



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de São José do Rio Preto

Lara Zácari Fanali

Descrição micromorfológica e efeitos do benzo[α]pireno em células hepáticas e sanguíneas das espécies *Physalaemus cuvieri* e *Leptodactylus fuscus* (Anura: Leptodactylidae)

São José do Rio Preto

2016

Lara Zácari Fanali

Descrição micromorfológica e efeitos do benzo[α]pireno em células hepáticas e sanguíneas das espécies *Physalaemus cuvieri* e *Leptodactylus fuscus* (Anura: Leptodactylidae)

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biologia Animal, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Orientador: Prof. Dr. Classius de Oliveira
Coorientadora: Profa. Dra. Cláudia Regina Bonini Domingos

São José do Rio Preto

2016

Fanali, Lara Zácari. Descrição anatômica e efeitos do benzo[α]pireno no fígado e no sangue das espécies *Physalaemus cuvieri* e *Leptodactylus fuscus* (Anura: Leptodactylidae) / Lara Zácari Fanali. -- São José do Rio Preto, 2016.

Orientador: Classius de Oliveira Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Anuro. 2. Anuro. 3. Melanomacrófago. 4. Micronúcleo. 5. Leucócitos. I. Oliveira, Classius de. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU -

Lara Zácari Fanali

Descrição micromorfológica e efeitos do benzo[α]pireno em células hepáticas e sanguíneas das espécies *Physalaemus cuvieri* e *Leptodactylus fuscus* (Anura: Leptodactylidae)

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biologia Animal, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Classius de Oliveira
UNESP – São José do Rio Preto
Orientador

Prof. Dr. Antonio Sebben
UnB - Brasília

Prof^a. Dr^a Luciana de Souza Onde
UEG - Anápolis

São José do Rio Preto

26 de fevereiro de 2016

RESUMO

Os anfíbios sofrem influência de diversos contaminantes que podem afetar o seu ciclo de vida. O benzo[α]pireno (BaP) é um composto biocumulativo encontrado na atmosfera, água e solo. Para mensurar como o BaP interfere nos anuros *Physalaemus cuvieri* e *Leptodactylus fuscus* utilizamos alguns biomarcadores de contaminação, como: os melanomacrófagos hepáticos, que são células com função de detoxificação; mastócitos, com função de proteção em respostas inflamatórias; micronúcleos (MN), fragmentos de DNA resultantes de exposição a agentes tóxicos e também os glóbulos brancos, pois alteração do padrão dos leucócitos indica que o animal não está nas suas condições normais (está sob influência de estresse, poluentes). A princípio foi feita a descrição do fígado das espécies com microscopia de luz e eletrônica de transmissão. Notou-se que o tecido hepático é semelhante entre elas, especialmente a disposição dos hepatócitos em cordão duplo. Para o estudo com o BaP utilizou-se 36 animais de cada espécie divididos em 6 tratamentos. Injetou-se por via cutânea 2mg/kg de BaP diluído em óleo mineral e nos controles apenas óleo mineral (mesma via). Seguiram-se os processos para análise hepática e sanguínea. Com 7d de tratamento, a área de melanina reduziu nas duas espécies e em 13d aumentou em *L. fuscus*. A diminuição pode estar relacionada ao efeito citotóxico do composto e o aumento, com o ajuste fisiológico. Houve aumento da densidade de mastócitos nas duas espécies e em todos os tratamentos. Essa resposta está relacionada com a função de proteção em respostas inflamatórias. Não houve alteração na frequência dos MN em nenhuma espécie, provavelmente porque as células mais danificadas sofreram morte celular ou perderam a capacidade de entrar em mitose. *L. fuscus*, em 13d, teve aumento dos neutrófilos devido à sua função em resposta inflamatória e diminuição de eosinófilos devido alteração da função imune.

Palavras-chave: anuro, melanomacrófago, micronúcleo, leucócitos, tecido hepático.

ABSTRACT

Amphibians are influenced by several pollutants that may affect their life cycle. Benzo[α]pyrene (BaP) is a bioaccumulative contaminant found in the atmosphere, water and soil. In order to measure how this pollutant acts in the species *Physalaemus cuvieri* and *Leptodactylus fuscus*, specific biomarkers were utilized, such as hepatic melanomacrophages, which displays detoxification functions; mast cells, which are protective cells during inflammatory response; micronuclei (MN), DNA fragments resulting from the exposure to toxic agents; white blood cells, due to leukocytes patterns alterations indicating that the organism is not in its normal conditions. Initially, the description of the species liver (6 animals of each species) was performed by means of light and transmission electron microscopy. It was observed that the hepatic tissue is very similar between species. For the BaP study, 36 animals of each species were used, divided in 6 treatments. The treated ones received a subcutaneous injection (2 mg/kg) of BaP, diluted in mineral oil, while control animals received only mineral oil. The following processes were performed for blood and light microscopy analysis: with 7d of treatment, melanin area were reduced in both species, followed by an increased in 13d for the species *L. fuscus*. This decline may be related to the cytotoxic effect of the compound or the organism physiological adjustment. Mast cells displayed increased density in both species and in all treated groups. This response is linked to the cells' protection function on inflammatory responses. No changes in MN frequency were found for both species, probably because most damaged cells underwent apoptosis or lost the capacity of initializing mitosis. After 13d of treatment, an increase in neutrophils was observed, given its function in inflammatory responses, such as a decrease in eosinophils, due to immune function alteration.

Keywords: anuran, melanomacrophage, micronuclei, leukocytes, liver tissue.

SUMÁRIO

Introdução geral	8
Classe Amphibia	8
Declínio dos anfíbios	8
Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos	8
Pigmento extracutâneo.....	9
Biomarcadores de contaminação	9
Espécie	11
Capítulo 1.....	17
<i>Morfologia hepática de <i>Physalaemus cuvieri</i> e <i>Leptodactylus fuscus</i> (Anura: <i>Leptodactylidae</i>).....</i>	17
Resumo	19
Introdução	20
Material e Métodos.....	20
Coleta dos animais	20
Processamento histológico.....	20
Análise Ultraestrutural	21
Resultados	22
Análise descritiva do fígado de <i>Physalaemus cuvieri</i>	22
Análise descritiva do fígado de <i>Leptodactylus fuscus</i>	23
Discussão	24
Agradecimentos	26
Referências	36
Capítulo 2.....	38
<i>Efeitos do benzo[<i>a</i>]pireno nos melanomacrófagos e mastócitos hepáticos de <i>Physalaemus cuvieri</i> e <i>Leptodactylus fuscus</i> (Anura: <i>Leptodactylidae</i>).....</i>	38
Resumo	40
Introdução	41
Material e Métodos.....	43
Coleta dos animais	43
Experimentos com benzo[<i>a</i>]pireno	43
Processamento histológico.....	44

Análises quantitativas	44
Análises estatísticas	45
Resultados	45
Efeitos do benzo[α]pireno nos melanomacrófagos.....	45
Efeitos do benzo[α]pireno na densidade de mastócitos	46
Discussão	46
Agradecimentos	49
Referências	52
Capítulo 3.....	57
<i>Efeitos do benzo[α]pireno nas células sanguíneas de <i>Physalaemus cuvieri</i> e <i>Leptodactylus fuscus</i> (Anura: Leptodactylidae).....</i>	<i>57</i>
Resumo	59
Introdução	60
Material e Métodos.....	61
Coleta dos animais	61
Experimentos com benzo[α]pireno	62
Análise de Micronúcleo	62
Análise dos Leucócitos	63
Análises estatísticas	63
Resultados	63
Teste de micronúcleo	63
Porcentagem de Leucócitos	64
Discussão	64
Agradecimentos	67
Referência.....	71
Conclusões	76

Introdução geral

Classe Amphibia

Com exceção de oceanos, anfíbios habitam áreas bem variadas, podendo ser localizados dos desertos até regiões onde há neve, do solo até a copa de árvores altas (Kohler 2000). De todas as regiões zoogeográficas, a região Neotropical é a que exhibe a maior diversidade de anfíbios. Mais de dois terços de todas as espécies de anfíbios recentemente descritos nos últimos dez anos são dessa região (Kohler 2000).

Pertencente a essa região Neotropical, o Brasil lidera mundialmente em relação à diversidade de anfíbios anuros (Silvano & Segalla 2005). Até abril de 2012 foi constatado que a classe Amphibia está representada por 946 espécies, onde 913 são anuros (Sociedade Brasileira de Herpetologia 2012).

Declínio dos anfíbios

Os anfíbios têm sido mencionados como o principal grupo ameaçado de extinção nas últimas décadas (Stuart *et al.* 2004; Wake & Vredenburg 2008; Hayes *et al.* 2010; Blaustein *et al.* 2011), uma vez que a perda e diminuição de espécies estão ocorrendo a taxas sem precedentes (May 2010).

As causas atribuídas ao declínio dos anfíbios são complexas e incluem uma gama de fatores como destruição do habitat, introdução de espécies exóticas, alterações climáticas e atmosféricas e poluição dos ambientes aquáticos por diversos contaminantes (Wake & Vredenburg 2008) provenientes de efluentes da agricultura, esgoto doméstico e indústria (Desbrow *et al.* 1998; Snyder *et al.* 1999; Boyd *et al.* 2003). Além disso, a intensa pressão humana, direta ou indiretamente, está causando profundos efeitos nos ambientes naturais (Wake & Vredenburg 2008).

Anfíbios apresentam características peculiares como permeabilidade cutânea e ciclo de vida dependente do ambiente aquático e do terrestre, que os tornam vulneráveis a uma série de estressores (Rabb 1990; Duellman & Trueb 1994), como por exemplo, os Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos.

Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos

Hidrocarboneto Policíclico Aromático (HPA) é uma classe de poluentes ambientais tóxicos acumulados no meio ambiente devido a uma variedade de atividades naturais, como vulcões e incêndios florestais (Zakaria *et al.* 2002; Jiao *et al.* 2009) ou antrópicas (Juhasz &

Naidu 2000; Bertilsson & Widenfalk 2002; Morillo *et al.* 2008a; Stogiannidis & Laane 2015): combustão incompleta de combustíveis fósseis, de matéria orgânica (Ou *et al.* 2004; Luo *et al.* 2008), utilização de produtos petrolíferos e biocombustíveis (Zakaria *et al.* 2002; Yan *et al.* 2006; Kim *et al.* 2008; Morillo *et al.* 2008a).

Essas atividades antrópicas excedem muito as fontes naturais (Stogiannidis & Laane 2015) e, por isso, é preciso se preocupar, pois dependendo da sua volatilidade o HPA pode ser transportado para longe de suas fontes originais e se acumular nos solos e sedimentos (Stark *et al.* 2003; Morillo *et al.* 2008a; Agarwal 2009; Harris *et al.* 2011), atingindo o ambiente em que muitos animais estão sempre em contato.

Benzo[α]pireno (BAP) é um HPA potencialmente cancerígeno e mutagênico quando exposto por via cutânea, injeção intraperitoneal, inalação ou administrado na dieta (Collins 1991; Kanaly & Harayama 2000). Assim como qualquer HPA possui propriedades hidrofóbicas e lipofílicas (Stogiannidis & Laane 2015). Por conta de sua hidrofobicidade, BAP tende a ser rapidamente absorvido em partículas orgânicas presente nos sedimentos, porém, apresenta dificuldade de dissolver em água (Bertilsson & Widenfalk 2002; Stogiannidis & Laane 2015).

Pigmento extracutâneo

Alguns tecidos de animais ectotérmicos são particularmente distintos de animais homeotérmicos pela elevada distribuição de células pigmentadas em alguns órgãos (Agius & Roberts 2003). As células do sistema pigmentar extracutâneo podem estar presentes no peritônio, mesentério, ao redor de vasos sanguíneos, fígado, baço, coração, pulmões e gônadas (Agius & Roberts 2003; Zieri *et al.* 2007; Moresco & Oliveira, 2009; Franco-Belussi *et al.* 2010).

Biomarcadores de contaminação

Melanomacrófago (MM) é uma célula arredondada capaz de produzir e armazenar pigmento em seu interior. Também podem constituir centros de melanomacrófagos (MMCs) quando essas células se agrupam, formando agregados celulares (Agius 1981). A quantidade de MMs, seu tamanho e distribuição do pigmento podem variar em diferentes espécies, idade do animal e estresse. Eles são encontrados em vários vertebrados como peixes, répteis e anfíbios (Wolke 1992; Fournie *et al.* 2001; Loumbourdis & Vogiatzis 2002; Fishelson 2006). MMs estão presentes em órgãos como fígado, baço e rins. Essas células armazenam pigmentos como: melanina, pigmento sintetizado endogenamente em vertebrados e

invertebrados (Césarini 1996) que tem a função de absorver e neutralizar radicais livres, cátions e outros agentes potencialmente tóxicos, derivados da degradação de material celular fagocitado (Zuasti *et al.* 1989); hemosiderina, substância granular derivada do catabolismo da hemoglobina dos eritrócitos (Kranz 1989); e lipofuscina, derivada da oxidação de ácidos graxos (Pickford 1953). As principais funções dos MMs são a destruição, detoxificação ou reciclagem de materiais endógenos e exógenos (Agius & Roberts 2003; Passantino *et al.* 2013).

