothelial cells using alkaline single cell gel electrophoresis. **Mutat. Res.,** v. 471, p. 145-155, 2000.

ARCAND, L. D.; METCALFE, C. D. Biomarkers of exposure of brown bullheads (*Ameivrus nebulosus*) of aromatic hydrocarbons from contaminated regions of the Great Lakes. In: CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL ASSOCIATION OF GREAT LAKES RESEARCH, 38, 1995, MICHIGAN (USA). **Proceedings...,** v. 1, p. 68, 1995.

ARELLANO, J.; STORCH, V.; SARASQUETE, C. Ultrastructural and histochemical study on skin and gills of the Senegal sole, *Solea senegalensis*. **J. Appl. Ichthyol.,** v. 45, p. 279-294, 2004.

ARELLANO, J. M.; ORTIZ, J. B.; GONZALEZ DE CANALES, M. L.; SARASQUETE, C. Histopathological alterations and induction of cytochrome P-450 1A in the liver and gills of the gilthead seabream (*Sparus aurata*) exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. **Histochem. J.,** v. 33(11-12), p. 663-674, 2001.

ARNAIZ, R. R. **Las toxinas ambientales y sus efectos genéticos.** 2ª Ed. México: IEPSA, 1995. 267 p.

ATSDR (Agency for toxic Substances and Disease Registry). **Toxicological profile for naphthalene, 1-methylnaphthalene, and 2-**

methylnaphthalene. Report of the U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, 1995.

AYLLÓN, F.; GARCIA-VASQUEZ, E. Induction of micronuclei and other nuclear abnormalities in European minnow *Phoxinus phoxinus* and mollie *Poecilia latipinna*: an assessment of the fish micronucleus test. **Mutat. Res.,** v. 467, p. 177–186, 2000.

AYLLÓN, F.; GARCIA-VASQUEZ, E. Micronuclei and other nuclear lesions as genotoxicity indicators in Rainbow Trout *Oncorhynchus mykiss.* **Ecotoxicol. Environ. Saf.,** v. 49, p. 221-225, 2001.

BAGCHI, D.; BAGCHI, M.; BALMOORI, J.; VUCHETICH, P. J.; STOHS, S. J. Induction of oxidative stress and DNA damage by chronic administration of naphthalene to rats. **Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.,** v. 101, p. 249-257, 1998.

BAGCHI, D.; BALMOORI, J.; BAGCHI, M.; YE, X. M.; WILLIAMS, C. B.; STOHS, S. J. Comparative effects of TCDD, endrin, naphthalene and chromium (VI) on oxidative stress and tissue damage in the liver and brain tissues of mice. **Toxicology,** v. 175, p. 73-82, 2002.

BAINY, A. C. D. How to evaluate the safety chemical substances in aquatic environments. **Ciência Cult., S Paulo,** v. 45, p. 10-11, 1993.

BALSA, E. S. Meio ambiente marinho e a poluição. In: NAZO, G. N. (Ed.). **Questões importantes referentes ao mar.** São Paulo: Sociedade amigos da marinha – SOAMAR, 1996. p. 51-73.

BANCROFT, J.; STEVENS, A. **Theory and Practice of Histological Techniques**, 2nd Ed. New York: Churchill Livingstone, 1982. 662 p.

BARRETO, R. E.; GONTIJO, A. M. M. C.; ALVES-DE-LIMA, R. O.; RAYMINDI, V. C.; PINHAL, D.; REYES, V. A. V.; VOLPATO, G. L.; SALVADORI, D. M. F. MS222 does not induce primary DNA damage in fish. **Aquacult. Int.**, v. 15, p. 163-168, 2007.

BARRETT, J. C.; VAINIO, H.; PEAKALL, D.; GOLDSTEIN, B. D. 12th meeting of the scientific group on methodologies for the safety evaluation of chemicals: susceptibility to environmental hazards. **Environ. Health Perspect.,** v. 105(4), p. 699-737, 1997.

BELLINGER, J. W.; AVAULT, J. W. Food habits of juvenile pompano (*Trachinotus carolinus)* in Louisiana. **Trans. Am. Fish. Soc.,** v. 100, p. 464-486, 1971.

BELPAEME, K.; DELBEKE, K.; ZHU, L.; KIRSCH-VOLDERS, M. Cytogenetic studies of PCB77 on brown trout (*Salmo trutta fario*) using the micronucleus test and the alkaline comet assay. **Mutagenesis,** v. 11, p. 485-492, 1996.

BERRY, F.; IVERSEN, E. S. Pompano: Biology of Fisheries and Farming Potential. In: ANNUAL SESSION OF THE GULF AND CARIBBEAN FISH INSTITUTE, 19, 1966, **Proceedings…,** p. 116-128, 1966.

BHAGWANT, S.; ELAHEE, K. B. Pathologic gill lesions in two edible lagoon fish species, *Mulloidichtys flavolineatus* and *Mugil cephalus*, from the bay of Poudre d'Or, Mauritis, western Indian ocean. **J. Mar. Sci.,** v. 1, p. 35-42, 2002.

BHATTACHARYA, S.; MUKHERJEE, S.; BHATTACHARYA, S. Toxic effects of endrin on hepatopancreas of the fish, *Clarias batrachus* (Linn.). **Indian J. Exp. Biol.,** v. 13, p. 185-186, 1975.

BLACK, M. C.; MILLSAP, D. S. & MCCARTHY, J. F. Effects of acute temperature-change on respiration and toxicant uptake by rainbow-trout, *Salmo gairdneri* (Richardson). **Physiol. Zool.,** v. 64(1), p. 145-168, 1991.

BLACK, S. D.; COON, M. J. P-450 Cytochromes: structure and function. **Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.,** v. 60, p. 35–87, 1987.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.,** v. 72, p. 248-254, 1976.

BRAUNBECK, T.; GORGAS, K.; STORCH, V.; VOLKL, A. Ultrastructure of hepatocytes in golden ide *(Leuciscus idus melanotus* L.; Cyprinidae: Teleostei) during thermal adaptation. **Anat. Embryol.,** v. 175, p. 303-313, 1987.

BRAUNBECK, T.; SEGNER, H. Preexposure temperature acclimation and diet as modifying factors for the tolerance of golden ide (*Leuciscus idus melanotus*) to short-term exposure to 4-chloroaniline. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v. 24, p. 72-94, 1992.

BROWN, A. C.; MCLACHLAN, A. **Ecology of sandy shores.** Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1990. 328 p.

BUCHELI, T. D.; FENT, K. Induction of cytochrome P450 as a biomarker for environmental contamination in aquatic ecosystems. **Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.** v. 25, p. 201-268, 1995.

BUHLER, D. R.; WILLIAMS, D. E. The role of biotransformation in the toxicity of chemicals. **Aquat. Toxicol.,** v. 11(1-2), p. 19-28, 1988.

BUSCHINI, A.; MARTINO, A.; GUSTAVINO, B.; MONFRINOTTI, M.; POLI, P.; ROSSI, C.; SANTORO, M.; DÖRR, A. J. M.; RIZZONI, M. Comet assay and micronucleus test in circulating erythrocytes of *Cyprinus carpio* specimens exposed *in situ* to lake waters treated with disinfectants for potabilization. **Mutat. Res.,** v. 557, p. 119-129, 2004.

CAJARAVILLE, M. P.; BEBIANNO, M. J.; BLASCO, J.; PORTE, C.; SARASQUETE, C.; VIARENGO, A. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: A practical approach. **Sci. Total Environ.,** v. 247. p. 295-311, 2000.

CALIXTO, R. J. **Poluição marinha: origens e gestão.** Brasília (DF): Editora Ambiental, (Série Ambiental), 2000. 238 p.

CALOW, P. **Handbook of Ecotoxicology.** London, UK: Blackwell Science Ltda, 1993. 523 p.

CAMPANA, M. A.; PANZERI, A. M.; MORENO, V. J.; DULOUT, F. Genotoxic evaluation of the pyrethroid lambda-cyhalothrin using the micronucleus test in erytrocytes of the fish *Cheirodon interruptus interruptus*. **Mutat. Res.,** v. 438, p. 155-161, 1999.

CAMPOS, D. Y. F. **Análise das respostas citogenéticas e histopatológicas do peixe *Trematomus newnesi* exposto à água do mar diante da Estação Antártica Brasileira "Comandante Ferraz", Ilha Rei George, Antártica.** 2007. 97 p. Dissertação (Mestrado) - Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

CARRASCO, K. R.; TILBURY, K. L.; MYERS, M. S. Assessment of the piscine micronucleus test as an in situ biological indicator of chemical contaminant effects. **Can. J. Fish. Aquat. Sci.,** v. 47, p. 2123-2136, 1990.

ÇAVAS, T.; ERGENE-GOZUKARA, S. Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in *Oreochromis niloticus* following exposure to petroleum

refinery and chromium processing plant effluents. **Aquat. Toxicol.,** v. 74, p. 264-271, 2005.

COLES, B.; KETTERER, B. The role of glutathione and glutathione transferases in chemical carcinogenesis. **Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.,** v. 25, p. 47-70, 1990.

COMPORTI, M. Three models of free radical-induced cell injury. **Chem. Biol. Interact.,** v. 72, p. 01-56, 1989.

DE FLORA, S.; VIGANÒ, L.; D'AGOSTINI, F.; CAMOIRANO, A.; BAGNASCO, M.; BENICELLI, C.; MELODIA, F.; ARILLO, A. Multiple genotoxicity biomarkers in fish exposed in situ to polluted river water. **Mutat. Res.,** v. 319, p. 167-177, 1993.

DEPLANO, M.; CONNES, R.; DIAZ, J. P.; PARIS, J. Intestinal steatosis in the farm reared seabass, *Dicentrarchus labrax*. **Dis. Aquat. Organ.**, v. 6, p. 121-130, 1989.

DEPLEDGE M. H.; AMARAL-MENDES, J. J.; DANIEL, B.; HALBROOK, R. S.; KLOEPPER-SAMS, P.; MOORE, M. N.; PEAKALL, D. B. The conceptual basis of the biomarker approach. In: PEAKALL, D. B.; SHUGART, L. R. (Eds.). **Biomarkers.** Heidelberg, Berlin: Springer, 1993. p. 15-29.

DEPLEDGE, M. H. The rational basis for the use of biomarkers as ecotoxicological tools. In: FOSSI, M. C.; LEONZIO, C. (Eds.). **Nondestructive biomarkers in vertebrates.** Boca Raton: Lewis Publishers, 1994. p. 271-295.

DIMICHELE, L.; TAYLOR, M. H. Histopathological and physiological responses of *Fundulus heteroclitus* to naphthalene exposure. **J. Fish. Res. Bd Can.,** v. 35, p. 1060-1066, 1978.

DI PAOLO, C. **Aplicação do ensaio cometa a estudo de danos ao DNA de robalos, *Centropomus parallelus* (Poey, 1860), expostos à ß-naftoflavona.** 2006. 91 p. Dissertação (Mestrado) - Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

DOMINGO, J. L.; BOCIO, A.; FALCÓ, G.; LLOBET, J. M. Benefits and risks of fish consumption. Part I. A quantitative analysis of the intake of omega-3 fatty acids and chemical contaminants. **Toxicology**, v. 230, p. 219-226, 2007a.

DOMINGO, J. L.; BOCIO, A.; MARTÍ-CID, R.; LLOBET, J. M. Benefits and risks of fish consumption. Part II. RIBEPEIX, a computer program to optimize the balance between the intake of omega-3 fatty acids and chemical contaminants. **Toxicology**, v. 230, p. 227-233, 2007b.

DUTTA, H. M.; ADHIKARI, S.; SINGH, N. K.; ROY, P. K.; MUNSHI, J. S. Histopathological changes induced by malathion in the liver of a freshwater catfish, *Heteropneustes fossilis* (Bloch). **Bull. Environ. Contam. Toxicol.,** v. 51, p. 895-900, 1993.

DWIVEDI, H.; SARI, R.; WATE, S. Long term effects of DI-aromatic hydrocarbon in catfish *Heteropneustes fossilis.* **J. Ecobiol.,** v. 9(4), p. 247-254, 1997.

EL-SAYED, N. K.; SALEM, S. A.; MOURSY, A.; IBRAHIM, B. M. Acute and chronic toxicity of some aromatic hydrocarbons on *Tilapia zillii.* **Bull. Natl Inst. Oceanogr. Fish.,** v. 21(2), p. 613-630, 1995.

EPA (U.S. Environmental Protection Agency). Health effects assessment for naphthalene. Report of the U.S. Environmental Protection Agency, Environmental Criteria and Assessment Office, Office of health and environmental assessment, office of research and development. EPA/600/8-89/094, Cincinnati, OH, 1988.

FAIRBAIRN, D. W.; OLIVE, P. L.; O'NEILL, K. L. The comet assay: a comprehensive review. **Mutat. Res.,** v. 339, p. 37-59, 1995.

FANTA, E.; RIOS, F. S.; ROMÃO, S.; VIANNA, A. C. C.; FREIBERGER, S. Histopathology of the fish *Corydoras paleatus* contaminated with sublethal levels of organophosphorus in water and food. **Ecotoxicol. Environ. Saf.,** v. 54, p. 119-130, 2003.

FRENZILLI, G.; SCARCELLI, V.; DEL BARGA, I.; NIGRO, M.; FÖRLIN, L.; BOLOGNESI, C.; STURVE, J. DNA damage in eelpout (*Zoarces viviparous*) from Göteborg harbour. **Mutat. Res.,** v. 552, p. 187-195, 2004.

FURIA, R. R. **Efeitos da fração solúvel, em água do mar, do petróleo e do diesel sobre a morfologia das brânquias de *Trachinotus* sp. (Perciformes: Carangidae).** 2005. 136 p. Tese (Doutorado) - Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

GALLAGHER, E. P.; GROSS, T. S.; SHEEHY, K. M. Decreased glutathione S-transferase expression and activity and altered sex steroids in Lake

Apopka brown bulheads (*Ameriurus nebulosos)*. **Aquat. Toxicol.,** v. 55, p. 223-237, 2001.

GARCÍA, O.; MANDINA, T.; LAMADRID, A. I.; DIAZ, A.; REMIGIO, A.; GONZALEZ, Y.; PILOTO, J.; GONZALEZ, J. E.; ALVAREZ, A. Sensitivity and variability of visual scoring in the comet assay. Results of an inter-laboratory scoring exercise with the use of silver staining. **Mutat. Res.,** v. 556, p. 25-34, 2004.

GARCIA, O.; ROMERO, I.; GONZÁLEZ, J. E.; MANDINA, T. Measurements of DNA damage on silver stained comets using free Internet software. **Mutat. Res.,** v. 627, p. 186-190, 2007.

GESAMP (IMO/FAO/UNESCO/WMO/IAEA/UM/UNEP). **Impact of oil and related chemicals and wastes on the marine environment.** Joint group of experts on the scientific aspects of marine pollution. Rep. Stud. Gesamp v. 50, 1993. 180 p.

GESTO, M.; TINTOS, A.; RODRÍGUEZ-ILLAMOLA, A.; SOENGAS, J. L.; MÍGUEZ, M. Effects of naphthalene, ß-naphthoflavone and benzo(a)pyrene on the diurnal and nocturnal indoleamine metabolism and melatonin content in the pineal organ of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. **Aquat. Toxicol.,** v. 92, p. 1-8, 2009.

GESTO, M.; TINTOS, A.; SOENGAS, J. L.; MÍGUEZ, J. M. Effects of acute and prolonged naphthalene exposure on brain monoaminergic neurotransmitters in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Comp. Biochem. Physiol.**, Part C, v. 144, p. 173-183, 2006.

GIANNINI, R. **Estrutura das comunidades de peixes da zona de arrebentação de praias arenosas do litoral do Estado de São Paulo, Brasil.** 1994. 139 p. Tese (Doutorado) - Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1994.

GONTIJO, A. M. M. C.; BARRETO, R. E.; SPEIT, G.; REYES, V. A. V.; VOLPATO, G. L.; SALVADORI, D. M. F. Anesthesia of fish with benzocaine does not interfere with comet assay results. **Mutat. Res.,** v. 534, p. 165-172, 2003.

GONTIJO, A. M. M. C.; TICE, R. Teste do cometa para a detecção de dano no DNA e reparo em células individualizadas. In: RIBEIRO, L. R.;

SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. (Eds.). **Mutagênese ambiental**. Canoas (RS): Editora Ulbra, 2003. p. 247-279.

GOWLAND, B.; MCINTOSH, A.; DAVIES, I.; MOFFAT, C.; WEBSTER, L. Implications from a field study regarding the relationship between polycyclic aromatic hydrocarbons and glutathione-S-transferase activity in mussels. **Mar. Environ. Res.,** v. 54, p. 231-235, 2002.

GRAVATO, C.; GUILHERMINO, L. Effects of benzo(a)pyrene on Seabass (*Dicentrarchus labrax* L.): Biomarkers, growth and behavior. **Hum. Ecol. Risk Assess.,** v. 15(1), p. 121-137, 2009.

GRAVATO, C.; SANTOS, M. A. Juvenile sea bass liver P450, EROD induction and erythrocytic genotoxic responses to PAH and PAH-like compounds. **Ecotoxicol. Environ. Saf.,** v. 51, p. 115-123, 2002a.

GRAVATO, C.; SANTOS, M. A. Liver Phase I and Phase II enzymatic induction and genotoxic responses of ß-naphthoflavone water-exposed sea bass. **Ecotoxicol. Environ. Saf.,** v. 52, p. 62-68, 2002b.

GRAVATO, C.; TELES, M.; OLIVEIRA, M.; SANTOS, M. A. Oxidative stress, liver biotransformation and genotoxic effects induced by copper in *Anguilla anguilla* L. – the influence of pre-exposure to ß-naphthoflavone. **Chemosphere**, v. 65(10), p. 1821-1830, 2006.

GRINWIS, G. C.; BESSELINK, H. T.; VAN DEN BRANDHOF, E. J.; BULDER, A. S.; ENGELSMA, M. Y.; KUIPER, R. V.; WESTER, P. W.; VAAL, M. A.; VETHAAK, A. D.; VOS, J. G. Toxicity of TCDD in European flounder (*Platichthys flesus*) with emphasis on histopathology and cytochrome P450 1A induction in several organ systems. **Aquat. Toxicol.,** v. 50, p. 387-401, 2000.

GRINWIS, G. C.; VAN DEN BRANDHOF, E. J.; ENGELSMA, M. Y.; KUIPER, R. V.; VAAL, M. A.; VETHAAK, A. D.; WESTER, P. W.; VOS, J. G. Toxicity of PCB-126 in European flounder (*Platichthys flesus*) with emphasis on histopathology and cytochrome P4501A induction in several organ systems. **Arch. Toxicol.,** v. 75, p. 80-87, 2001.

GRISOLIA, C. K.; CORDEIRO, C. M. T. Variability in micronucleus induction with different mutagens applied to several species of fish. **Genet. Mol. Biol.,** v. 23, p. 235-239, 2000.

GRISOLIA, C. K.; STARLING, F. L. R. M. Micronuclei monitoring of fishes from Lake Paranoá, under influence of sewage treatment plant discharges. **Mutat. Res.,** v. 491, p. 39-44, 2001.

GUTIÉRREZ, M. Coloración histological para ovarios de peces, crustáceos y moluscos. **Inv. Pesq.,** v. 31, p. 265-271, 1967.

HABIG, W. H.; JAKOBY, W. B. Glutathione S-Transferases (rat and human). **Methods Enzymol.**, v. 77, n. 27, p. 218-239, 1981

HABIG, W. H.; PABST, M. J.; JAKOBY, W. B. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. **Biol. Chem.,** v. 249, p. 7130-7139, 1974.

HARTMANN, A.; AGURELL, E.; BEEVERS, C.; BRENDLER-SCHWAAB, S.; BURLINSON, B.; CLAY, P.; COLLINS, A.; SMITH, A.; SPEIT, G.; THYBAUD, V.; TICE, R. R. Recommendations for conducting the in vivo alkaline comet assay. **Mutagenesis**, v. 18(1), p. 45-51, 2003.

HEATH, A. G. **Water pollution and fish physiology.** Boca Ranton: CRC Press, 1987. 359 p.

HEILMAN, M. J.; SPIELER, R. E. The daily feeding rhythm to demand feeders and the effects of timed meal feeding on the growth of juvenile Florida pompano, *Trachinotus carolinus*. **Aquaculture,** v. 180, p. 53-64, 1999.

HINTON, D. E.; COUCH, J. A. Pathobiological measures of marine pollution effects. In: WHITE, H. (Ed.). **Concepts in marine pollution measurements.** Maryland Sea Grant College: University of Maryland Sea Grant Publications, 1984. p. 7-32.

HINTON, D. E.; LAUREN, D. J. Liver structural alterations accompanying chronic toxicity in fishes: potential biomarkers of exposure. In: MCCARTHY, J. F.; SHUGART, L. R. (Eds.). **Biomarkers of environmental contamination.** Boca Raton: Lewis Publishers, 1990. p. 17-57.

