

LABORATÓRIO DE EDUCAÇÃO PROFISSIONAL EM TÉCNICAS LABORATORIAIS  
EM SAÚDE  
ESCOLA POLITÉCNICA DE SAÚDE JOAQUIM VENÂNCIO  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

Tiago Pereira dos Santos

“AVALIAÇÃO DE BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS E HISTOLÓGICO DE  
TILÁPIAS (*Oreochromis niloticus*) EXPOSTAS AO CHUMBO”

Rio de Janeiro

2009

Tiago Pereira dos Santos

“AVALIAÇÃO DE BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS E HISTOLÓGICO DE  
TILÁPIAS (*Oreochromis niloticus*) EXPOSTAS AO CHUMBO”

Trabalho de conclusão de curso apresentada à  
Escola Politécnica de Saúde Joaquim  
Venâncio como requisito parcial para  
aprovação no curso técnico de nível médio em  
saúde com habilitação em análises clínicas

Orientador: Dr. Renato Matos Lopes

Co-orientador: Daniel Santos Souza

Rio de Janeiro

2009

Tiago Pereira dos Santos

“AVALIAÇÃO DE BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS E HISTOLÓGICO DE  
TILÁPIAS (*Oreochromis niloticus*) EXPOSTAS AO CHUMBO”

Trabalho de conclusão de curso apresentada à  
Escola Politécnica de Saúde Joaquim  
Venâncio como requisito parcial para  
aprovação no curso técnico de nível médio em  
saúde com habilitação em análises clínicas

Aprovado em \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

BANCA EXAMINADORA

(Doutor Renato Matos Lopes / EPSJV)

(Biólogo Leandro Medrado / EPSJV)

(Doutor Moacelio Veranio Silva Filho / ENSP)

*Dedico este trabalho  
ao autor da minha vida e da minha salvação: o Senhor Yeshua  
e à minha querida mãe.*

## AGRADECIMENTOS

Quero agradecer, primeiramente, a Deus que me guardou e me sustentou durante esses 18 anos de vida e que me ensinou durante o período que estive nesse colégio a confiar cada dia mais nEle. Quero agradecer também ao seu filho o Senhor Yeshua pela salvação concedida na cruz, que me livrou da morte, podendo hoje ser livre para gozar a real felicidade de poder me chegar a Deus e desfrutar de sua presença.

Agradeço a Igreja do Senhor Yeshua situada na cidade do Rio de Janeiro, aos irmãos pertencentes a Ela (os quais amo), ao Pr. Mario Bahia e ao Pr. Israel que me ensinam a andar nos caminhos do Eterno, aos professores Fábio Míriam e Alex, aos adolescentes e aos demais irmãos.

Agradeço a minha família e também irmãos em Cristo (mãe e irmã) em especial minha mãe, que é uma mulher corajosa e batalhadora, que não abriu mão de mim e por isso hoje posso comemorar a vitória de estar me formando nessa instituição que tanto desejei pertencer.

Agradeço a meu pai que não me esqueceu apesar das circunstâncias.

Agradeço aos meus parentes: a minha vó (que gosto muitíssimo), meus tios Fátima e Gilberto que confiam na minha capacidade e que ajudam enormemente minha família e aos meus primos.

Agradeço aos meus amigos e colegas mais antigos: Ellen, Nathália, Mayara, Vinícius, Guil, Roberto, Sandro. E aos meus mais recentes, que conheci no politécnico: Pedro, Jean, Gabriel, Helena, Bianca, Mayara, Lucas, Tiago, Gabi, Rafael, Jéssica e Marília. (se esqueci de alguém me perdoe)

Agradeço a todos os funcionários da Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio, em especial ao Renato que “me aturou” durante a monografia, mostrando sua paciência e dedicação para a produção deste, pois se não fosse também ele esse trabalho não estaria realizado (um forte abraço). Ao professor Daniel, que o conheço desde os tempos de cursinho e que se mostrou durante esse período uma pessoa também muito atenciosa (um forte abraço também). Ao professor Leandro que aceitou que parte deste trabalho fosse realizado no laboratório da escola, e que mostrou durante esse período total confiança em mim (um forte abraço). Ao professor Flávio que, embora o conheça há pouco tempo, tem mostrado ser uma ótima pessoa, e também contribuiu para esse trabalho (um forte abraço). E aos demais que contribuíram.

Agradeço ao pessoal do CESTEH que se mostram muito atenciosos: Ana, Carlúcio, Rita, Leandro e ao professor Moacelio (que além de aceitar em participar da minha banca, foi um dos que grandemente me ajudou para a elaboração desse trabalho) e à Ana, que além de ser muito atenciosa, também contribuiu cedendo os animais para a realização deste trabalho.

Por fim quero agradecer a todos que ajudaram para que essa monografia fosse realizada.

## RESUMO

Parâmetros sanguíneos e histológicos são ferramentas empregadas para avaliação da saúde de peixes e, como consequência, podem ser utilizadas no auxílio da análise da qualidade ambiental de corpos hídricos. O chumbo é empregado em diversos processos industriais e é um importante contaminante ambiental. Um dos efeitos tóxicos do chumbo é a alteração da síntese da hemoglobina, que ocorre por meio da inibição da enzima ALAD. Esta pode ser empregada, ao lado de outros parâmetros, como biomarcadores da exposição de peixes ao chumbo. Este estudo avaliou os efeitos da exposição ao chumbo por injeção intraperitoneal sobre parâmetros sanguíneos e histológicos de tilápias mantidas em laboratório. Para isto, foram usadas cerca de 80 tilápias, obtidas em um abatedouro, pesando por volta de 450g, que foram anestesiadas com eugenol, sangradas com seringas heparinizadas através da veia caudal e feita a aplicação de diferentes doses de acetato de chumbo (1 e 100mg/kg), por via intraperitoneal, em solução isotônica de glicose. O grupo controle sofreu o mesmo processo, porém foi injetado apenas com solução de glicose. Os parâmetros avaliados foram: glicose, hemoglobina, as atividades das enzimas ALAD e das transaminases, além da avaliação histológica dos fígados. A inibição da ALAD e o aumento dos valores de glicose foram os parâmetros bioquímicos que apresentaram diferenças significativas. Na avaliação histopatológica não foi detectada nenhuma alteração dos fígados dos animais corados com o método HE. A dose de 1mg/kg de acetato de chumbo não provocou a morte de nenhum peixe, porém a dose única de 100mg/kg levou ao óbito todos os animais ao final de 4 dias de exposição.

Palavras-chave: chumbo. Biomarcador. Intoxicação

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Foto da espécie <i>Oreochromis niloticus</i> .....	17
Figura 2	Análise de glicose de tilápias expostas a uma dose de 1mg/kg de acetato de chumbo.....	20
Figura 3	Análise de glicose de tilápias expostas a uma dose de 100mg/kg de acetato de chumbo.....	20
Figura 4	Análise de ALAD de tilápias expostas a uma dose de 1mg/kg de acetato de chumbo.....	21
Figura 5	Análise de ALAD de tilápias expostas a uma dose de 100mg/kg de acetato de chumbo.....	21
Figura 6	Análise de hemoglobina de tilápias expostas a uma dose de 1mg/kg de acetato de chumbo.....	22
Figura 7	Análise de hemoglobina de tilápias expostas a uma dose de 100mg/kg de acetato de chumbo.....	22
Figura 8	Morfologia de tilápias expostas a 1 mg/Kg de acetato de chumbo.....	23
Figura 9	Morfologia de tilápias expostas a 100 mg/Kg de acetato de chumbo.....	24
Figura 10	Micromorfologia de fígado de tilápia para avaliação.....	25
Figura 11	Micromorfologia de fígado de tilápia injetada com 100 mg/kg de acetato de chumbo.....	26
Figura 12	Representação do mecanismo de ação das transaminases TGP e TGO.....	30
Figura 13	Esquema da ação do Pb sobre a biossíntese do HEME na medula óssea.....	32

## LISTA DE SIGLAS

ALA	Àcido delta aminolevulínico
ALAD	Ácido delta aminolevulínico desidratase
ALT/TGP	Alanina Amino Transaminase
AST/TGO	Aspartato Amino Transaminase
CESTEH	Centro de Estudo da Saúde do Trabalhador e Ecologia Humana
CGVAM	Coordenação Geral de vigilância Ambiental
EDTA	Etilenodiaminotetracético
ENSP	Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca
EPSJV	Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
SNVA	Sistema Nacional de Vigilância Ambiental em Saúde

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	7
1.1 ECOTOXICOLOGIA NO BIOMONITORAMENTO AMBIENTAL.....	8
1.2 BIOMARCADORES .....	10
1.3 O CHUMBO .....	10
1.4 CINÉTICA DO CHUMBO NO MEIO AMBIENTE E NOS ORGANISMOS.....	12
1.5 TOXICIDADE DO CHUMBO .....	13
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	16
2.1 GERAL .....	16
2.2 ESPECÍFICOS.....	16
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	17
3.1 ANIMAIS .....	17
3.2 MATERIAIS PARA OS PARÂMETROS HISTOPATOLÓGICOS.....	18
3.3 METODOLOGIA PARA A AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA .....	18
3.4 PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS.....	19
<b>4 RESULTADOS</b> .....	20
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	27
5.1 HISTOTECNOLOGIA DOS TECIDOS.....	27
5.2 TRANSAMINASES.....	29
5.3 GLICOSE .....	30
5.4 ALAD.....	32
5.5 HEMOGLOBINA.....	33
5.6 FÍGADO .....	34
<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	36
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	37

## 1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, devido ao crescimento populacional, aos processos de urbanização e ao uso de novas tecnologias, o homem vem aumentando exponencialmente a pressão sobre o meio ambiente, gerando impactos ambientais negativos que interferem na qualidade da sua própria saúde e na de outras populações. Além disso, com o advento da revolução industrial, foram e ainda são descobertos, desenvolvidos e utilizados em maiores proporções, muitos produtos químicos com alta capacidade de penetração nos compartimentos ambientais (ar, água, solo, biota<sup>1</sup>).

Diante dessa crise ambiental, o meio ambiente vem se tornando nos últimos anos um dos temas centrais dos discursos políticos e sociais que consideram sua deterioração como sendo algo prejudicial à saúde e ao bem estar social. Tendo em vista esta preocupação, especialistas de diversas áreas conceberam um novo enfoque à saúde pública que antes se restringia ao controle e prevenção de doenças infecciosas, onde se combina uma interdependência entre saúde e meio ambiente. Essa combinação é denominada de saúde ambiental (BRILHANTE, 1999).

A Saúde Ambiental utiliza como instrumento metodológico a avaliação de riscos (tanto naturais quanto tecnológicos) de forma a auxiliar e apontar propostas que norteiem as decisões que deverão ser tomadas por essa política.

A partir disso, na década de 1980, foram sendo aprimorados alguns modelos conceituais para a avaliação de riscos em saúde sendo que em 1996 foi publicado um relatório no qual tenta sistematizar diversos fatores de forma a gerir o risco. (BRILHANTE, 1999 e BARCELLOS, 2006).

No Brasil esses modelos foram sendo incorporados pelo SUS à Vigilância Ambiental que é definida como:

um conjunto de ações que proporcionam o conhecimento e a detecção de qualquer mudança nos fatores determinantes e condicionantes do meio ambiente que interferem na saúde humana, com a finalidade de recomendar e adotar medidas de prevenções e controle dos fatores de riscos e das doenças ou agravos relacionados à variável ambiental. (FRANCO NETO apud BARCELLOS, 2006, p. 175).

Sendo assim em 1999 foi implantado no território nacional pelo SUS, através da Coordenação Geral de vigilância Ambiental (CGVAM), o Sistema Nacional de Vigilância

---

<sup>1</sup> Biota, conhecida também como comunidade biológica, é o nome que se dá ao conjunto de populações de diferentes espécies de uma dada região. (AMABIS, 2004).

Ambiental em Saúde (SNVA), que prioriza o estudo no campo do meio ambiente, de fatores biológicos, a qualidade da água para consumo humano, os toxicantes ou poluentes ambientais de caráter químico ou físico que possam interferir na qualidade da água, do ar e do solo, além dos riscos naturais e dos acidentes com outros produtos. (BARCELLOS, 2006).

Norteando para uma das questões centrais da Vigilância Ambiental, a saber, o meio ambiente, é importante ressaltar para esse trabalho a relevância dos corpos hídricos como estudo, uma vez que estes são receptores finais ou temporários de diversos poluentes e, ao mesmo tempo, fornecem recursos econômicos, recreativos, estéticos e ecológicos à sociedade. Sendo assim eles são de grande importância econômica, ambiental e à saúde humana.