Os MMs são frequentemente utilizados como biomarcadores de contaminação ambiental. Passantino *et al.* (2013) afirmam esse fato com base em estudos com peixes avaliando regiões poluídas e não poluídas. Santos *et al.* (2014) utilizam essas células pigmentadas como biomarcadoras de alterações climáticas em anfíbios. Em peixes, os agregados de melanomacrófagos normalmente aumentam em número e tamanho quando expostos a substâncias tóxicas (Wolke 1992); desempenham um papel na resistência contra agentes infecciosos (vírus, bactérias e parasitas) (Roberts 1975), além disso, a variação de temperatura diminui a pigmentação hepática (Santos *et al.* 2014). Com base nisso, essas células pigmentares também serão utilizadas como biomarcadoras frente à exposição ao benzo[α]pireno.

Mastócitos são células especializadas em secretar uma variedade de produtos, como mediadores de lipídeos, leucotrienos, proteases e histamina, os quais contribuem no processo inflamatório (Shakoory *et al.* 2004). Eles desempenham papel importante nos mecanismos de resposta inflamatória associada a uma vasta gama de condições de estresse, como a exposição aos xenobióticos (Lauriano *et al.* 2012). Dessa forma, essas células podem ser usadas como indicadoras de resposta inflamatória em vários tecidos (Franco-Belussi *et al.* 2013b). Payne e Fancey (1989) mostraram que os HPAs causam danos no sistema imune. O estudo foi realizado com uma espécie de peixe que sofreu exposição de altos níveis de HPA presentes na água de aquário em que se encontravam.

Quanto às células sanguíneas, diferentemente de mamíferos, em anfíbios os eritrócitos apresentam-se de forma ovalada e com núcleo localizado centralmente ao citoplasma (Arikan & Çiçek 2014). A exposição de vertebrados como peixes e anfíbios a contaminantes como benzo[α]pireno e pesticidas induzem a formação de micronúcleo (MN) em eritrócitos maduros (Grinfeld *et al.* 1986; Candioti *et al.* 2010; Pastore *et al.* 2014; Pérez-Iglesias *et al.* 2014), dessa forma é utilizado como biomarcador por vários autores (Pérez-Iglesias *et al.* 2014; Josende *et al.* 2015; Neta *et al.* 2015). Micronúcleos são originados a partir de

fragmentos de cromossomos ou cromossomo inteiro em anáfase refletindo eventos respectivamente, clastogênicos e aneugênicos (Fortin *et al.* 2015).

Outros parâmetros hematológicos, como os leucócitos, também podem ser utilizados como biomarcadores de contaminação ambiental (Dutta *et al.* 2015; Neta *et al.* 2015; Zhelev *et al.* 2015). Dutta *et al.* (2015) observaram alteração quantitativa nos glóbulos brancos de *Channa punctatus* (Bloch) contaminados com nitrato de chumbo, por isso também utilizaremos os leucócitos como biomarcadores na exposição de anuros ao benzo[α]pireno.

Espécie

No Brasil, *Physalaemus cuvieri* está distribuída nas regiões Nordeste, Centro-Oeste, Sudeste e Sul. Essa espécie apresenta coloração dorsal variável, presença de uma faixa escura e espessa que vai do focinho até os membros dianteiros, afinando gradativamente até a região inguinal. São terrestres e noturnas, encontradas em áreas abertas, principalmente em ambientes recém-inundadas, vocalizando abaixo de gramíneas. Podem ser encontradas também dentro de pegadas de animais, quando profundas e preenchidas com água (Uetanabaro *et al.* 2008).

Leptodactylus fuscus possui distribuição ampla, pode ser encontrada do Panamá à Argentina. Possui o dorso variando de verde-escuro a marrom claro, com manchas marrom-escuras. Aproximadamente 20% dos indivíduos apresentam linha dorsal branca a creme. Seu focinho é pontiagudo com a ponta clara nos machos. Esses animais também são terrestres e noturnos, encontrados em áreas abertas. Os machos vocalizam sobre o chão, nas margens de lagoas temporárias ou depressões sujeitas a inundação (Uetanabaro *et al.* 2008).

A justificativa para a escolha das duas espécies se deve ao fato da busca por generalizações em relação à morfofisiologia em espécies diferentes, pertencentes à mesma família.

Referências

- Agarwal T. 2009. Concentration level, pattern and toxic potential of PAHs in traffic soil of Delhi, India. *J Hazard Mater.* v171. pp 894–900.
- Agius, C. 1981. Preliminary Studies on the Ontogeny of the Melanomacrophages of Teleost Hematopoietic Tissues and Age-Related Changes. *Dev Comp Immunol.* v5. pp 597-606.
- Agius, C.; Roberts, R.J. 2003. Review: Melano-Macrophage Centres and their Role in Fish Pathology. *J Fish Biol.* v26. pp 499-509.
- Arikan, H; & Çiçek, K. 2014. Haematology of amphibians and reptiles: a review. *North-Western J Zool.* v10(1). pp 190-209.
- Bertilsson S.; Widenfalk A. 2002. Photochemical degradation of PAHs in freshwaters and their impact on bacterial growth – influence of water chemistry. *Hydrobiol.* v469. pp 23–32.
- Blaustein, A.R.; Han, B.A.; Relyea, R.A.; Johnson, P.T.J.; Julia C. Buck, J.C.; Gervasi, S.S.; Kats, L.B. 2011. The complexity of amphibian population declines: understanding the role of cofactors in driving amphibian losses. *Ann NY Acad Sci ISSN. The Year in Ecol Conserv Biol.* v1223. pp 108-119.
- Boyd, G.R.; Reemtsma, H.; Grimm, D. A.; Mitra, S. 2003. Pharmaceuticals and Personal Care Products (PPCPs) in Surface and Treated Waters of Louisiana, USA and Ontario, Canada. *Sci Total Environ.* v311. pp 135–149.
- Candioti, J. V.; Natale, G.S.; Soloneski, S.; Ronco, A.E.; & Larramendy, M.L. 2010. Sublethal and lethal effects on *Rhinella Arenarum* (Anura, Bufonidae) tadpoles exerted by the pirimicarb-containing technical formulation insecticide Aficida®. *Chemosphere.* v78(3). pp 249-255.
- Césarini, J.P. 1996. Melanins and their Possible Roles through Biological Evolution. *Adv Space Res.* v18. pp 35-40.
- Collins, J.F.; Brown, J.P.; Dawson, S.V.; & Marty, M.A. 1991. Risk assessment for benzo[a]pyrene. *Regul Toxicol Pharm.* v13(2). pp 170-184.
- Desbrow C.; Routledge E.J.; Brighty G.C.; Sumpter J.P.; Waldock M. 1998. “Identification of Estrogenic Chemicals in STW Effluent. 1. Chemical Fractionation and in Vitro Biological Screening”. *Environ Sci Technol.* v32(11). pp 1549-1558.
- Duellman W.E.; Trueb L. 1994. Biology of amphibians. New York, McGraw-hill. pp 405.
- Dutta, B., Sarma, S. R., & Deka, P. 2015. Lead nitrate toxicity on haematological changes in a live fish species *Channa punctatus* (Bloch). *Int. J. Fish. Aquac.* v3(2). pp 196-198.
- Fishelson, L. 2006. Cytomorphological alterations of the thymus, spleen, head-kidney, and liver in cardinal fish (Apogonidae, Teleostei) as bioindicators of stress. *J Morphol.* v267. pp 57-69.

Fortin, F.; Bonvalot, Y.; Pham, T.C.V.; Ouellet, N.; Ayotte, P.; Viau, C.; & Lemieux, N. 2015. Biomarkers of genotoxicity measured in human lymphocytes exposed to benzo[a]pyrene: Aneugenic effect, and involvement multiple primary DNA lesions. *Integr Pharm Toxicol Gentoxicol.* v1(1). pp 21-32.

Fournie J.W; Summers J.K; Courtney L.A; Engle V.D. 2001. Utility of splenic macrophage aggregates as an indicator of fish exposure to degraded environments. *J Aquat Anim Health.* v13. pp 105-116.

Franco-Belussi, L.; Castrucci, A.M.D.L.; & de Oliveira, C. 2013. Responses of melanocytes and melanomacrophages of *Eupemphix nattereri* (Anura: Leiuperidae) to Nle^4 , $D-Phe^7$ - α -melanocyte stimulating hormone and lipopolysaccharides. *Zool.* v116(5). pp 316-324.

Franco-Belussi, L.; Santos, L.R.S; Zieri, R.; Oliveira, C. 2010. Visceral pigmentation in *Dendropsophus* (Anura: Hylidae): Occurrence and Comparison. *Zool Anz.* v250, pp 103-110.

Grinfeld, S.; Jaylet, A.; Siboulet, R.; Deparis, P.; & Chouroulinkov, I. 1986. Micronuclei in red blood cells of the newt *Pleurodeles waltl* after treatment with benzo(a)pyrene: dependence on dose, length of exposure, posttreatment time, and uptake of the drug. *Environ mutagen.* v8(1). pp 41-51.

Harris K.A.; Yunker M.B.; Dangerfield N.; Ross O.S. 2011. Sediment-associated aliphatic and aromatic hydrocarbons in coastal British Columbia, Canada: concentrations, composition, and associated risks to protected sea otters. *Environ Pollut.* v159. pp 2665–2674.

Hayes, T.B.; Falso P.; Gallipeau S.; Stice, M. 2010. The cause of global amphibian declines: a developmental endocrinologist's perspective. *J Exp Biol.* v213. pp 921-933.

IUCN (International Union for Conservation of Nature). <http://www.iucn.org/>. Visto em: 8 de janeiro de 2015.

Jiao L.; Zheng G.J.; Minh T.B.; Richardson B.; Chen L.; Zhang Y.; Yeung L.W.; Lam J.C.W.; Yang X.; Lam P.K.S.; Wong M.H. 2009. Persistent toxic substances in remote lake and coastal sediments from Svalbard, Norwegian Arctic: levels, sources and fluxes. *Environ Pollut.* v157. pp 1342–1351.

Josende, M.E.; Tozetti, A.M.; Alalan, M.T.; Mathies Filho, V.; da Silva Ximenez, S.; da Silva Júnior, F.M.R.; & Martins, S.E. 2015. Genotoxic evaluation in two amphibian species from Brazilian subtropical wetlands. *Ecol Indic.* v49. pp 83-87.

Juhasz, A.L.; & Naidu, R. 2000. Bioremediation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons: a review of the microbial degradation of benzo[a]pyrene. *Int Biodeter Biodegr.* v45(1). pp 57-88.

Kanally, R.A.; & Harayama, S. 2000. Biodegradation of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria. *J Bacteriol.* v182. pp 2059-2067.

Kim M.; Kennicutt M.C. II.; Yaorong Q. 2008. Source characterization using compound composition and stable carbon isotope ratio of PAHs in sediments from lakes, harbor and shipping waterway. *Sci Total Environ.* v389. pp 367–377.

- Kohler, J.; Glaw, F.; & Bohme, W. 2000. Diversity in amphibians. pp 32-35.
- Kranz, H. 1989. Changes in Splenic Melano-Macrophages Centres of Dab, *Limanda limanda* During and After Infection with Ulcer Disease. *Dis Aquat Organ*. v6. pp 167-173.
- Lauriano, E.R.; Calò, M.; Silvestri, G.; Zacccone, D.; Pergolizzi, S.; Lo Cascio, P. 2012. Mast cells in the intestine and gills of the sea bream, *Sparus aurata*, exposed to a polychlorinated biphenyl, PCB126. *Acta Histochem*. v114. pp 166–171.
- Loumbourdis N.S; Vogiatzis A.K. 2002. Impact of cadmium on liver pigmentary system of the frog *Rana ridibunda*. *Ecotoxicol Environ Saf*. v53. pp 52-58.
- Luo X.J.; Chen S.J.; Mai B.X.; Sheng G.Y.; Fu J.M.; Zeng E.Y. 2008. Distribution, source apportionment, and transport of PAHs in sediments from the Pearl River delta and the northern South China Sea. *Arch Environ Contam Toxicol*. v55. pp 11–20.
- May, R.M. 2010. Ecological science and tomorrow's world. *Philos Trans Royal Soc B*. v365. pp 41–47.
- Moresco, R.M.; Oliveira, C. 2009. A comparative study of the extracutaneous pigmentary system in three anuran amphibian species evaluated during the breeding season. *South Am J Herpetol*. v4,(1), pp 1-8.
- Morillo E.; Romero A.S.; Madrid L.; Villaverde J.; Maqueda C. 2008a. Characterization and sources of PAHs and potentially toxic metals in urban environments of Sevilla (Southern Spain). *Water Air Soil Pollut*. v187. pp 41–51.
- Neta, R.N.F.C.; Sousa, D.B.P.; de Macêdo Sobrinho, I. C.; Horton, E.Y.; de Almeida, Z.D.S.; Tchaicka, L., & de Sousa, A.L. 2015. Genotoxic and hematological parameters in *Colossoma macropomum* (Pisces, Serrasalminidae) as biomarkers for environmental impact assessment in a protected área in northeastern Brazil. *Environ Sci Pollut Res*. v22(20). pp 15994-16003.
- Ou S.; Zheng J.; Zheng J.; Richardson B.J.; Lam P.K.S. 2004. Petroleum hydrocarbons and polycyclic aromatic hydrocarbons in the surficial sediments of Xiamen Harbour and Yuan Dan Lake China. *Chemosphere*. v56. pp 107–112.
- Passantino, L.; Santamaria N.; Zupa R.; Pousis C.; Garofalo R.; Cianciotta A.; Jirillo E.; Acone F.; Corriero A. 2013. Liver melanomacrophage centres as indicators of Atlantic bluefin tuna, *Thunnus thynnus* L. well-being. *J Fish Dis*. pp 1-10.
- Pastore, A. S.; Santacroce, M.P.; Narracci, M.; Cavallo, R.A.; Acquaviva, M.I.; Casalino, E.; & Crescenzo, G. 2014. Genotoxic damage of benzo[a]pyrene in cultured sea bream (*Sparus aurata* L.) hepatocytes: Harmful effects of chronic exposure. *Mar Environ Res*. v100. pp 74-85.
- Payne, J.F.; Fancey, L.F. 1989. Effect of polycyclic aromatic hydrocarbons on immune responses in fish: Change in melanomacrophage centers in flounder (*Pseudopleuronectes americanus*) exposed to hydrocarbon-contaminated sediments. *Mar Environ Res*. v28(1). pp 431-435.