HOESE, H. D.; MOORE, R. H. **Fishes of the Gulf of Mexico.** College Station: Texas A & M University Press, 1977. 432 p.

HOOFTMAN, R. N.; De RAAT, W. K. Induction of nuclear abnormalities (micronuclei) in the peripheral blood erythrocytes of the eastern mudminnow *Umbra pygmaea* by ethyl methanesulphonate. **Mutat. Res.**, v. 104, p. 147-152, 1982.

HOOSE, H. D.; MOORE, R. **Fishes of the Gulf of Mexico: Texas, Louisiana and adjacent waters.** College Station, TX, USA: Texas A&M University Press, 1992. 327 p.

HOSHINA, M. M.; ANGELIS, D. F.; MARIN-MORALES, M. A. Induction of micronucleus and nuclear alterations in fish (*Oreochromis niloticus*) by a petroleum refinery effluent. **Mutat. Res.,** v. 656, p. 44-48, 2008.

HTTP://AUTOCOMET.COM. Sítio acessado em 21/07/2009.

HUSOY, A. M.; MYERS, M. S.; GOKSØYR, A. Cellular localization of cytochrome P450 (CYP1A) induction and histology in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) and European flounder (*Platichthys flesus*) after environmental exposure to contaminants by caging in Sorfjorden Norway. **Aquat. Toxicol.,** v. 36, p. 53-74, 1996.

HUSOY, A. M.; MYERS, M. S.; WILLIS, M. L.; COLLIER, T. K.; CELANDER, M.; GOKSØYR, A. Immunohistochemical localization of CYP1A and CYP3A-like isozymes in hepatic and extrahepatic tissues of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.), a marine fish. **Toxicol. Appl. Pharmacol.,** v. 129, p. 294-308, 1994.

HYMEL, M. K.; BALTZ, D. M.; CHESNEY, E. J.; TARR, M. A.; KOLOK, A. S. Swimming performance of juvenile Florida pompano exposed to ethylene glycol. **Trans. Am. Fish. Soc.**, v. 131, p. 1152-1163, 2002.

IRWIN, R. J.; VANMOUWERIK, M.; STEVENS, L.; SEESE, M. D.; BASHAM, W. **Environmental contaminants encyclopedia.** Colorado, Fort Collins: National Park Service, Water Resources Division, 1997. 114 p.

JIFA, W.; ZHIMING, Y.; XIUXIAN, S.; YOU, W. Response of integrated biomarkers of fish (*Lateolabrax japonicus*) exposed do benzo[a]pyrene and sodium dodecylbenzene sulfonate. **Ecotox. Environ. Saf.,** v. 65, p. 230-236, 2006.

JORGE, R. A. D. L. V. C. **Avaliação de impacto ambiental sobre o ecossistema marinho utilizando larvas de mexilhões (*Perna perna)* (Linnaeus, 758) (Mollusca: Bivalvia) como bioindicadores, através de técnicas ecotoxicológicas.** 2003. 504 p. Tese (Doutorado) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2003.

JORY, D.; IVERSEN, E.; LEWIS, R. Culture of fishes of the genus *Trachinotus* (Carangidae) in the western Atlantic. **J. World. Maric. Soc.,** v. 16, p. 87-94, 1985.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica.** 9ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 1999. 427 p.

JUNQUEIRA, L. C. U.; JUNQUEIRA, L. M. M. **Técnicas básicas de citologia e histologia.** São Paulo: Livraria Santos, 1983. 123 p.

KENT, C. R. H.; EADY, J. J.; ROSS, G. M.; STEEL, G. G. The comet moment as a measure of DNA damage in the comet assay. **Int. J. Radiat. Biol.,** v. 67, p. 655-660, 1995.

KHAN, R. A. Comparison of tissue lesions in four species of benthic fish sampled in 1972-1973 and 1997-1998 on the grand banks off Newfoundland. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.,** v. 65(1), p. 78-83, 2000.

KHAN, R. A. Parasites of fish as biomarkers of environmental degradation: a field study. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.,** v. 72, p. 394-400, 2004.

KIRSCH-VOLDERS, M.; SOFUNI, T.; AADERMA, M.; ALBERTINI, S.; EASTMOND, D.; FENECH, M.; ISHIDATE, M.; LORGE, E.; NORPPA, H.; SURALLE´S, J.; VON DER HUDE, W.; WAKATA, A. Report from the *in vitro* micronucleus assay working group. **Environ. Mol. Mutagen.,** v. 35, p. 167-172, 2000.

KLUMPP, D. W.; HUMPHREY, C.; HUASHENG, H.; TAO, F. Toxic contaminants and their biological effects in coastal waters of Xiamen, China. II. Biomarkers and embryo malformation rates as indicators of pollution stress in fish. **Mar. Pollut. Bull.,** v. 44, p. 761-769, 2002.

KURZ, J. M. Naphthalene poisoning: critical care nursing techniques. **Dimens. Crit. Care Nurs.,** v. 6, p. 264-270, 1987.

LAZO, J. P.; DAVIS, D. A.; ARNOLD, C. R. The effects of dietary protein level on growth, feed efficiency and survival of juvenile Florida pompano (*Trachinotus carolinus)*. **Aquaculture,** v. 169, p. 225-232, 1998.

LEE, R. F.; ANDERSON, J. W. Significance of cytochrome P450 system responses and levels of bile fluorescent aromatic compounds in marine wildlife following oil spills. **Mar. Pollut. Bull.**, v. 50, p. 705-723, 2005.

LEE, R. F.; STEINERT, S. Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. **Mutat. Res.,** v. 544, p. 43-64, 2003.

LEMAIRE, P.; FÖRLIN, L.; LIVINGSTONE, D. R. Responses of hepatic biotransformation and antioxidant enzymes to CYP1A-inducers (3-methylcholanthrene, ß-naphthoflavone) in sea bass (*Dicentrarchus labrax*), dab (*Limanda limanda*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquat. Toxicol.,** v. 36, p. 141-160, 1996.

LEMOS, C. T.; RÖDEL, P. M.; TERRA, N. R.; ERDTMANN, B. Evaluation of basal micronucleus frequency and hexavalent chromium effects in fish erythrocytes. **Environ. Toxicol. Chem.,** v. 10, p. 1320-1324, 2001.

LEVINTON, J. S. **Marine biology: function, biodiversity, ecology.** 2nd Ed. New York: Oxford University Press, 2001. 515 p.

LINDSTROM-SEPPA, P.; KORYTKO, P. J.; HAHN, M. E.; STEGEMAN, J. J. Uptake of waterborne 3,3',4'-tetrachlorobiphenyl and organ and cell-specific induction of cytochrome P4501A in adult and larval fathead minnow *Pimephales promelas*. **Aquat. Toxicol.,** v. 28, p. 147-167, 1994.

LINICK, M. Illness associated with exposure to naphthalene in mothballs-Indiana. **MMWR,** v. 32, p. 34-35, 1983.

LINNAEUS, C. Systema naturae per regna tria naturae, secundum classes, ordines, genera, species, cum characteribus, differentiis, synonymis, locis. Laurentii Salvii, Holmiae. **Systema Naturae,** v. 12, p. 1-532, 1766.

LIVINGSTONE, D. R. Biotechnology and pollution monitoring: use of molecular biomarker in the aquatic environment. **J. Chem. Technol. Biotechnol.,** v. 57, p. 195-211, 1993.

LORENZANA, R. M.; HEDSTROM, O. R.; BUHLER, D. R. Localization of cytochrome P-450 in the head and trunk kidney of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). **Toxicol. Appl. Pharmacol.,** v. 96, p. 159-167, 1988.

MACIEL, N. A. L. **Estudo sobre a composição, distribuição, abundância e diversidade da ictiofauna de três enseadas na região litorânea de Ubatuba – Estado de São Paulo – Brasil.** 1995. 141 p. Dissertação (Mestrado) - Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1995.

MALLATT, J. Fish gill structural changes induced by toxicants and other irritants. **Can. J. Fish. Aquat. Sci.,** v. 42, p. 630-648, 1985.

MARTINEZ, C. B. R.; NAGAE, M. Y.; ZAIA, C. T. B. V.; ZAIA, D. A. M. Acute morphological and physiological effects of lead in the neotropical fish *Prochilodus lineatus*. **Braz. J. Biol.,** v. 64, p. 797-807, 2004.

MARTOJA, R.; MARTOJA-PIERSON, M. **Técnicas de histología animal.** Barcelona: Toray Masson S.A., 1970. 350 p.

MASKAOUI, K.; ZHOU, J. L.; HONG, H. S.; ZHANG, Z. L. Contamination by polycyclic aromatic hydrocarbons in the Jiulong river estuary and western Xiamen sea, China. **Environ. Pollut.,** v. 118, p. 109-122, 2002.

MASTROTI, R. R. **Toxicidade e biodegradabilidade de tensoativos aniônicos em água do mar.** 1997. 112 p. Dissertação (Mestrado) – Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1997.

MATHER-MIHAICH, E.; DI GIULIO, R. T. Oxidant, mixed-function oxidase and peroxisomal response in channel catfish exposed to a bleached kraft mill effluent. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.,** v. 20, p. 391-397, 1991.

MATSUMOTO, F. E.; COLUS, I. M. S. Micronucleus frequencies in *Astyanax bimaculatus* (Characidae) treated with cyclophosphamide and vinblastine sulfate. **Genet. Mol. Biol.,** v. 23, p. 489-492, 2000.

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. 96 p.

METCALFE, C. D. Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in the erythrocytes of mudminnows (*Umbra limi*) and brown bullheads (*Ictalurus nebulosus*). **Bull. Environ. Contam. Toxicol.,** v. 40, p. 489-495, 1988.

MEYER, A.; CHRISMAN, J.; MOREIRA, J. C.; KOIFMAN, S. Cancer mortality among agricultural workers from Serrana Region, state of Rio de Janeiro, Brazil. **Environ. Res.,** v. 93, p. 264-271, 2003.

MILLER, M. R.; HINTON, D. E.; BLAIR, J. J.; STEGEMAN, J. J. Immunohistochemical localization of cytochrome P-450E in liver, gill and heart of scup (*Stenotomus chrysops*) and rainbow trout (*Salmo gairdneri*). **Mar. Environ. Res.,** v. 24, p. 37-39, 1988.

MILLER, M. R.; HINTON, D. E.; STEGEMAN, J. J. Cytochrome P450E induction and localization in gill pillar (endothelial) cells of scup and rainbow trout. **Aquat. Toxicol.,** v. 14, p. 307-314, 1989.

MITCHELL, A. E.; LAKRITZ, J.; JONES, A. D. Quantification of individual glutathione S-transferase isozymes in hepatic and pulmonary tissues of naphthalene-tolerant mice. **Arch. Toxicol.,** v. 74, p. 215-221, 2000.

MOLES, A.; WADE, T. L. Parasitism and phagocytic function among sand lance *Ammodytes hexapterus* Pallas exposed to crude oil-laden sediments. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.,** v. 66, p. 528-535, 2001.

MYERS, M. S.; FRENCH, B. L.; REICHERT, W. L. Reductions in CYP1A expression and hydrophobic DNA adducts in liver neoplasms of English sole (*Pleuronectes vetulus*): further support for the "resistant hepatocyte" model of hepatocarcinogenesis. **Mar. Environ. Res.,** v. 56, p. 197-202, 1988.

MYERS, M. S.; RHODES, L. D.; MCCAIN, B. B. Pathologic anatomy and patterns of occurrence of hepatic neoplasms, putative preneoplastic lesions and other idiopathic hepatic conditions in English sole (*Parophrys vetulus*) from Puget Sound, Washington. **J. Natl Cancer Inst.**, v. 78, p. 333-363, 1987.

NADIN, S. B.; VARGAS-ROIG, L. M.; CIOCCA, D. R. A Silver staining method for single-cell gel assay. **Histochem. Cytochem.,** v. 49, p. 1183-1186, 2001.

NASCIMENTO, I. A.; PEREIRA, S. A.; LEITE, M. B. Biomarcadores como instrumentos preventivos de poluição. In: ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. (Eds.). **Ecotoxicologia aquática: Princípios e aplicações.** São Carlos: RiMa, 2006. p. 413-431.

NCR (National Research Council). **Oil in the sea: Inputs, fates and effects.** Washington, DC: National Academy Press, 1985. 601 p.

NEPOMUCENO, J. C.; FERRARI, I.; SPANO, M. A.; CENTENO, A. J. Detection of micronuclei in peripheral erythrocytes of *Cyprinus carpio* exposed to metallic mercury. **Environ. Mol. Mutagen.,** v. 30, p. 293-297, 1997.

NEWMAN, M. C. **Fundamentals of ecotoxicology.** Chelsea, USA: Ann Arbor Press, 1998. 402 p.

NIGRO, M.; FRENZILLI, G.; SCARCELLI, V.; GORBI, S.; REGOLI, F. Induction of DNA strand breakage and apoptosis in the eel *Anguilla anguilla*. **Mar. Environ. Res.,** v. 54(3-5), p. 517-520, 2002.

NIMMO, I. A. The glutathione S-transferases of fish. **Fish Physiol. Biochem.,** v. 3, p. 163-172, 1987.

NIYOGI, S.; BISWAS, S.; SARKER, S.; DATTA, A. G. Seasonal variation of oxidant and biotransformation enzymes in barnacle, *Balanus balanoides*, and their relation with polyaromatic hydrocarbons. **Mar. Environ. Res.,** v. 52, p. 13-26, 2001.

NTP (National Toxicology Program). **Toxicology and carcinogenisis studies of naphthalene (CAS No. 91-20-3) in B6C3F1 mice (inhalation studies).** Research Triangle Park, NC: US Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health. Technical report series N°. 410, NIH Publication N°. 92-3141, 1992.

OLIVE, P. L.; BANÁTH, J. P.; DURAND, R. E. Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumour and normal cells measured using the “comet” assay. **Radiat. Res.,** v. 142, p. 144-152, 1990.

ORBEA, A.; ORTIZ-ZARRAGOITIA, M.; SOLK, M.; PORTE, C.; CAJARAVILLE, M. P. Antioxidant enzymes and peroxisome proliferation in relation to contaminant body burdens of PAHs and PCBs in bivalve mollusks, crabs and fish from the Urdaibai and Plentzia estuaries (Bay of Biscay). **Aquat. Toxicol.,** v. 58, p. 75-98, 2002.

ORTIZ-DELGADO, J. B. **Efecto de xenobióticos lipofílicos en ejemplares de dorada, *Sparua aurata* L. Estudío de biomarcadores e histopatología.** 2001. 368 p. Tese (Doutorado) - Universidad de Cádiz, Cádiz, Espanha, 2001.

ORTIZ-DELGADO, J. B.; SARASQUETE, C. Toxicity, histopathological alterations and immunohistochemical CYP1A induction in the early life stages of the seabream, *Sparus aurata*, following waterborne exposure to B(a)P and TCDD. **J. Mol. Histol.,** v. 35(1), p. 29-45, 2004.

ORTIZ-DELGADO, J. B.; SARASQUETE, C.; BEHRENS, A.; GONZALEZ DE CANALES, M. L.; SEGNER, H. Expression, cellular distribution and induction of Cytochrome P4501A (CYP1A) in gilthead seabream, *Sparus aurata*, brain. **Aquat. Toxicol.,** v. 60(3-4), p. 269-283, 2002.

ORTIZ-DELGADO, J. B.; SEGNER, H.; ARELLANO, J. M.; SARASQUETE, C. Histopathological alterations, EROD activity, CYP1A protein and biliary metabolites in gilthead seabream *Sparus aurata* exposed to benzo(a)pyrene. **Histol. Histopathol.,** v. 22, p. 417-432, 2007.

ORTIZ-DELGADO, J. B.; SEGNER, H.; SARASQUETE, C. Cellular distribution and induction of CYP1A following exposure of gilthead seabream, *Sparus aurata*, to waterborne and dietary benzo(a)pyrene and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin: An immunohistochemical approach. **Aquat. Toxicol.,** v. 75, p. 144-161, 2005.

ORZALESI, N.; MIGLIAVACCA, L.; MIGLIOR, S. Subretinal neovascularization after naphthalene damage to the rabbit retina. **Investig. Ophtalmol. Vis. Sci.,** v. 35, p. 696-705, 1994.

ÖSTLING, O.; JOHANSON, K. J. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.,** v. 123, p. 291-298, 1984.

PACHECO, M.; SANTOS, M. A. Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in the erythrocytes of *Anguilla anguilla* L. exposed either to cyclophosphamide or to bleached kraft pulp mill effluent. **Fresenius Environ. Bull.,** v. 5, p. 746-751, 1996.

PACHECO, M.; SANTOS, M. A. Induction of EROD activity and genotoxic effects by polycyclic aromatic hydrocarbons and resin acids on the juvenile eel (*Anguilla anguilla* L.). **Ecotoxicol. Environ. Saf.,** v. 38, p. 252-259, 1997.

PACHECO, M.; SANTOS, M. A. Biotransformation, endocrine and genetic responses of *Anguilla anguilla* L. to petroleum distillate products and environmental contaminated waters. **Ecotoxicol. Environ. Saf.,** v. 49(1), p. 64-75, 2001.

PACHECO, M.; SANTOS, M. A. Naphthalene and B-naphthoflavone effects on *Anguilla anguilla* L. hepatic metabolism and erythrocytic nuclear abnormalities. **Environ. Int.,** v. 28, p. 285–293, 2002.

PEAKALL, D. **Animal biomarkers as pollution indicators.** London: Chapman & Hall, 1992. 291 p.

PERRY, S. F.; LAURENT, P. Environmental effects on fish gill structure and function. In: RANKIM, J. C.; JENSEN, F. B. (Eds.). **Fish ecophysiology.** London: Chapman and Hall, 1993. p. 231-264.

PETERS, L. D.; MORSE, H. R.; WATERS, R.; LIVINGSTONE, D. R. Responses of hepatic cytochrome P450A and formation of DNA-adducts in juveniles of turbot (*Scophthalmus maximus* L.) exposed to water-borne benzo[a]pyrene. **Aquat. Toxicol.,** v. 38. p. 67-82, 1997.

PHAN, V. N.; GOMES, V.; PASSOS, M. J. A. C. R.; USSAMI, K. A.; CAMPOS, D. Y. F.; ROCHA, A. J. S.; PEREIRA, B. A. Biomonitoring of the genotoxic potential (micronucleus and erythrocyte nuclear abnormalities assay) of the Admiralty Bay water surrounding the Brazilian Antarctic Research Station "Comandante Ferraz", King George Island. **Polar Biol.,** v. 30(2), p. 209-217, 2007.

POLAK, J. M.; VAN NOORDEN, S. **Immunocytochemistry: Practical Applications in Pathology and Biology.** 2nd Ed. Boston: Wright Press, 1983. 703 p.

POLEKSIC, V.; MITROVIC-TUTUNDZIC, V. Fish gills as monitor of sublethal and chronic effects of pollution. In: MÜLLER, R.; LLOYD, R. (Eds.). **Sublethal and chronic effects of pollutants on freshwater fish.** Oxford: Fishing News Books, 1994. p. 339-352.

PORTO, J. I. R.; ARAUJO, C. S. O. B.; FELDBERG, E. Mutagenic effects of mercury pollution as revealed by micronucleus test on three Amazonian fish species. **Environ. Res.,** v. 97(3), p. 287-292, 2005.

PRINTES, L. B.; CALLAGHAN, A. Acetilcolinesterase como biomarcador em *Daphnia* e relações com efeitos em níveis superiores de organização biológica. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ECOTOXICOLOGIA e V REUNIÃO DA SETAC LATINO-AMERICANA, 7. **Livro de Resumos...,** p. 100, 2002.

PRÓSPERI, V. A.; NASCIMENTO, A. Avaliação ecotoxicológica de ambientes marinhos estuarinos. In: ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. (Eds.). **Ecotoxicologia aquática: princípios e aplicações.** São Carlos: Rima, 2006. p. 269-292.

RAND, G. M.; PETROCELLI, S. R. **Fundaments of aquatic toxicology: methods and applications.** Washington, D.C: Hemisphere, 1985. 666 p.

REID, D. J.; MACFARLANE, G. R. Potential biomarkers of crude oil exposure in the gastropod mollusc, *Austrocochlea porcata*: laboratory and manipulative field studies. **Environ. Pollut.,** v. 126, p. 147-155, 2003.

REYNAUS, S.; DESCHAUX, P. The effects of polycyclic aromatic hydrocarbons on the immune system of fish: a review. **Aquat. Toxicol.,** v. 77, p. 229-238, 2006.

SALVO, L. M. **A utilização de biomarcadores de contaminação ambiental para avaliar os efeitos do endosulfano em peixes da espécie *Cyprinus carpio* (Linnaeus, 1758).** 2003. 109 p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2003.

SANTOS, A. A.; RANZANI-PAIVA, M. J. T.; FELIZARDO, N. N.; RODRIGUES, E. L. Análise histopatológica de fígado de tilápia-do-nilo, *Oreochromis niloticus*, criada em tanque-rede na represa de Guarapiranga, São Paulo, SP, Brasil. **Bolm Inst. Pesca, S. Paulo,** v. 30(2), p. 41-145, 2004.