Para a análise desses corpos hídricos é necessário fazer menção do conceito de poluição uma vez que ela pode causar perturbações nos ecossistemas podendo assim, modificar algumas das características do meio. (BRILHANTE, 1999)

A Lei Federal N° 6938/81 definiu como poluição as alterações das características do meio ambiente que são resultados de atividades que direta ou indiretamente:

- a) prejudiquem a saúde, a segurança e o bem-estar da população;
- b) criem condições adversas às atividades sociais e econômicas;
- c) afetem desfavoravelmente a biota;
- d) afetem as condições estéticas ou sanitárias do meio ambiente;
- e) lancem matérias ou energia em desacordo com os padrões ambientais estabelecidos;

A partir dessa definição podemos perceber que em relação aos corpos hídricos a acumulação de metais pesados (por exemplo, o chumbo) tem trazido sérias conseqüências para o ecossistema em geral, sendo, portanto considerado um poluente ambiental.

## 1.1 ECOTOXICOLOGIA NO BIOMONITORAMENTO AMBIENTAL

Toxicologia segundo Seizi, Márcio e José em seu livro: Fundamentos de Toxicologia foi definida como sendo: “a ciência que estuda os efeitos nocivos decorrentes das interações de substâncias químicas com o organismo, sob condições específicas de exposição.” (OGA, 2008) Cujas finalidades se baseiam no diagnóstico, tratamento e prevenção da intoxicação que é seu objeto de estudo.

A toxicologia é dividida em várias áreas dependendo do agente intoxicante e da maneira como este atinge um organismo. Uma delas é a toxicologia ambiental que está relaciona-

da com a interação do tóxico com o ambiente (ar, água, solo) e com o homem. É um dos campos de trabalho dessa ciência é a ecotoxicologia que estuda as agressões ecológicas causadas pelo toxicante em animais de um ecossistema afetado. (OGA, 2008).

A ecotoxicologia foi definida em 1969, pelo toxicologista francês René Truhaut durante uma reunião do *committee of the International Council of Scientific Unions* (ICSU), em Estocolmo. Mas Ramade (1977) em seu livro definiu essa ciência como sendo:

a ciência que tem por objetivo estudar as modalidades de contaminação do ambiente pelos poluentes naturais ou sintéticos, produzidos por atividades humanas, seus mecanismos de ação e seus efeitos sobre o conjunto de seres vivos que habitam a biosfera. (MAGALHÃES, 2008, pág. 356)

Portanto essa ciência se tornou uma ferramenta de monitoramento ambiental, pois se fundamenta na avaliação individual de um organismo diante do resultado causado por um estressor químico em seu meio. (MAGALHÃES, 2008).

Na década de 80 agências ambientais do mundo todo começaram a padronizar testes de toxicidade utilizando organismos aquáticos, com a finalidade de estabelecer um controle populacional e um biomonitoramento da qualidade dos corpos hídricos. Em 1975 o Brasil participou da padronização de testes de toxicidade aguda com peixes, e desde então veio adaptando e desenvolvendo testes com outros organismos, entre eles: peixes, algas e microcrustáceos. (MAGALHÃES, 2008).

A ecotoxicologia utiliza-se atualmente de um conceito denominado de “ecologia do estresse” que envolve o conceito de nicho ecológico e os fatores como temperatura, pH, pressão, que são considerados estressores naturais, para relacionar os agentes toxicantes, que podem interferir para menos ou para mais na interação dos fatores estressores com as condições ambientais de sobrevivência e reprodução de um dado organismo fazendo-o encontrar-se fora do seu nicho. Sendo assim esse novo conceito analisa não apenas o indivíduo, como ocorria anteriormente, mas o organismo em um contexto muito mais amplo e sistêmico com o meio ambiente. (MAGALHÃES, 2008).

Sendo assim os peixes tem sido estudado como bioindicadores das condições ambientais de corpos hídricos, pois esses animais ocupam diferentes posições na cadeia alimentar, estão presentes em diversos habitats, resistem a variações bruscas do meio ambiente.

## 1.2 BIOMARCADORES

Atualmente biomarcadores são definidos como alterações biológicas (desde alterações bioquímicas até comportamentais) utilizadas como parâmetros para indicar a intensidade da exposição e o risco que esta pode trazer à saúde do organismo avaliado. (AMORIM, 2003 e JESUS e CARVALHO, 2008)

Os biomarcadores são muito utilizados para fins de confirmação e avaliação do diagnóstico clínico, para mensurar o risco que uma exposição pode trazer à saúde e para o monitoramento ambiental de forma que este também não ofereça risco ao homem. Ou seja, eles são usados para diferentes propósitos dependendo da sua finalidade na pesquisa e da substância exposta. Sendo assim, são classificados de três formas:

1<sup>a</sup> Biomarcadores de exposição → são aqueles que marcam a presença de uma substância a partir da sua biotransformação ou de uma substância química no organismo, que possibilita a quantificação do toxicante dentro de um indivíduo estabelecendo uma relação entre a exposição externa e a determinação da quantidade da exposição interna. (AMORIM, 2003)

2<sup>a</sup> Biomarcadores de efeitos → são marcadores biológicos que indicam a interação da substância química com os receptores biológicos. Esses marcadores podem indicar alterações que ainda podem ser minimizados. (AMORIM, 2003)

3<sup>a</sup> biomarcadores de suscetibilidade<sup>2</sup> → são avaliações dos efeitos genéticos ou adquiridos que influenciam na alteração do organismo frente às substâncias químicas exposta. Eles indicam os fatores que podem agravar ou diminuir o risco decorrente da exposição a um agente químico. (AMORIM, 2003)

## 1.3 O CHUMBO

O chumbo é um metal pesado de coloração cinza azulado considerado tóxico, com peso molecular de 379,3, com ponto de fusão a 327°C, de densidade 11340 kg/m<sup>3</sup> a 16°C, com poder de concentração na cadeia alimentar, com estabilidade química no ar, na água e no solo e com a solubilidade na água de 55,04g/100ml de água a 25°C. A Organização Mundial da Saúde (OMS) coloca o chumbo como um dos metais mais perigosos à saúde humana. Ele se encontra presente no ambiente de duas formas: o chumbo inorgânico, que são os sais (se dissolvem em água quando estão ácidas) e o chumbo metálico, e o chumbo orgânico, que é o

---

<sup>2</sup> Suscetibilidade é a disposição individual do organismo em influenciar na sua própria saúde de maneira a prejudicá-la ou a beneficiá-la (por exemplo, o fenótipo de um determinado organismo), podendo, para isso, interagir com fatores externos tais como: idade, sexo, qualidade de vida etc. (AMORIM, 2003)

metal ligado ao carbono (isso pode ocorrer por conta do chumbo ser tetra valente, podendo realizar ligações covalentes) (BAIRD, 2002; CAVALCANTE, 2009, SECRETARIA DE ESTADO DO MEIO AMBIENTE e WHO, 1999).

Por suas características físicas, esse metal permite que sua forma seja moldada e trabalhada pelo homem. Na Antiguidade o chumbo serviu para construção de edifícios resistentes à ação dos fenômenos ambientais. Com os romanos ele foi utilizado para a construção de ductos de água e recipientes para uso alimentício. Hoje se sabe que naquela época a concentração desse metal na atmosfera era elevada, e que só alcançou novamente esse nível no Renascimento, pois nessa época começa a haver um aumento da população, da produção agrícola e do artesanato fundamentando-se em uma atividade comercial. (BAIRD, 2002; NOVAES, 1996).

Na segunda revolução industrial o chumbo foi um dos metais que foram requisitados pelas indústrias que produziam em grande escala para atender o consumo Europeu e internacional. Em consequência dessa revolução as concentrações de chumbo no meio ambiente aumentaram e com a introdução do chumbo como aditiva à gasolina aumentou de forma alarmante. (SHVOONG).

Atualmente esse metal possui uma grande importância comercial, além de variadas aplicações na indústria. Podemos encontrar chumbo em telhas, em isolamentos acústicos, em munições, em antigas tubulações domésticas de água e como pigmentos de algumas tintas. Porém o aumento da concentração de chumbo no ambiente nos últimos anos se originou principalmente na emissão veicular, decorrente do uso da gasolina que contém o chumbo tetraetila em sua composição. Sua concentração teve seu pico nos anos 70 e um declínio no início dos anos 90, pois esse foi sendo retirado aos poucos da gasolina (BAIRD, 2002).

Mesmo com a redução e a remoção do chumbo como um aditivo da gasolina alguns países continuam utilizando o chumbo na gasolina, sendo, por isso, ainda um grave problema de saúde ambiental e ocupacional<sup>3</sup>, visto que este, como é lançado diretamente no ar através da queima do combustível, entra em contato com o homem pelo ar inalado e por outras vias, causando, dependendo da susceptibilidade do indivíduo, uma intoxicação (BAIRD, 2002).

Há de se ressaltar, porém, que a contaminação não está restrita somente ao uso desse metal pelo homem.

O chumbo é encontrado na natureza em diversas formas químicas podendo causar contaminação a um determinado meio. As principais fontes de emissões naturais são: vulcões,

---

<sup>3</sup> Campo da saúde relacionado com a promoção e prevenção dos trabalhadores. (BRILHANTE, 1999)

intemperismos e névoas aquáticas. Contudo a contaminação antropogênica constitui-se a de maior importância (ASTDR, 2007).

#### 1.4 CINÉTICA DO CHUMBO NO MEIO AMBIENTE E NOS ORGANISMOS

O homem lança o chumbo no meio ambiente por três compartimentos (no solo, na água e no ar). O chumbo entra na atmosfera na forma de partículas e é transportado pelo ar até ser transferido para as superfícies e compartimentos ambientais. No solo a transferência depende de alguns fatores: como pH, composição mineral, quantidade de matéria orgânica, que irão influenciar na disponibilidade e no transporte do chumbo para o interior do solo ou da água. Já na água o chumbo entra como resultado da erosão dos solos, da lixiviação<sup>4</sup> ou pelo uso antropogênico, dependendo de algumas condições tais como pH e de outros materiais que formam quelatos<sup>5</sup> com o chumbo (CAVALCANTE, 2009).

Em geral o chumbo não apresenta risco para o meio ambiente enquanto encontra-se ligado a outros compostos, porém ao se dissolver em decorrência, por exemplo, da mudança de pH, a forma iônica pode ocasionar problemas (BAIRD, 2002).

Organismos que se alimentam de partículas contendo chumbo (por exemplo, mexilhões e ostras) poderão ter uma provável bioacumulação (acumulação do metal dentro do organismo) e por isso também uma bioconcentração (concentração do chumbo dentro do organismo) desse metal.

Esses organismos de baixos níveis na cadeia trófica apresentam maior concentração de chumbo do que aqueles de maior nível, fazendo com que a biomagnificação (aumento progressivo das concentrações dentro de uma cadeia alimentar) do metal ao longo dessa cadeia diminua. (WHO, 2003).

#### 1.5 TOXICIDADE DO CHUMBO

---

<sup>4</sup> Lixiviação é o processo descendente do chumbo na matriz do solo com a água, sendo sua intensidade dependente das condições do solo e climáticas (INOUE, M.H. et. Al, 2003)

<sup>5</sup> Quelatos são compostos onde o átomo central é um metal, que faz uma ligação simples com os demais átomos da molécula. (OLIVEIRA, 2004)

A toxicidade do chumbo começa com a entrada do metal em um organismo pelo ar inalado, quando este se encontra na atmosfera, ou pela via oral através dos alimentos e água contaminados. Uma vez absorvido no homem (não importa qual for a entrada), o chumbo é distribuído no corpo pela corrente sanguínea, onde, com aumento da concentração, o excesso penetra em tecidos macios, tais como o fígado, rins e cérebro e podendo também depositar-se nos ossos, substituindo o cálcio.

Cabe ressaltar que a absorção do chumbo pelo organismo depende também da carência deste em relação a alguns fatores dietéticos tais como: Jejum, ingestão de proteínas e da presença de cálcio, ferro e fósforo. (BAIRD, 2002; CAVALCANTE, 2009).