- Pérez-Iglesias, J.M.; de Arcaute, C.R.; Nikoloff, N.; Dury, L.; Soloneski, S.; Natale, G.S.; & Larramendy, M.L. 2014. The genotoxic effects of the imidacloprid-based insecticide formulation Glacoxan Imida on Montevideo tree frog *Hypsiboas pulchellus* tadpoles (Anura, Hylidae). *Ecotoxicol Environ Saf.* v104. pp 120-126.
- Pickford, G.W. 1953. Fish endocrinology. A study of the hypophysectomized male killifish, *Fundulus Heteroclitus* (L.). *Bull. Bingham Oceanogr Coll.* v14. pp 5–41.
- Rabb G.B. 1990. Declining amphibian population. *Species.* v13. pp 33-34.
- Roberts, R.J. 1975. Melanin-containing cells of teleost fish and their relation to disease. *Pathol Fishes.* pp 399-428.
- Santos, L.R.S; Franco-Belussi, L.; Zieri, R.; Borges, R.E.; & Oliveira, C. 2014. Effects of Thermal Stress on Hepatic Melanomacrophages of *Eupemphix nattereri* (Anura). *The Anat Rec.* v297. pp 864-875.
- Shakoory, B., Fitzgerald, S.M., Lee, S.A., Chi, D.S., Krishnaswamy, G. 2004. The role of human mast cell-derived cytokines in eosinophil biology. *J. Interf. Cytok. Res.* v24. pp 271–281.
- SHB (Sociedade Brasileira de Herpetologia): Lista oficial de anfíbios do Brasil 2012. Disponível em http://sbherpetologia.org.br/checklist/checklist_brasil.asp. Acesso em: 8 de janeiro de 2016.
- Silvano, D.L.; Segalla, M.V. 2005. Conservação de anfíbios do Brasil. *Megadiversidade.* v1. pp 80-86.
- Snyder S.; Keith T.L.; Verbrugge D.A.; Snyder E.M.; Gross T.S.; Kannan K.; Giesy J.P. 1999. Analytical Methods for Detection of Selected Estrogenic Compounds in Aqueous Mixtures. *Environ Sci Technol.* v33. n16. pp 2814-2820.
- Stark A.; Abrajano T.; Hellou J.; Metcalf-Smith J.L. 2003. Molecular and isotopic characterization of polycyclic aromatic hydrocarbon distribution and sources at the international segment of the St. Lawrence River. *Org Geochem.* v34. pp 225–237.
- Stogiannidis E.; & Laane R. 2015. Source Characterization of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Using Their Molecular Indices: An Overview of Possibilities. In *Rev Environ Contam Toxicol.* pp 49-133.
- Stuart, S.N.; Chanson, J.S.; Cox, N.A.; Young, B.E.; Rodrigues, A.S.L.; Fischman, D.L.; Waller R.W. 2004. Status and trends of amphibian declines and extinctions worldwide. *Science.* v306. pp 1783–1786.
- Uetanabaro M.; Prado C.P.A.; Rodrigues D.J.; Gordo M.; Campos Z. 2008. Guia de Campo dos Anuros do Pantanal e Planaltos do Entorno. pp 196.
- Wake, D.B.; Vredenburg, V. T. 2008. Are we in the midst of the sixth mass extinction? A view from the world of amphibians. *PNAS.* v105(1). pp 11467.

Wolke, R.E.; Murchelano, R.A.; Dickstein, C.D.; & George, C.J. 1985. Preliminary evaluation of the use of macrophage aggregates (MA) as fish health monitors. *Bull Environ Contam Toxicol.* v35(1). pp 222-227.

Yan B.; Abrajano T.A.; Bopp R.F.; Benedict L.A.; Chaky DA.; Perry E.; Song J.; Keane D.P. 2006. Combined application of $\delta^{13}\text{C}$ and molecular ratios in sediment cores for PAH source apportionment in the New York/New Jersey harbor complex. *Org Geochem.* v37. pp 674–687.

Zakaria M.P.; Takada H.; Tsutsumi S.; Ohno K.; Yamada J.; Kound E.; Kumata H. 2002. Distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in rivers and estuaries in Malaysia: a widespread input of petrogenic PAHs. *Environ Sci Technol.* v36. pp 1907–1918.

Zhelev, Z.M.; Popgeorgiev, G.S.; & Mehterov, N.H. 2015. Haematological Parameters of *Pelophylax ridibundus* (Amphibia: Ranidae) from the Region of the Lead and Zinc Plant “Kardzhali”(South Bulgaria) and their use in the Environmental Quality Assessment. *Acta Zool. Bulg.* v67(2). pp 271-282.

Zieri, R.; Taboga, S.R.; Oliveira, C. 2007. Melanocytes in the Testes of *Eupemphix nattereri* (Anura, Leiuperidae): Histological, Etereological and Ultrastructural Aspects. *The Anat Rec.* v290, pp 795-800.

Zuasti, A.; Jara, J.R.; Ferre, C.; Solano, F. 1989. Occurrence of Melanin Granules and Melanosynthesis in the Kidney of *Sparus auratus*. *Pig Cell Res.* pp 93-100.

Capítulo 1

Morfologia hepática de *Physalaemus cuvieri* e *Leptodactylus fuscus* (Anura: Leptodactylidae)

**Morfologia hepática de duas espécies de anuros da família Leptodactylidae:
Physalaemus cuvieri e *Leptodactylus fuscus***

Lara Zácari Fanali¹, Lilian Franco-Belussi², Classius de Oliveira²

¹Programa de Pós-graduação em Biologia Animal - IBILCE - UNESP / São José do Rio Preto
- SP

²Departamento de Biologia - IBILCE - UNESP / São José do Rio Preto - SP

Manuscrito a ser submetido ao periódico *Zoological Science*

Resumo

O fígado possui múltiplas funções sendo o principal órgão de detoxificação e pode apresentar variações morfofisiológicas entre as espécies. O trabalho teve como objetivo descrever o fígado de duas espécies de pequenas rãs pertencentes à família – Leptodactylidae. Para isso, foram analisados fragmentos hepáticos de 18 exemplares machos de cada espécie *Physalaemus cuvieri* e *Leptodactylus fuscus*. Seguiram-se os processos para análise de microscopia de luz e eletrônica de transmissão. Na análise histológica e ultraestrutural confirma-se que os fígados de *P. cuvieri* e *L. fuscus* são bastante semelhantes anatomicamente entre si e também com outras espécies, como o arranjo dos hepatócitos em cordão duplo, porém há certas características que são distintas, tanto entre as espécies quanto em outros anuros, como a presença de maior quantidade de retículo endoplasmático em *L. fuscus* e o arranjo dos hepatócitos em túbulos em *L. castebeianus*.

Palavras-chave: anuros, fígado, ultraestrutura, hepatócito.

Introdução

O fígado é a maior glândula dos vertebrados e desempenha um importante papel quando nos referimos ao metabolismo, como síntese de proteínas, secreção da bile, armazenamento de metabólitos e detoxificação, ou seja, é essencial para a homeostase corporal. É o órgão no qual os nutrientes absorvidos são processados e armazenados para uso posterior (Akiyoshi & Inoue 2012).

O arranjo do tecido hepático está diretamente relacionado com as características fisiológicas do animal, como ectotermia e status reprodutivo (Brusle & Anadon 1996). O componente principal do órgão são os hepatócitos, especialmente responsáveis pelo metabolismo geral.

Em anuros, o fígado, normalmente, é dividido em três lobos e apresenta variação na disposição do tecido hepático. Pode ser encontrado na forma de cordão duplo ou tubular (Spornitz 1975; Duellman & Trueb 1994; Fenerick Junior 2008; Franco-Belussi *et al.* 2012).

Em consequência dessa variação encontrada entre as espécies, o trabalho teve como objetivo descrever o fígado de duas espécies diferentes, mas pertencentes à mesma família – Leptodactylidae.

Material e Métodos

Coleta dos animais

Foram utilizados 72 espécimes adultos, 36 da espécie *Physalaemus cuvieri* e 36 *Leptodactylus fuscus* (projeto aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais, protocolo 094 e RAN/IBAMA/MMA 18573- 1) para análise da quantidade de melanina dos melanomacrófagos e mastócitos. Desses 72 foram utilizados seis de cada espécie para análise descritiva.

Os animais foram coletados em brejos próximos à região de São José do Rio Preto, com pouca influência antrópica. Todos os espécimes eram do sexo masculino, pois os animais são capturados por busca ativa e somente os machos vocalizam. Após a coleta, os animais foram levados ao laboratório de Anatomia Comparada do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto, onde, primeiramente, passaram por um processo de aclimação por sete dias, com fotoperíodo de 12:12 claro/escuro e temperatura de 25±0,5°C.

Processamento histológico

Após o período de aclimação, os animais foram eutanasiados com solução benzocaína (0,5g/500mL de água), o fígado foi retirado, pesado em balança analítica com precisão 0,05g e seguiram-se os procedimentos para análise.

Para as análises histológicas fragmentos de fígado de *Physalaemus cuvieri* foram fixados em solução fixadora Karnovsky (tampão fosfato Sörensen 0,1 M, tampão fosfato pH 7.2 contendo paraformaldeído a 5% e glutaraldeído a 2.5%), por 24 horas, a 4°C. Os fragmentos de fígado de *Leptodactylus fuscus* foram fixados em Metacarn¹ (60% metanol, 30% clorofórmio, 10% ácido acético). Posteriormente, as amostras foram lavadas em água, desidratadas em série alcoólica e emblocadas em historesina (Leica-historesin embedding kit). Secções de 2µm obtidas em micrótomo (RM 2265, Leica, Suíça) foram coradas e observadas em microscópio (Leica DM4000 B) com sistema de captura de imagens (Leica DFC 280).

Para análise em microscopia de luz, os cortes foram corados com Hematoxilina-eosina, 0,025g de azul de toluidina com bórax (pH 4,0), diluído em 50ml de água destilada com auxílio de um agitador magnético e também com reticulina (Gömori), capaz de corar fibras reticulares. Na preparação dessa última coloração foram utilizados: ácido oxálico 3%, permanganato de potássio 1%, alúmen de ferro 1%, prata amoniacal, formol 10%, cloreto de ouro 0,2% e hipossulfito de sódio 2%. Todas as soluções foram gotejadas sobre os cortes histológicos. Após a reação, as lâminas foram muito bem lavadas com água destilada, com a finalidade de evitar a formação de precipitados nos tecidos.

As lâminas foram montadas com bálsamo do Canadá e fotografadas no microscópio (Leica DM4000 B) com sistema de captura de imagens (Leica DFC 280). Para cada animal do grupo controle foi feita uma lâmina com 20 cortes, onde foram fotografados 25 campos aleatórios e analisada a área de melanina dos melanomacrófagos. A quantificação da área dos cortes foi realizada com a utilização do programa Image Pro-Plus, Media-Cybernetics Inc.(versão 6.0). Para a contagem dos mastócitos foram escolhidos 10 cortes aleatórios do fígado de cada animal, com áreas equivalentes, e quantificadas no microscópio (Leica DM4000 B).

Análise Ultraestrutural

Para análise da ultraestrutura hepática os cortes foram fixados durante 2 horas a 25°C em 3% de glutaraldeído e 0,25% de ácido tânico Millonig tampão de pH 7,3. Depois da imersão no tampão, as amostras foram pós-fixadas em tetróxido de ósmio a 1% diluído no

¹ Alguns testes feitos no laboratório (depois que os experimentos com *Physalaemus cuvieri* já haviam sido feitos) mostraram que o fixador preserva melhor o material e por isso foi utilizado.

mesmo tampão durante 1 hora, desidratados em acetona, e embebidos em Araldite (Cotta-Pereira et al. 1976). Cortes ultrafinos (50-75 nm) foram contrastados com acetato de uranilo a 2% durante 20 min (Watson 1958), e citrato de chumbo numa solução de hidróxido de sódio (Venable & Coggeshall 1965) durante oito minutos e examinados em microscópio eletrônico de transmissão Leo-microscópio Zeiss EM - 906 operando a 80 kV.

Índice Hepatossomático

O índice hepatossomático (IHS) é calculado a partir do peso do fígado em relação ao peso total de cada espécime. Para cada animal foi calculado o IHS e depois foi feita a média dos 6 animais de cada espécie para saber o valor do índice no período reprodutivo.