SANTOS, T. C. A. **Efeitos do naftaleno sobre o consumo de oxigênio, a excreção de amônia e a histologia das brânquias de pampos, *Trachinotus carolinus* (Perciformes, Carangidae).** 2005. 137 p. Dissertação (Mestrado) - Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

SANTOS, T. C. A.; PHAN, V. N.; PASSOS, M. J. A. C. R.; GOMES, V. Effects of naphthalene on metabolic rate and ammonia excretion of juvenile Florida pompano, *Trachinotus carolinus.* **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.,** v. 335, p. 82-90, 2006.

SARASQUETE, C.; GISBERT, E.; RIBEIRO, L.; VIEIRA, L.; DINIS, M. T. Glycoconjugates in epidermal, branchial and digestive mucous cells and gastric glands of gilthead seabream, *Sparus aurata*, Senegal sole, *Solea senegalensis* and Siberian sturgeon, *Acipenser baeri*. **Eur. J. Histochem.,** v. 45, p. 267-278, 2001.

SARASQUETE, C.; SEGNER, H. Cytochrome P4501A (CYP1A) in teleostean fishes: A review of immunohistochemical studies. **Sci. Total. Environ.,** v. 247, p. 313-332, 2000.

SCHIEWE, M. H.; WEBER, D. D.; MYERS, M. S.; JAQUES, F. J.; REICHERT, W. L.; KRONE, C. A.; MALINS, D. C.; MCCAIN, B. B.; CHAN, S. L.; VARNASI, U. Induction of foci of cellular alteration and other hepatic lesions in English sole *(Parophrys vetulus*) exposed to an extract of an urban marine sediment. **Can. J. Fish. Aquat. Sci.,** v. 48, p. 1750-1760, 1991.

SCHIRMER, K.; DIXON, D. G.; GREENBERG, B. M.; BOLS, N. C. Ability of 16 priority PAHs to be directly cytotoxic to a cell line from the rainbow trout gill. **Toxicology,** v. 127(1-3), p. 129-141, 1998.

SCHLEZINGER, J. J.; STEGEMAN, J. J. Induction of cytochrome P450 1A in the American Eel by model halogenated and nonhalogenated aryl hydrocarbon receptor agonists. **Aquat. Toxicol.,** v. 50, p. 375-386, 2000.

SCHRECK, C. B. Immunomodulation: endogenous factors. In: IWAMA, G.; NAKANISHI, T. (Eds.). The fish immune system: organism, pathogen and environment. **Fish Physiol.,** v. 15, p. 311-327, 1996.

SCHWAIGER, J.; FERLING, H.; MALLOW, U.; WINTERMAYR, H.; NEGELE, R. D. Toxic effects of the non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac. Part I: Histopathological alterations and bioaccumulation in rainbow trout. **Aquat. Toxicol.,** v. 68, p. 141-150, 2004.

SCHWAIGER, J.; WANKE, R.; ADAM, S.; PAWERT, M.; HONNEN, W.; TRIEBSKORN, R. The use of histopathological indicators to evaluate contaminat-related stress in fish. **J. Aquat. Ecosyst. Stress Recov.,** v. 6, p. 75-86, 1997.

SEATON, C. L.; TJEERDEMA, R. S. Tissue disposition and biotransformation of naphthalene in Striped Bass (*Morone saxatilis*). **Mar. Environ. Res.,** v. 42 (1-4), p. 345-348, 1996.

SEGNER, H.; STORCH, V.; REINECKE, M.; KLOAS, W. The development of functional digestive and metabolic organs in turbot, *Scophthalmus maximus.* **Mar. Biol.**, v. 119, p. 471-486, 1994.

SIES, H. Oxidative stress: from basic research to clinical application. **Am. J. Med.,** v. 91(3), p. S31-S38, 1991.

SIMONATO, J. D.; ALBINATI, A. C.; MARTINEZ, C. B. R. Effects of the water soluble fraction of diesel fuel oil on some functional parameters of the

neotropical freshwater fish *Prochilodus lineatus* Valenciennes. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.,** v. 76, p. 505-511, 2008.

SINGH, N. P.; MCCOY, M. T.; TICE, R. R.; SCHNEIDER, E. L. A simple technique for quantitation of low level of DNA damage in individual cells. **Exp. Cell. Res.,** v. 175, p. 184-191, 1988.

SINGH, N. P.; STEPHENS, R. E.; SCHNEIDER, E. L. Modification of alkaline microgel electrophoresis for sensitive detection of DNA damage. **Int. J. Radiat. Biol.,** v. 66, p. 23-28, 1994.

SLUPPHAUG, G.; KAVLI, B.; KROKAN, H. E. The interacting pathways for prevention and repair of oxidative DNA damage. **Mutat. Res.,** v. 531(1-2), p. 231-251, 2003.

SMOLOWITZ, R. M.; HAHN, M. E.; STEGEMAN, J. J. Immunohistochemical localization of cytochrome P4501A1 induced by 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl and by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzofuran in liver and extrahepatic tissues of the teleost *Stenotomus chrysops* (scup). **Drug Metab. Dispos.,** v. 19, p. 113-123, 1991.

SMOLOWITZ, R. M.; PETERSON, R. E.; STEGEMAN, J. J. Correlation of 2,3,7, 8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin induction of Cytochrome P4501A in vascular endothelium with toxicity in early life stages of Lake trout. **Toxicol. Appl. Pharmacol.,** v. 143, p. 256-273, 1997.

SMOLOWITZ, R. M.; SCHULTZ, M. E.; STEGEMAN, J. J. Cytochrome P4501A induction in tissues, including olfactory epithelium, of topminnows (*Poeciliopsis* spp.) by waterborne benzo(a)pyrene. **Carcinogenesis,** v. 13, p. 2395-2402, 1992.

SOLÉ, M.; LIMA, D.; REIS-HENRIQUE, M. A.; SANTOS, M. M. Stress biomarkers in juvenile senegal sole, *Solea senegalensis*, exposed to the water-accommodated fraction of the "Prestige" fuel oil. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.,** v. 80, p. 19-23, 2008.

SPIES, R. B.; STEGEMAN, J. J.; HINTON, D. E.; WOODIN, B.; SMOLOWITZ, R.; OKIHIRO, M.; SHEA, D. Biomarkers of hydrocarbon exposure and sublethal effects in embiotocid fishes from a natural petroleum seep in the Santa Barbara Channel. **Aquat. Toxicol.,** v. 34, p. 195-219, 1996.

STAGG, R. M.; RUSIN, J.; BROWN, F. Na+, K+-ATPase activity in the gills of the flounder (*Platichthys flesus* L.) in relation to mercury contamination in the Firth of Forth. **Environ. Res.,** v. 33, p. 255-266, 1992.

STEGEMAN, J. J.; HAHN, M. E. Biochemistry and molecular biology of monooxygenases: Current perspectives on forms, functions, and regulation of cytochrome P450 in aquatic species. In: MALINS, D. C.; OSTRANDER, G. K. (Eds.). **Aquatic Toxicology: Molecular, biochemical and cellular perspectives.** Boca Raton: CRC Press, 1994. p. 87-206.

STEGEMAN, J. J.; SMOLOWITZ, R. M.; HAHN, M. E. Immunohistochemical localization of environmentally induced cytochrome P450IA1 in multiple organs of the marine teleost *Stenotomus chrysops* (Scup). **Toxicol. Appl. Pharmacol.,** v. 110, p. 486-504, 1991.

STEHR, C. M.; MYERS, M. S.; JOHNSON, L. L.; SPENCER, S.; STEIN, J. E. Toxicopathic liver lesions in English sole and chemical contaminant exposure in Vancouver Harbour, Canada. **Mar. Environ. Res.,** v. 57, p. 55-74, 2003.

STRMAC, M.; OBEREMM, A.; BRAUNBECK, T. Effects of sediment eluates and extracts from differently polluted small rivers on zebrafish embryos and larvae. **J. Fish. Biol.,** v. 61, p. 24-38, 2002.

STURCHIO, E.; BOCCIA, P.; MARCONI, S.; BAGNI, G.; HERNANDEZ, S.; MASCINI, M.; BENI, C. Detection of DNA damage by genotoxic substances: Comparative investigation with comet assay, micronucleus test and DNA biosensor. **Fresenius Environ. Bull.,** v. 15(8), p. 724-730, 2006.

TAO, S.; LI, H.; LIU, C. S.; LAM, K. C. Fish uptake of inorganic and mucus complexes of lead. **Ecotoxicol. Environ. Saf.,** v. 46, p. 174-180, 2000.

TELES, M.; PACHECO, M.; SANTOS, M. A. *Anguilla anguilla* L. liver ethoxyresorufin O-deethylation, glutathione S-transferase, erythrocytic nuclear abnormalities, and endocrine responses to naphthalene and β-naphthoflavone. **Ecotoxicol. Environ. Saf.,** v. 55, p. 98-107, 2003.

THOPHON, S.; KRUATRACHUE, M.; UPATHAM, E.S.; POKETHITIYOOK, P.; SAHAPHONG, S.; JARITKHUAN, S. Histopathological alterations of white seabass, *Lates calcarifer*, in acute and subchronic cadmium exposure. **Environ. Pollut.,** v. 121, p. 307-320, 2003.

TICE, R. R. The single cell gel/comet assay: a microgel electrophoretic technique for the detection of DNA damage and repair in individual cells. In: PHILLIPOS, D. H.; VENITT, S. (Eds.). **Environmental mutagenesis.** Oxford: BIOS Scientific Publishers, 1995. p. 315-339.

TICE, R. R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D.; BURLINSON, B.; HARTMANN, A.; KOBAYASHI, H.; MIYAMAE, Y.; ROJAS, E.; RYU, J. C.; SASAKI, Y. F. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environ. Mol. Mutagen.,** v. 35, p. 206-221, 2000.

USEPA, U. S. Environmental protection agency. **Trifluralin health advisory. Office of drinking water.** Washington, DC, 1987. 17 p.

USSAMI, K. A. **Ensaio cometa em microalgas marinhas: danos no DNA de *Dunaliella tertiolecta* Butcher 1959 causados pela exposição à 4-nitroquinolina-N-óxido e ao benzo(a)pireno.** 2007. 103 p. Dissertação (Mestrado) - Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

VAN DYK, J. C.; PIETERSE, G. M.; VAN VUREN, J. H. J. Histological changes in the liver of *Oreochromis mossambicus* (Cichlidae) after exposure to cadmium and zinc. **Ecotoxicol. Environ. Saf.,** v. 66, p. 432-440, 2007.

VAN VELD, P. A.; VOLGELBEIN, W. K.; COCHRAN, M. K.; GOKSOYR, A.; STEGEMAN, J. J. Route-specific cellular expression of cytochrome P4501A (CYP1a) in fish (*Fundulus heteroclitus*) following exposure to aqueous and dietary benzo(a)pyrene. **Toxicol. Appl. Pharmacol.,** v. 142, p. 348-359, 1997.

VAN VELD, P. A.; VOGELBEIN, W. K.; SMOLOWITZ, R.; WOODIN, B. R.; STEGEMAN, J. J. Cytochrome P450IA1 in hepatic lesions of a teleost fish (*Fundulus heteroclitus*) collected from a polycyclic aromatic hydrocarbon-contaminated site. **Carcinogenesis,** v. 13, p. 505-507, 1992.

VANZELLA, T. P.; MARTINEZ, C. B. R.; CÓLUS, I. M. S. Genotoxic and mutagenic effects of diesel oil water soluble fraction on a neotropical fish species. **Mutat. Res.,** v. 631, p. 36-43, 2007.

VARNASI, U.; GMUR, D. J.; REICHERT, W. L. Effect of environmental temperature on naphthalene metabolism by juvenile starry flounder (*Platichtys stellatus)*. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.,** v. 10, p. 203-214, 1981.

VIEIRA, L. R.; SOUSA, A.; FRASCO, M. F.; LIMA, I.; MORGADO, F.; GUILHERMINO, L. Acute effects of benzo(a)pyrene, anthracene and a fuel oil on biomarkers of the common goby *Pomatoschistus microps* (Teleostei, Gobiidae). **Sci. Total Environ.,** v. 395, p. 87-100, 2008.

VIGURI, J.; VERDE, J.; IRABIE, A. Environmental assessment of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in surface sediments of the Santander Bay, Northern Spain. **Chemosphere,** v. 48, p. 157-165, 2002.

WALKER, C. H.; HOPKIN, S. P.; SIBLY, R. M.; PEAKALL, D. B. **Principles of ecotoxigology.** London: Taylor & Francis, 1996. 321 p.

WALKER, N. **Toxic effects of selected insecticides on Jamaican red hybrid tilapia.** 1997. 108 p. Dissertação (Mestrado) - University of the West Indies, Mona, Jamaica, 1997.

WALSH, A. H.; RIBELIN, W. E. The pathology of pesticide poisoning. In: RIBELIN, W. E.; MIGAKI, G. (Eds.). **The patology of fishes**. Madison, WI: University of Wisconsin Press, 1975. p. 515-537.

WANG, C. G.; CHEN, Y. X.; LI, Y. Effects of low dose tributyltin on activities of hepatic antioxidant and phase II enzymes in *Sebastiscus marmoratus*. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.,** v. 74, p. 114-119, 2005.

WILLIAMS, R. C.; METCALFE, C. D. Development of an in vivo hepatic micronucleus assay with rainbow trout. **Aquat. Toxicol.,** v. 23, p. 193-202, 1992.

WINKALER, E. U.; SILVA, A. G.; GALINDO, H. C.; MARTINEZ, C. B. R. Biomarcadores histológicos e fisiológicos para o monitoramento da saúde de peixes de ribeirões de Londrina, Estado do Paraná. **Acta Scient.,** v. 23, p. 507-514, 2001.

WOJEWÓDZKA, M.; BURACZEWSKA, I.; KRUSZEWSKI, M. A modified neutral comet assay: elimination of lysis at high temperature and validation of the assay with anti-single-stranded DNA antibody. **Mutat. Res.,** v. 518, p. 9-20, 2002.

ZAMBONI, A. J. **Avaliação da quantidade de água e sedimentos do Canal de São Sebastião através de testes de toxicidade com *Lytechinus variegatus* (Echinodermata: Echinoidea).** 1993. 100 p. Dissertação (Mestrado) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 1993.

Figura 1. *Trachinotus carolinus*.

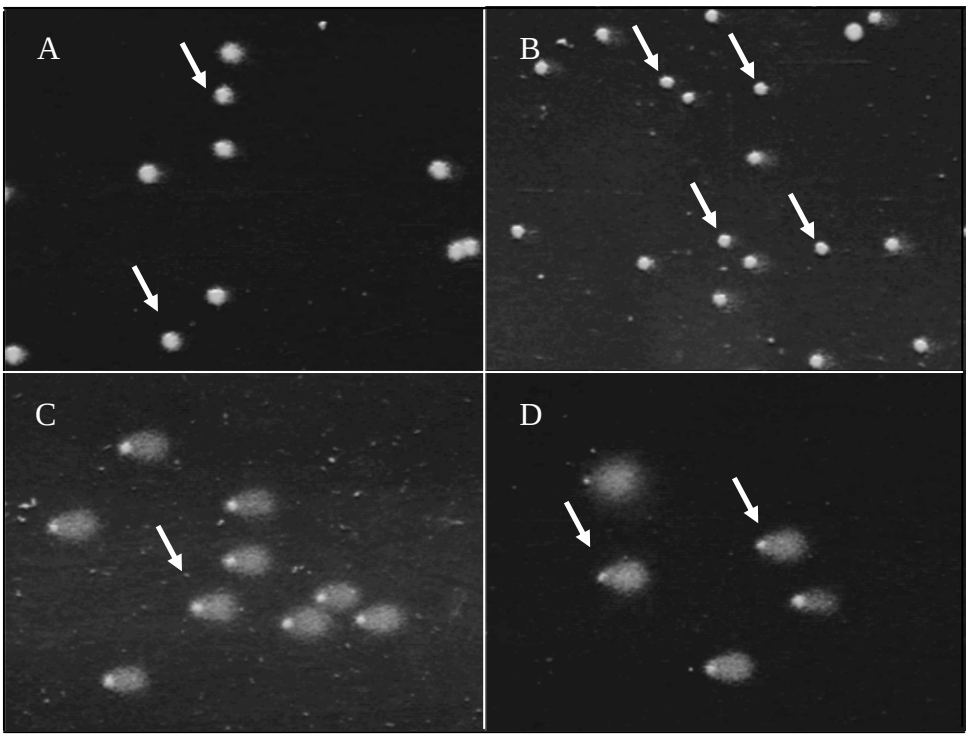

Figura 2. Fotografias negativas de cometas de pampos utilizadas em análise de imagem. **A.** Cometas sem cauda em peixes expostos ao DMSO por 12 horas (setas). **B.** Cometas sem cauda em peixes controle 24 horas (seta). **C.** Cometas em pampos expostos a 8,1 µM de BAP por 48 horas (seta). **D.** Cometas em pampos expostos a 2,7 µM de NAP após 96 horas (setas).

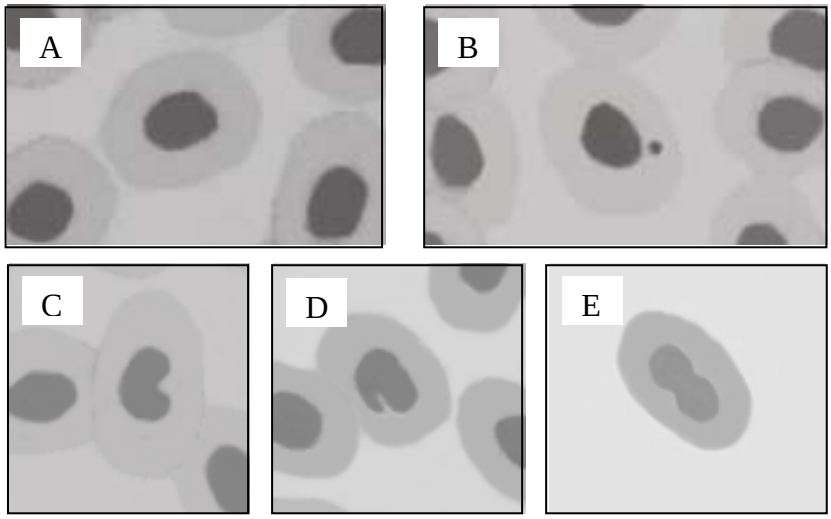

Figura 3. Eritrócitos de pampos evidenciando os diferentes tipos de alterações celulares. **A**. Núcleo normal. **B.** Eritrócitos com micronúcleos. **C.** Núcleo reniforme. **D.** Núcleo lobado. **E.** Núcleo segmentado. Coloração: Giemsa 10%.

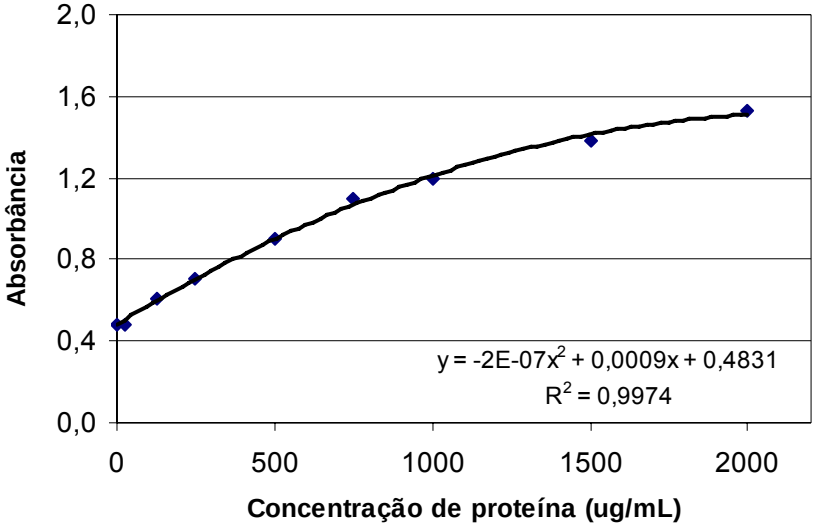

Figura 4. Média dos dados de determinação de curva padrão de proteínas, equação da curva e correlação (R^2). Padrão determinado em microplaca segundo o método de Bradford.