Na fase da toxicodinâmica o chumbo interage no funcionamento das membranas celulares (formando complexos com enxofre, fósforo, nitrogênio e oxigênio) e em algumas enzimas, interagindo com grupamentos - SH, alterando sua função resultando em uma intoxicação. Sendo assim ocorrem alguns efeitos biológicos tais como: neurológicos, hematológicos, endocrinológicos, renais, carcinogênico, bioquímicos e hepáticos. (MOREIRA, 2004)

A excreção do chumbo pelo organismo, embora lenta, dá-se principalmente pelas vias renais e gastrintestinais. No sangue o chumbo possui uma meia vida (tempo necessário para que a metade da concentração de uma substância decaia no organismo) de aproximadamente três semanas, nos tecidos macios, também em torno desse mesmo período e nos ossos pode chegar por volta de vinte anos. (SADAO, 2002).

Nos peixes, os sintomas da toxicidade são: a atrofia muscular, a paralisia, escurecimento da cauda, a degeneração da nadadeira caudal, a hiperatividade, a natação errática, a perda de equilíbrio e a mortalidade. Além de interferir na biossíntese do grupamento HEME das hemácias, e causar alterações mutagênicas que podem se desenvolver em tumores cancerígenos. (CAVALCANTE, 2009).

Na biossíntese do grupamento HEME da hemoglobina, o chumbo interrompe a ação de algumas enzimas (entre elas ALAD e ALAS) que se acumulam, sendo possível detectá-la em testes. Por isso essas enzimas também são consideradas biomarcadores de efeito, pois refletem alterações bioquímicas que podem ser prejudiciais à saúde tanto do animal quanto do homem (ONUKI, 2002). O chumbo pode encontrar um estado de equilíbrio em peixe após algumas semanas de exposição sendo que a incorporação desse metal pelos organismos depende da sua concentração no meio. A acumulação ocorre principalmente nos seguintes órgãos: brânquias, rins, ossos e fígado, onde os níveis aumentam conforme a idade. (CAVALCANTE, 2009).

Outros biomarcadores de efeito importantes em peixes que, embora não forneçam respostas específicas a estressores químicos, indicam o estado fisiológico e de saúde do animal são os parâmetros hematológicos. A alanina amino transaminase (ALT ou TGP) e a aspartato amino transaminase (AST ou TGO) são transaminases que quando aumentam sua atividade no plasma se tornam sensíveis indicadores de danos celulares ocorridos na membrana de certos órgãos, principalmente o fígado. Outros marcadores hematológicos como: hematócrito, hemoglobina e glicose, embora menos específicos, podem ser influenciados por fatores naturais, podendo também apresentar sensibilidade para determinados poluentes. (CAVALCANTE, 2009).

A ALT e a AST são encontradas principalmente no fígado, mas outros órgãos como: rins, coração e músculos esqueléticos também apresentam, em concentrações moderadas, essas enzimas. Quando ocorrem lesões tissulares, doenças que afetem o parênquima hepático (células responsáveis pelas funções típicas do órgão) ou qualquer outra lesão tecidual nos órgão que contém essas enzimas haverá um aumento da concentração destas no sangue. Em peixes o aumento na atividade dessas enzimas no plasma pode significar exposição a algum agente estressor. (CAVALCANTE, 2009).

Outro biomarcador que também é muito utilizado para a avaliação dos impactos causados por poluentes ambientais em peixes através de exames histopatológicos é o fígado (JESUS, 2008). O fígado é um órgão que está relacionado com a desintoxicação e a excreção de substâncias tóxicas, dentre elas os metais pesados, que dependendo da concentração e da duração da exposição pode causar efeitos prejudiciais ao órgão. Por isso também que a avaliação histopatológica desse órgão pode ser considerado um biomarcador de efeito, pois ela apresenta as mudanças que ocorrem na morfologia do mesmo (JESUS, 2008 e LOPES, 2007).

Um trabalho realizado com Lambari sob a influência de efluentes petroquímicos em que se utilizou o fígado para a avaliação foram considerados como resposta ao estresse ambiental as seguintes alterações: “vacuolização dos hepatócitos, depleção de glicogênio, inflamação, alterações no formato dos vasos sinusóides e neoplasmas” (LOPES, 2007). Já em um trabalho realizado com Piadugu sob a influência pelo Roundup (herbicida) foram encontradas no fígado: “congestão, hemorragia e necrose focal” (ALBINATI, 2008).

Tendo em vista algumas possíveis alterações na morfologia de fígado de peixes, e baseado no material controle (fígado de tilápias que não foram expostas ao chumbo) foi realizada uma análise desse órgão.

A relevância desse trabalho reside no fato de se experimentar o fenômeno da biomagnificação e bioacumulação sendo por isso um contaminante ambiental, podendo ser considerado um problema de saúde pública. Sendo assim, são desenvolvidos biomarcadores como, por exemplo, os parâmetros sanguíneos e histológicos, que são ferramentas empregadas para avaliação da saúde de peixes e, como consequência, podem ser utilizados no auxílio da análise da qualidade ambiental de corpos hídricos.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 GERAL

1 - Avaliar possíveis efeitos histopatológicos e bioquímicos da intoxicação aguda de chumbo em exemplares comerciais de tilápia (*Oreochromis niloticus*).

### 2.2 ESPECÍFICOS

1 - Avaliar os efeitos de diferentes doses de chumbo injetados no peritônio dos animais nas atividades das enzimas transaminases alanina-amino-transferase (ALT ou TGP) e Aspartato-amino-transferase (AST ou TGO), na atividade da enzima ALAD, da hemoglobina e da glicose.

2 - Avaliar os efeitos de diferentes doses de chumbo injetados no peritônio sobre os fígados dos animais.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 ANIMAIS

*Oreochromis niloticus*, também conhecida como tilápia do Nilo, é uma espécie de peixe de origem africana. Ela foi introduzida no Brasil nos anos 1970, na região do nordeste e desde então foi disseminada pelo país por meio da técnica de piscicultura brasileira. Atualmente, ela é a segunda espécie mais cultivada no mundo atrás da cultura de carpas e salmonídeos (BOSCOLO *et al.*, 2001).

Suas características são: resistência a condições adversas do meio, rápido crescimento e adaptação, hábito alimentar onívoro e com fácil aceitação de rações em quase todas as fases da vida, além de serem sensíveis a fatores estressantes. Por conta disso, esses peixes são ótimos bioindicadores servindo como bons modelos experimentais (CAVALCANTE, 2009 e MAGALHÃES e FERRÃO FILHO, 2008).

Essa espécie também é usada para outras pesquisas de avaliação toxicológica e tem se mostrado, até o exato momento, um bom indicador biológico na avaliação toxicológica por chumbo (RASHED, 2001).



Figura 1 – foto da espécie *Oreochromis niloticus*. Fonte: CAVALCANTE, 2009.

Os animais utilizados para essa pesquisa (*Oreochromis niloticus* ou tilápia do Nilo) foram adquiridos de um abatedouro e foram transportados para o laboratório de Toxicologia do CESTEJ onde foi feita a exposição ao chumbo. O trabalho foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Fundação Oswaldo Cruz (CEUA) sob a licença N° L0033/08.

Os animais foram sacrificados através da secção da medula e tiveram os fígados removidos no último dia do experimento, ou caso demonstrassem sinais de perda de atividade e controle da flutuação.

### 3.2 MATERIAIS PARA OS PARÂMETROS HISTOPATOLÓGICOS

Os exames histológicos foram realizados no laboratório de histologia da Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio, sendo utilizados para esses exames os seguintes materiais: micrótomo da marca SLEE Mainz modelo CUT4050, processador automático de tecidos SAKURA, autoinclusor LEICA modelo EG1120, placa aquecedora OVIMIS, banho maria histológico, corantes HE (hematoxilina e eosina), millonig modificado (fixador<sup>6</sup>), cassetes histológicos (para acondicionar e separar os tecidos), álcool (usado no processamento e na coloração), xilol (atua como um agente solvente da parafina), parafina (a pura usada para a impregnação e e a composta com cera, para inclusão dos tecidos a 60°C), água (usada para hidratar e esticar os tecidos depois dos cortes), cuba de vidro para coloração, tipo Schifferdecker (usada para coloração das lâminas), lâminas, lamínulas, bálsamo do Canadá usado para a junção da lamínula com a lâmina depois da coloração do tecido; albumina-glicerina (usada como revestimento para a superfície das lâminas de modo a evitar o desprendimento do tecido durante a coloração), microscópio óptico ZEISS modelo ICS-KF2 (usado para a visualização dos tecidos) e os tecidos hepáticos (de organismos expostos a 1mg/kg e a 100mg/kg e os seus respectivos grupos controles).

### 3.3 METODOLOGIA PARA A AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA

Os materiais histológicos ao chegarem no laboratório de Histologia da EPSJV foram registrados, para facilitar o processo e a identificação na avaliação dos mesmos, e acondicionados em um recipiente de vidro contendo Millonig Modificado, onde ficaram até o momento do processamento.

O processamento, que foi feito pelo processador automático de tecido, fez com que os tecidos, ao passarem por uma bateria de soluções (álcool 70%, álcool 80%, álcool 95%, duas imersões em álcool 100%, três imersões em xilol, duas imersões em parafina) estivessem preparados para serem incluídos.

---

<sup>6</sup> Fixador: solução que evita a destruição das células pelas suas enzimas ou por bactérias. (Junqueira e Carneiro, 2008)

Na inclusão os tecidos foram envolvidos com uma substância consistente e firme (parafina composta), utilizando o autoinclusor, que permitiu o corte na etapa posterior, a microtomia. Na microtomia os tecidos foram fatiados pelo micrótomo numa espessura de 4µm (o que possibilitou uma melhor visualização no microscópio óptico). Na etapa anterior à microtomia, a superfície das lâminas foi preparada previamente com a albumina-glicerinada para receberem o tecido fatiado.

Ao serem fatiados, os tecidos foram transferidos para o banho maria histológico, onde, ao entrarem em contato com a água ele foram distendidos e separados de forma a evitar dobras e, então, foram colhidos na superfície das lâminas e distendidos novamente em um período entre 1 a 3 minutos sobre a superfície da placa aquecedora. Na etapa da coloração (HE), uma nova bateria de soluções: desparafinização em 3 imersões em xilol (3 minutos cada), hidratação em 2 imersões de álcool 100%, uma de álcool 95%, uma de álcool 70%, uma de água (3 minutos cada imersão), coloração em hematoxilina de Mayer durante 20 minutos, lavagem em água corrente durante 25 minutos, imersão em álcool 70% por 2 minutos, coroloração em eoxina-floxina por 2 minutos, diferenciação rapidamente em álcool 95%, desidratação em três imersões em álcool 100% (3 minutos cada) e clarificação em três imersões em xilol (3 minutos cada). As lâminas foram montadas usando uma resina (bálsamo do Canadá) que juntou a lamínula à lâmina permitindo que os tecidos fossem analisados no microscópio óptico.

Os parâmetros utilizados para a avaliação semiquantitativa desse material serão feita segundo Schwaiger (1997) ordenando segundo o grau de severidade na seguinte escala: grau 1 = nenhuma alteração; grau 2 = alterações moderadas e localizadas; grau 3 = alterações severa intensamente distribuída (SCHWAIGER, 1997 e WINKALER, 2001)

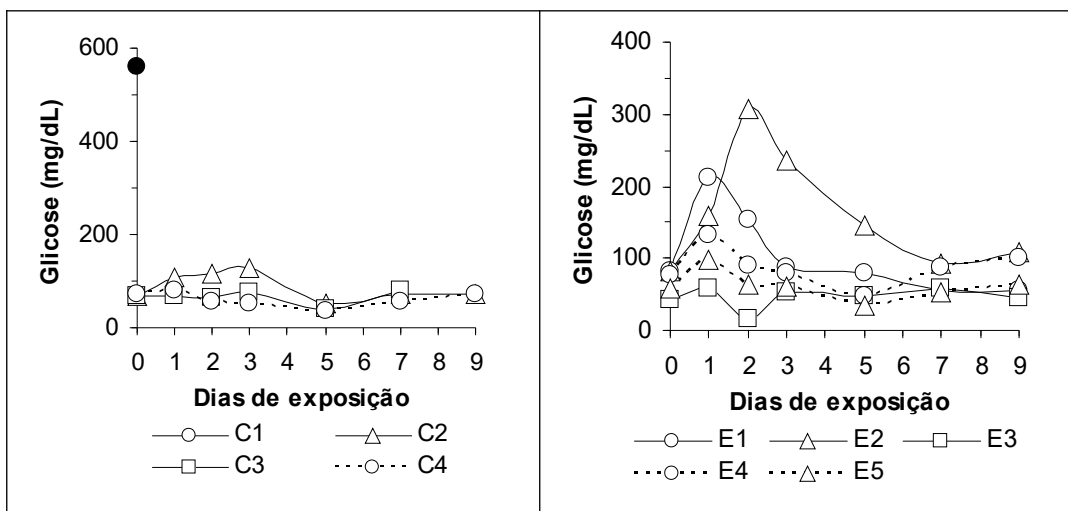
### 3.4 PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS

Nesse trabalho foram adotados como parâmetro bioquímico, baseado na literatura, os níveis de glicose presente no plama sanguíneo, a hemoglobina, a atividade das enzimas transaminases TGO e TGP e a enzima ALAD que está relacionada com a síntese da hemoglobina.