Resultados

Análise descritiva do fígado de *Physalaemus cuvieri*

O fígado de *P. cuvieri* localiza-se na cavidade pleuroperitoneal, sendo que seu tamanho, forma e volume estão relacionados com os seguintes órgãos: coração e pulmões; sendo possível assim observar as depressões do coração na superfície dorsal do órgão, enquanto que a superfície ventral mostra-se lisa, sem sinais de impressões anatômicas. O índice hepatossomático da espécie é 1,18% durante o período reprodutivo. De coloração marrom, o fígado pode ser dividido em três lobos: direito, médio e esquerdo (Fig. 1). Dorsalmente, entre os lobos hepáticos, encontra-se a vesícula biliar, esférica e com coloração verde escuro devido à bile.

O fígado é revestido por uma fina cápsula de tecido conjuntivo (Fig. 2A), enquanto o parênquima hepático é sustentado por fibras reticulares (Fig. 2B). O elemento celular do fígado é o hepatócito (Fig. 2C). Também são evidentes macrófagos pigmentados ou melanomacrófagos (Fig. 2C) e células com função de proteção, os mastócitos, que estão dispersos por todo o tecido hepático, inclusive dentro dos sinusoides (Fig. 2D).

Na análise ultraestrutural é possível observar a associação dos melanomacrófagos com sinusoides hepáticos (Fig. 3A). Em uma visão mais detalhada dessa célula podemos ver a presença dos grânulos de melanina que constituem o melanomacrófago (Fig. 3B) e também, seus respectivos núcleos (Fig. 3B). Além de melanina, os MMs armazenam lipídeo (Fig. 3C), que se acumulam devido ao metabolismo hepático.

O parênquima hepático é formado por uma camada de hepatócitos, dispostos em cordão duplo (Fig. 4A). Esses hepatócitos são poliédricos e possuem citoplasma volumoso,

com núcleo central e nucléolo (Fig. 4B). Alguns hepatócitos podem apresentar mais heterocromatina (Fig. 4B) do que eucromatina e o número de nucléolo pode ser variável (de 1 a 4). No hepatócito também pode se notar grande quantidade de mitocôndrias, retículo endoplasmático liso (Fig. 4C) e glicogênio (Fig. 4D).

Canalículos biliares são evidentes, podendo ser delimitados por até quatro hepatócitos (Fig. 4E). Na figura 4F destaca-se o limite entre dois hepatócitos e a matriz extracelular com fibras colágenas.

Análise descritiva do fígado de *Leptodactylus fuscus*

Durante o período reprodutivo o índice hepatossomático de *L. fuscus* é 1,44%. A localização e forma do fígado de *L. fuscus* é idêntica à de *P. cuvieri* (Fig. 5). Em relação à histologia, há semelhanças macro e microscópicas. Externamente, o fígado dessa espécie é coberto por uma cápsula de tecido conjuntivo (Fig. 6A). No parênquima hepático podem-se notar as fibras reticulares (Fig. 6B), responsáveis pela sustentação do órgão.

Melanomacrófagos são células que também estão presentes no parênquima hepático (Fig. 6C), mas o principal constituinte do fígado é o hepatócito (Fig. 6D), que pode se arranjar na forma de cordões dependendo da disposição dessas células. Células do sistema imune também estão presentes no fígado. O mastócito é o mais comum e está presente por todo o tecido hepático, inclusive dentro de vasos sanguíneos (Fig. 6E).

Assim como a figura 6C e 6D, a figura 7A ilustra o parênquima hepático com hepatócitos e melanomacrófagos, porém na microscopia eletrônica de transmissão, na qual é possível notar com mais detalhes os constituintes do tecido hepático. Os hepatócitos possuem arranjo cordonal dispostos em dupla camada, com nucléolo único (Fig. 7B). No citoplasma dos hepatócitos são encontradas muitas mitocôndrias (Fig. 7C), retículo endoplasmático liso (Fig. 7C), complexo de Golgi (Fig. 8A) e glicogênio (Fig. 8B). Analisando as imagens, nessa espécie é perceptível que há menos glicogênio do que em *Physalaemus cuvieri* quando comparadas. São encontradas também, prolongamentos dos MMs para dentro dos sinusoides, a fim de facilitar trocas de substâncias (Fig. 8C).

Além disso, há ductos biliares (Fig. 8D), com corpos vesiculares (Fig. 8D). Pode-se notar que um único ducto pode drenar até quatro hepatócitos (Fig. 8E). No tecido hepático é possível encontrar muitos sinusoides (Fig. 8F) e associados a eles estão as células de Kupffer (Fig. 8F) e os melanomacrófagos (Fig. 9A). Na periferia desse tipo celular encontra-se um núcleo denso, devido a maior quantidade de heterocromatina do que eucromatina (Fig. 9B).

No restante da célula notamos a presença de vacúolos (Fig. 9C), grânulos de melanina (Fig. 9D) e outro pigmento, a lipofuscina (Fig. 9D).

Discussão

A descrição da anatomia de qualquer órgão em condição normal é de suma importância a fim de conseguir identificar histopatologias em órgãos que sofrem alterações decorrentes de contaminação, estresse, infecção, parasitos e toxinas. Além disso, facilita o entendimento da interação da morfologia com a função do órgão.

A disposição do tecido hepático é diretamente relacionada a características fisiológicas dos animais, tais como ectotermia e *status* reprodutivo (Brusle & Anadon 1996). Esses mesmos autores afirmam que existem variações no índice hepatossomático (IHS) entre os sexos, em diferentes idades, dependendo da alimentação, reprodução e estresse. No período reprodutivo, o índice hepatossomático de *P. cuvieri* foi 1,18% e *L. fuscus* 1,44%. *Euphempix nattereri* apresentou IHS de 1,37% (Franco-Belussi *et al.* 2012), bastante semelhante aos nossos e também no mesmo período. Em Osteichthyes é descrito que o IHS é cerca de 1 a 2% (Brusle & Anadon 1996) e, embora sejam animais representantes de outra classe apresentam índice semelhante aos anfíbios.

A quantidade de melanomacrófagos, o tamanho e distribuição do pigmento podem variar em diferentes espécies, idade do animal, estresse e ciclo anual (Agius 1980; Wolke 1992; Fournie *et al.* 200; Barni *et al.* 2002). Nosso estudo comprova que a quantidade de melanina presente nos melanomacrófagos e a densidade de mastócitos também variam em diferentes espécies, ou seja, cada espécie, por mais que seja da mesma família (como *Physalaemus cuvieri* e *Leptodactylus fuscus*) pode apresentar diferenças nos padrões celulares, o que pode estar relacionado à fisiologia do animal.

Junqueira & Carneiro (2008) afirmam que os hepatócitos de mamíferos estão radialmente dispostos no lóbulo hepático, agrupados em placas interconectadas. Segundo Spornitz (1975), o arranjo típico dos hepatócitos em anuros é tubular, em forma de placa e rodeado por sinusoides, mas afirma também que pode haver variações. Franco-Belussi *et al.* (2012) descrevem que *Euphempix nattereri* possuem os hepatócitos dispostos em cordão duplo, ou seja, formados por uma camada de duas células.

Em *E. nattereri* a disposição dos hepatócitos é associada com melanomacrófagos e canalículo biliar. Além disso, nessa mesma espécie, há uma grande quantidade de organelas,

como mitocôndrias e complexo de Golgi, devido à intensa atividade metabólica. Outra semelhança de *E. nattereri*, *P. cuvieri* e *L. fuscus* é a divisão do fígado dessas espécies em três lobos: direito, médio e esquerdo. Essa mesma divisão também é observada em peixes teleósteos, com um lobo central ou médio, e dois lobos hepáticos laterais: direito e esquerdo (Brusle & Anadon 1996; Bombonato *et al.* 2007).

Além da divisão em lobos, Bombonato *et al.* (2007) mostram a distribuição dos melanomacrófagos ao longo do parênquima hepático de peixes da espécie *Leporinus macrocephalus* e também sua associação com vasos sanguíneos, acúmulo de melanina e de lipofuscina. Ainda afirmam que essas substâncias estão relacionadas com o estado nutricional do peixe.

Os melanomacrófagos não são as únicas células associadas aos sinusoides. Células de Kupffer são macrófagos encontrados na superfície luminal das células endoteliais. São células muito ativas na fagocitose e algumas de suas funções são: metabolizar eritrócitos velhos, digerir hemoglobina, secretar proteínas relacionadas com processos imunológicos e destruir bactérias (Junqueira & Carneiro 2008).

Coerente com o que encontramos na análise ultraestrutural, Spornitz (1975) destaca uma grande quantidade de glicogênio no parênquima hepático de *Xenopus laevis*, mas também, em outras espécies de anfíbios, portanto ele ressalta que isso deve ser reconhecido como uma característica típica de anfíbios, visto que nem em mamíferos como homem, rato e porco foi encontrado tanto glicogênio.

Akiyoshi & Inoue (2004) mostraram que peixes possuem os hepatócitos na forma poliédrica, com núcleo arredondado. O arranjo da célula pode ser na forma de cordão, tubular ou forma sólida, mas na maioria das vezes que foi encontrado na forma de cordão foi classificado como simples, ou seja, uma única camada de hepatócitos.

Apesar da similaridade no arranjo hepático de *P. cuvieri*, *L. fuscus*, *E. nattereri* e até mesmo quando comparamos com peixes, existem espécies que possuem arranjo hepático distinto de outros anfíbios, mas semelhante ao de peixes. *Lithobates catesbeianus*, por exemplo, possui hepatócitos com arranjo tubular, na forma de placas e cercados por sinusoides. Os hepatócitos apresentam-se como células grandes e poliédricas (como também foi observado em nosso estudo), com núcleo arredondado e nucléolo evidente. Destaca-se também, a presença de retículo endoplasmático granular, geralmente disposto em lamelas (Fenerick Junior 2008).

Akiyoshi & Inoue (2012) fizeram um estudo comparando o fígado das três ordens de Amphibia (Anura, Caudata e Gimnofiona) e os resultados mostraram que os hepatócitos

variavam no formato. Os hepatócitos da ordem Anura são quadrados e poliédricos, em Caudata são redondos e em Gimnofiona também são quadrados. Nas três ordens foi descrito um núcleo arredondado. Nesse mesmo estudo os autores afirmam que o fígado dos anfíbios pode estar arranjado em placas com uma, duas ou diversas camadas de célula de espessura, mas a ordem Anura especificamente apresenta arranjo das placas com uma única camada de célula, assim como nos mamíferos (Elias & Bengelsdorf 1952).

Portanto, o fígado é um órgão com estrutura bastante conservada nos anfíbios em relação ao formato dos hepatócitos e à forma em que estão distribuídos.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Prof. Dr. Sebastião Roberto Taboga, Luiz Roberto Falleiros Junior e José Augusto Maulin pela ajuda com o processamento e análise na Microscopia Eletrônica de Transmissão e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado em São Paulo – FAPESP pelo apoio financeiro concedido na forma de bolsa de mestrado à aluna Lara Zácari Fanali (Proc. 2014/07466-8).

Figuras

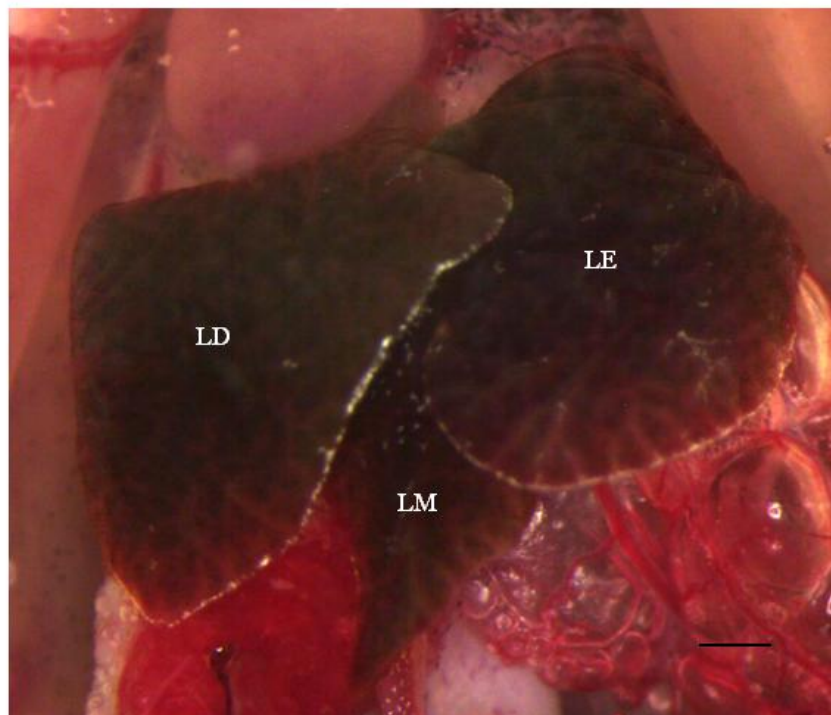


Figura 1. Anatomia do fígado de *P. curvieri*. LD= Lobo Direito; LM= Lobo Médio; LE= Lobo Esquerdo. Escala: 1mm.