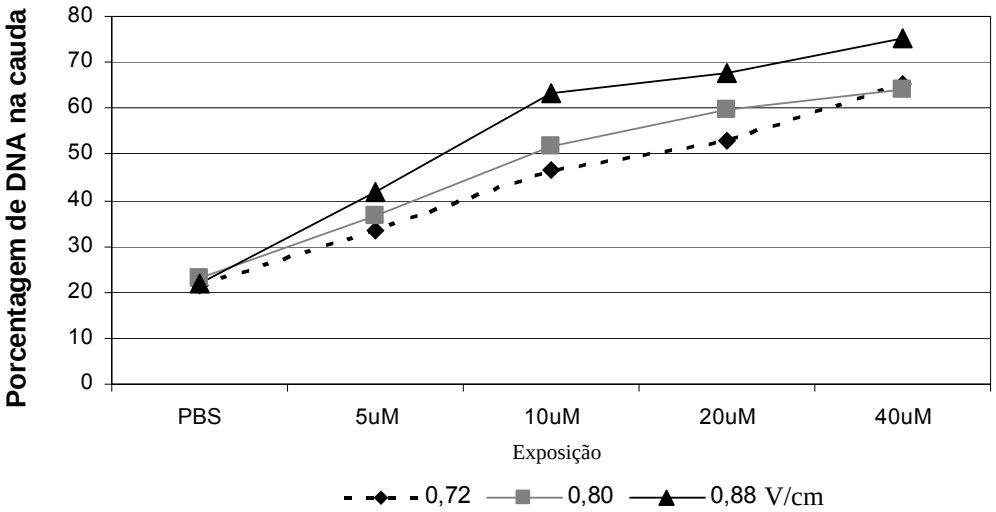

Figura 5. Variação da porcentagem de DNA na cauda dos cometas em função da voltagem de eletroforese e da concentração de peróxido de hidrogênio. PBS: tampão fosfato utilizado como controle; Concentrações de H_2O_2 representadas em µM.

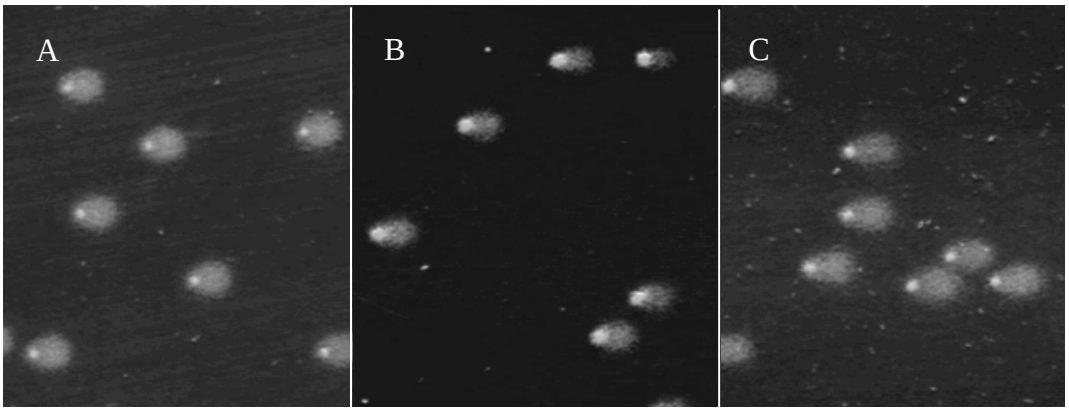

Figura 6. Cometas observados nas voltagens de 0,72 **(A)**, 0,80 **(B)** e 0,88 V/cm **(C)**.

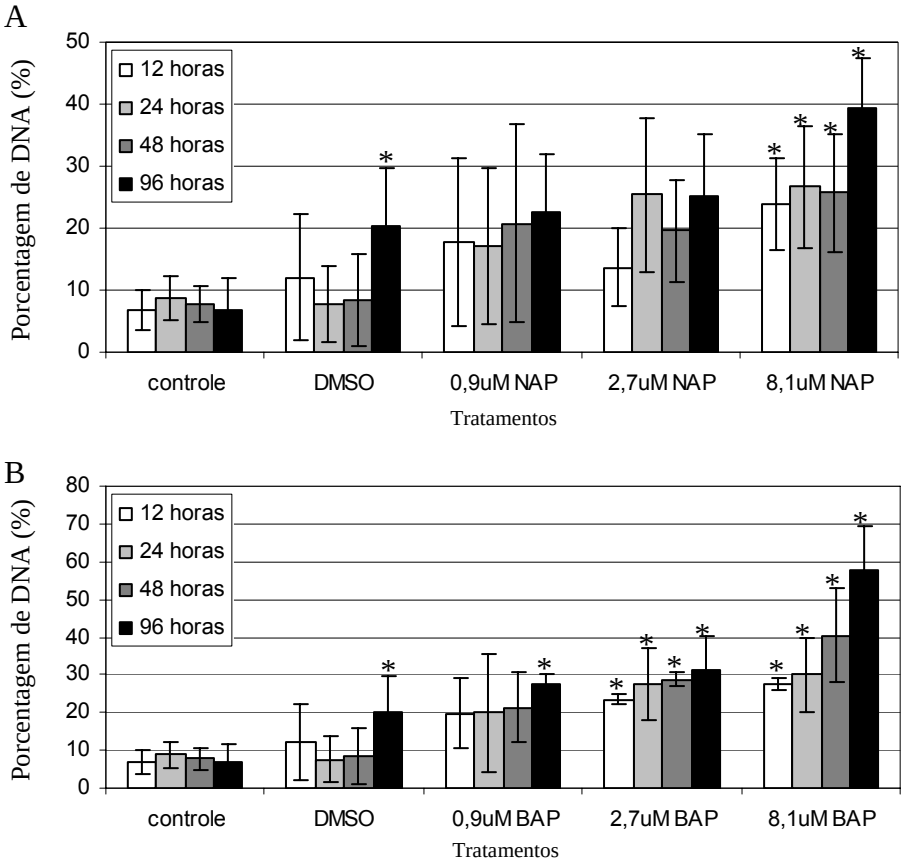

Figura 7. Porcentagem de DNA na cauda dos cometas após exposições de 12, 24, 48 e 96 horas. Controle: controle em água; DMSO: controle solvente exposto ao DMSO; A. NAP: naftaleno; B. BAP: benzo(a)pireno. Asteriscos indicam diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle de um mesmo período de exposição.

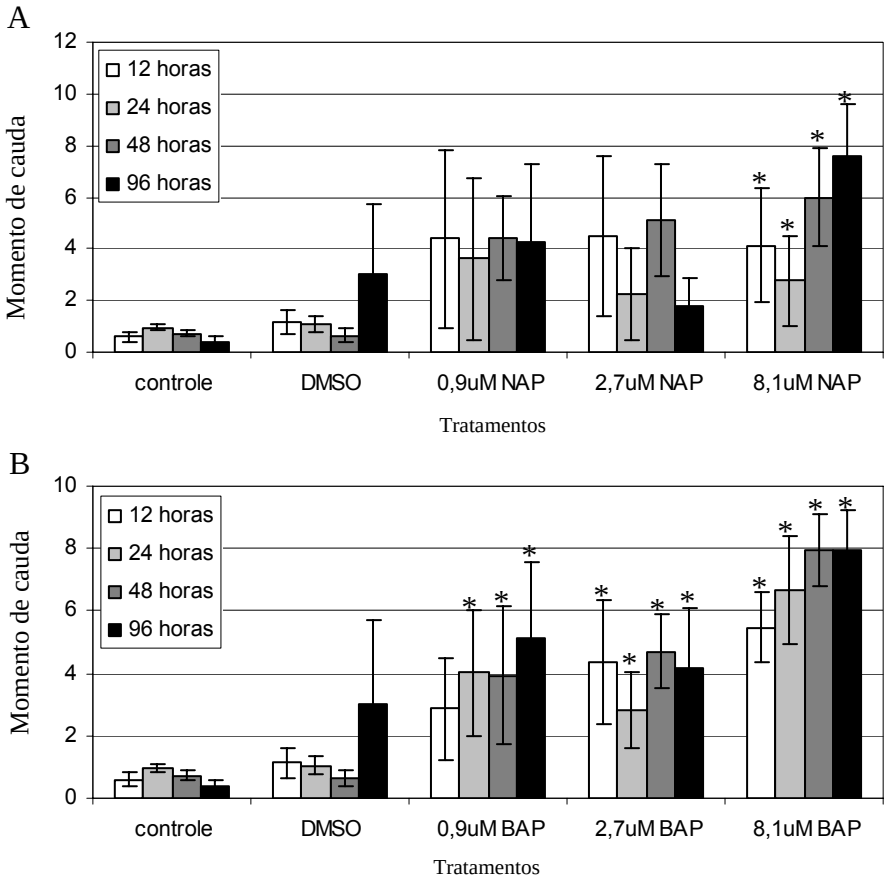

Figura 8. Momento de cauda (tail moment) obtido dos cometas após exposições de 12, 24, 48 e 96 horas. Controle: controle em água; DMSO: controle solvente exposto ao DMSO; A. NAP: naftaleno; B. BAP: benzo(a)pireno. Asteriscos indicam diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle de um mesmo período de exposição.

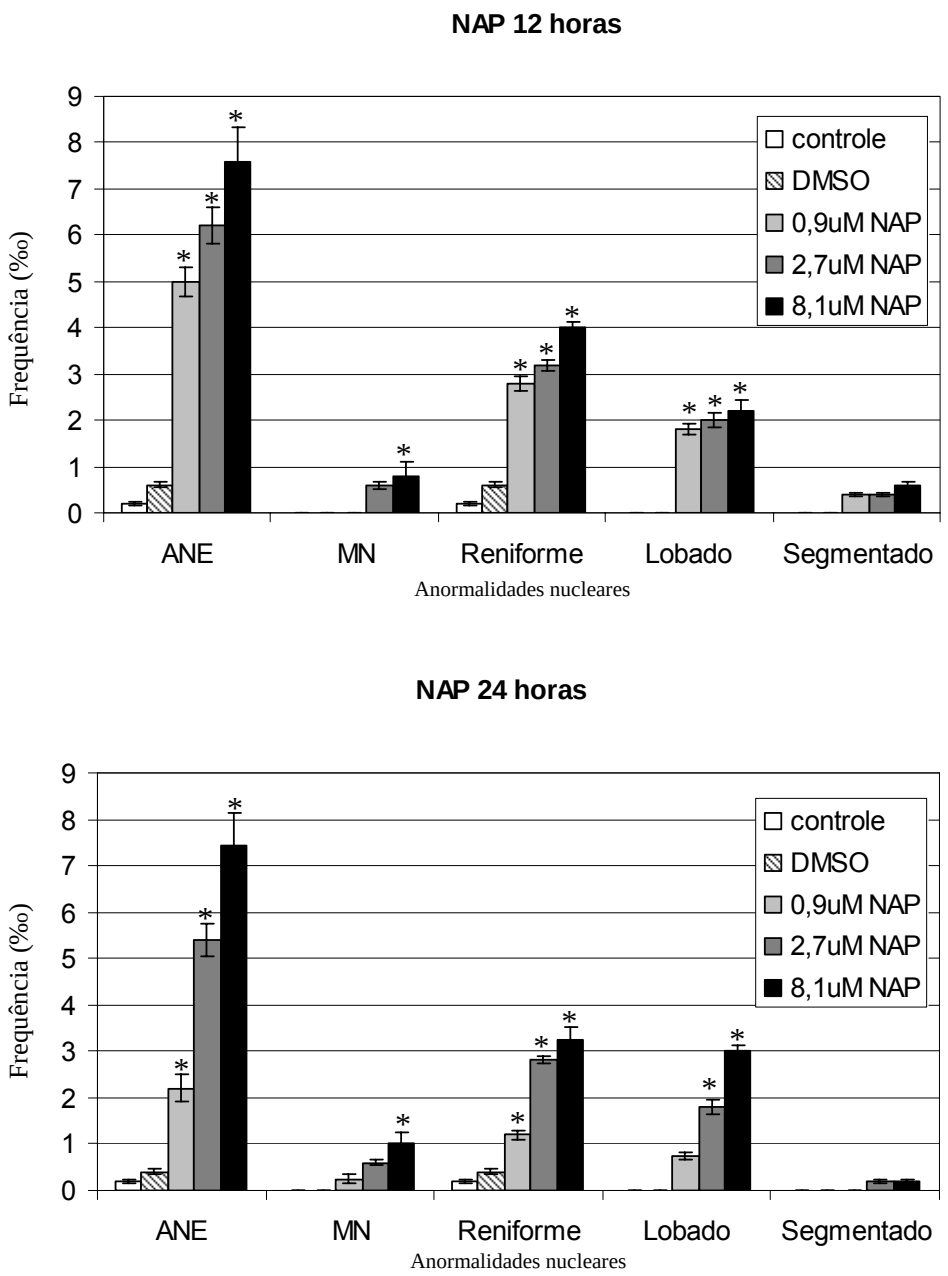

Figura 9. Frequência de micronúcleos e anormalidades nucleares eritrocitárias (ANE) (‰) após exposições por 12 e 24 horas ao naftaleno. Controle: controle em água; DMSO: controle solvente exposto ao DMSO; NAP: naftaleno. Asteriscos indicam diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle da mesma alteração observada.

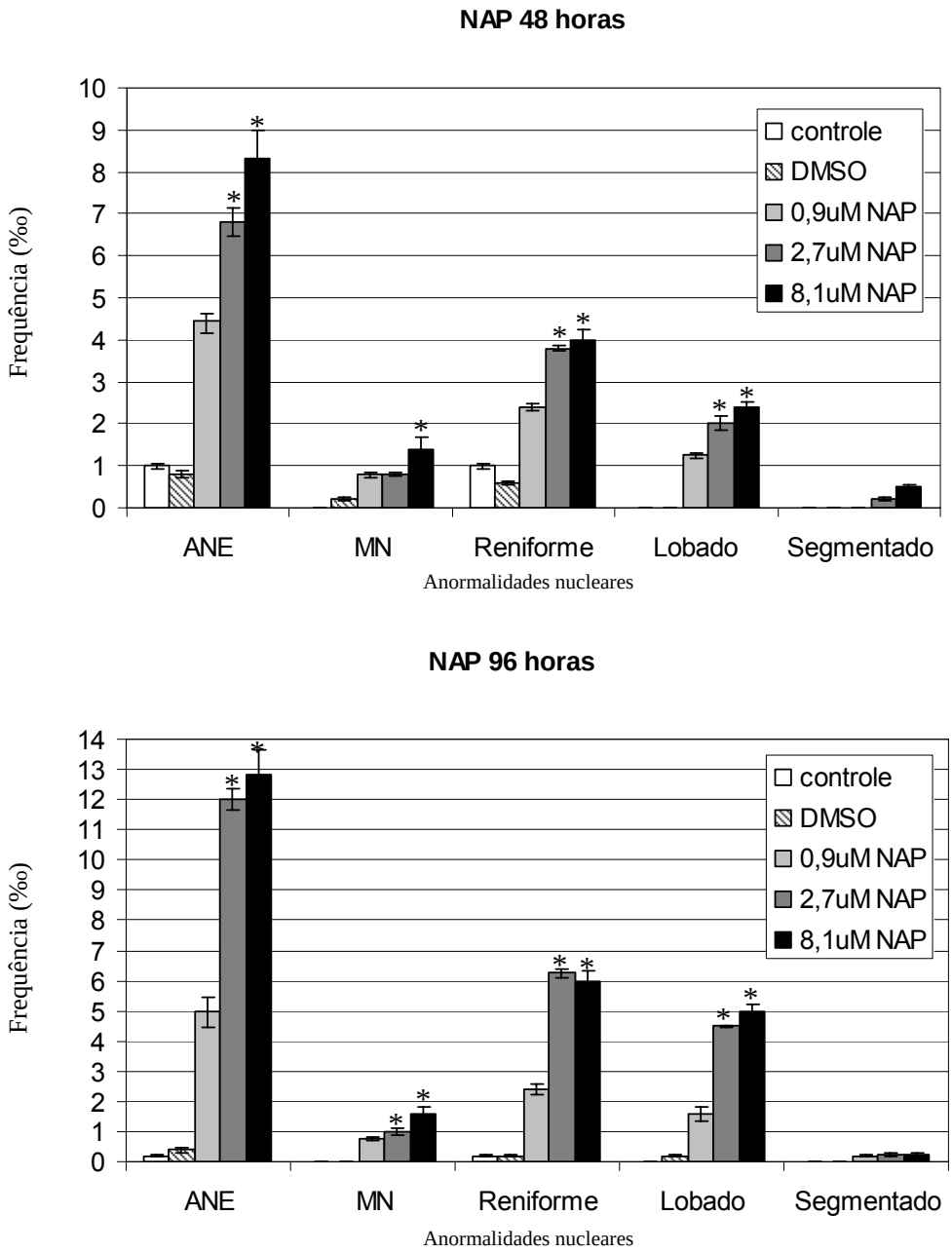

Figura 10. Frequência de micronúcleos e anormalidades nucleares eritrocitárias (ANE) (‰) após exposições por 48 e 96 horas ao naftaleno. Controle: controle em água; DMSO: controle solvente exposto ao DMSO; NAP: naftaleno. Asteriscos indicam diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle da mesma alteração observada.

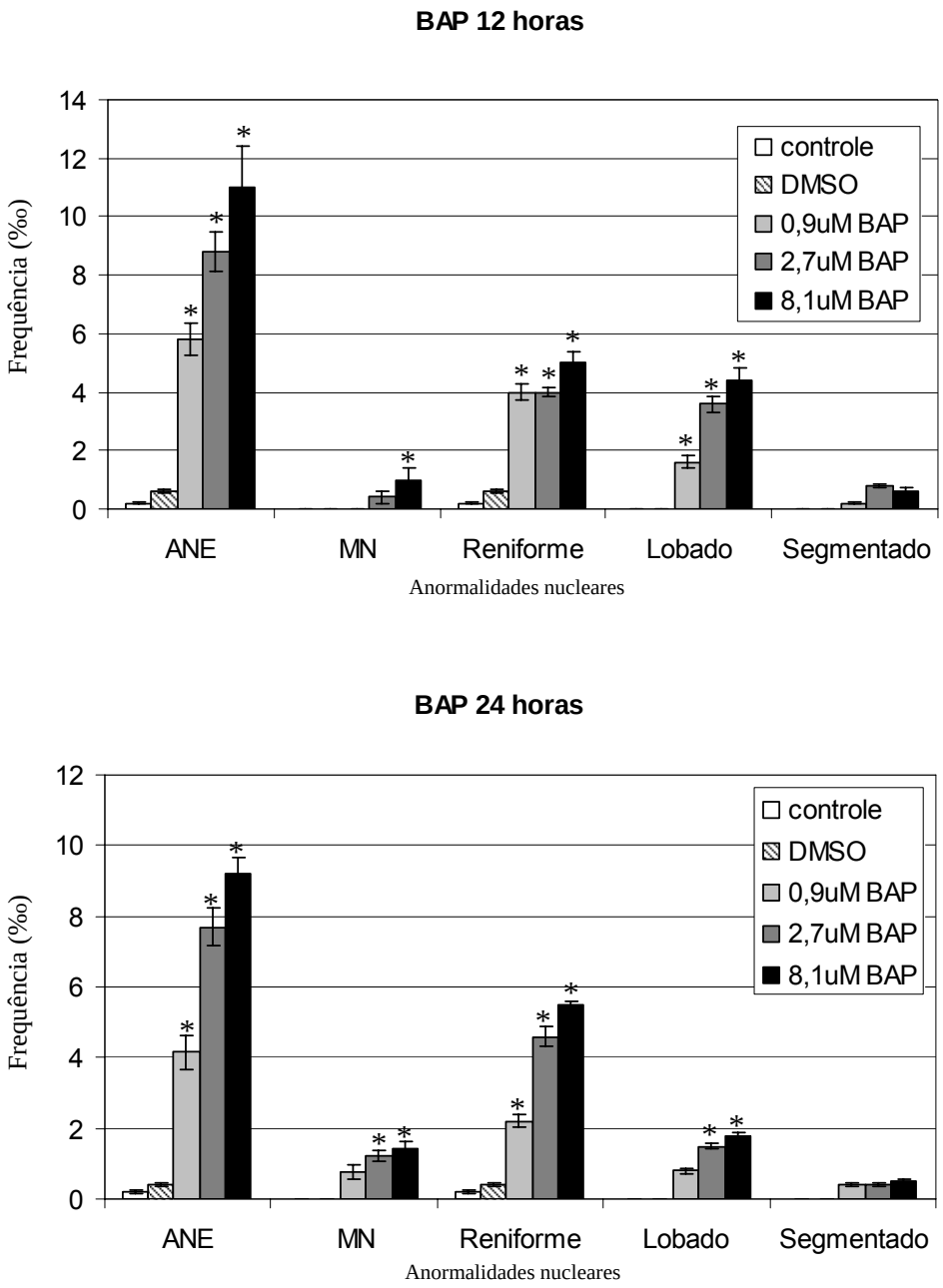

Figura 11. Frequência de micronúcleos e anormalidades nucleares eritrocitárias (ANE) (‰) após exposições por 12 e 24 horas ao benzo(a)pireno. Controle: controle em água; DMSO: controle solvente exposto ao DMSO; BAP: benzo(a)pireno. Asteriscos indicam diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle da mesma alteração observada.