Todos esses parâmetros foram ensaiados no laboratório de toxicologia do CESTE, seguindo o protocolo do laboratório, para realização do trabalho de Ana Luiza Cavalcante e foram aproveitados para esse trabalho com o intuito de possibilitar uma correlação entre os resultados e uma relação entre mesmos sob os da avaliação histológica.

## 4 RESULTADOS

Os resultados obtidos estão descritos abaixo por meios de gráficos que indicam os níveis de glicose (figuras 2 e 3), ALAD (figuras 4 e 5) e hemoglobina (figuras 6 e 7) presentes no sangue dos animais durante o experimento e de imagens que revelam a morfologia



macroscópica e microscópica do fígado do animal (figuras 8, 9, 10 e 11).

Figura 2 – Análise de glicose de tilápias expostas a uma dose de 1mg/kg de acetato de chumbo (Parte B). C = Controle; E = Exposto; Cada símbolo representa o resultado do parâmetro em um animal. Os símbolos cheios representam o último resultado de um peixe que veio a morrer entre esse momento e a próxima coleta de sangue.

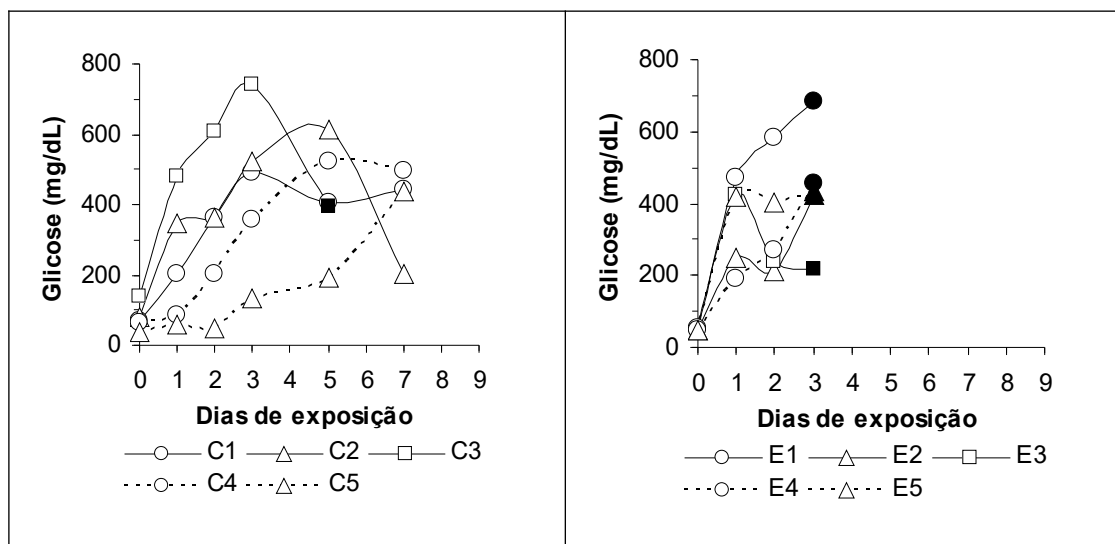


Figura 3 – Análise de glicose de tilápias expostas a uma dose de 100mg/kg de acetato de chumbo (Parte B). C = Controle; E = Exposto; Cada símbolo representa o resultado do parâmetro em um animal. Os símbolos cheios representam o último resultado de um peixe que veio a morrer entre esse momento e a próxima coleta de sangue.

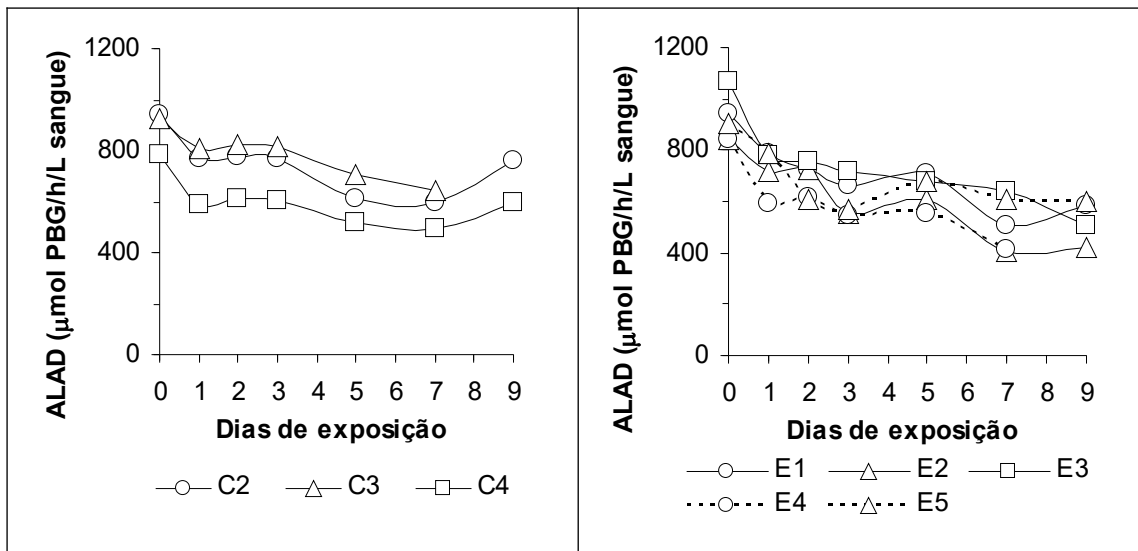


Figura 4 – Análise de ALAD de tilápias expostas a uma dose de 1mg/kg de acetato de chumbo (Parte B).C = Controle; E = Exposto; Cada símbolo representa o resultado do parâmetro em um animal. Os símbolos cheios representam o último resultado de um peixe que veio a morrer entre esse momento e a próxima coleta de sangue.

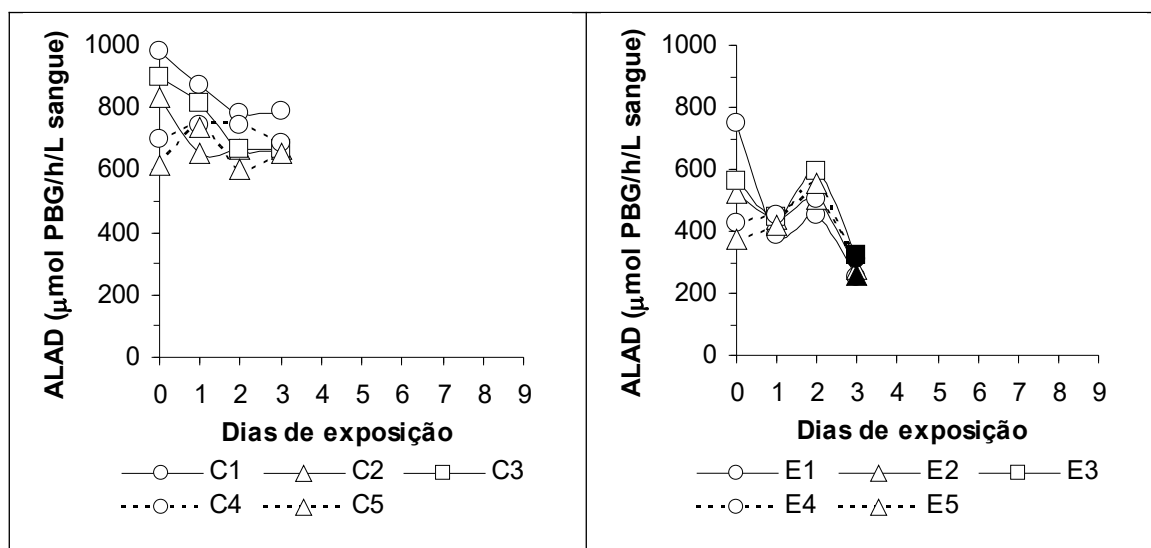


Figura 5 – Análise de ALAD de tilápias expostas a uma dose de 100mg/kg de acetato de chumbo (Parte B).C = Controle; E = Exposto; Cada símbolo representa o resultado do parâmetro em um animal. Os símbolos cheios representam o último resultado de um peixe que veio a morrer entre esse momento e a próxima coleta de sangue.

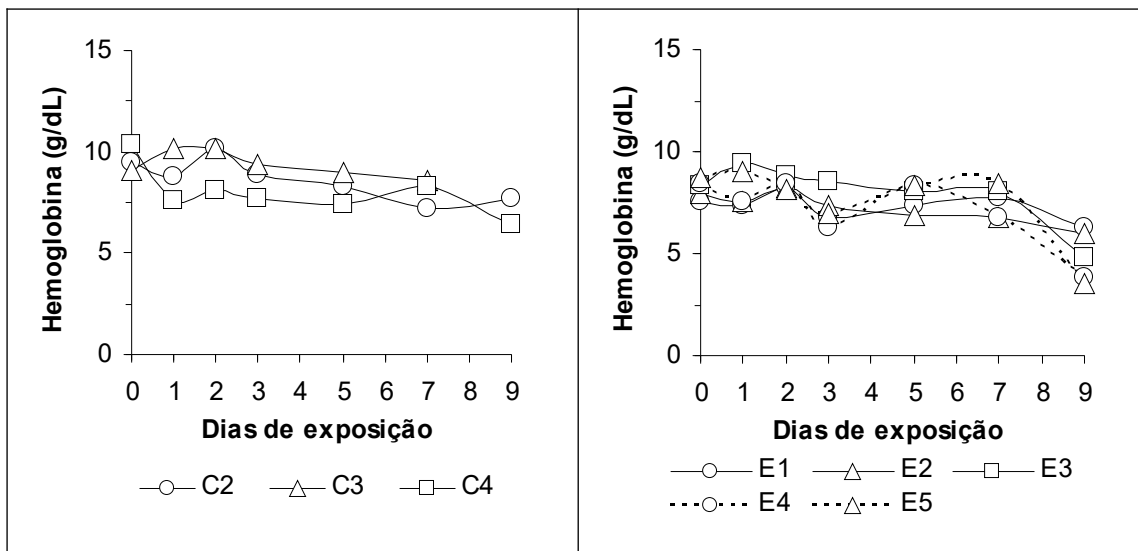


Figura 6 - Análise de hemoglobina de tilápias expostas a uma dose de 1mg/kg de acetato de chumbo (Parte B).C = Controle; E = Exposto; Cada símbolo representa o resultado do parâmetro em um animal. Os símbolos cheios representam o último resultado de um peixe que veio a morrer entre esse momento e a próxima coleta de sangue.

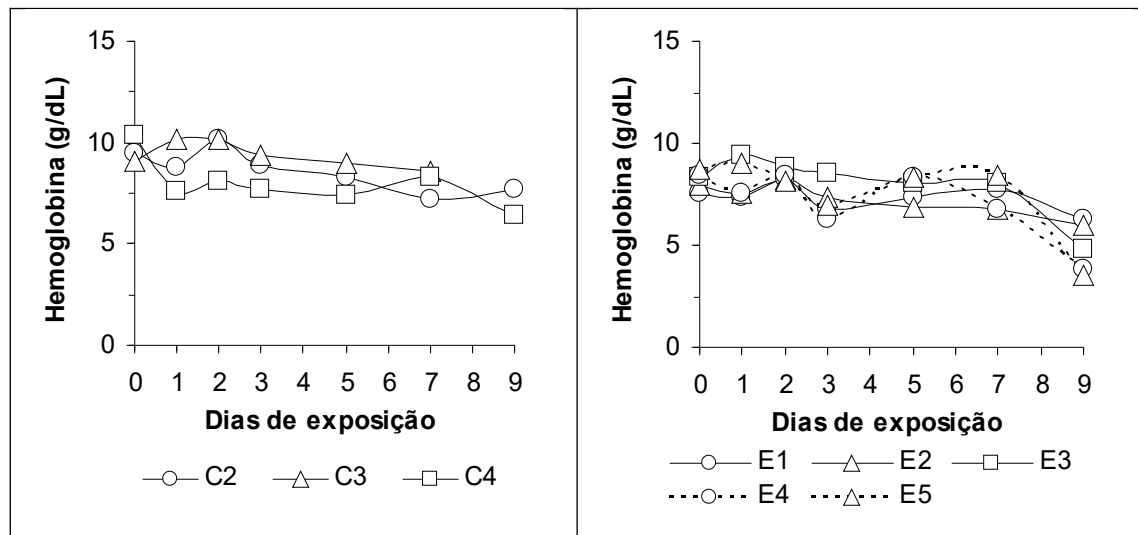


Figura 7 - Análise de hemoglobina de tilápias expostas a uma dose de 100mg/kg de acetato de chumbo (Parte B).C = Controle; E = Exposto; Cada símbolo representa o resultado do parâmetro em um animal. Os símbolos cheios representam o último resultado de um peixe que veio a morrer entre esse momento e a próxima coleta de sangue.