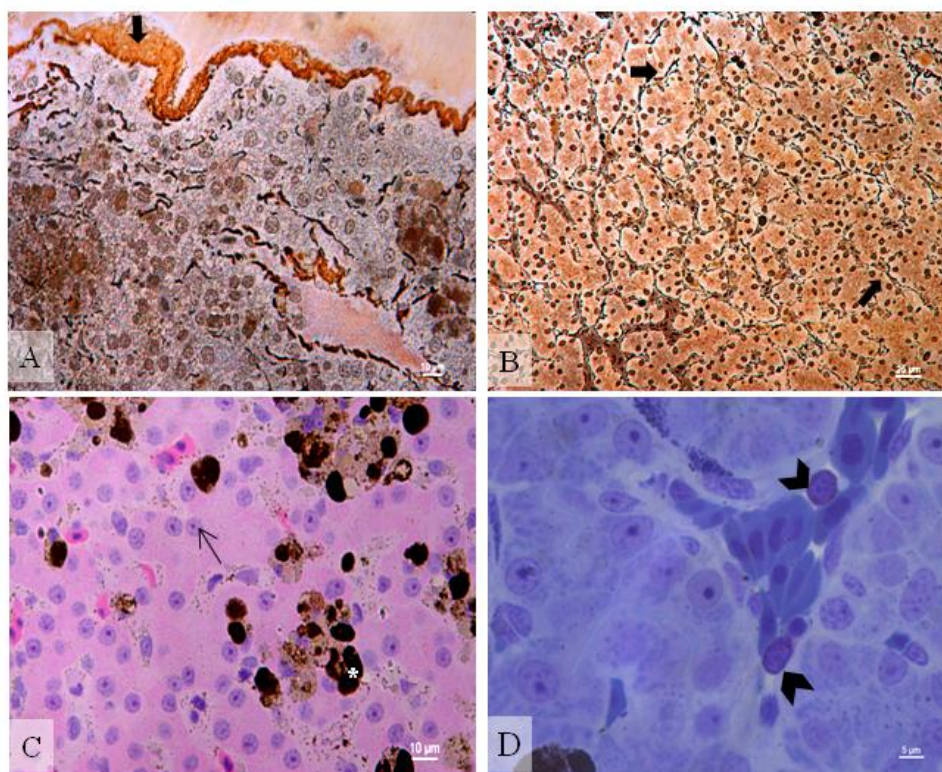


Figura 2. A: Fígado de *P. cuvieri*. Cápsula de tecido conjuntivo (seta), color. Reticulina; B: Fibras reticulares (setas), Reticulina; C: Hepatócito (seta), Melanomacrófago (*), H/E; D: Mastócitos (cabeça de seta) dentro de um sinusoide, Azul de Toluidina com Bórax.

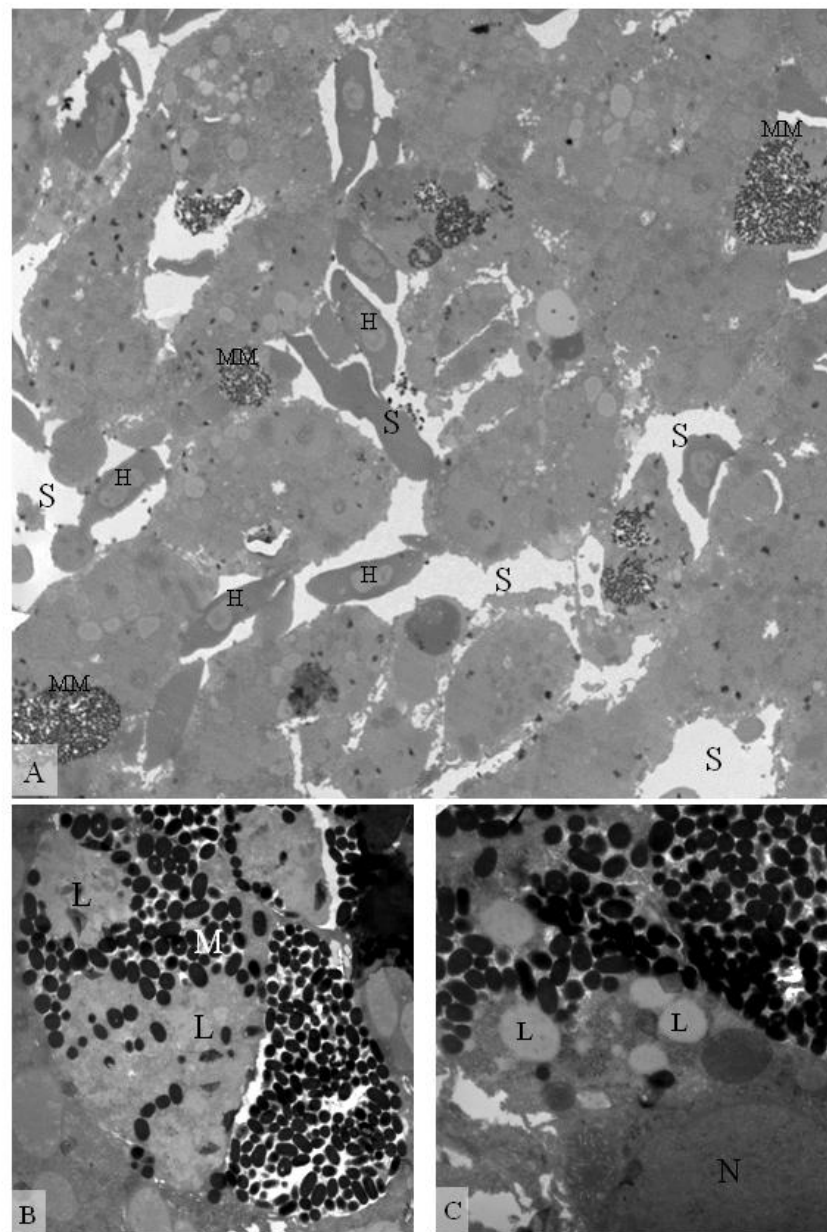


Figura 3. A: Visão geral do fígado de *P. curvieri*. MM= Melanomacrófaos, S= sinusoides, H = Hemáceas; B: L= Lipofuscina, M= Melanina; C: L= Lipídeo, N= Núcleo do melanomacrófo. Aumentos: A: 1.000x; B: 10.000x; C: 16.700x.

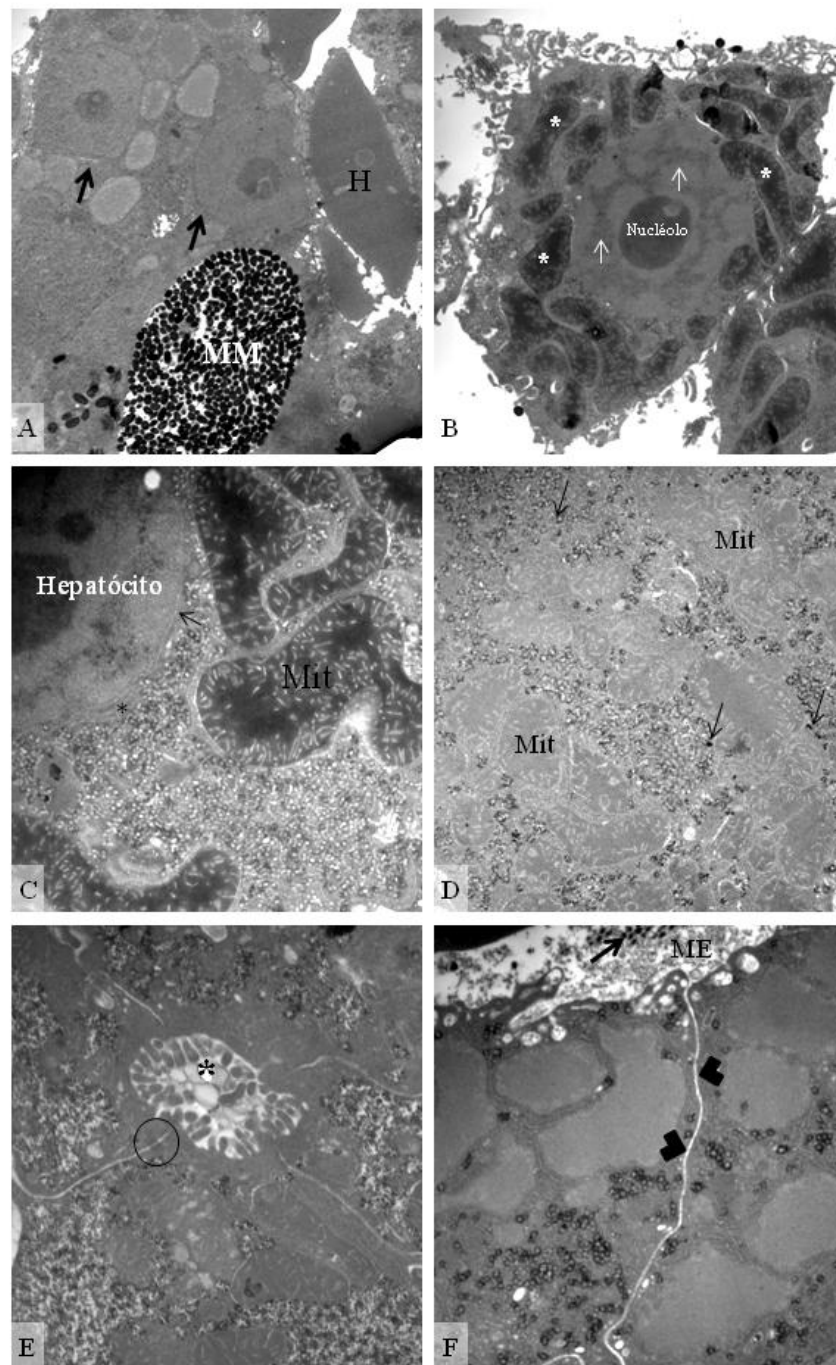


Figura 4. A: Arranjo dos hepatócitos de *P. cuvieri* em cordão duplo (setas), MM= Melanomacrófago, H= Hemácea; B: Hepatócito de forma poliédrica com muitas mitocôndrias (*) e núcleo com heterocromatina (setas); C: Retículo Endoplasmático Liso (REL) (*), Membrana basal do hepatócito (seta), Mit= Mitocôndria; D: Grânulos de Glicogênio (setas), Mit= Mitocôndria; E: Canalículo biliar (*) delimitando 4 hepatócitos, Desmossomo (círculo); F: Limite entre 2 hepatócitos (seta sem cabeça), Fibra

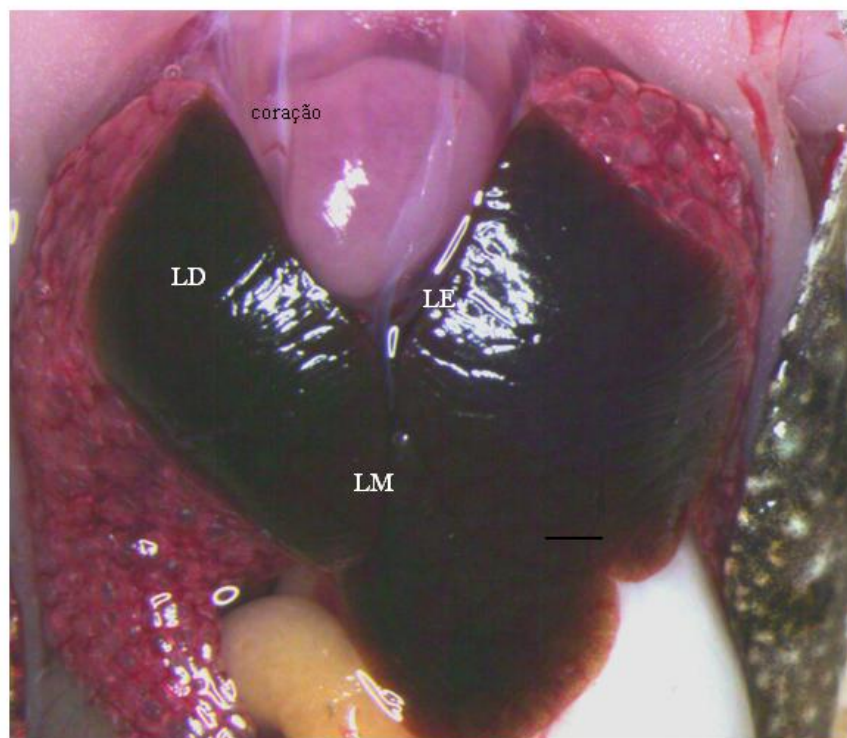


Figura 5. Anatomia do fígado de *L. fuscus*. LD= Lobo Direito; LM= Lobo Médio; LE= Lobo Esquerdo. Escala: 1mm.