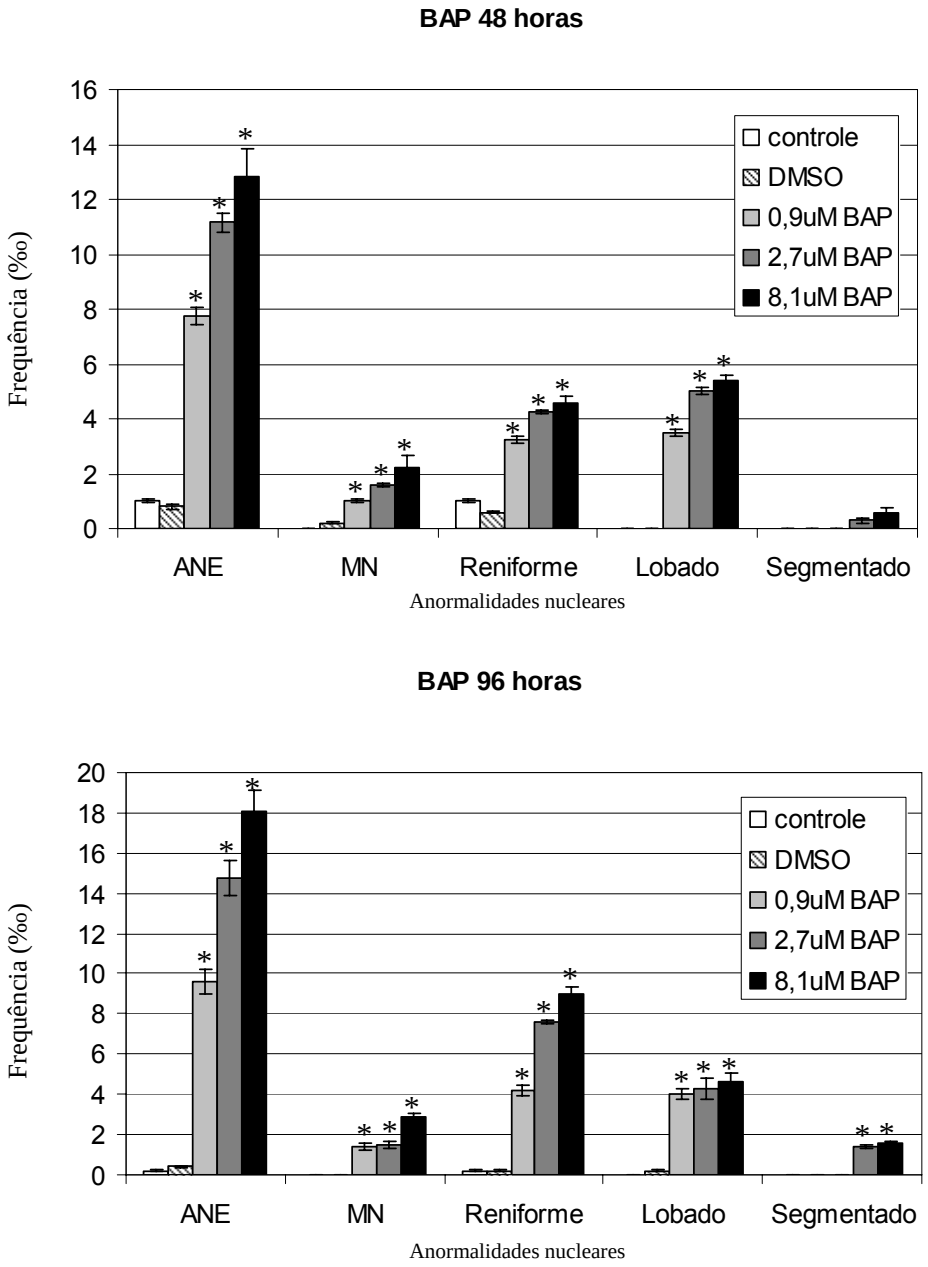

Figura 12. Frequência de micronúcleos e anormalidades nucleares eritrocitárias (ANE) (‰) após exposições por 48 e 96 horas ao benzo(a)pireno. Controle: controle em água; DMSO: controle solvente exposto ao DMSO; BAP: benzo(a)pireno. Asteriscos indicam diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle da mesma alteração observada.

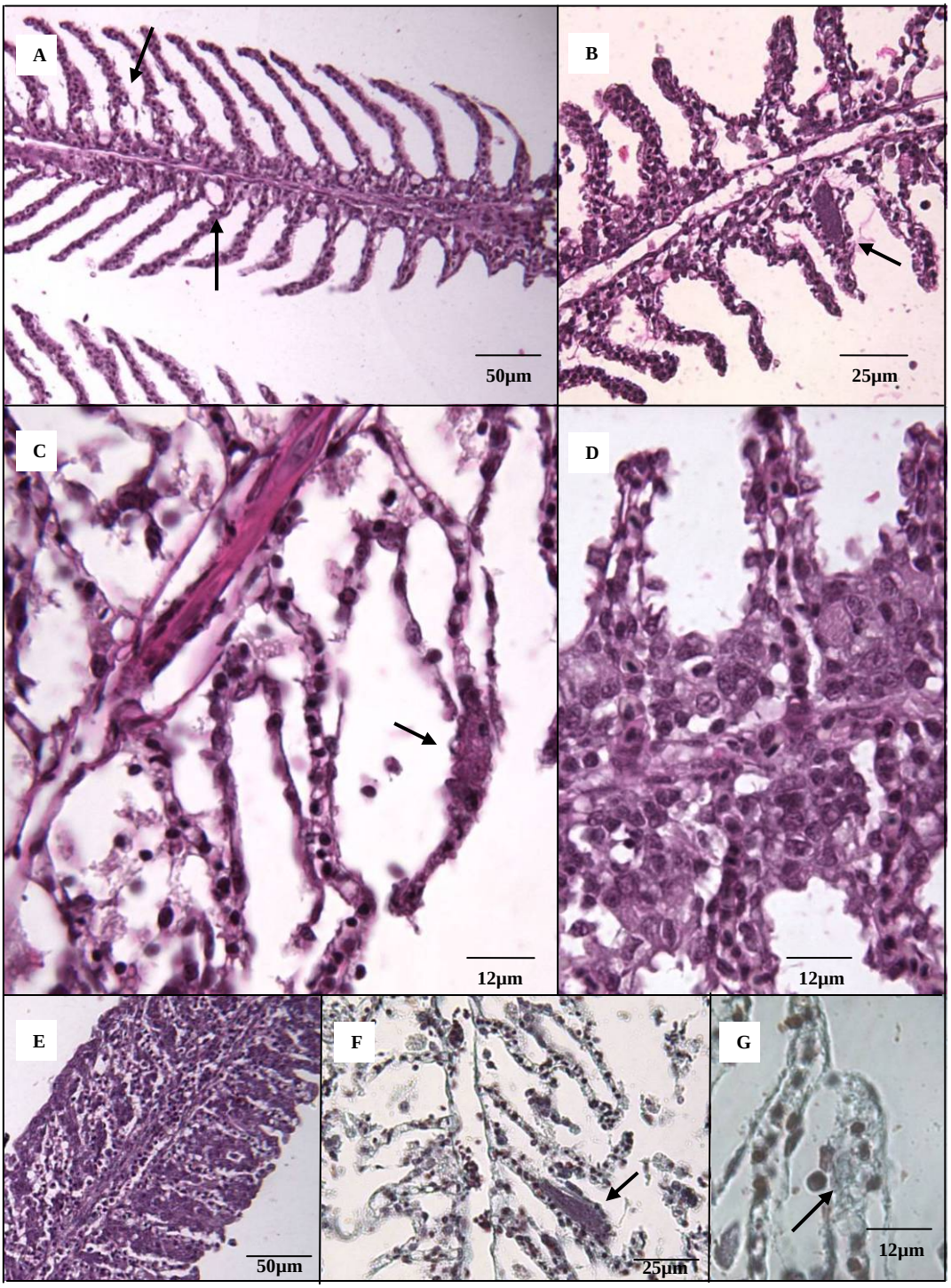

Figura 13. Alterações encontradas em secções de brânquia de *T. carolinus*. **A.** Brânquia de indivíduo em situação controle com poucas alterações no tecido, nota-se leve descolamento de células epiteliais (setas). HE. **B.** Aneurisma em lamela secundária em exposição à 0,9 µM de BAP por 24 horas (seta). HE. **C**. Necrose em células pilares de lamela secundária (seta) e deslocamento de células epiteliais. HE. **D.** Espessamento de tecido interlamelar. HE. **E.** Fusão completa de lamelas secundárias. HE. **F.** Aneurisma em lamela secundária (seta). H-VOF. **G.** Necrose em células de lamela secundária. H-VOF.

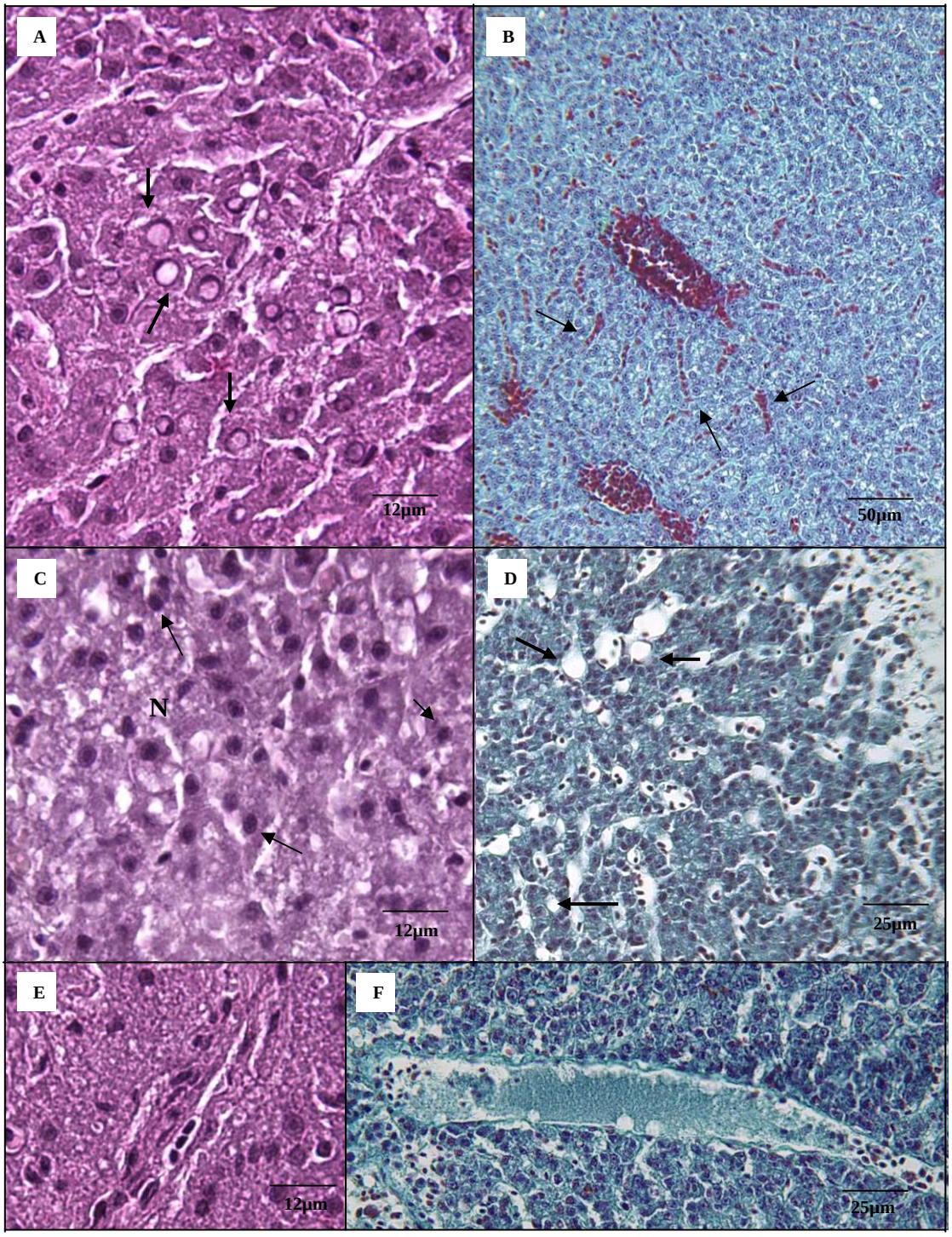

Figura 14. Secções de fígado de *T. carolinus* demonstrando algumas das alterações encontradas nos tecidos. **A.** Degeneração vacuolar de núcleo (setas). HE. **B.** Infiltração de sangue nos sinusóides (setas). H-VOF. **C.** Necrose (N) e núcleos picnóticos (setas). HE. **D.** Alterações nas gorduras do tecido hepático (setas) e infiltração de sangue nos sinusóides. H-VOF. **E.** Cirrose. Proliferação de tecido conectivo no estroma. HE **F.** Estancamento sanguíneo. H-VOF.

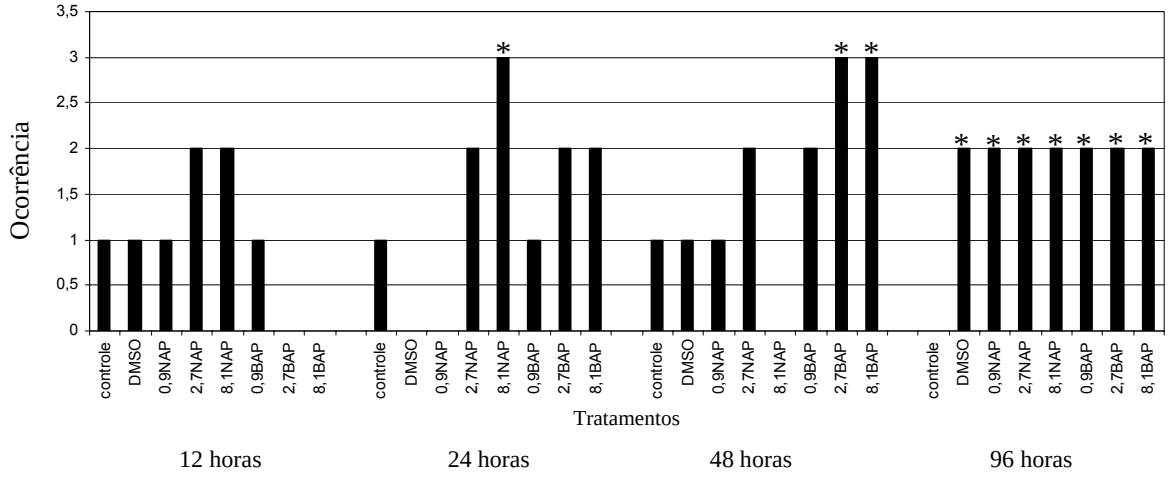

Figura 15. Ocorrência de parasitas nas brânquias de pampos. Escala de ocorrência comparativa de 0 para a ausência de parasitas até 4 para a presença de muitos parasitas. * representa diferença significativa em relação ao grupo controle de mesmo período de exposição.

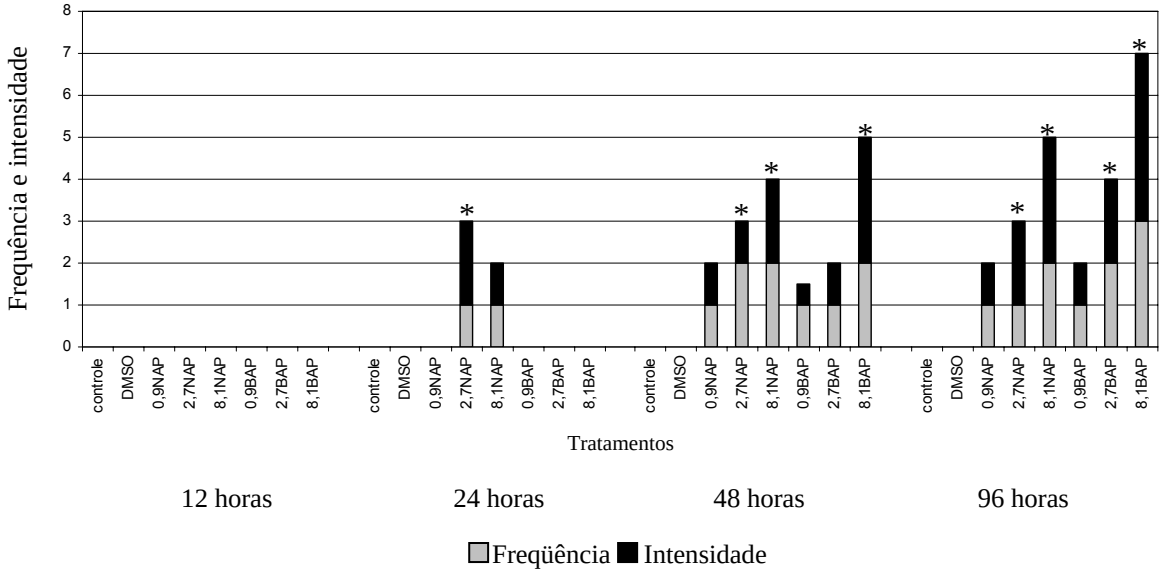

Figura 16. Freqüência e intensidade de necrose em brânquias de pampos. Escala de 0 a 4 para freqüência e de 0 a 5 para intensidade. * indica diferença significativa em relação ao controle em um mesmo período experimental.

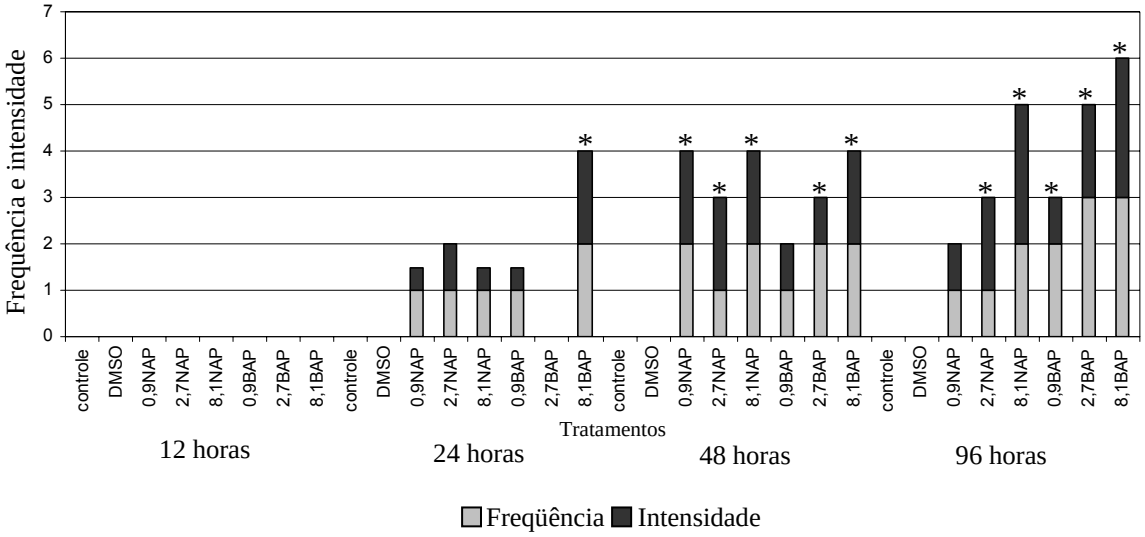

Figura 17. Freqüência e intensidade de hepatite no fígado de pampos. Escala de 0 a 4 para freqüência e de 0 a 5 para intensidade. * indica diferença significativa em relação ao controle em um mesmo período experimental.