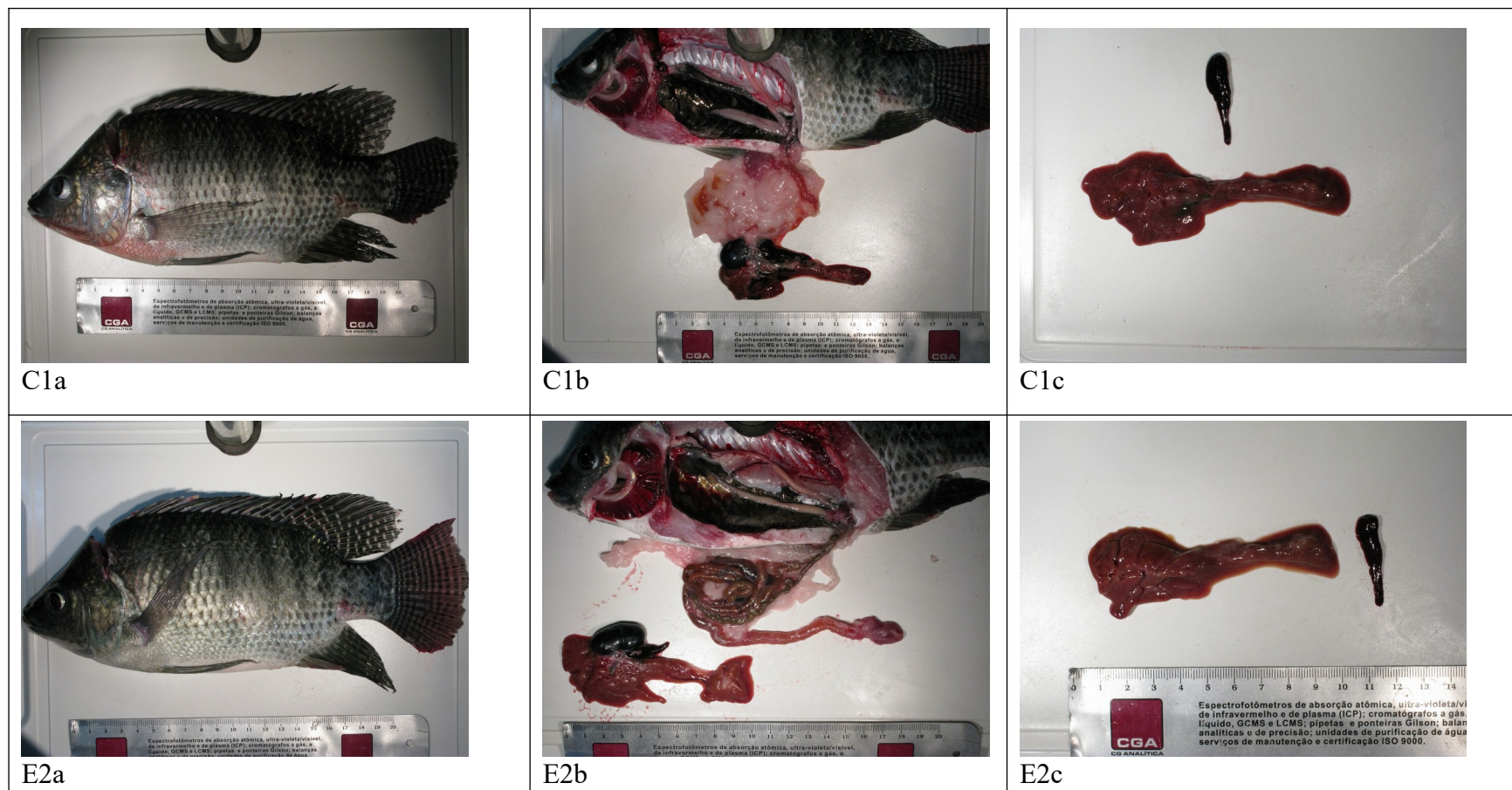


Figura 8 – Morfologia de tilápias expostas a 1 mg/Kg de acetato de chumbo. C = controle e E = exposto.  
Fonte: CAVALCANTE, 2009.

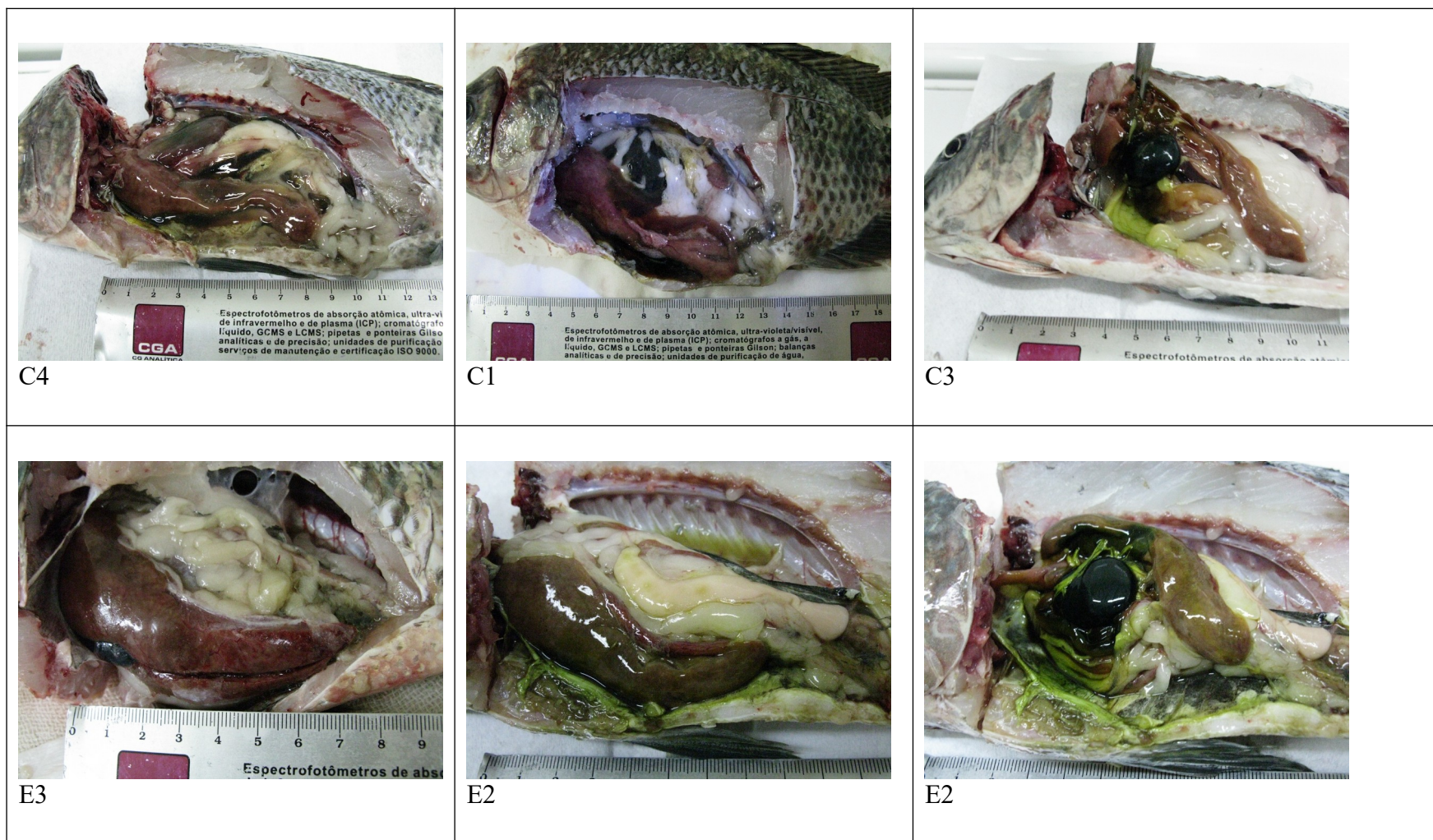


Figura 9 – Morfologia de tilápias expostas a 100 mg/Kg de acetato de chumbo. C = controle e E = exposto.  
Fonte: CAVALCANTE, 2009.

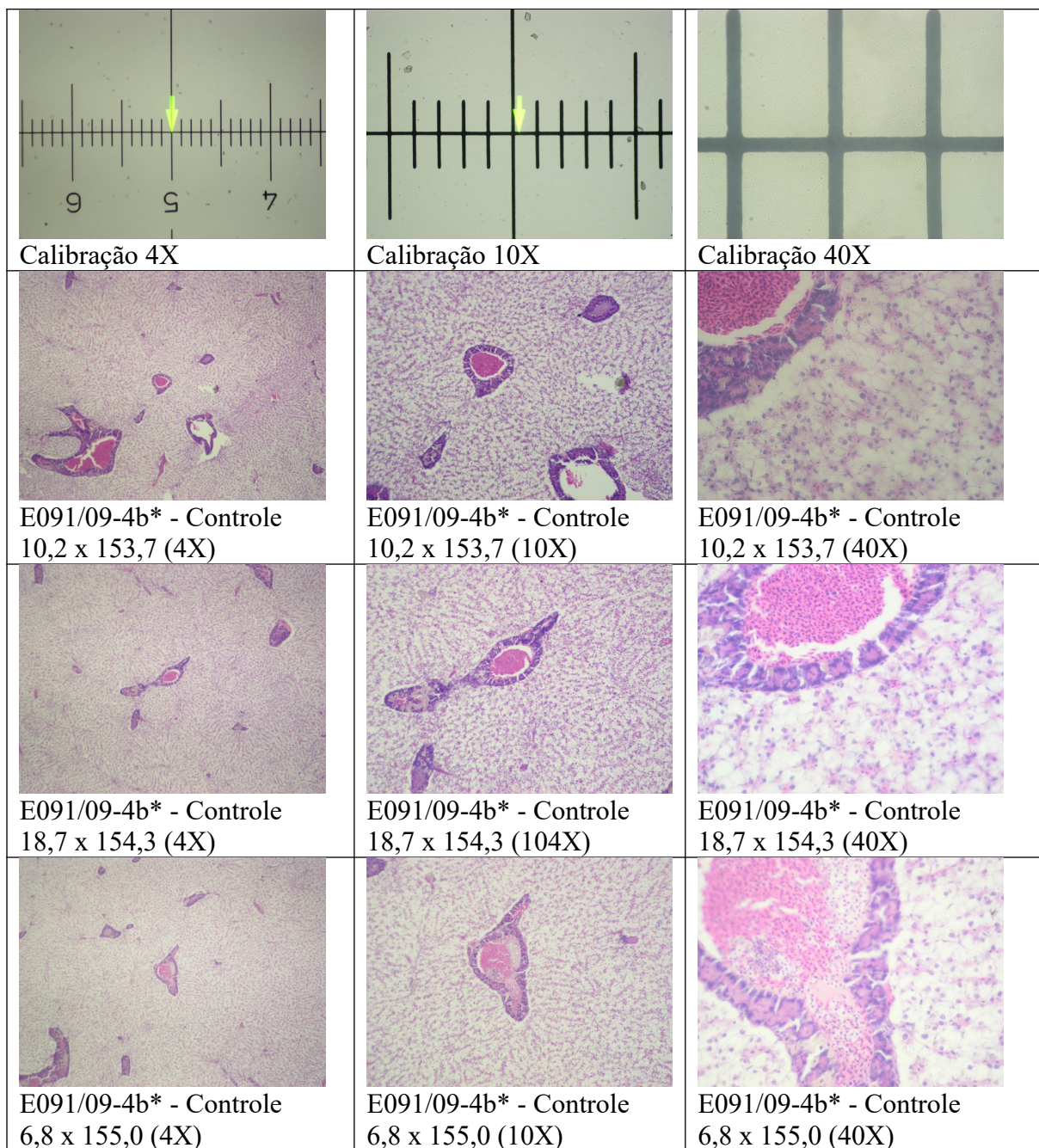


Figura 10 – Micromorfologia de fígado de tilápia que foi usada como controle para a avaliação histopatológica.