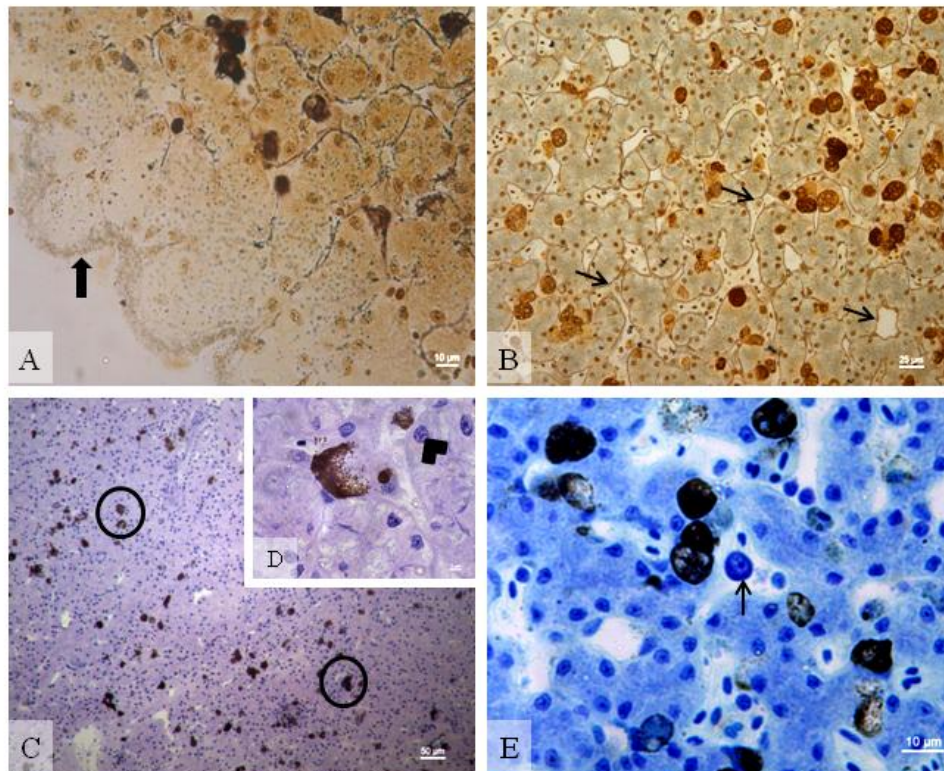


Figura 6. A: Fígado de *L. fuscus*. Cápsula de tecido conjuntivo (seta), color. Reticulina; B: Fibras reticulares (setas), Reticulina; C: Melanomacrófago (círculo), H/E; D: Hepatócito (cabeça da seta), H/E; E: Mastócitos (seta) dentro de um sinusoide, Azul de Toluidina com Bórax.

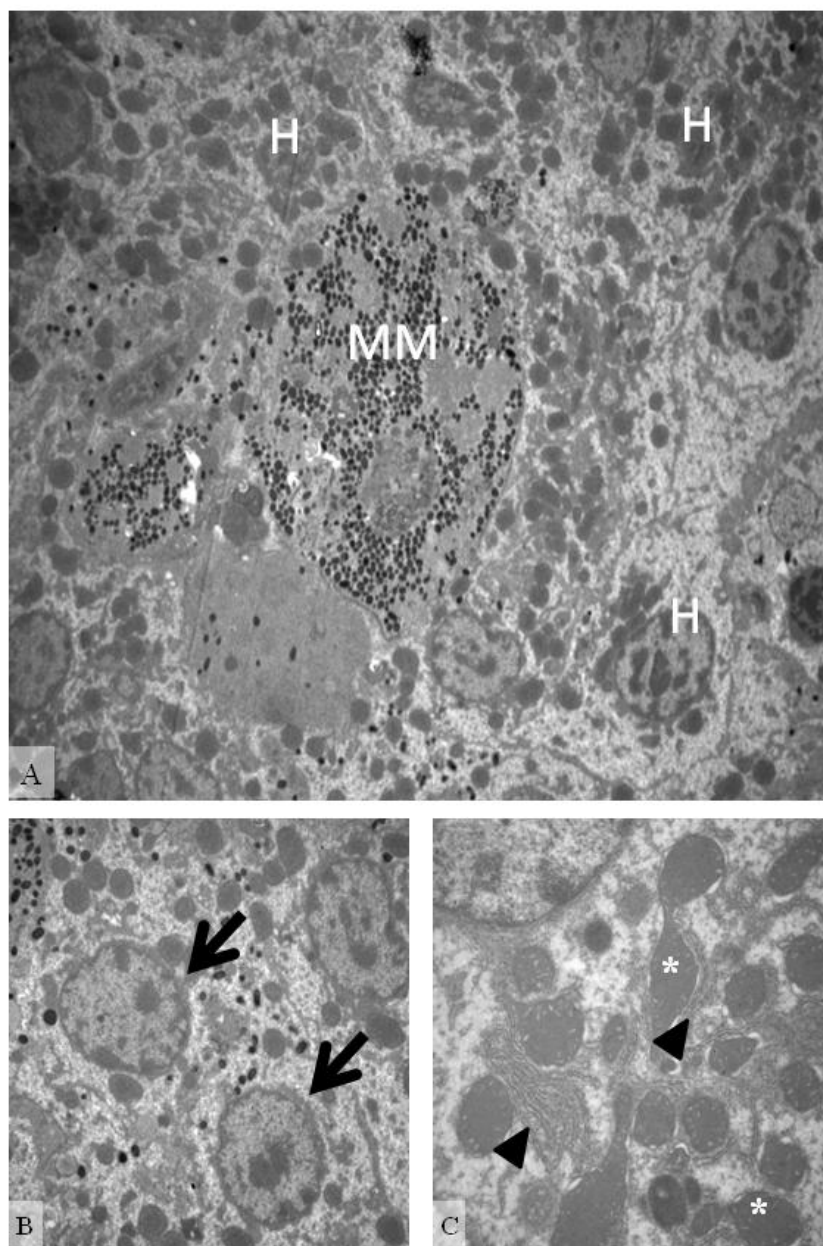


Figura 7. A: Visão geral do fígado de *L. fuscus*. MM= Melanomacrófagos, H = Hepatócito; B: Arranjo dos hepatócitos em cordão duplo (setas); C: Mitocôndrias (*), Retículo Endoplasmático Liso (REL) (cabeça de seta). Aumentos: A: 1.000x; B: 10.000x; C: 16.700x.

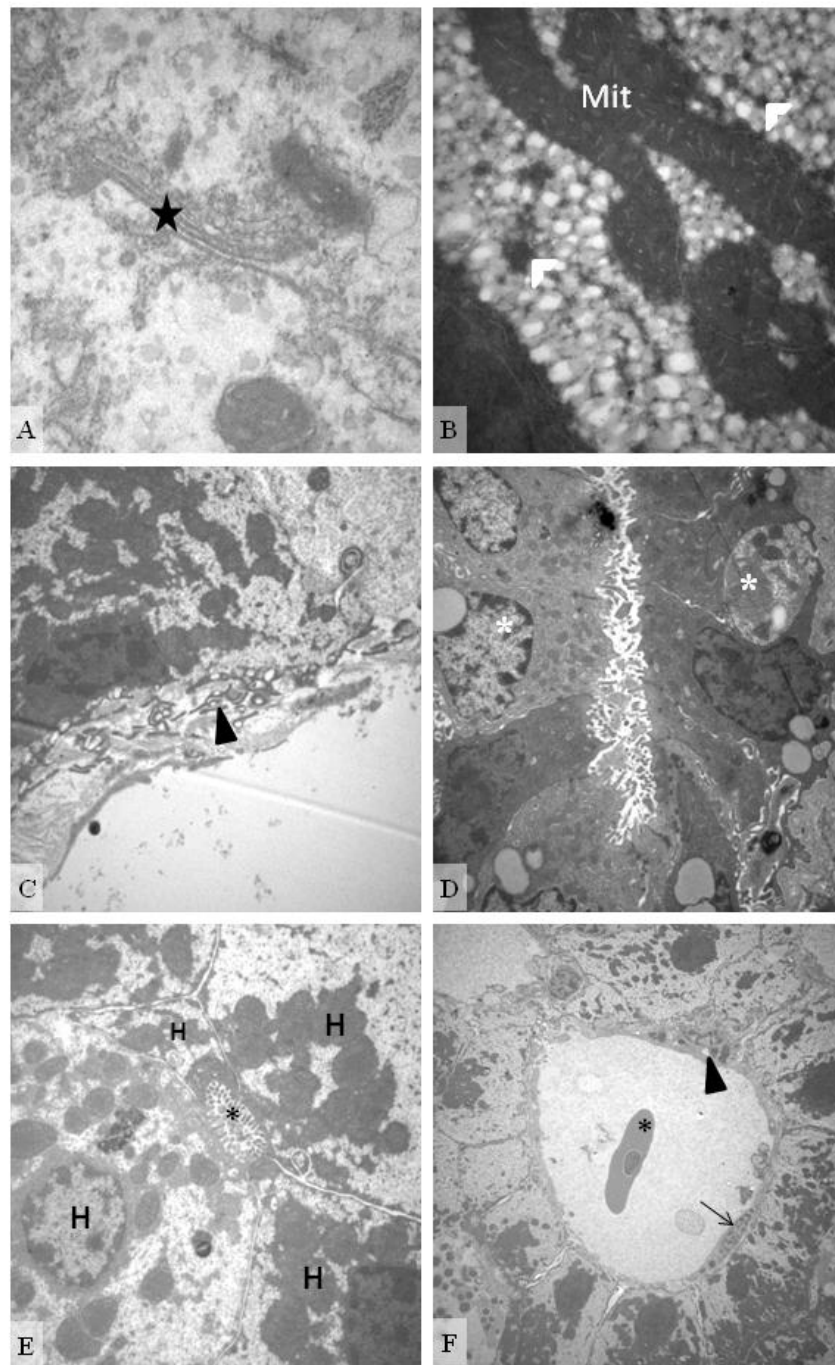


Figura 8. A: Complexo de Golgi (estrela); B: Glicogênio (cabeça de seta), Mitocôndrias (Mit); C: Prolongamento dos MMCs; D: Ducto biliar com corpos vesiculares (*); E: Canalículo biliar (*) delimitando 4 hepatócitos (H); F: Vaso sanguíneo com hemácia (*), célula endotelial (seta) e célula de Kupffer. Aumentos: A: 40.000x; B: 40.000x; C: 16.700x; D: 8.000x; E: 10.000x; F: 27.000x.

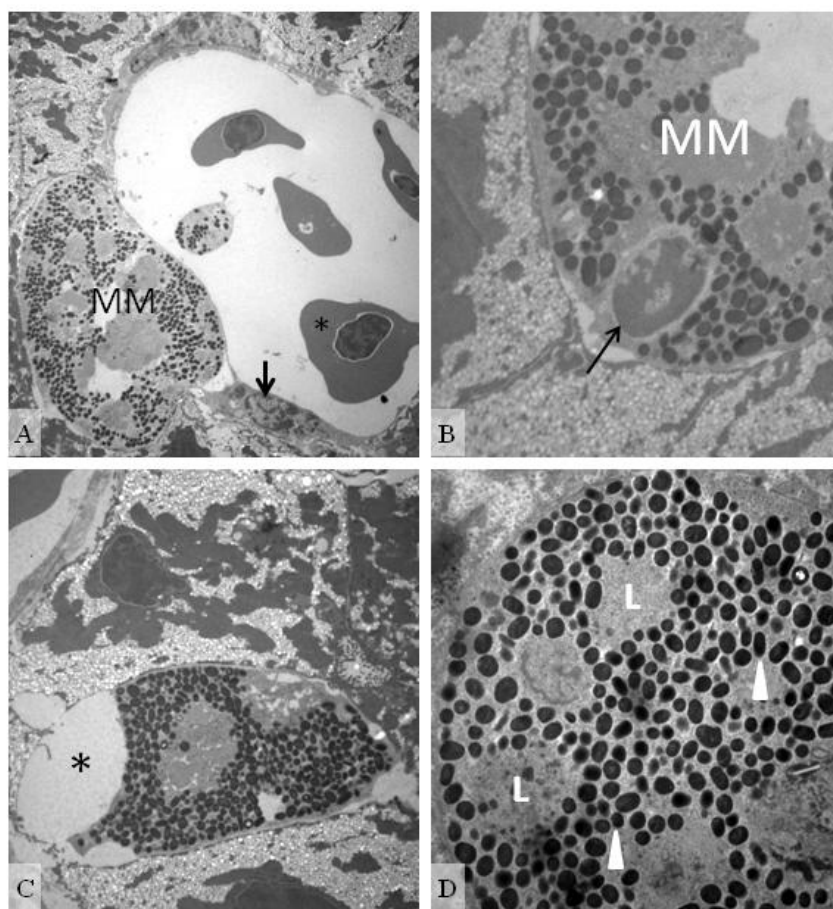


Figura 9. A: Melanomacrófago (MM) associado ao sinusoide, Hemácea (*), Fibroblasto (seta); B: Núcleo do melanomacrófago (seta); C: Vacúolo (*) dentro do melanomacrófago; D: Lipofuscina (L), Grânulos de melanina (cabeça de seta). Aumentos: A: 4.000x; B: 8.000x; C: 27.000x; D: 14.000x.