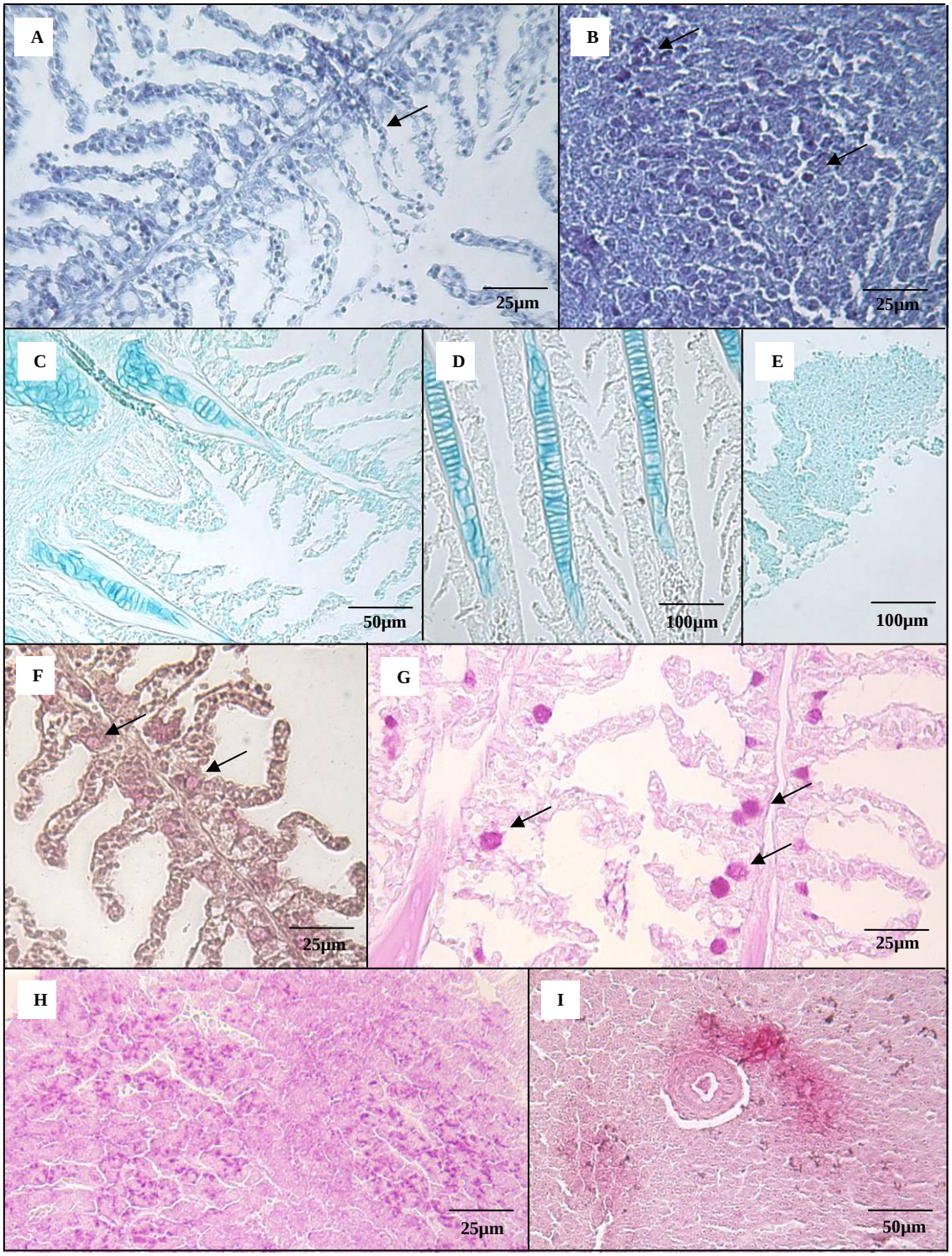

Figura 18. Cortes de brânquias e fígados de pampos ilustrando as diferentes técnicas histoquímicas empregadas. **A.** Células pilares coradas por azul de bromofenol em brânquia. **B.** Núcleos picnóticos tingidos por azul de bromofenol em fígado (setas). **C.** Brânquia corada por azul alcian pH 2.5. **D.** Brânquia corada por azul alcian pH 1.0 apresentado reação somente no tecido cartilaginoso. **E.** Fígado corado por azul alcian pH 2.5. **F.** Brânquia corada por Carmin *the best*, células mucosas diferenciadas das demais (setas). **G.** Brânquia de pampos com células mucosas fortemente coradas (setas) por PAS. **H.** Citoplasma de hepatócitos corados por PAS. **I.** Fígado corado por Carmin *the best* revelando regiões com alterações, fortemente coradas.

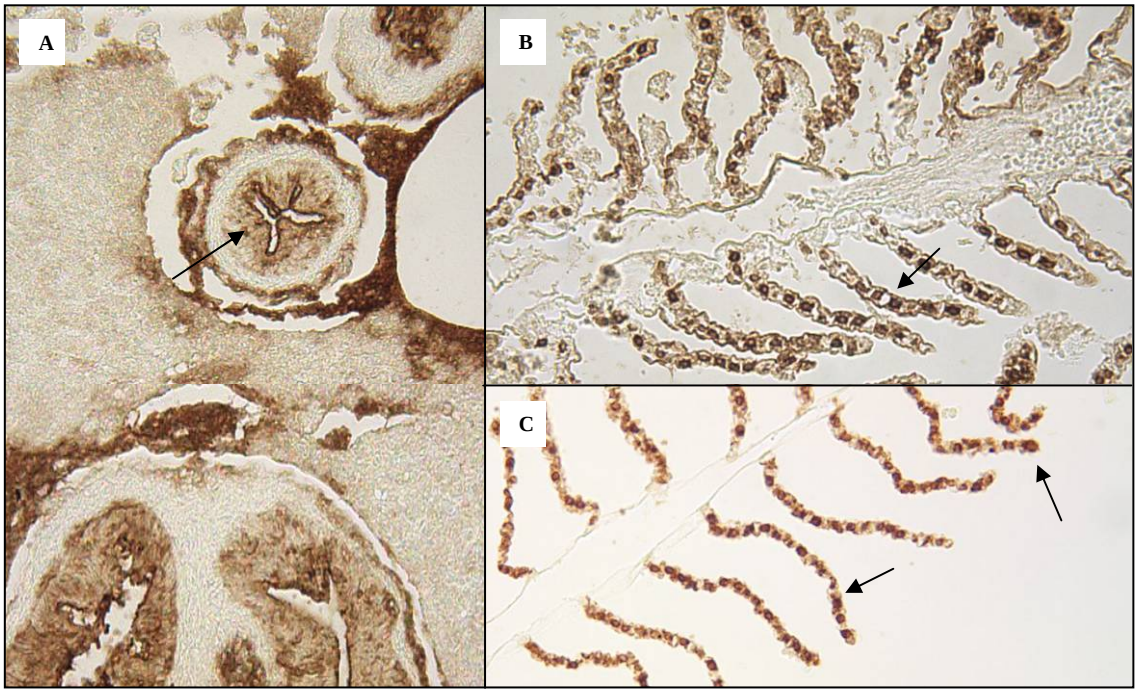

Figura 19. Imunohistoquímica em fígado e brânquia de pampos. **A.** Endotélio de canalículos biliares com forte resposta ao anticorpo (seta). **B.** Células epiteliais de brânquia intensamente coradas (seta). **C.** Células sangüíneas e pilares de brânquia fortemente coradas (setas).

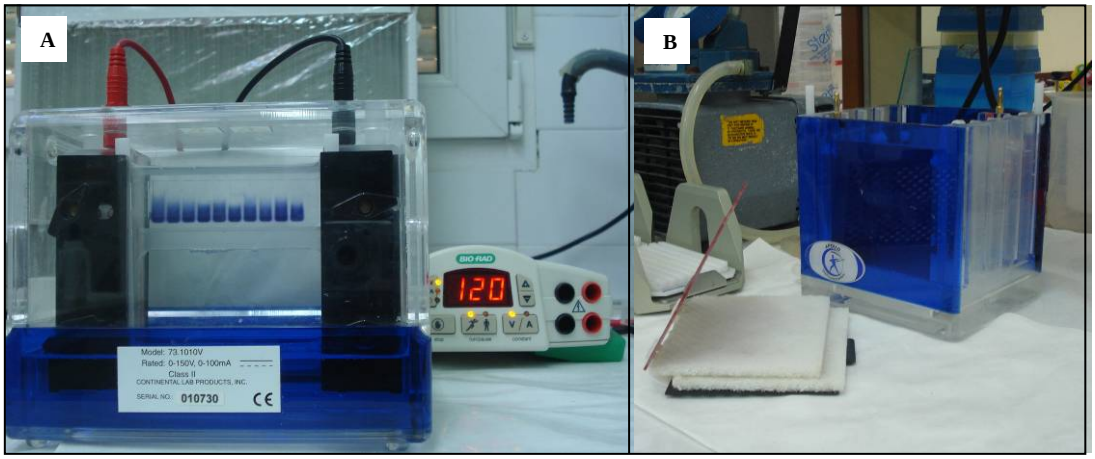

Figura 20. Cubas de eletroforese utilizadas no experimento de *western blot*. **A.** Primeira eletroforese de separação das proteínas microssomais, com as amostras nas faixas tingidas pelo azul de bromofenol. **B.** Aparato utilizado para a segunda eletroforese de transferência das proteínas para a membrana de nitrocelulose.

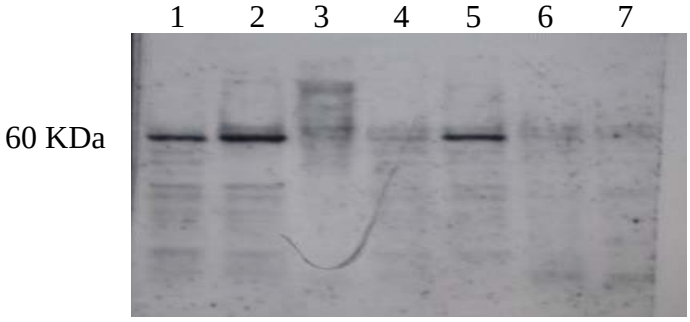

Figura 21. Membrana fotográfica revelando proteínas separadas de amostras microssomais de brânquias de pampos após teste de *western blot*. Nas faixas 1 e 2 *pool* de amostras de tecidos de peixes expostos ao BAP. Faixa 3 e 5 amostra de fígado de peixes expostos ao NAP. Faixas 4, 6 e 7 peixes dos grupos controle e DMSO de diferentes períodos de exposição.

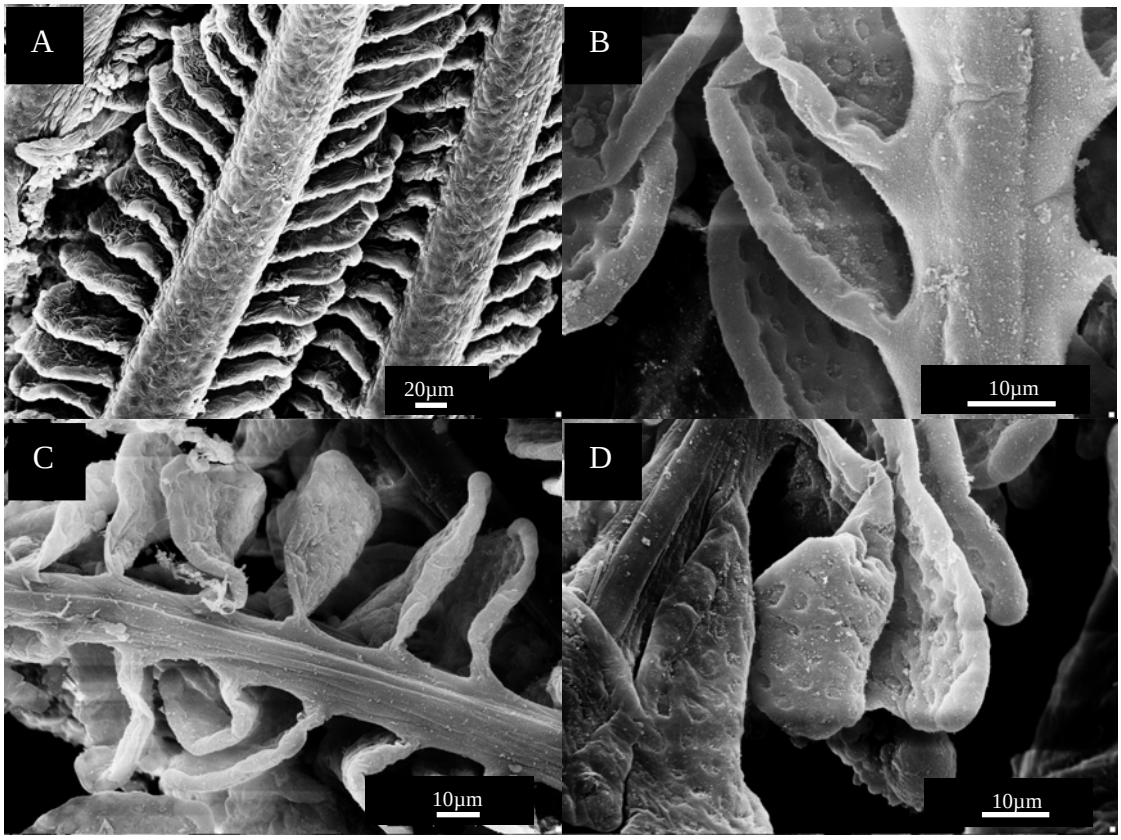

Figura 22. Fotografias obtidas em microscópio eletrônico de varredura. **A**. Lamela primária e lamelas secundárias mostrando aspecto normal de indivíduo do grupo controle em água após 12 horas de exposição. **B.** Detalhe de lamela secundária sem alterações de peixe do grupo DMSO após 96 horas de exposição. **C.** Lamela secundária de pampo após exposição a 2,7 µM de BAP por 48 horas. **D.** Lamela secundária de indivíduo exposto a 8,1 µM de BAP após 96 horas de exposição.

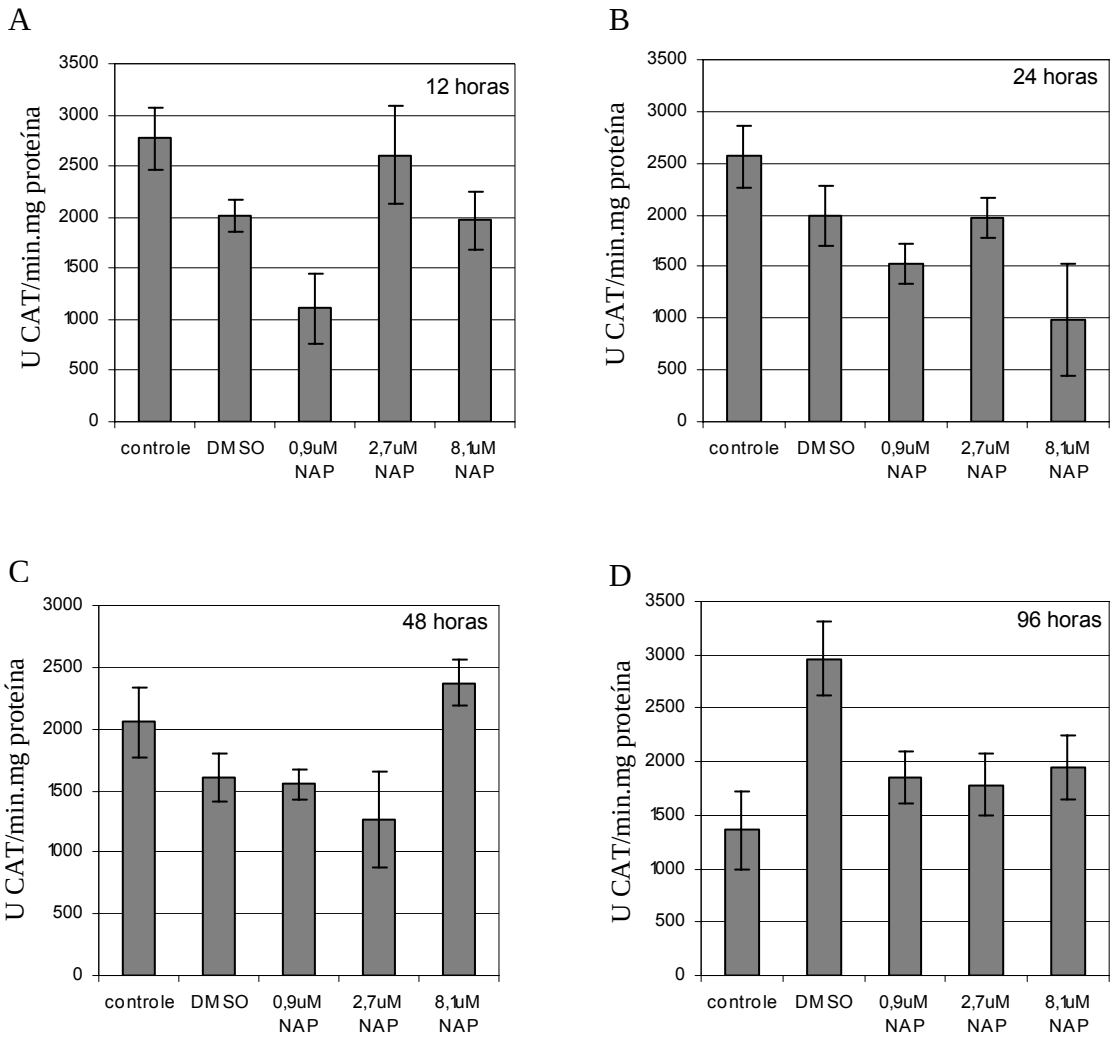

Figura 23. Atividade da enzima catalase, expressa em unidades de catalase por minuto por miligrama de proteína (U CAT/min.mg proteína) para os peixes de experimentos de exposição ao naftaleno (NAP) nos diferentes períodos: 12 horas **(A)**, 24 horas **(B)**, 48 horas **(C)** e 96 horas **(D)**.

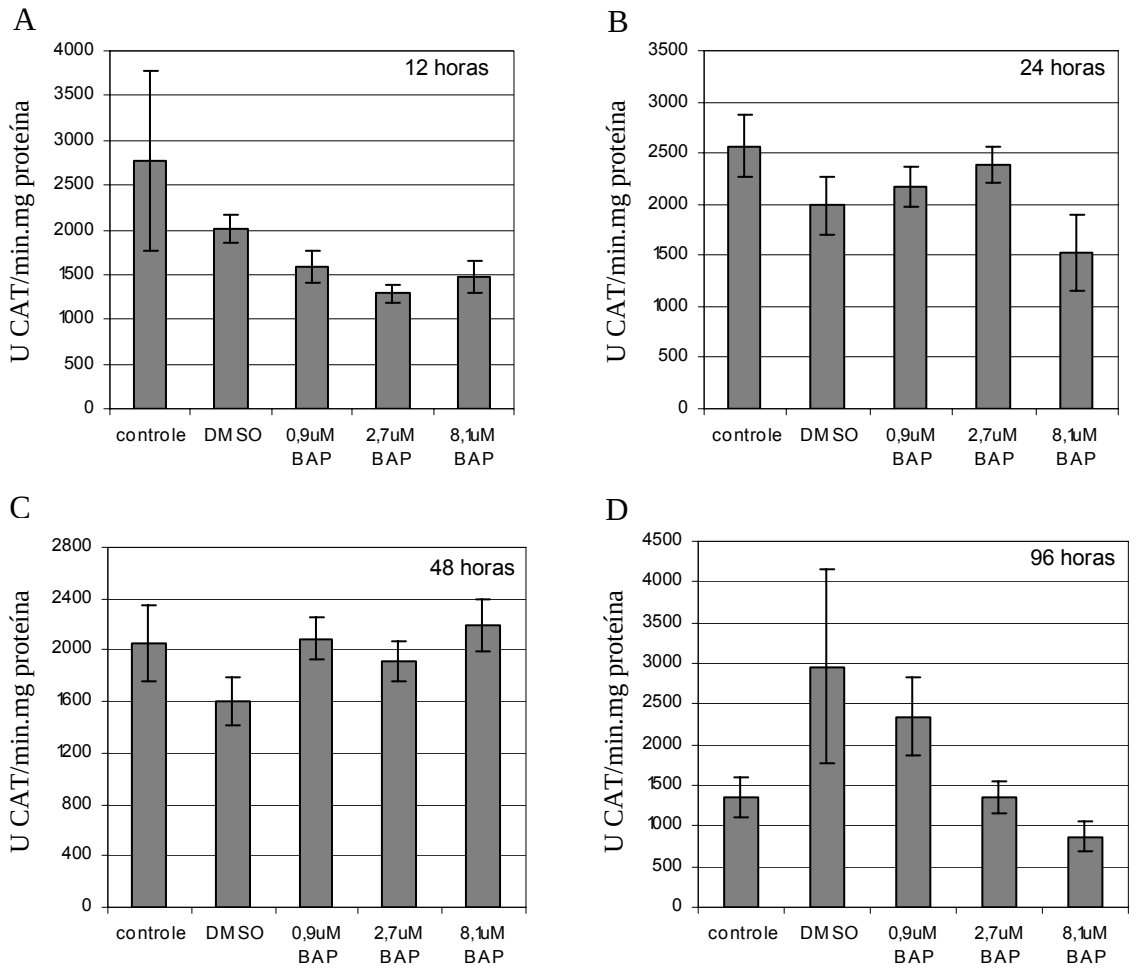

Figura 24. Atividade da enzima catalase, expressa em unidades de catalase por minuto por miligrama de proteína (U CAT/min.mg proteína) para os peixes de experimentos de exposição ao benzo(a)pireno (BAP) nos diferentes períodos: 12 horas **(A)**, 24 horas **(B)**, 48 horas **(C)** e 96 horas **(D)**.