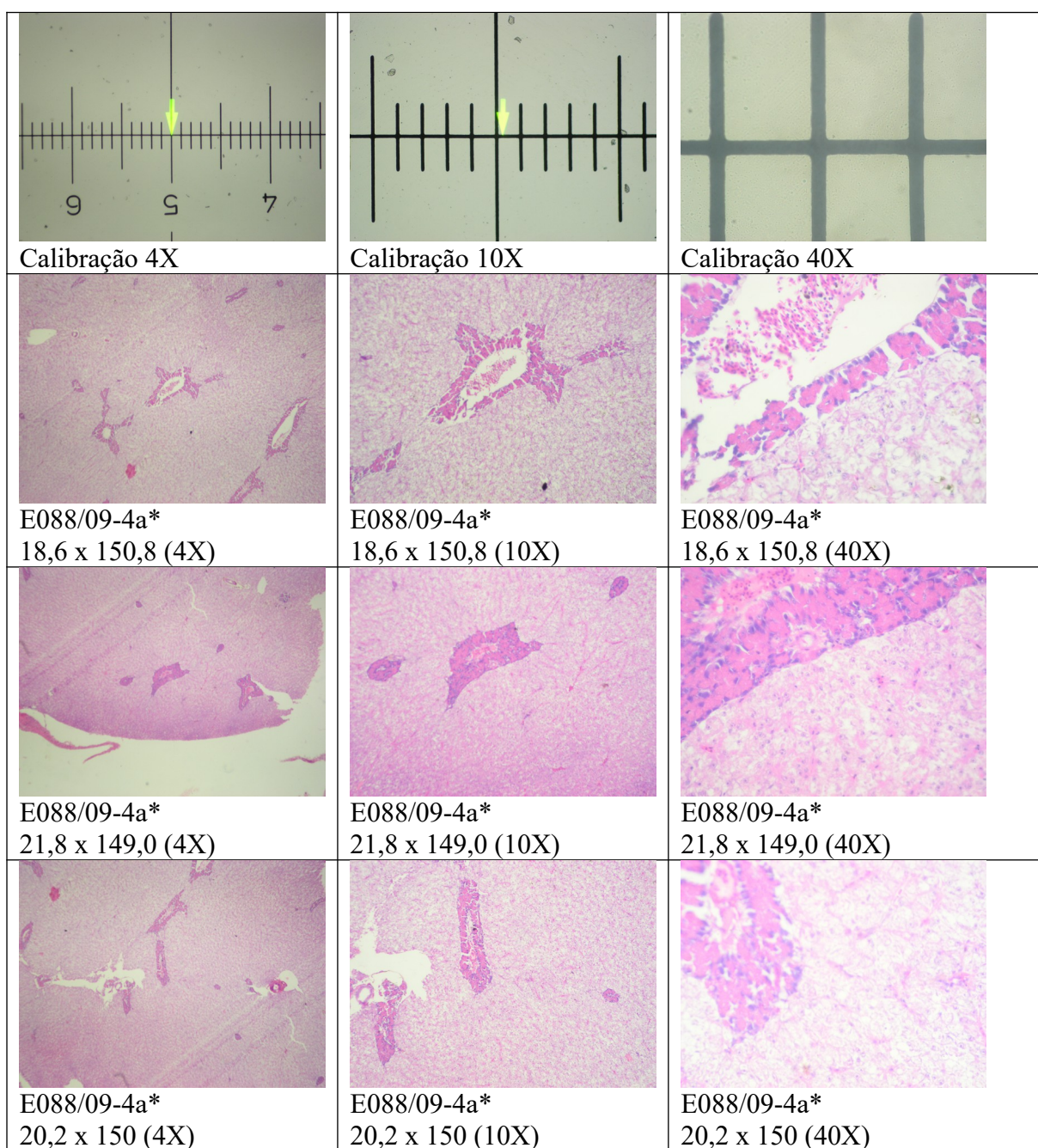


Figura 11 - Micromorfologia de fígado de tilápia injetada com 100 mg/kg de acetato de chumbo.

Não foi detectada alteração das atividades das transaminases. Esse resultado aponta que provavelmente não ocorreram lesões tissulares nas células hepáticas dos animais expostos.

## 5 DISCUSSÃO

### 5.1 HISTOTECNOLOGIA DOS TECIDOS

O material (o fígado) do experimento a 1mg/kg, tanto do grupo controle quanto do grupo exposto, chegaram ao laboratório de histologia da Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio (EPSJV) acondicionado dentro de um pote de vidro nos cassetes, contendo formalina (fixador de aldeído fórmico a 3,7%), e foram transferidos para um pote também de vidro contendo millonig modificado (que também é um fixador) onde permaneceram até o momento do processamento, pois não é recomendado deixar os tecidos por um longo período em formol (Medrado, 2009). O mesmo sucedeu com o experimento a 100mg/kg, sendo que o fígado só foi colocado (cortados de forma a caber) nos cassetes quando chegou no laboratório.

O material foi registrado no laboratório de histologia da EPSJV, segundo o caderno de registro do próprio laboratório onde recebeu a numeração por ordem de entrada, a sigla E (de material experimental), o ano, o número equivalente ao do tecido e uma letra que significa a secção do tecido (exemplo: E-088/09 4a) com a finalidade de identificar um material no meio dos demais. Foi feito também um requerimento controle onde foram determinados a quantidade de lâminas e o tipo de coloração que seria utilizada, a espessura do corte, o tipo de fixador e uma observação macroscópica dos tecidos (aspectos importantes do requerimento podem ser encontrado no anexo no final deste trabalho).

Na ficha de requerimento foi feita uma observação quanto ao material E-088/09 4a, em cuja macroscopia foram detectadas manchas acizentadas na parte interna (parenquimal) do órgão. O processo começa com desidratação pelo álcool, que é o agente desidratante mais usado, em doses crescentes, pois dificilmente em apenas um banho de álcool se obterá uma desidratação completa. A desidratação seriada evita lesões teciduais.

A segunda parte desse processo chama-se clarificação onde o etanol (álcool) presente nos tecidos deve ser substituído por uma substância que seja miscível tanto com o etanol quanto com a parafina. A substância mais usada é o xilol, que é um líquido que remove o álcool presente no tecido, deixando-o com um aspecto translúcido. Cada imersão foi de 30 minutos.

Na última etapa dessa parte os tecidos são imersos em duas respectivas soluções de parafina a 60°C, onde o xilol é retirado pela ação do calor, deixando os espaços existentes serem preenchidos pela parafina (Junqueira, 2008). Este processo serve também para endurecer o material para a microtomia.

Passado o processamento os tecidos foram incluídos. Nessa parte, os tecidos são retirados dos cassetes e arrumados em formas, contendo parafina composta, que garante ao bloco (tecido envolto com a resina) uma maceis para facilitar o corte na microtomia. Essa etapa foi realizada com o auxílio de um auto inclusor que mantinha a resina a uma temperatura de 60°C.

Cabe ressaltar que no momento da inclusão as amostras: E-088/09 4a, E-088/09 4b, E-091/09 4b e E-089/09 4a, apresentaram nas extremidades consistência característica da impregnação, enquanto que a região central apresentava uma consistência amolecida aparentando não estar devidamente impregnada.

Antes da microtomia as lâminas foram preparadas para receberem os tecidos fatiados. Essa preparação consiste em colocar uma superfície delgada de proteína (albumina glicerinada) nas lâminas para evitar o descolamento dos tecidos na coloração. Feito isso elas foram identificadas com o registro de cada material.

Como a parte técnica da microtomia foi descrita na metodologia cabe apenas ressaltar que não foi possível o corte do bloco E-089/09 4a visto que ao ser fatiado pelo micrótomo seu tecido se fragmentava em vários pequenos pedaços, não sendo possível sua obtenção, embora estivesse sendo fatiado numa espessura de 7µm. Outros blocos também tiveram que ser cortados a 7µm devido sua fragmentação na espessura requerida.

A coloração é fundamental para uma melhor visualização e caracterização de certas estruturas celulares. A coloração HE (hematoxilina eosina) é a mais usada nos laboratórios e apresenta excelentes resultados sendo possível fazer uma análise geral dos tecidos e órgãos (MEDRADO, 2009 e LOPES, 2007).

A etapa inicial do processo de coloração HE consiste em remover a parafina excedente nos tecidos possibilitando que os mesmos sejam corados. Nessa coloração os núcleos e substâncias basófilas (estruturas ácidas que se coram por corantes básicos) se coram de azul e os restantes dos componentes da lâmina se coram de vários tons de rosa por conta da eosina (MEDRADO, 2009). Por fim as lâminas forma montadas usando bálsamo do Canadá.

## 5.2 TRANSAMINASES

A análise de parâmetros sanguíneos nos oferece muitas informações sobre a situação do indivíduo, sendo, portanto um meio de diagnóstico que nos fornece as condições necessárias do organismo.

As transaminases são enzimas responsáveis por catalizar à reação da remoção do grupamento amina dos aminoácidos transferindo-os para serem degradados ou reutilizados no organismo. Elas são encontradas em grande quantidade, principalmente no fígado (órgão responsável pela desintoxicação do organismo) e servem para diagnosticar lesões nos hepatócitos e nas células cardíacas (pois ao serem lesadas vazam seus componentes, incluindo as aminotransferases, para a corrente sanguínea) ocasionadas por infecções, intoxicações e o infarto do miocárdio. (MARZZOCO, 2007e LEHNINGER, 2002).

A Alanina Aminotransferase (ALT) ou Transaminase Glutâmico-pirúvica (TGP) é responsável por catalizar à reação entre o aminoácido alanina e o  $\alpha$ -cetoglutarato. Ela age removendo do aminoácido, que se torna em piruvato, através da coenzima pirodoxal –fosfato, o grupamento amina transferindo-o para o  $\alpha$ -cetoglutarato que se torna em glutamato. Essa reação ocorre no citoplasma das células hepáticas. (MARZZOCO, 2007).

Na segunda etapa do processo de degradação do aminoácido, o glutamato entra na mitocôndria dos hepatócitos e sofre uma nova transaminação por ação da transaminase Aspartato Aminotransferase (AST) ou também conhecida com transaminase Glutâmico-Oxolacética (TGO) cujo grupamento amina presente no glutamato, que se torna novamente em  $\alpha$ -cetoglutarato, é transferido (pela transaminase) para o oxaloacetato que se torna em aspartato. (MARZZOCO, 2007).

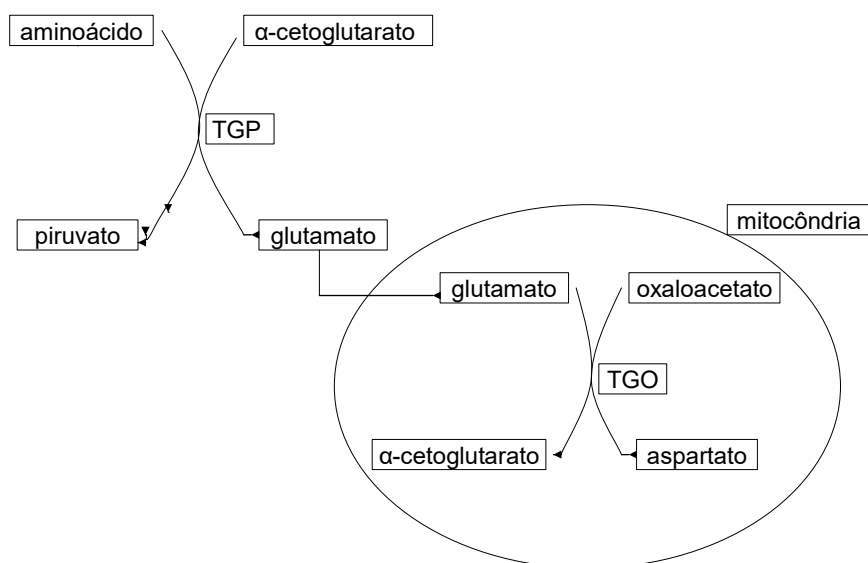


Figura 12 – representação do mecanismo de ação das transaminases TGP e TGO

As transaminases que foram ensaiadas (TGP e TGO) são as mais usadas para identificação de lesões hepáticas e cardíacas. Como neste trabalho estamos também avaliando os efeitos agudos do chumbo em fígados, cabe, com a dosagem dessas enzimas em peixes, ilustrar os danos ocorridos no fígado da tilápia.