Referências

- Agius, C. 1980. Phylogenetic development of melano-macrophage centres in fish. *J. Zool.* v191(1). pp 11-31.
- Akiyoshi, H. & Inoue, A. 2004. Comparative histological study of teleost livers in relation to phylogeny. *Zool Sci.* v21(8). pp 841-850.
- Akiyoshi, H. & Inoue, A.M. 2012. Comparative histological study of hepatic architecture in the three orders amphibian livers. *Comp. Hepatol.* v11(1). pp 1-8.
- Barni, S.; Vaccarone, R.; Bertone, V.; Fraschini, A.; Bernini, F.; & Fenoglio, C. 2002. Mechanisms of changes to the liver pigmentary component during the annual cycle (activity and hibernation) of *Rana esculenta* L. *J Anat.* v200(2). pp 185-194.
- Bombonato M.T.S, Rochel S.S, Vicentini C.A, Vicentini I.B.F. 2007. Estudo morfológico do tecido hepático de *Leporinus macrocephalus*. *Acta Sci.* v29. pp 81-85.
- Bruslè J, Anadon G.G. 1996. The Structure and function of fish liver. In: "Fish Morphology Horizon of New Research". *Sci Publ Inc.* pp 77-93.
- Cotta-Pereira G.; Rodrigo F.G; David-Ferreira J.F. 1976. The use of tannic acid-glutaraldehyde um the study of elastic related fibers. *Stain Technol.* v51. pp 7-11.
- Duellman, W.E. & Trueb, L. 1994. Biology of Amphibians. New York: McGraw-Hill. pp 670.
- Elias, H; Bengelsdorf, H. 1952. The structure of the liver of vertebrates. *Acta Anat.* v14. pp 297-337.
- Fenerick F.Jr. 2008. Desempenho produtivo, Hematologia e Morfologia do Tecido Hepático de Rã-Touro, *Lithobates catesbeianus*, Alimentada com Ração Contendo Diferentes Níveis de Carboidratos e Lipídios. *Tese de doutorado*. Centro de Aquicultura, Jaboticabal.
- Fournie, J.W; Summers, J.K; Courtney, L.A; Engle, V.D. 2001. Utility of splenic macrophage aggregates as an indicator of fish exposure to degraded environments. *J Aquat Anim Health.* v13. pp 105-116.
- Franco-Belussi L.; Santos L.R.S.; Zieri R.; Vicentini C.A.; Taboga S.R.; Oliveira C. 2012. Liver Anatomy, Histochemistry, and Ultrastructure of *Eupemphix nattereri* (Anura: Leiuperidae) During the Breeding Season. *Zool Sci.* pp 844-848.
- Junqueira, L.; & Carneiro, J. 2008. Histologia Básica-Texto. Atlas 11ª edição Guanabara Koogan. pp 524.

Spornitz, U.M. 1975. Studies on liver of *Xenopus laevis*.I. The ultrastruture of the parenchymal cell. *Anat. Embryol.* v146. pp 245.

Venable J.H.; Coggeshall R. 1965. A simplified lead citrate stain for use in electron microscopy. *J Cell Biol.* v25. pp 407–408.

Watson ML (1958) Staining tissue sections of electron microscopy with heavy metals. *J Biophys Biochem Cytol* v4. pp 475–478

Wolke, R.E. 1992. Piscine macrophage aggregates: a review. *Annual Rev Fish Dis.* v2. pp 91-108.

Capítulo 2

Efeitos do benzo[α]pireno nos melanomacrófagos e mastócitos hepáticos de *Physalaemus cuvieri* e *Leptodactylus fuscus* (Anura: Leptodactylidae)

**Efeitos do benzo[α]pireno nos melanomacrófagos e mastócitos hepáticos de
Physalaemus cuvieri e *Leptodactylus fuscus* (Anura: Leptodactylidae)**

Lara Zácari Fanali¹, Lilian Franco-Belussi², Classius de Oliveira²

¹Programa de Pós-graduação em Biologia Animal - IBILCE - UNESP / São José do Rio Preto - SP

²Departamento de Biologia - IBILCE - UNESP / São José do Rio Preto - SP

Manuscrito a ser submetido ao periódico *Journal of Experimental Biology*

Resumo

A permeabilidade cutânea e ciclo de vida dependente do ambiente aquático e terrestre maximiza a exposição dos anuros aos contaminantes, como o benzo[α]pireno (BaP), composto cancerígeno e mutagênico produzido na combustão incompleta. Os anuros possuem células hepáticas com funções protetoras que possibilitam a sobrevivência e adaptação dos animais: os melanomacrófagos (MMs) e os mastócitos, biomarcadores de contaminação. Assim, os objetivos do trabalho foram avaliar os efeitos do BaP na melanina dos MMs hepáticos e também a densidade de mastócitos das espécies *Physalaemus cuvieri* e *Leptodactylus fuscus*. Foram utilizados os fígados de 36 *P. cuvieri* e 36 *L. fuscus*. Cada espécie foi submetida a 6 tratamentos: cont 24h, cont 7d, cont 13d, trat 24h, trat 7d e trat 13d. Os tratados receberam injeção subcutânea com 2mg/kg de BaP, diluído em óleo mineral e os controles receberam apenas óleo mineral. Seguiram-se os processos para análise de microscopia de luz. Com 7d de tratamento, a área de melanina reduziu nas duas espécies e em 13d de tratamento aumentou em *L. fuscus*. A diminuição pode estar relacionada ao efeito citotóxico do composto, enquanto o aumento em 13d pode ter relação com ajuste fisiológico devido à função de detoxificação dos MMs. Houve aumento da densidade de mastócitos nas duas espécies e em todos os grupos tratados com o contaminante. Essa resposta está relacionada com a função de proteção em respostas inflamatórias, por meio da apresentação de antígenos.

Palavras-chave: benzo[α]pireno, mastócito, melanomacrófago, anuro.

Introdução

Nos últimos anos, o número de estudos ecotoxicológicos em anfíbios tem crescido demasiadamente (Burlibaşa & Gavrilă 2011) e algumas características peculiares justificam tamanha preocupação com essa classe em particular. Acredita-se que esses animais sejam bastante sensíveis aos poluentes, pois a pele é altamente permeável e o ciclo de vida dependente tanto do ambiente aquático quanto terrestre, o que pode maximizar sua exposição (Conrad 2010; Burlibaşa & Gavrilă 2011). Essas características tornam os anfíbios vulneráveis a vários estressores (Rabb 1990; Duellman & Trueb 1994) como o contaminante benzo[α]pireno e ambas as fases, aquática e terrestre, estão sujeitas aos efeitos desse composto e de vários outros presentes no ambiente (Unger 2003; Burlibaşa & Gavrilă 2011).

O benzo[α]pireno (BaP) é um contaminante pertencente à classe dos Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPA), produzido na combustão incompleta de matéria orgânica, portanto pode ser originado naturalmente em queimadas e vulcões (Zakaria *et al.* 2002; Ou *et al.* 2004; Luo *et al.* 2008; Jiao *et al.* 2009) ou em decorrência de ação antrópica (Juhasz & Naidu 2000; Bertilsson & Widenfalk 2002; Stogiannidis & Laane 2015), na produção de carvão mineral, queima de carvão vegetal e processos de utilização do petróleo e seus derivados (extração, transporte e refino) (Bamforth & Singleton 2005; Kim *et al.* 2008; Morillo *et al.* 2008a).

Devido às suas características lipofílicas, o benzo[α]pireno pode se acumular nos solos e sedimentos (Stark *et al.* 2003; Morillo *et al.* 2008a; Agarwal 2009; Harris *et al.* 2011), mas também pode ser encontrado no ambiente aquático, absorvido na matéria orgânica (Hylland 2006; Stogiannidis & Laane 2015). A exposição dos anuros pode ocorrer por inalação, administração na dieta, via cutânea ou injeção intraperitoneal. Além disso, a bioativação do composto no organismo produz metabólitos mutagênicos e cancerígenos (Collins 1991; Kanaly & Harayama 2000).

Em consequência de algumas características dos poluentes, sabe-se que eles podem interferir na vida dos anfíbios de diversas maneiras, reduzindo a taxa

de crescimento, atuando como desregulador endócrino, afetando o comportamento, podendo levar o animal a óbito (Blaustein 2002). Porém, alguns mecanismos de proteção possibilitam aos anuros sobreviverem e se adaptarem ao ambiente antropizado. Dentre eles, podemos citar duas células: os melanomacrófagos e os mastócitos, células presentes no fígado, que é o principal órgão de detoxificação e também de metabolização do benzo[α]pireno (Foth *et al.* 1988).

Melanomacrófago (MM) é um macrófago que produz e armazena melanina, além de lipofuscina e hemosiderina. A melanina é sintetizada endogenamente (Césarini 1996) e tem a função de absorver e neutralizar radicais livres, cátions e outros agentes potencialmente tóxicos, derivados da degradação de material celular fagocitado (Zuasti *et al.* 1989). A hemosiderina é produto do catabolismo da hemoglobina dos eritrócitos (Kranz 1989) e a lipofuscina, pigmento derivado da oxidação de ácidos graxos (Pickford 1953).

Os melanomacrófagos são encontrados em órgãos hematopoiéticos como fígado, baço e rins (Agius 1980; Cesarini 1996) de animais ectotérmicos (peixes, anfíbios e répteis) (Wolke 1992; Fournie *et al.* 2001; Loumbourdis & Vogiatzis 2002; Fishelson 2006). Essa célula pode se agregar formando o que denominamos de centros de melanomacrófagos (MMC) (Agius 1981). Algumas das funções dos melanomacrófagos são: a destruição, detoxificação ou reciclagem de materiais endógenos e exógenos, bactericida, imunidade (Agis & Roberts 2003; Passantino *et al.* 2013, Franco-Belussi 2013b).

Alguns estudos mostram alterações morfológicas nos melanomacrófagos quando há exposição por contaminantes (Franco-Belussi 2013b; Çakıcı 2015). Por esse motivo, essas células são utilizadas como biomarcadoras de contaminação (Paetow 2012; Santos *et al.* 2014). Passantino *et al.* 2013 apresentam resultados com base em estudos com peixes de regiões poluídas e não-poluídas.

Mastócitos são células especializadas em secretar uma variedade de produtos, como mediadores de lipídeos, leucotrienos, proteases e histamina, os quais contribuem no processo inflamatório (Shakoory *et al.* 2004). Eles

desempenham papel importante nos mecanismos de resposta inflamatória associada a uma vasta gama de condições de estresse, como a exposição aos xenobióticos (Lauriano *et al.* 2012). Dessa forma, essas células podem ser usadas como indicadoras de resposta inflamatória em vários tecidos (Franco-Belussi *et al.* 2013b). Payne e Fancey (1989) mostraram que os HPAs causam danos no sistema imune. O estudo foi realizado com uma espécie de peixe exposta a altos níveis de HPA.

Os objetivos do trabalho foram avaliar os efeitos do benzo[α]pireno na melanina presente no interior dos melanomacrófagos hepáticos e também a densidade de mastócitos das espécies *Physalaemus cuvieri* e *Leptodactylus fuscus*.

Material e Métodos

Coleta dos animais

Foram analisados 36 espécimes adultos de *Physalaemus cuvieri* e 36 de *Leptodactylus fuscus* (projeto aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais, protocolo 094 e RAN/IBAMA/MMA 18573- 1), todos do sexo masculino.

Os animais foram coletados em brejos próximos à região de São José do Rio Preto, com pouca influência antrópica. Após a coleta, os animais foram levados ao laboratório de Anatomia Comparada do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto, onde, primeiramente, passaram por um processo de aclimação por sete dias, com fotoperíodo de 12:12 claro/escuro e temperatura de $25\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ e posteriormente injeção subcutânea do composto. As injeções ocorreram no dorso do animal, próximas do membro inferior, a fim de evitar perfurações nos órgãos.

Todos os animais foram alimentados com drosófilas durante o período experimental e o alimento era ofertado logo após as injeções para evitar mais períodos de estresse.

Experimentos com benzo[α]pireno

O experimento foi realizado em 3 tempos: 24h, 7 e 13 dias, onde os animais receberam uma concentração de 2mg/kg de benzo[α]pireno, diluída 0,02ml de óleo mineral Nujol. Para cada espécie havia 6 grupos experimentais com 6 animais em cada grupo: controle de 24h (cont24h), tratado de 24h (trat24h), controle de 7 dias (cont7d), tratado de 7 dias (trat7d), controle 13 dias (cont13d), tratado de 13 dias (trat13d). Os grupos controles receberam apenas óleo mineral. A aplicação do composto e do óleo ocorreu a cada 48h, até o final do experimento. As concentrações foram escolhidas com base nos artigos de Padrós *et al.* (2003) e Malmstrom *et al.* (2004), com adaptações.

Após o período experimental os animais foram eutanasiados com solução benzocaína (0,5g/500mL de água), o fígado foi retirado, pesado em balança analítica com precisão 0,05g e seguiram-se os procedimentos para análise.

Processamento histológico

Para as análises histológicas fragmentos de fígado foram fixados em solução fixadora Karnovsky (tampão fostato Sörensen 0,1 M, tampão fosfato pH 7.2 contendo paraformaldeído a 5% e glutaraldeído a 2.5%), por 24 horas, a 4°C. Os fragmentos de fígado de *Leptodactylus fuscus* foram fixados em Metacarn² (60% metanol, 30% clorofórmio, 10% ácido acético). Posteriormente, as amostras foram lavadas em água, desidratadas em série alcoólica e emblocadas em historesina (Leica-historesin embedding kit). Secções de 2 μ m obtidas em micrótomo (RM 2265, Leica, Suíça) foram coradas e observadas em microscópio (Leica DM4000 B) com sistema de captura de imagens (Leica DFC 280).

Análises quantitativas

Os cortes foram corados com Hematoxilina-eosina e a quantificação da pigmentação realizada com a utilização do programa Image Pro-Plus, Media-Cybernetics Inc.(versão 6.0) de acordo com a proposta de Santos *et al.* (2014), o qual se baseia na diferença de intensidade de coloração. Para cada animal foi feita

² Alguns testes feitos no laboratório (depois que os experimentos com *Physalaemus cuvieri* já haviam sido feitos) mostraram que o fixador preserva melhor o material e por isso foi utilizado.

uma lâmina com 20 cortes, onde foram fotografados 25 campos aleatórios e analisada a área de melanina dos melanomacrófagos.