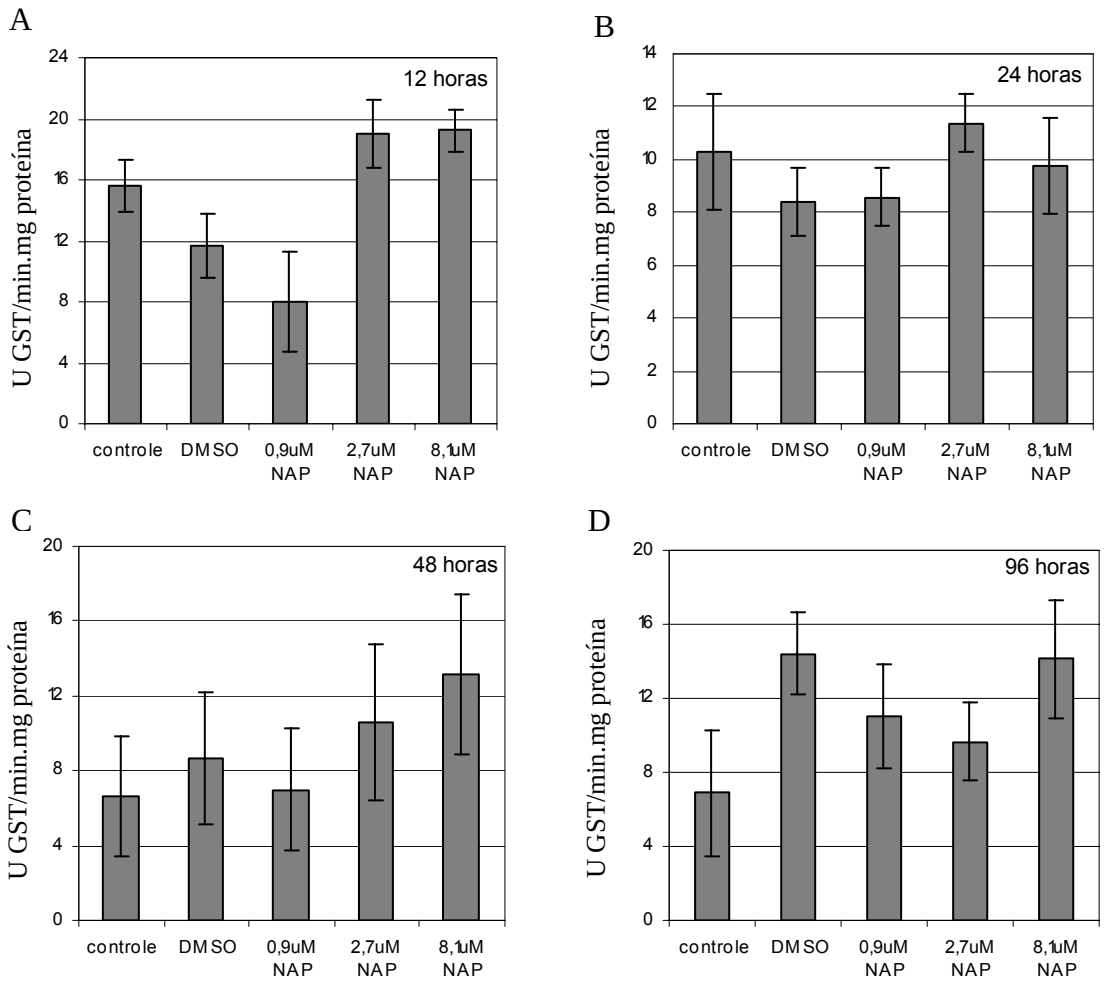

Figura 25. Atividade da enzima glutationa-S-transferase, expressa em unidades de glutationa por minuto por miligrama de proteína (U GST/min.mg proteína) para os peixes de experimentos de exposição ao naftaleno (NAP) nos diferentes períodos: 12 horas **(A)**, 24 horas **(B)**, 48 horas **(C)** e 96 horas **(D)**.

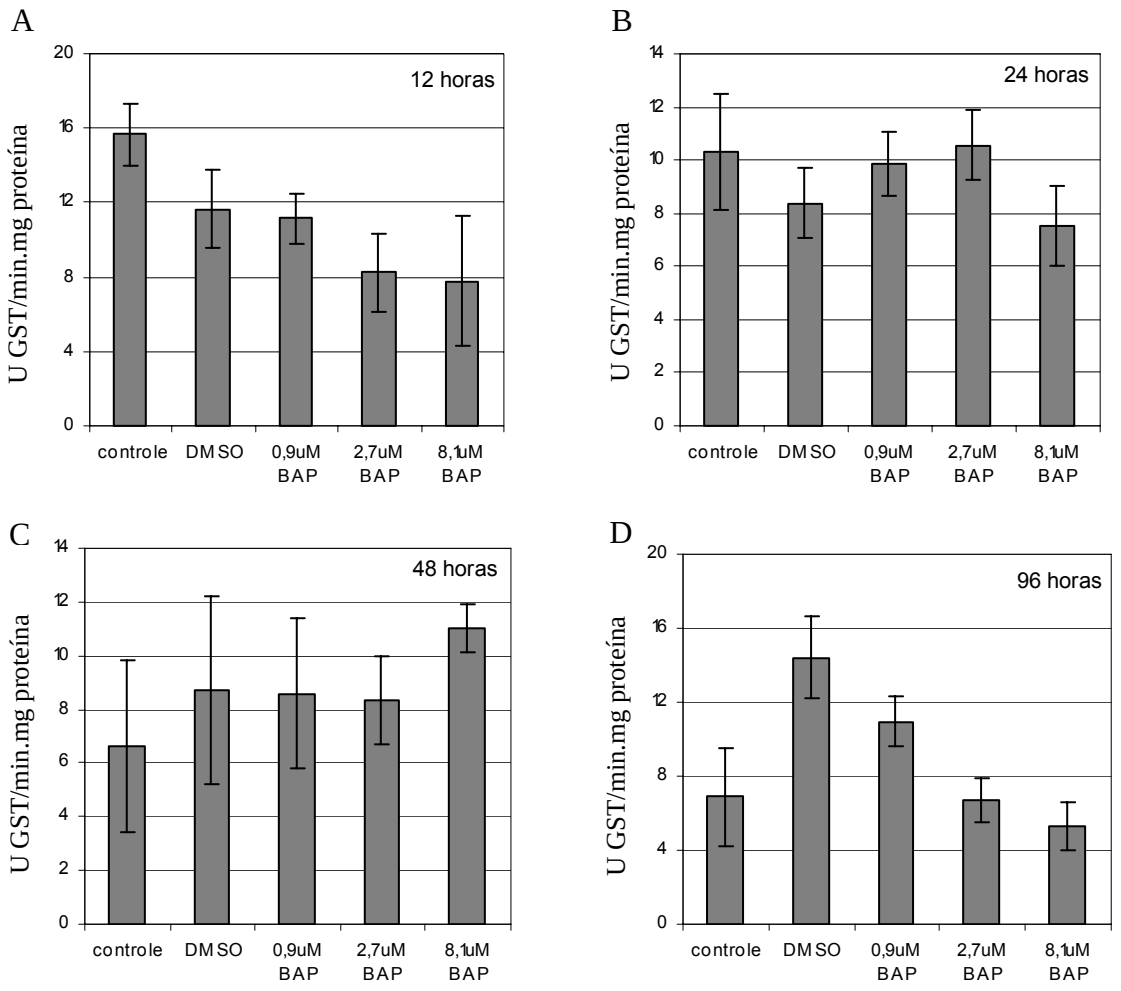

Figura 26. Atividade da enzima glutationa-S-transferase, expressa em unidades de glutationa por minuto por miligrama de proteína (U GST/min.mg proteína) para os peixes de experimentos de exposição ao benzo(a)pireno (BAP) nos diferentes períodos: 12 horas **(A)**, 24 horas **(B)**, 48 horas **(C)** e 96 horas **(D)**.

Tabela 1. Distribuição dos 160 peixes utilizados nos diferentes grupos de exposição aos poluentes naftaleno e benzo(a)pireno em diferentes períodos de exposição.

Número de peixes	Controle	DMSO	NAP 0,9µM	NAP 2,7µM	NAP 8,1µM	BAP 0,9µM	BAP 2,7µM	BAP 8,1µM
12 horas	5	5	5	5	5	5	5	5
24 horas	5	5	5	5	5	5	5	5
48 horas	5	5	5	5	5	5	5	5
96 horas	5	5	5	5	5	5	5	5
Total	20	20	20	20	20	20	20	20

Tabela 2. Tecidos dissecados de cada peixe utilizado nos experimentos de exposição aos HPAs, forma de preservação e finalidade.

Material coletado e forma de preservação:			**Finalidade**
Sangue:	10 µL	tampão fosfato	ensaio cometa
	gotas	esfregaço em lâmina	teste de micronúcleo
Brânquias:	1º arco branquial esquerdo	formaldeído	histopatologia
	2º arco branquial esquerdo	glutaraldeído	ultramorfologia
	3º arco branquial esquerdo	nitrogênio líquido	*western blot*
Fígado:	partes do tecido	formaldeído	histopatologia
		nitrogênio líquido	enzimologia

Tabela 3. Freqüência e intensidade de alterações morfológicas em brânquias de *T. carolinus*. HE e H-VOF.

	Grupos	Hipertrofia do epitélio	Deslocamento das células epiteliais	Infiltração de leucócitos no epitélio	Estreitamento do epitélio respiratório	Ruptura e descamação	Hiperplasia de células epiteliais	Hiperplasia caótica de células epiteliais	Fusão de extremidades de lamela secundária	Espessamento de tecido interlamelar	Fusão de muitas lamelas secundárias	Encurtamento da lamela secundária
12 horas	controle	-	-	-	-	+/+/-	-	-	-	-	-	-
	DMSO	+/+/-	+/+/-	-	-	+/+/-	-	-	-	-	-	-
	0,9uM NAP	+/+	+/+	-	-	+/+	-	-	-	-	-	-
	2,7uM NAP	+/+	+/+	-	-	+/+	-	-	-	-	-	-
	8,1uM NAP	+/+	+/+	+/+	-	++/+	-	-	-	+/+/-	+/+/-	-
	0,9uM BAP	+/+	++/+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2,7uM BAP	-	+/+/-	-	-	+/+/-	++/+	-	-	+/+	-	-
	8,1uM BAP	++/+	+/+/-	+/+	-	++/++	-	-	-	-	-	-
24 horas	controle	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	DMSO	-	+/+	-	-	+/+/-	-	-	-	-	-	-
	0,9uM NAP	+/+	+/+/-	-	-	++/++	-	-	-	-	-	-
	2,7uM NAP	++/++	+/+/-	+/+	-	+/+/-	+/++	+/++	-	+++/+++	-	-
	8,1uM NAP	++/+	+++/+++	++/+	+/+	+++/++	-	-	+/++	+++/+++	-	++/++
	0,9uM BAP	++/++	+/+/-	-	-	++/+	-	-	-	+/+	-	-
	2,7uM BAP	++/+	+/+/-	+/+	++/++	+/++	-	-	+/+	++/++	-	-
	8,1uM BAP	++/++	+/+/-	+/+	-	+++/++	+++/++	-	-	++/++	-	-
48 horas	controle	+/+/-	+/+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	DMSO	-	-	-	-	-	-	+/+	-	+/+	-	-
	0,9uM NAP	++/++	+/+	+/+	-	+/+	-	-	+/+	++/++	-	-
	2,7uM NAP	++/++	+/+	+/+/-	++/+	+++/++	-	-	++/++	++/+++	++/++	-
	8,1uM NAP	+/+/-	++/+	++/+	+/+	+++/+++	-	-	-	++/+++	++/++	-
	0,9uM BAP	++/++	+/+	+/+	-	++/++	-	+/++	+/+	++/+++	++/++	-
	2,7uM BAP	++/+++	++/++	+/+	-	-	++/++	-	-	+++/+++	+++/++	-
	8,1uM BAP	+++/+++	+++/++	++/++	-	+++/++	++/++	++/++	+/++	++/+++	+++/+++	-
96 horas	controle	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	DMSO	-	-	-	-	+/+/-	-	-	-	-	-	-
	0,9uM NAP	+/+/-	+/+	+/+	+/+/-	++/+	-	-	+/+	+/+	-	-
	2,7uM NAP	++/++	+++/++	++/++	+/++	++/+	-	-	+/+	+/+	++/++	-
	8,1uM NAP	++/++	+++/+++	++/++	++/+	++/++	+/+	-	++/++	++/++	-	+/+
	0,9uM BAP	++/++	+++/++	+/+	+/+	++/+	-	-	+/+	++/++	+/+	-
	2,7uM BAP	++/++	+++/+++	++/++	+/++	+++/++	++/++	-	++/+++	++/+++	-	-
	8,1uM BAP	+++/++	-	+++/+++	++/+++	+++/+++	+++/+++	+++/+++	+++/++	+++/+++	++/++	++/++

Tabela 4. Continuação de freqüência e intensidade de alterações morfológicas em brânquias de *T. carolinus*. HE e H-VOF.

	Grupos	Fusão completa de lamelas secundárias	Telangiectasia de lamelas	Alargamento de vasos sangüíneos	Hemorragias com ruptura epitelial	Ectasia, aneurismas	Parasitas	Fibrose	Necrose	Hiperplasia de células de cloro	Hipertrofia de células de cloro	Hiperplasia de células mucosas	Hipertrofia de células mucosas
12 horas	controle	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
	DMSO	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
	0,9uM NAP	-	-	+/+/-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
	2,7uM NAP	-	-	+/+/-	-	-	++	-	-	-	-	-	-
	8,1uM NAP	-	+/++	++/++	-	+/+/-	++	-	-	-	+/+	-	+/+
	0,9uM BAP	-	++/+/-	+/+/-	-	-	+	-	-	-	+/+	-	-
	2,7uM BAP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+/+/-	-	-
	8,1uM BAP	-	++/++	++/++	-	+/+/-	-	-	-	-	++/++	+/++	+/+
24 horas	controle	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
	DMSO	-	+/+/-	+/+/-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	0,9uM NAP	-	++/++	+/+	-	-	-	-	-	-	++/+/-	-	-
	2,7uM NAP	++/++	++/+++	++/++	-	-	++	-	+/++	-	+/+	++/++	-
	8,1uM NAP	-	+++/+++	+++/++	+/+	-	+++	-	+/+	++/+	++/+++	++/+++	++/++
	0,9uM BAP	-	+/+	+/+	-	+/+	+	-	-	-	++/+	-	-
	2,7uM BAP	-	++/+++	+/++	-	-	++	-	-	+/++	-	++/++	-
	8,1uM BAP	-	+++/++	+++/++	+/++	-	++	-	-	++/++	++/++	++/++	+/+
48 horas	controle	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+/+/-
	DMSO	+/+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
	0,9uM NAP	-	+/+	+/+	-	-	+	-	+/+	-	++/++	+/+	+/+
	2,7uM NAP	-	++/++	++/++	+/++	-	++	-	++/+	-	+/+/-	+/+	-
	8,1uM NAP	-	++/+++	++/++	+/+	-	-	-	++/++	-	++/++	+/+	++/++
	0,9uM BAP	-	+++/+++	++/++	+/++	+/++	++	-	+/+/-	+/++	-	+/+	-
	2,7uM BAP	-	-	++/++	+/++	-	+++	-	+/+	+/+	+/+	-	-
	8,1uM BAP	-	+++/++	+++/++	++/++	-	+++	-	++/+++	+++/+++	++/+++	++/++	++/++
96 horas	controle	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	DMSO	-	+/+	+/+/-	-	-	++	-	-	-	+/+/-	-	-
	0,9uM NAP	-	++/++	+++/++	+/+/-	-	++	-	+/+	-	+/+/-	+/+/-	+/+
	2,7uM NAP	+/+	++/++	++/++	+/+	+/+	++	-	+/++	++/++	++/++	++/++	++/++
	8,1uM NAP	-	++/+++	++/+++	+/+/-	++/++	++	-	++/+++	++/++	+++/+++	-	++/++
	0,9uM BAP	-	+++/++	+/+	-	-	++	-	+/+	+/+	++/++	+/+	+/+
	2,7uM BAP	-	+++/++++	+++/+++	++/++	++/++	++	-	++/++	-	++/++	+/+	++/++
	8,1uM BAP	++/++	+++/++++	++/+++	++/+++	+/+	++	-	+++/++++	-	++/+++	-	-

Tabela 5. Freqüência e intensidade de alterações morfológicas em fígados de *T. carolinus.* HE e H-VOF.

	Grupos	Hiperemia de capilares	Resposta inflamatória (leucócitos)	Dilatação e granulação celular	Estancamento sangüíneo	Infiltração de sangue nos sinusóides (congestão)	Diminuição do tamanho dos hepatócitos	Incremento de vacúolos lipídicos	Anisocitose e anisocariose dos hepatócitos	Aumento da eosinofilia citoplasmática	Hipertrofia hepatócitos
12 horas	controle	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	DMSO	-	-	-	-	+/+	-	+/+	-	-	-
	0,9uM NAP	-	-	-	-	+/+/++	-	+/+	-	+/+/-	-
	2,7uM NAP	+/+	-	+/+/-	-	+/+/-	-	++/+	-	-	-
	8,1uM NAP	++/+	+/+	+/+	-	++/+	-	-	-	+/+	-
	0,9uM BAP	+/+	-	-	-	-	-	-	-	+/+	-
	2,7uM BAP	-	-	+/+	-	+/+/-	-	++/+	+/+	+/+	-
	8,1uM BAP	-	-	+/+	-	+/+/-	-	++/+	+/+	+/+	-
24 horas	controle	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	DMSO	+/+	-	-	-	+/+/-	-	+/+/-	-	-	-
	0,9uM NAP	+++/++	+/+/-	+/++	-	+/+	-	+/+	-	-	+/+
	2,7uM NAP	-	-	+/+	-	+/+	-	++/+	-	++/+	-
	8,1uM NAP	+++/+++	++/++	++/++	-	++/++	-	-	-	-	-
	0,9uM BAP	++/++	-	+/+	-	++/++	-	++/++	-	-	-
	2,7uM BAP	+/+	+/+/-	+/+	-	+/+/-	+/+	++/++	++/++	+/+/-	-
	8,1uM BAP	++/++	+/++	+/+	-	++/++	-	+/+/-	+/+/-	++/++	-
48 horas	controle	+/+/-	-	+/+/-	-	-	-	-	-	-	-
	DMSO	+/+	-	+/+	-	-	-	+/+	-	-	-
	0,9uM NAP	++/++	+/+	+/+/-	-	+/+	-	++/+	-	++/+	-
	2,7uM NAP	++/+	++/+	+/+	-	++/+	-	+++/++	-	+/+	-
	8,1uM NAP	++/+++	++/++	+/+	-	+/+	-	+++/+++	-	+/+/-	-
	0,9uM BAP	+/++	+/+/-	+/++	-	+/+	-	+/+	+/+	++/++	-
	2,7uM BAP	+/++	+/+	++/++	-	+/+/-	-	+++/++	++/++	-	++/++
	8,1uM BAP	+++/+++	++/+++	+++/+++	++/++	+++/++	+/+	++/++	++/++	+/++	+/+
96 horas	controle	+/+	-	+/+/-	-	-	-	-	-	-	-
	DMSO	+/+	-	+/+/-	-	-	-	-	-	-	-
	0,9uM NAP	+/+	+/+	++/++	-	+/+	+/+	-	+/+	+/+	-
	2,7uM NAP	++/++	++/+	++/++	+/++	++/++	++/+	-	++/++	+/+	+/+
	8,1uM NAP	+++/+++	+++/+++	+++/++	-	++++/++	++/++	+/+	-	++/++	-
	0,9uM BAP	+/+	++/++	+/+	-	++/+	-	++/++	+/+	+/++	-
	2,7uM BAP	+++/+++	++/++	+++/++	+/+++	++/+++	++/++	+++/+++	++/++	+/+	+/+
	8,1uM BAP	+++/++++	+++/+++	+++/+++	-	+++/+++	+++/++	+/+	+++/+++	+++/+++	++/++

Tabela 6. Continuação de freqüência e intensidade de alterações morfológicas em fígados de *T. carolinus.* HE e H-VOF.