Por isso é importante ressaltar também que as transaminases têm sido utilizadas como ótimos biomarcadores de efeito em peixes. Quanto ao resultado das transaminases não houve atividade dessas enzimas detectadas no plasma sanguíneo em nenhum momento durante a pesquisa realizada no laboratório do CESTEHE, o que indica que não houve lesões nas células hepáticas ou em outras células do organismo (por exemplo o miocárdio). Porém ao realizar a necropsia de alguns dos peixes expostos foi observado um aumento no volume do fígado.

### 5.3 GLICOSE

A glicose é um biomarcador muito utilizado em pesquisas de avaliação de intoxicação, onde, pela variação desta, medimos a intensidade e o risco do toxicante. Sendo assim, ela é considerada um parâmetro hematológico para muitas pesquisas em que se utilizam peixes como modelo experimental.

No trabalho da CAVALCANTE, ela foi determinada através de testes enzimáticos a partir do sangue colhido dos animais expostos à doses de 1 e 100 mg/Kg de acetato de chumbo e dos animais controles.

A glicose é utilizada na respiração como fonte de energia para o organismo. Ela é adquirida através da alimentação, onde com o aumento da concentração na corrente sanguínea faz com que determinados órgãos, como o fígado, a armazene na forma de glicogênio (polímero de glicose). Quando a concentração de glicose no plasma decai, o glicogênio hepático é degradado, de forma a manter a glicemia equilibrada no organismo. (MARZZOCO, 2007)

Em momentos de estresse os níveis de glicose circulante podem vir a aumentar juntamente com depleção de reservas teciduais de glicogênio. No momento do estresse o organismo se utiliza de dois tipos de resposta endócrina: a primeira se dá através do aumento do cortisol plasmático, que é um hormônio proveniente do córtex das supra-renais, que resulta na elevação da concentração do hormônio catecolamina: epinefrina, que atua juntamente com o primeiro causando variadas alterações bioquímicas e fisiológicas, constituindo-se a segunda resposta. Nesta ocorre o estímulo à gliconeogênese (síntese da glicose a partir de aminoácidos, lactato e glicerol) através da proteólise (quebra de proteínas), a qual libera aminoácidos, e a indução da síntese de enzimas que promovam essa produção de glicose, causando assim, a hiperglicemia, a depleção das reservas teciduais de glicogênio e a lipase. (WINKALER, 2001 e MARZZOCO, 2007)

Esse mecanismo endócrino pode ser resultado de uma exposição aguda a um fator estressante como uma forma de adaptação do organismo. Em contrapartida peixes cronicamente expostos apresentam redução da glicemia, também depleção de glicogênio hepático, redução alimentar e perda de glicose na urina. (MARZZOCO, 2007).

No resultado obtido por CAVALCANTE foi detectado um aumento dos níveis de glicose nos animais expostos ao chumbo quando comparado com o resultado do grupo controle (comparar os gráficos de glicose dos animais expostos a 1mg/Kg e a 100mg/Kg de acetato de chumbo). E cabe ressaltar que mesmo na dose a 1mg/Kg, que foi considerada baixa, é possível perceber que houve um aumento da glicose no experimento como ocorreu no experimento a 100mg/Kg.

Esse resultado demonstra a capacidade estressante do chumbo em peixes da espécie *Oreochromis niloticus* e que a mesma espécie pode servir como um bioindicador, pois se apresenta sensível ao chumbo causando alterações detectáveis nos organismos teste como é o caso da glicose.

## 5.4 ALAD

A ALAD (ácido delta aminolevulínico desidratase) é uma enzima que participada via de biossíntese do grupamento Heme da hemoglobina, a qual é responsável pelo transporte dos gases respiratórios. Um dos efeitos do chumbo sobre o organismo é a inibição da atividade dessa enzima podendo ocasionar um quadro de anemia hipocrômica. Por isso a ALAD é considerada um ótimo biomarcador de efeito do chumbo para o monitoramento ambiental, pois é possível através dela mensurar a exposição e avaliar o risco que esta pode trazer à ao meio ambiente e ao homem. (CAVALCANTE, 2009 e FAUSTO, 2008)

A figura abaixo representa o esquema da ação do chumbo na biossíntese do grupamento heme na medula óssea:

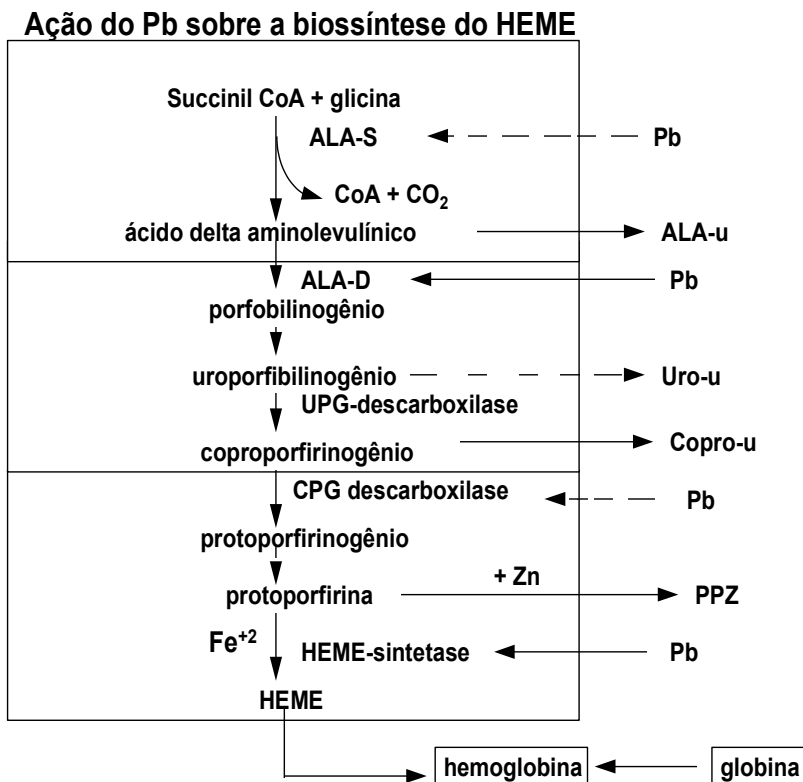


Figura 13 - Esquema da ação do Pb sobre a biossíntese do HEME na medula óssea.  
Fonte: Salgado, P.E.T. Toxicologia Ocupacional ECO/OPAS/OMS/1986

A primeira etapa ocorre na mitocôndria dos eritroblastos da medula onde se condensa a glicina com a succinil-coA através da enzima ALA-S (ácido delta aminolevulínico sintetase) formando o ácido delta aminolevulínico (ALA). (ALVAREZ-LEITE)

Na segunda etapa, duas moléculas de ALA se condensam com o auxílio da enzima ALAD, formando o porfobilinogênio (PBG). E por fim vemos a formação de outros produtos resultando na formação do grupamento heme. (ALVAREZ-LEITE)

O chumbo inibe a ação da ALAD por mecanismos ainda não bem definidos. O mais aceito é a competição entre o chumbo e o zinco pela ligação de um sítio ativo dessa enzima. É interessante observar que além da ALAD o chumbo também pode inibir a ação de outras enzimas na biossíntese do grupamento heme, as quais também podem ser detectadas por outros métodos práticos. (ALVAREZ-LEITE)

Para este trabalho os dados obtidos no CESTEJ através da análise das amostras sanguíneas coletadas dos animais utilizando-se do protocolo do laboratório revelam comprovadamente que houve a inibição da atividade da enzima ALAD de eritrócitos ocasionados por uma única dose de acetato de chumbo a 100mg/Kg e a 1 mg/Kg nos diferentes experimentos, apesar de não ter causado alterações relevantes no hematócrito (pois este pode ser influenciado por fatores naturais) e nos níveis de hemoglobina, comprovando que o chumbo pode interferir na atividade dessa enzima e que esta pode ser usada como um bom biomarcador de efeito. (CAVALCANTE, 2009)

## 5.5 HEMOGLOBINA

Como foi comentada anteriormente a hemoglobina é a responsável pelo transporte dos gases respiratórios dentro do organismo. Ela é uma molécula tetramérica, onde cada cadeia está associada a um grupo prostético chamado Heme. A heme é uma porfina que possui um íon de ferro que se apresenta no estado ferroso ( $Fe^{2+}$ ) e é nela onde o oxigênio se liga para ser transportado.

O chumbo, como também foi visto anteriormente, inibe a capacidade do organismo de produzir a hemoglobina interferindo em algumas enzimas que são responsáveis pela síntese do grupamento heme. (MOREIRA, 2004 e MARZZOCO, 2007).

Alguns autores consideram que o decréscimo desse parâmetro pode ser relacionado com a presença de chumbo no meio. Winkaler e colaboradores (2001), ao comparar valores de hemoglobina coletados de lambaris de diferentes locais, observaram um decréscimo desse parâmetro nos animais coletados na região contaminada por chumbo.

## 5.6 FÍGADO

O fígado é o principal órgão do metabolismo e está relacionado com a conversão do alimento, com a produção de vitelogenina durante o crescimento gonadal e com a desintoxicação do organismo de teleósteos. Ele é também a maior glândula exo-endócrina dos vertebrados, que apresenta diversas funções, sendo uma delas a possibilidade de armazenar glicose na forma de glicogênio e de limpar o sangue, proveniente da região intestinal, de substâncias desconhecidas e que podem ser consideradas tóxicas para o organismo. (LOPES, 2007).

Os fígados de peixes, em especial, apresentam ausência de lobulação (hepatócitos interconectados que formam uma placa), de espaços porta clássicos (região da periferia do lóbulo onde é encontrado nervos, vasos linfáticos e sanguíneos) e de células de Kupfer (sistema imune), porém apresenta tecido pancreático intra-hepático em algumas espécies, centros melano macrofágicos e de tecido hemacitopoiético. Cabe ressaltar que também há diferenças fisiológicas e morfológicas em diversas espécies de peixes. (LOPES, 2007 e JUNQUEIRA, 2008).

O hepatócito dos teleósteos apresenta núcleo localizado na região central de característica grande e arredondado com o nucléolo proeminente. Nessa célula também é possível encontrar uma grande quantidade de glicogênio hepático. (LOPES, 2007 e ALBINATI, 2009). Segundo Lopes (2007): “Alterações como vacuolização dos hepatócitos, depleção de glicogênio, inflamação, alteração no formato dos vasos sinusóides (capilares que estão ramificados dentro dos lóbulos) e neoplasmas (aumento do tecido) são indicativos de estresse ambiental”.

Alguns autores como Schuwaiger (2001) propõem a análise histopatológica como um biomarcador para a avaliação de efeitos tóxicos, pois estes têm se apresentado como ferramenta sensível para a detecção de efeitos causados por poluentes no organismo (LOPES, 2007). No presente trabalho foi feita uma avaliação dos efeitos das diferentes doses de chumbo injetados no peritônio sobre os fígados dos animais.

O resultado dessa avaliação revela que não houve nenhum dano significativo como pode ser visto e comparado nas figuras 10 e 11. Essa conclusão é possível, pois não foi detectado nenhum dano nos vasos sinusóides dos fígados expostos às duas concentrações de acetato de chumbo, visto que estes se apresentam sem nenhuma lesão indicativa de hemorragia.

Segundo os autores Albinati (2009) e Lopes (2007) para a verificação da presença ou ausência de glicogênio, lâminas basais, mucoproteínas, ou glicoproteínas o método de coloração mais apropriado é o PAS (ácido periódico de Schiff) sendo que esta coloração não foi realizada no laboratório de histologia da Escola Politécnica. Porém com a análise do resultado da glicose é possível inferir que possa ter ocorrido alguma modificação, pois segundo Winkaler (2001) a situação de estresse em peixes dispara respostas endócrinas, como foi referido na discussão da glicose, que culminam em efeitos metabólitos, tais como: a hiperglicemia (o que aconteceu com os peixes expostos a ambas as concentrações) e a depleção das reservas teciduais de glicogênio, que está relacionado com o primeiro efeito citado.

Por não ser possível fazer o método do PAS, não será possível afirmar se houve ou não vacuolização dos hepatócitos, pois segundo os resultados de Albinati (2009), peixes que não foram expostos ao herbicida Roundup apresentaram hepatócitos com reserva de glicogênio. Entretanto, os animais expostos a esse agente químico, apresentaram suas células hepáticas com os vacúolos indicando ausência de glicogênio.