	Grupos	Cariólise	Citólise	Necrose focal	Hepatite	Cirrose	Tumor	Dilatação dos sinusóides	Colanginoma
12 horas	Controle	-	-	-	-	-	-	-	-
	DMSO	+/+/-	+/+/-	-	-	-	-	-	-
	0,9uM NAP	-	-	-	-	-	-	+/+	-
	2,7uM NAP	+/+	+/+	+/+	-	-	-	+/+	-
	8,1uM NAP	-	+/+	+/+	-	-	-	+/+	-
	0,9uM BAP	-	-	-	-	-	-	-	-
	2,7uM BAP	-	++/+	-	-	-	-	-	-
	8,1uM BAP	-	++/+	-	-	-	-	-	-
24 horas	Controle	-	-	-	-	-	-	-	-
	DMSO	-	-	-	-	-	-	+/+/-	-
	0,9uM NAP	+/+/-	-	-	+/+	-	-	++/+/-	-
	2,7uM NAP	++/+	++/++	+/+/-	+/+	-	-	+/+/-	-
	8,1uM NAP	-	-	+/+	+/+/-	+/+/-	-	+/+/-	-
	0,9uM BAP	+/+/-	+/+/-	+/+/-	+/+/-	-	-	+/+/-	-
	2,7uM BAP	+/+	++/++	++/++	-	+/+/-	-	+/+/-	-
	8,1uM BAP	-	+++/++	++/++	++/++	+/+	-	++/++	-
48 horas	Controle	+/+/-	-	-	-	-	-	+/+/-	-
	DMSO	+/+/-	+/+/-	-	-	-	-	-	-
	0,9uM NAP	-	+/+	++/++	++/++	+/+	-	-	-
	2,7uM NAP	+/+	+++/++	+/+++	+/++	+/+/-	-	++/+	-
	8,1uM NAP	+/+	++/++	++/++	++/++	+/+	-	-	-
	0,9uM BAP	+/++	++/++	+/+/-	+/+	+/+	-	+/+	-
	2,7uM BAP	++/++	++/++	++/++	++/+	+/+	-	++/++	-
	8,1uM BAP	++/+++	+++/+++	+++/++++	++/++	+/+/-	-	++/++	-
96 horas	Controle	-	+/+/-	-	-	-	-	-	-
	DMSO	-	+/+/-	-	-	-	-	+/+	-
	0,9uM NAP	+/+	++/+	+/++	+/+	+/+	-	++/+	-
	2,7uM NAP	++/++	++/++	++/++	+/++	+/+	-	+/++	-
	8,1uM NAP	+/+	+++/+++	++/+++	++/+++	++/+++	-	+++/++	-
	0,9uM BAP	+/+	++/++	+/++	++/+	+/+	-	++/++	-
	2,7uM BAP	++/+++	+++/+++	++/++	+++/++	++/+	-	+++/++	-
	8,1uM BAP	+++/++++	+++/+++	+++/+++	+++/+++	+++/+++	-	++/++	-

Tabela 7. Freqüência e intensidade de coloração em fígado e brânquia de *T. carolinus* através da técnica de azul de bromofenol.

	Grupos	FÍGADO						BRÂNQUIA					
		Citoplasma dos hepatócitos	Endotélio dos sinusóides	Células sangüíneas	Endotélio de vasos	Endotélio de canalículos biliares	Células acinares pancreáticas	Células pilares	Células epiteliais	Células sangüíneas	Cartilagem	Células de cloro	Células mucosas
12 horas	controle	+/+	-	+/+	-	-	-	-	+/+/-	+/+/-	+++/++	-	-
	DMSO	-	-	-	-	-	-	-	-	+/+	++++/++	-	-
	0,9uM NAP	-	+/+/-	-	-	-	-	+/+	-	+/+/-	+++/++	-	-
	2,7uM NAP	-	-	-	-	-	-	-	-	+/+/-	+++/++	-	-
	8,1uM NAP	-	-	-	-	-	-	-	+/+/-	+/++	++/++	-	-
	0,9uM BAP	-	-	-	-	-	-	-	-	+/+/-	+++/+	-	-
	2,7uM BAP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++/++	-	-
	8,1uM BAP	-	-	-	+/+/-	-	-	++/++	-	+/+	+++/++	-	-
24 horas	controle	-	-	+/+/-	-	-	-	-	-	+/+/-	++++/+	-	-
	DMSO	-	-	-	-	-	-	-	-	+/+/-	++++/++	-	-
	0,9uM NAP	+/+/-	-	-	-	-	-	+/+	+/+	+++/++	++++/+++	-	-
	2,7uM NAP	-	-	-	-	-	-	+/+/-	-	-	+/+	-	-
	8,1uM NAP	-	-	-	-	-	-	+/+/-	++/+/-	+/+/-	+++/+	-	-
	0,9uM BAP	-	-	-	-	-	-	-	-	+/+	+++/++	-	-
	2,7uM BAP	+/+/-	-	-	-	-	-	-	-	++/++	++/++	-	-
	8,1uM BAP	-	-	-	-	++/+	-	++/++	++/++	+++/++	+++/++	+/+	+/+/-
48 horas	controle	+/+/-	+/+/-	-	-	-	-	+/+/-	+/+/-	+/+/-	+++/+++	-	-
	DMSO	-	-	-	-	-	-	-	-	+/+/-	++++/+	-	-
	0,9uM NAP	-	-	+/+	-	-	-	-	-	++++/+++	++++/+	-	-
	2,7uM NAP	-	-	-	-	-	-	+/+/-	-	-	+++/+++	-	-
	8,1uM NAP	-	-	++/++	-	-	-	++/++	-	+++/+++	+++/+++	-	-
	0,9uM BAP	-	-	-	-	-	-	+/+/-	+/+	-	+++/++	-	-
	2,7uM BAP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++/++	-	-
	8,1uM BAP	-	-	-	-	-	-	+/+/-	-	++/+	+++/+	-	-
96 horas	controle	-	-	-	-	-	-	-	-	+/+/-	+++/++	-	-
	DMSO	-	-	-	-	-	-	-	-	++/++	++++/++	-	-
	0,9uM NAP	+/+/-	-	-	++/++	-	-	++/++	-	++/++	+++/+++	-	-
	2,7uM NAP	-	-	-	-	-	-	-	-	+/+/-	++++/+	-	-
	8,1uM NAP	+/+/-	-	-	-	-	-	+/+/-	+/+/-	+/+/-	+++/++	-	-
	0,9uM BAP	+/+/-	-	-	-	+/+/-	-	+/+/-	+/+/-	+/+/-	+++/++	+/+/-	-
	2,7uM BAP	-	-	-	-	-	-	-	+/+/-	++/++	+++/++	-	-
	8,1uM BAP	+/+/-	-	-	-	-	-	++/++	+/+/-	++/+	++++/+++	-	-

Tabela 8. Freqüência e intensidade de coloração em fígado e brânquia de *T. carolinus* através da técnica de azul alcian pH 0.5.

	Grupos	FÍGADO						BRÂNQUIA					
		Citoplasma dos hepatócitos	Endotélio dos sinusóides (céls verm.)	Células sangüíneas	Endotélio de vasos	Endotélio de canalículos biliares	Células acinares pancreáticas	Células pilares	Células epiteliais	Células sangüíneas	Cartilagem	Células de cloro	Células mucosas
12 horas	controle	+/+/-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++/++	-	-
	DMSO	+/+/-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++/+++	-	-
	0,9uM NAP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++/++++	-	-
	2,7uM NAP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+/++	-	-
	8,1uM NAP	+/+/-	-	-	-	-	-	-	-	-	++++/+++	-	-
	0,9uM BAP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++++/++++	-	-
	2,7uM BAP	+/+/-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++/++	-	-
	8,1uM BAP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++/+++	-	-
24 horas	controle		-	-	-	-	-	-	-	-	++/++	-	-
	DMSO	+/+/-	-	-	-	-	-	-	-	-	++/+	-	-
	0,9uM NAP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++/+++	-	-
	2,7uM NAP	-	-	-	-	-	-	-	+/+/-	-	+++/++	-	-
	8,1uM NAP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++/+++	-	-
	0,9uM BAP	++/+/-	-	-	-	-	-	-	-	-	+/++	-	-
	2,7uM BAP	-	-	-	-	-	-	+/+/-	+/+/-	+/+/-	++++/+++	-	-
	8,1uM BAP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++/+++	-	-
48 horas	controle	++/+/-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++/+++	-	-
	DMSO	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++/++	-	-
	0,9uM NAP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++/+++	-	-
	2,7uM NAP	++/+/-	-	-	-	-	-	+/+/-	-	-	+++/++++	-	-
	8,1uM NAP	+/++	-	-	-	-	-	-	-	+/++	+++/+++	-	-
	0,9uM BAP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++/+++	-	-
	2,7uM BAP	++/+/-	-	-	-	-	-	-	-	-	++++/+++	-	-
	8,1uM BAP	+/+	-	-	-	-	-	-	-	-	+++/+++	-	-
96 horas	controle	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++/++	-	-
	DMSO	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++/++	-	-
	0,9uM NAP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++/+++	-	-
	2,7uM NAP	-	-	-	-	-	-	-	-	+/+	++++/+++	-	-
	8,1uM NAP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++/+++	-	-
	0,9uM BAP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++/+++	-	-
	2,7uM BAP	+/+/-	-	-	-	-	-	-	+/+/-	-	+++/+++	-	-
	8,1uM BAP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++/+++	-	-

Tabela 9. Freqüência e intensidade de coloração em fígado e brânquia de *T. carolinus* através da técnica de azul alcian pH 1.0.

	Grupos	FÍGADO						BRÂNQUIA					
		Citoplasma dos hepatócitos	Endotélio dos sinusóides (céls verm.)	Células sangüíneas	Endotélio de vasos	Endotélio de canalículos biliares	Células acinares pancreáticas	Células pilares	Células epiteliais	Células sangüíneas	Cartilagem	Células de cloro	Células mucosas
12 horas	controle	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++/+++	-	-
	DMSO	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++/+++	-	-
	0,9uM NAP	-	-	+/+	-	-	-	-	-	-	+++/+++	-	-
	2,7uM NAP	-	-	-	-	-	-	-	-	+/+/-	+++/+++	-	-
	8,1uM NAP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++/+++	-	-
	0,9uM BAP	+/+/-	-	-	-	-	-	-	-	+/+/-	+++/++	-	-
	2,7uM BAP	-	-	-	-	-	-	-	+/+	+/+	+++/++++	-	-
	8,1uM BAP	-	-	-	-	-	-	-	-	+/+/-	+++/+++	-	-
24 horas	controle	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++++/+++	-	-
	DMSO	+/+	-	-	-	-	-	-	-	+/+	++++/++++	-	-
	0,9uM NAP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++++/+++	-	-
	2,7uM NAP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++/+++	-	-
	8,1uM NAP	+/+/-	-	-	-	-	-	-	-	-	++++/+++	-	-
	0,9uM BAP	-	-	-	-	-	-	-	-	+/+/-	++/++	-	-
	2,7uM BAP	+/+/-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++/+++	-	-
	8,1uM BAP	+/+/-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++/+++	-	-
48 horas	controle	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++/++	-	-
	DMSO	+/+/-	-	-	-	-	-	-	-	+/+/-	++++/+++	-	-
	0,9uM NAP	-	-	+/+/-	-	-	-	-	-	-	+++/+++	-	-
	2,7uM NAP	-	-	+/+	-	-	-	-	-	-	++++/+++	-	-
	8,1uM NAP	-	-	+/+/-	-	-	-	-	-	-	+/+	-	-
	0,9uM BAP	-	-	+/+/-	-	-	-	-	-	+/+/-	++++/++++	-	-
	2,7uM BAP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++/+++	-	-
	8,1uM BAP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++/+++	-	-
96 horas	controle	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+/+	-	-
	DMSO	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++++/++++	-	-
	0,9uM NAP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++/+++	-	-
	2,7uM NAP	-	-	+/+/-	-	-	-	-	-	-	++++/++++	-	-
	8,1uM NAP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++/+++	-	-
	0,9uM BAP	-	-	-	-	-	-	-	+/+/-	+/+/-	++++/+++	-	-
	2,7uM BAP	-	-	+/+/-	-	-	-	-	-	-	++++/++++	-	-
	8,1uM BAP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++++/+++	-	-

Tabela 10. Freqüência e intensidade de coloração em fígado e brânquia de *T. carolinus* através da técnica de azul alcian pH 2.5.

	Grupos	FÍGADO						BRÂNQUIA					
		Citoplasma dos hepatócitos	Endotélio dos sinusóides (céls verm.)	Células sangüíneas	Endotélio de vasos	Endotélio de canalículos biliares	Células acinares pancreáticas	Células pilares	Células epiteliais	Células sangüíneas	Cartilagem	Células de cloro	Células mucosas
12 horas	controle	++++/+/-	-	+/+/-	+/+/-	-	-	+++/+/-	+++/+	+++/+	++++/+++	+++/+/-	++/+/-
	DMSO	-	-	+/++	-	-	-	++/++	++/++	+++/+	++++/++++	++/+	+++/+
	0,9uM NAP	++/+/-	-	-	-	-	-	-	+/+	++/+	++++/+++	-	-
	2,7uM NAP	-	-	-	-	-	-	-	-	+/++	+++/+++	-	-
	8,1uM NAP	+/+/-	-	-	-	-	-	++/+/-	++/+/-	+++/+/-	++/++	+++/+	++/+
	0,9uM BAP	+/+	-	+/+/-	-	-	-	+++/++	+++/++	+++/++	++/++	++/++	++/++
	2,7uM BAP	+/++	-	-	-	-	-	-	+++/+	+++/+	+++/+++	-	++/+
	8,1uM BAP	+/+	-	-	-	-	-	++/++	++/++	++++/++	++++/++++	++/+	++/+
24 horas	controle	+/+	-	-	-	-	-	+/+	++/++	+++/++	++++/+++	-	++/+
	DMSO	-	-	-	+/+	-	-	++/+	++/+	++/+++	+++/+++	+++/+/-	+++/+/-
	0,9uM NAP	++++/+/-	-	-	-	-	-	+/+/-	+/+	++/+/-	+++/+	++/+	+/+/-
	2,7uM NAP	-	-	+/++	-	-	-	+++/+	+++/+	+++/+	++++/++++	++/+	++/+
	8,1uM NAP	+/+/-	-	-	-	-	-	+/+/-	+/+/-	++/++	+++/++	+/+/-	-
	0,9uM BAP	+/+	-	-	-	-	-	-	+/+	+/+	++/+	-	-
	2,7uM BAP	-	-	-	-	-	-	++/+	+/+/-	++/++	++/++	+/+/-	+/+/-
	8,1uM BAP	-	-	-	-	-	-	++/+	++/+	++/+	++/+++	++/+	++/+
48 horas	controle	++++/+	-	+/+/-	-	-	-	++++/++	++++/++	++++/+	++++/+++	+++/++	+++/++
	DMSO	-	-	-	+/+	-	-	++/+	++/+	+++/++	+++/+++	++/+	++/+
	0,9uM NAP	-	-	+/+/-	-	-	-	-	+/+	+/+/-	++++/++++	+/+/-	-
	2,7uM NAP	-	-	-	-	-	-	+++/+/-	+++/+/-	+++/++	+++/++	+++/+/-	+++/+/-
	8,1uM NAP	+/+/-	-	+/+	-	-	+/+	++/++	++/++	++/++	++/++	++/+	++/++
	0,9uM BAP	++++/+/-	-	+/+/-	-	-	-	-	+/+	++/++	++++/+++	-	-
	2,7uM BAP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	8,1uM BAP	-	-	-	+/+/-	-	-	++/+	++/++	++/++	++++/+++	+/+	-
96 horas	controle	+/+	-	++/++	+/+/-	-	-	-	+/+/-	+/+/-	+++/+++	-	-
	DMSO	+/+/-	-	+/+	-	-	-	+/+	+++/++	+++/+	+++/+++	++/+	+++/+
	0,9uM NAP	+/+	-	+/+/-	-	-	-	+/+/-	-	++/+	+++/++	-	-
	2,7uM NAP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++/++	-	-
	8,1uM NAP	+/++	-	-	-	-	-	-	++/+	+++/+	++++/+++	-	-
	0,9uM BAP	-	-	-	-	-	-	++/+	+++/++	++/+	++++/++++	++/++	++/+
	2,7uM BAP	+++/+	-	+/++	-	-	-	++/++	+/+/-	++/++	++++/++++	-	-
	8,1uM BAP	-	-	-	+/+	-	-	++/+	++/++	++/+++	+++/++	++/+	++/+

Tabela 11. Freqüência e intensidade de coloração em fígado e brânquia de *T. carolinus* através das técnicas de PAS e Carmin the best.

	Grupos	Citoplasma dos hepatócitos (PAS)	Citoplasma dos hepatócitos (Carmin the best)	Células mucosas das brânquias (PAS)
12 horas	controle	+/++	+/+	++/+++
	DMSO	+/+	+/+/-	+++/+++
	0,9uM NAP	++/++	++/++	-
	2,7uM NAP	++/++	++/++	+/+/-
	8,1uM NAP	-	++/++	-
	0,9uM BAP	++/++	+/+	+++/++
	2,7uM BAP	-	+/++	-
	8,1uM BAP	-	++/++	-
24 horas	controle	-	-	+++/++++
	DMSO	+/++	+/+/-	+/++
	0,9uM NAP	+/+/-	+/+	++++/++++
	2,7uM NAP	+++/++++	+/+	++/++
	8,1uM NAP	-	++/+/-	++/+++
	0,9uM BAP	++/+++	++/++	-
	2,7uM BAP	++/+++	++/++	-
	8,1uM BAP	-	+/+/-	+++/+++
48 horas	controle	+++/++	+/++	+++/++++
	DMSO	++/+++	-	-
	0,9uM NAP	+/+/-	-	++/++++
	2,7uM NAP	++/+++	++/++	++/++
	8,1uM NAP	++/+++	++/++	+++/++++
	0,9uM BAP	++/++	++/++	+++/+++
	2,7uM BAP	+++/++	++/+++	+++/+++
	8,1uM BAP	-	-	-
96 horas	controle	-	+/+/-	-
	DMSO	++/++	++/++	++/+++
	0,9uM NAP	-	+/++	-
	2,7uM NAP	-	++/++	+/++
	8,1uM NAP	++/++	+/+/-	+/+
	0,9uM BAP	+++/+++	+/+/-	++/+++
	2,7uM BAP	-	++/++	+/++
	8,1uM BAP	-	+/++	+/++

Tabela 12. Freqüência e intensidade de reação ao anticorpo CYP1A em fígado e brânquia de *T. carolinus* através do método imunohistoquímico.

	Grupos	FÍGADO						BRÂNQUIA				
		Citoplasma dos hepatócitos	Endotélio dos sinusóides (céls verm.)	Células sangüíneas	Endotélio de vasos	Endotélio de canalículos biliares	Células acinares pancreáticas	Células pilares	Células epiteliais	Células de cloro	Células mucosas	Células sangüíneas
12 horas	controle	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+/+
	DMSO	-	-	++/+/-	-	-	-	-	-	-	-	-
	0,9uM NAP	++/+/-	-	++/++	-	-	-	-	-	-	-	+/+
	2,7uM NAP	+/+/-	-	-	-	-	-	+/++	-	-	+/+/-	++/++
	8,1uM NAP	+/+/-	-	++/++	-	+/+	-	+++/++	+++/++	++/++	-	+++/+++
	0,9uM BAP	-	-	++/++	+/+	-	-	-	-	-	-	+/+/-
	2,7uM BAP	+/+	-	+/++	-	-	-	+/++	-	-	-	++/++
	8,1uM BAP	+/+	-	+++/++++	++/++	++/++	-	-	-	-	-	++/++
24 horas	controle	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	DMSO	-	-	+/+	-	-	-	-	-	-	-	-
	0,9uM NAP	++/++	-	++/+++	++/+++	+/+	-	-	-	-	-	+/+/-
	2,7uM NAP	++/+	-	+/++	-	-	-	+/+/-	-	-	-	+/+
	8,1uM NAP	++/++	-	+/++	-	-	-	+/+/-	+/+	-	-	+/+/-
	0,9uM BAP	++/++	-	++/++	+/+	-	-	-	-	-	-	-
	2,7uM BAP	++/++	-	+++/++	++/++	-	-	++/+	+/+	-	-	++/++
	8,1uM BAP	++/+/-	-	++/++	++/+++	++/+++	++/++	++/++	-	-	-	+++/++
48 horas	controle	-	-	+/+	-	-	-	-	-	-	-	-
	DMSO	-	-	+/+	-	-	-	-	-	-	-	-
	0,9uM NAP	+/+/-	-	++/+++	++/++	-	-	+/++	-	-	-	++/++
	2,7uM NAP	++/++	-	++/+++	++/++	-	-	+/+	+/+/-	-	-	++/++
	8,1uM NAP	++/++	+/+	+++/+++	++/++	+/++	+/++	++/++	++/+	-	+/+	+++/++
	0,9uM BAP	++/+++	+/+/-	+++/++++	+/+/-	-	-	-	-	-	-	+/+/-
	2,7uM BAP	++/++	+/+/-	++/+++	+/+	-	-	-	-	-	-	++/+
	8,1uM BAP	+++/++	++/++	+++/++++	++/+++	++/+++	++/+++	+/+	+/+/-	-	-	++/+++
96 horas	controle	-	-	+/+	-	-	-	-	-	-	-	-
	DMSO	++/+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	0,9uM NAP	++/+	+/+/-	++/++	+/++	-	-	++/+	-	-	-	+++/++
	2,7uM NAP	+/+	-	+++/+++	+/+	-	-	++/++	+++/++	-	-	+++/++++
	8,1uM NAP	++/+	+/+/-	+/+++	+/+++	+/++	+/++	++/++	++/+++	+/+/-	-	+++/+++
	0,9uM BAP	++/++	++/+	+/++	+/+	++/++	++/+	+++/++	+++/+++	-	+/+/-	+++/+++
	2,7uM BAP	+++/++	++/++	++/+++	++/++	++/+	-	+++/++	+++/++	-	++/++	+++/+++
	8,1uM BAP	+++/+++	++/++	+++/+++	++/+++	-	-	+++/+++	+/++	++/++	++/++	++++/++++