Outro fator que esteve presente nesse trabalho, que se relaciona com a vacuolização dos hepatócitos e que foi citado por Lopes (2007) é o aumento do volume do órgão como é visto na figura 9. Apesar de apenas alguns dos animais que sofreram a necropsia apresentar o aumento de volume. (CAVALCANTE, 2009).

Outro fator que é possível de se relacionar com o resultado da avaliação das lâminas é o resultado das transaminases, visto que não foi detectada nenhuma lesão nos hepatócitos assim como não houve resultado dessas enzimas.

Sendo assim não foi possível detectar nenhuma alteração patológica no fígado das tilápias injetadas com ambas as concentrações de chumbo com a coloração HE, por causa disso o grau de severidade das lesões dos hepatócitos é considerado 1, ou seja sem nenhum dano.

## 6 CONCLUSÃO

A partir dos resultados desse trabalho é possível concluir que:

- 1 – Durante os 3 primeiros dias de exposição das tilápias a dose única de 100mg/kg de acetato de chumbo, ou durante os 9 dias de exposição a dose única de 1mg/kg, foi possível detectar a inibição da atividade da ALAD de eritrócitos e a elevação dos níveis de glicose do plasma. Por outro lado, não ocorreram alterações significativas nos níveis de hemoglobina e das transaminases séricas dos animais.
- 2 – Que as doses de 100mg/kg e 1mg/kg de acetato de chumbo, respectivamente, durante 4 e 9 dias, não foram suficientes para identificar danos morfológicos em fígados de tilápias do nilo que foram corados com a coloração HE.
- 3 -Nossos resultados mostram que a tilápia é uma espécie resistente às condições laboratoriais, mesmo manipuladas diariamente, indicando que essa espécie pode ser empregada em seu uso no monitoramento ambiental.

## REFERÊNCIAS

ALBINATI, A. C. L. et al. Biomarcadores histológicos – toxicidade crônica pelo Roundup em piauçu (*Leporinus macrocephalus*). **Curso de Medicina Veterinária – UNIVASF**. Rodovia BR 407, quadra 12 Lote 543 CEP: 56300000 Petrolina, PE. Arq. Bras. Med. Zootec., v. 61, n. 3, p. 621-627, 2009.

ALVAREZ- LEITE, E. M. **Exposição Ocupacional ao Chumbo e seus compostos**. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Departamento de Análises Clínicas. Av. Antônio Carlos 6627 - campus da Pampulha. CEP: 31270-901 - Belo Horizonte, MG – Brasil.

AMABIS, J. M. **Biologia**/ volume 3. -2. ed.- São Paulo: Moderna, 2004

AMORIM, L. C. A. **Os biomarcadores e sua aplicação na avaliação da exposição aos agentes químicos ambientais**. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas Faculdade de Farmácia Universidade Federal de Minas Gerais. Av. Olegário Maciel, 2360 CEP 30180-112 - Bairro de Lourdes Belo Horizonte, MG – Brasil. Rev. Bras. Epidemiol. Vol. 6, n. 2, 2003.

ASTDR - Agency for Toxic Substances and Disease Registry. **Toxicological Profile for Lead**. 2007. Atlanta, Georgia.

BARCELLOS, C., QUITÉRIO, L. A. D. **Vigilância ambiental em saúde e sua implantação no Sistema Único de Saúde**. Departamento de informações em saúde/ FIOCRUZ. Av. Brasil, 4365. CEP: 21045900 Rio de Janeiro. Rev. Saúde Pública 2006; 40(1) 170-177.

BAIRD, C. Química ambiental; trad. Maria Angeles, Lobo Recio e Luiz Carlos Marques Carrera. -2d- Porto Alegre: Bookman, 2002

BOASAÚDE. **Exposição Ambiental ao chumbo: um problema global**. <<http://boasaude.uol.com.br/lib/emailorprint.cfm?id=3859&type=lib>>. Última modificação: Quinta feira 5 de outubro de 2000. Acesso em: 11/2/2009.

BOMFIM, T. de J. et al. **Utilização de biomarcadores em peixes como ferramenta para a avaliação de contaminação ambiental por mercúrio**. Centro de biociência e biotecnologia, UENE. Campos dos Goytacazes-RJ, 2008.

Boscolo WR, Hayashi C, Soares CM, Furuya WM, Meurer F. Desempenho e Características de Carcaça de Machos Revertidos de Tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*), Linhagens Tailandesa e Comum, nas Fases Inicial e de Crescimento. **Rev. bras. zootec.** 2001; 30 (5): 1391-1396.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Conselho Nacional de Saúde. Subsídios para construção da Política Nacional de Saúde Ambiental** / Ministério da Saúde, Conselho Nacional de Saúde. – Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2007

BRILHANTE, O. M. **Gestão e avaliação de risco em saúde ambiental**. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 1999.

CAVALCANTE, A. L. M. Parâmetros sanguíneos de tilápia (*Oreochromis niloticus*) no monitoramento ambiental do chumbo. **CESTEH**, Rio de Janeiro-RJ, 2009.

CASA CIVIL, Presidência da República. **Lei nº 6938, de 31 de agosto de 1981**. Política nacional do meio ambiente. [http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/Leis/L6938.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/Leis/L6938.htm). acesso em: 6/12/2009.

FERNANDES, A. F. O uso de biomarcadores em estudos de toxicologia aquática. **Revista portuguesa de zootecnia**, ano/vol. XII, número 001. Associação portuguesa dos engenheiros zootécnicos. Vila Real, Portugal, pp. 67-86, 2005.

INOUE, M.H. et. **Critérios para avaliação do potencial de lixiviação dos herbicidas comercializados no Estado do Paraná**. Planta daninha vol.21, n.2, Viçosa, mai/ago, 2003.

JESUS, T. B., CARVALHO, C. E. V. **Utilização de biomarcadores em peixes como ferramenta para avaliação de contaminação ambiental por mercúrio**. Laboratório de Ciências Ambientais. Universidade Estadual do Norte Fluminense. Av. Alberto Lamego, 2000, Parque Califórnia, 28015620, Campos dos goytacazes – RJ. *Oecol. Bras.* 12(4): 680-693, 2008.

JÚNIOR, C. A. F. , JÚNIOR, A. S. V. **Cultivo de tilápia no Brasil: origens e cenário atual**. SOBER. XLVI congresso da Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural. Rio Branco – Acre, 20 a 23 de julho de 2008.

JUNQUEIRA, L. C. U., **Histologia básica**. 11. Ed. – Rio de Janeiro: Guanabara Koogam, 2008.

KENDALL, R. J. et al. **Aquatic and terrestrial ecotoxicology**. IN: KLASSEN, C.D.; AMDUR, M.O.; DOULL, J. (ed.) Casarett and Doull's Toxicology: the basic science of poisons. 5 ed. New York: McGraw-Hill, p. 883-906.1996.

LEHNINGER, A. L. **Lehninger princípios de bioquímica**. Traduzido por Arnaldo Simões, Wilson Roberto Navega Lodi. 3. Ed. – São Paulo: SARVIER, 2002.

LOPES, F. F. et al. Alterações histopatológicas observadas no fígado do lambarí *Astyanax jacuhiensis* (cope, 1894) sob influência de efluentes petroquímicos. **Biociências**, Porto Alegre, v.15, n.2, p. 166-172, jul.2007.

MACHADO, C. J. S. Recursos Hídricos e Cidadania no Brasil:Limites, Alternativas e Desafios. **Ambiente & Sociedade** – Vol. VI nº. 2 jul./dez. 2003.

MAGALHÃES, D. P., FILHO, A. S. F. **A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos**. Laboratório de Avaliação e Promoção da Saúde Ambiental, Pavilhão Lauro Travassos, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz). Av. Brasil, 4365 - Manguinhos, CEP: 21040-360. Rio de Janeiro, Brasil, 2008. *Oecol. Bras.* 12(3): 355-381, 2008.

MARTINEZ, C. B. R. et al. **Acute morphological and physiological effects of lead in the neotropical fish *Prochilodus lineatus***. Departamento de Ciências Fisiológicas. Londrina, PR, Brasil. *Bras. J. Biol.*, 64(4): 797-807, 2004.

MARZZOCO, A. e TORRES, B. B. **Bioquímica básica Anita Marzzoco**, Bayardo torres. – 3. ed. – Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007.

MEDRADO, L. **Apostila de técnicas Histológicas**. Escola politécnica de saúde Joaquim Venâncio (EPSJV), Rio de Janeiro-RJ, 2009.

MOREIRA, F. R., MOREIRA, J. C. Os efeitos do chumbo no organismo humano e seu significado para a saúde. Rev. Panam Salud Publica. 2004; 15(2): 119-129. \_\_\_\_\_ . A cinética do chumbo no organismo humano e sua importância para a saúde. Rio de Janeiro: FIOCRUZ/ENSP/CESTEH. Ciência & Saúde Coletiva, 9(1):167-181, 2004.

MOTTA, V. T. **Bioquímica Clínica: Princípios e Interpretações**. Porto Alegre: Editora Médica Missau, 2000.

NOVAES, R. L. Sobre a técnica. **História, Ciência Saúde- Manguinhos**, III (1): 24-49 Mar.-Jun., 1996.

OGA, S., CAMARGO, M. M. A., BATISTUZZO, J. A. **Os Fundamentos de toxicologia**. 3. Ed. – São Paulo: Atheneu Editora, 2008.

OLIVEIRA, R.V. **Dinâmica da absorção, retenção e excreção de zinco nas formas orgânicas e inorgânicas em gatos**. Lavras: UFLA, 2004.

OOST, R.V.D., BEYER, J., VERMEULEN, N.P.E. **Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review**. Environ. Toxicol. and Pharmacol., v.13, p. 57-149, 2003.

ONUJI, J, Teixeira PC, Medeiros MHG, Di Mascio P. **Danos ao DNA promovidos por ácido  $\delta$ -aminolevulínico**: possível associação com o desenvolvimento de carcinoma hepatocelular em portadores de porfiria aguda intermitente. Quim. Nova. 2002; 25, (4): 594-608.

PAOLIELLO, M. M. B. **Ecotoxicologia do chumbo e seus compostos**. Salvador: CRA, 2001. 144 p. ; 15 x 21 cm. – (caderno de referencia ambiental; v.3).

RASHED MN. Cadmium and Lead Levels in Fish (Tilapia Nilotica) Tissues as Biological Indicator for Lakewater Pollution. **Environmental Monitoring and Assessment**. 2001; 68: 75–89.

SADAO, M. Intoxicação por chumbo. **Revista de Oxidologia**. Jan, 2002.

SCHWAIGER. J. et al. The use of histopathological indicators to evaluate contaminant-related stress in fish. Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery 6: 75- 86, 1997. \_\_\_\_\_ . **The use of histopathological indicators to evaluate contaminant-related stress in fish**. Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery 6: 75-86, 1997.

SECRETARIA DE ESTADO DO MEIO AMBIENTE, **Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental**. Ficha de informação de produto químico. CETESB.

<[http://www.cetesb.sp.gov.br/emergencia/produtos/ficha\\_completa1.asp?consulta=ACE...](http://www.cetesb.sp.gov.br/emergencia/produtos/ficha_completa1.asp?consulta=ACE...)>. Acesso em: 15/7/2009.

SHVOONG. **Segunda revolução industrial**. <<http://pt.shvoong.com/humanities/1876098-segunda-revolução-industrial/>>. Acesso em: 2/12/2009.

TROSTERI, E. J. **Intoxicação plúmbica. Instituto da Criança "Prof. Pedro de Alcantara" do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.** Unidade - Berçário Anexo à Maternidade do ICHC.

WHO (World Health Organization). **International Programme on Chemical Safety - IPCS. Biomarkers and Risk Assessment: Concepts and Principles.** Environmental Health Criteria, 155. Geneva, 1993.

WINKALER, E. U. et al. **Biomarcadores histológicos e fisiológicos para o monitoramento da saúde de peixes de ribeirões de Londrina**, Estado do Paraná. Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Estadual de Londrina. C. P. 6001, CEP: 86051990, Londrina, Paraná, Brasil. Maringá, v. 23, n. 2, p. 5007514, 2001.

WORLD HEALTH ORGANIZATION; **Guidelines for Air Quality**, WHO: Geneva, 1999.

WHO. **World Health Organization. Lead Review.** Nordic Council of Ministers, 2003. Report n° 1, Issue n° 4.