A fim de detectar a presença de mastócitos no fígado usou-se 0,025g de azul de toluidina com bórax (pH 4,0), diluído em 50ml de água destilada. Os cortes foram lavados em água destilada por 1 minuto, corados pelo azul de toluidina por 30 segundos, lavados em água destilada, deixados secar para montagem com bálsamo do Canadá. Foram escolhidos 10 cortes aleatórios de cada animal para a contagem dos mastócitos. A quantificação da área dos cortes foi realizada com a utilização do programa Image Pro-Plus, Media-Cybernetics Inc.(versão 6.0).

Análises estatísticas

Para avaliar se a área dos melanomacrófagos (variável dependente) variaram com o tempo de administração do benzo[α]pireno (variável independente) entre as duas espécies foi utilizado Análise de Variância Dois Critérios (TWO WAY ANOVA) e para testar os efeitos do tratamento em cada espécie, Análise de Variância Um Critério (ONE WAY ANOVA).

Para avaliar se a densidade de mastócitos (variável dependente) variou com o tempo de administração do benzo[α]pireno (variável independente) em cada espécie, foi utilizado Análise de Variância Um Critério (ONE WAY ANOVA).

Todos os dados foram previamente transformados pelo Log para corroborar com o pressuposto de homogeneidade e variância e complementados com o teste de Tukey. O programa de estatística utilizado foi o R 3.0.

Resultados

Efeitos do benzo[α]pireno nos melanomacrófagos

Nossos resultados mostraram que *L. fuscus* possui maior área de melanina nos melanomacrófagos que *P. cuvieri* ($F= 33,47$; $P<0,01$) (Fig. 1), porém a resposta frente exposição ao BaP foi semelhante nas duas espécies.

O contaminante benzo[α]pireno alterou a área de melanina presente nos melanomacrófagos nas duas espécies. Em *P. cuvieri*, com 7 dias de tratamento, a área de ocupação de melanina reduziu em aproximadamente 42% ($F= 47,82$; $P<0,01$), enquanto que em *L. fuscus* houve decréscimo de 64% da área de melanina em 7 dias e aumento de 38% ($F=57,01$; $P<0,001$) em 13 dias ($F=57,01$; $P<0,001$) (Fig 2).

Efeitos do benzo[α]pireno na densidade de mastócitos

BaP alterou a densidade de mastócito em *Physalaemus cuvieri* em todos os grupos tratados com o contaminante. Os aumentos das densidades foram o dobro em cada tratamento, em relação ao seu respectivo controle ($F=28,03$; $P<0,05$). Esse aumento também foi encontrado em todos os grupos tratados de *Leptodactylus fuscus*, sendo eles: 11,5x ($F=84,88$; $P<0,05$) em 24h; 1,28x ($F=84,88$; $P<0,05$) em 7d; 1,65x ($F=84,88$; $P<0,01$) em 13d (Fig 3).

Discussão

Com relação à exposição das duas espécies ao BaP, com 24h de tratamento não houve alteração na área de melanina dos melanomacrófagos. Isso pode ter acontecido porque o período foi muito curto para essas células começarem a responder nesse nível de avaliação histopatológica. O tamanho dos organismos, taxa de ingestão, taxa de crescimento, a permeabilidade da membrana e frequência ventilatória são processos biológicos que influenciam a absorção de HPAs nos organismos (Juhasz & Naidu 2000). Nós acreditamos que esses processos estejam influenciando de alguma forma na resposta imediata de 24h nos MMs.

Franco-Belussi *et al.*, (2013b) demonstraram que sob exposição de LPS de *E. coli* não há alteração na área de melanina dos melanomacrófagos do anuro *Euphempix nattereri* em tempos mais curtos como: 2h, 6h, 12h. Somente com 24h e 48h que a pigmentação hepática aumentou. Além da fisiologia do animal influenciar no tempo de resposta dos melanomacrófagos, é provável que o tempo de ação dos compostos sejam distintos, visto que o LPS começa agir com 24h.

Para hormônios sexuais (estradiol e testosterona) ocorre diminuição da pigmentação hepática em 8 dias de tratamento com estradiol e aumento de testosterona (Zieri *et al.* 2015). Isso pode estar relacionado ainda ao metabolismo de cada composto e a atuação de cada catabólito na fisiologia hepática e dos MMs.

Enquanto que, certos trabalhos destacam o aumento dos MMs quando há exposição por metal pesado ou o organismo habita rio poluído (Fenoglio 2005; Louboudis & Vogialitz 2002), nós ressaltamos em nosso trabalho que essas células responderam de maneira oposta quando expusemos os animais ao BaP, pois a área de melanina dos melanomacrófagos diminuiu com o tratamento.

Em 7 dias de exposição, há diminuição na área ocupada pela melanina nos melanomacrófagos. Um estudo recente com anuros da espécie *Xenopus tropicalis* expostos ao benzo[α]pireno mostrou decréscimo da área pigmentar dos melanomacrófagos do fígado após 12, 18 e 24h de exposição. Com 18h houve a maior redução dessas células, pois havia três vezes menos MMs em relação ao controle. Os autores acreditam que essa redução está relacionada com estresse hepático e apoptose de hepatócitos (Regnault *et al.* 2014).

Pronina (2014) estudou peixes da espécie *Rutilus rutilus* em dois lagos russos diferentes: um estava contaminado com uma toxina (microcistina de cianobactéria) e o outro onde essa cianobactéria era ausente. Este último foi utilizado como controle. Analisando os melanomacrófagos hepáticos dos peixes que viviam no lago contaminado foi possível notar que houve uma redução da área ocupada pelos MMs comparando com os animais do lago controle.

Payne e Fancey (1989) observaram alterações degenerativas graves e uma diminuição no número de MMs no fígado de *Pseudopleuronectes americanus* mantidos num aquário com altos níveis de HPAs. Eles revelam que um elevado nível de poluição provoca uma diminuição da atividade fagocítica dos macrófagos e o sistema imune dos peixes, o que leva a degeneração dos MMs. É possível que essa classe de composto seja responsável por esse tipo de resposta, pois outro estudo com HPA, os melanomacrófagos de peixes também foram encontrados em menores quantidades do que no grupo controle (Weeks 1984). Em síntese, altas

dosagens causam estresses celulares ou têm efeitos citotóxicos e a resposta, paradoxalmente, pode ser inversa ao esperado.

Após 13 dias de tratamento houve aumento da melanina dos MMs, mas somente em *Leptodactylus fuscus*. Zieri *et al.* (2015) em um trabalho com o hormônio 17 β -estradiol injetado no anuro *Eupemphix nattereri* mostrou que, oito dias após o experimento, a área dos MMs que contém melanina diminuiu. Por outro lado, os animais analisados após um período de recuperação de 15 dias mostrou que a área pigmentada após injeção do hormônio foi maior do que a do grupo de oito dias, mas semelhante ao grupo controle.

Barni *et al.* (2002) afirmaram em seu trabalho com *Rana esculenta*, que o fígado é um órgão muito plástico. As células hepáticas, que contém pigmento são muito sensíveis a certos ritmos biológicos anuais como a hibernação, pois as células pigmentadas do fígado analisadas durante o pleno período de atividade do animal estão presentes em menor quantidade quando comparada com o período de hibernação, quando há o aumento da quantidade de células que contém pigmento. Portanto, essa plasticidade pode não estar restrita somente a esses fatores relacionados com ritmos biológicos, mas também aos contaminantes, tendo em vista que não houve diferença em 13 dias de exposição ao BaP.

Nós supomos que após diminuição em sete dias houve um ajuste da fisiologia celular dos MMs e eles adquiriram sensibilidade para responder em 13 dias, devido às funções de detoxificação.

Nosso estudo mostrou aumento dos mastócitos em todos os tratamentos em ambas as espécies. Mastócitos são células especializadas em secretar uma variedade de produtos, como mediadores de lipídeos, leucotrienos, proteases e histamina, os quais contribuem no processo inflamatório (Shakoory *et al.* 2004). Dessa forma, essas células podem ser usadas como indicadoras de resposta inflamatória em vários tecidos (Franco-Belussi *et al.* 2013b).

Franco-Belussi *et al.* (2013b) relatam em seu trabalho um grande aumento dos mastócitos do fígado de *Eupemphix nattereri* 2h após injeção de LPS de *E. coli*. Nesse mesmo trabalho foi quantificado também o número de mastócitos nos

testículos. Os resultados mostraram que o número foi mais elevado após 12h e 48h de tratamento com LPS.

Franco-Belussi *et al.* (2014) mostraram que após 12h de injeção com LPS em *Eupemphix nattereri*, o número de mastócitos nos testículos triplicou. Isso pode ter acontecido devido à infiltração de exudados de células inflamatórias e imunes na região intersticial.

Ma *et. al.* (2011) mostraram em seu estudo com ratos que o benzo[α]pireno causou aumento dos linfócitos e enzimas envolvidas em inflamação, além de aumento do vaso sanguíneo. Moller *et. al.* (2014) em seu trabalho relataram aumento de linfócitos B e T no fígado das trutas contaminadas com o BaP. Dessa forma esses autores mostraram que o composto causa inflamação.

No fígado *P. cuvieri* e *L. fuscus* o BaP deve ter desencadeado uma resposta inflamatória no tecido hepático, o que aumentou a densidade de mastócitos, devido a sua função de proteção em respostas inflamatórias. Portanto, as células respondem diferentemente ao efeito do contaminante, visto a diminuição da melanina dos melanomacrófagos e o aumento dos mastócitos.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado em São Paulo – FAPESP pelo apoio financeiro concedido na forma de bolsa de mestrado à aluna Lara Zácari Fanali (Proc. 2014/07466-8).

Figuras

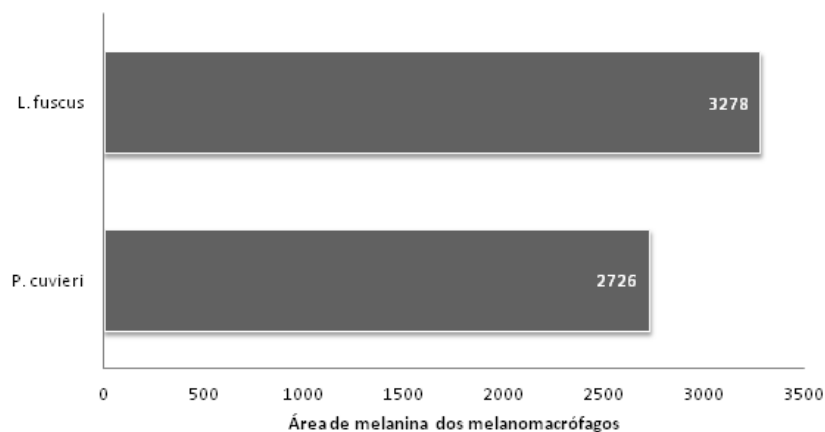


Figura 1. Média da quantidade de melanina no interior dos melanomacrófagos dos grupos controles de *P. cuvieri* e *L. fuscus* ($P < 0,05$).

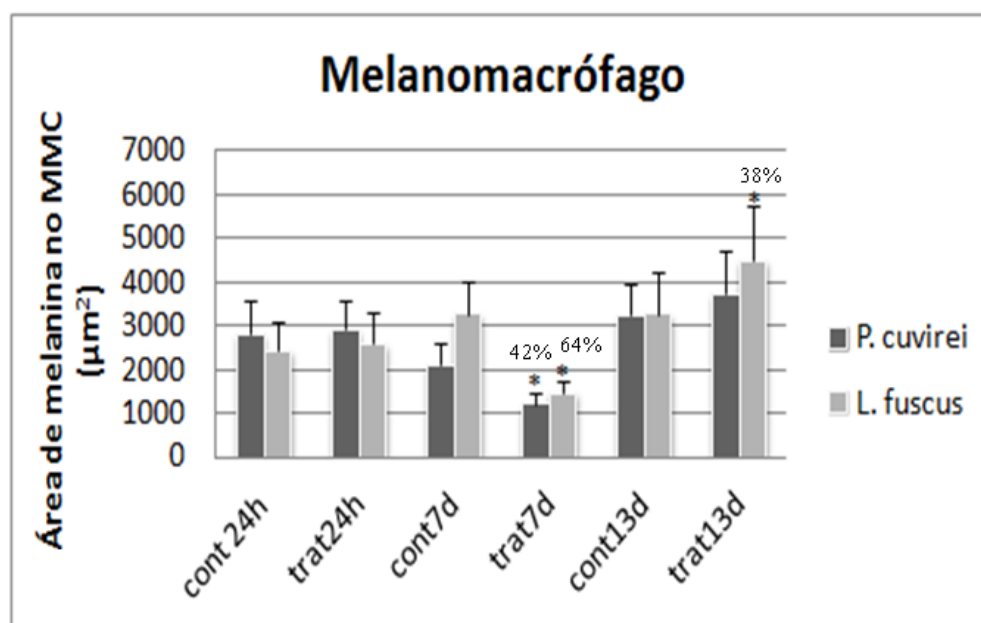


Figura 2. Área ocupada pela melanina no interior dos melanomacrófagos do fígado de *P. cuvieri* e *L. fuscus* tratados com 2 mg/kg de benzo[a]pireno. O asterisco indica diferença significativa entre os controles e os tratados de um mesmo grupo experimental ($P < 0,05$).

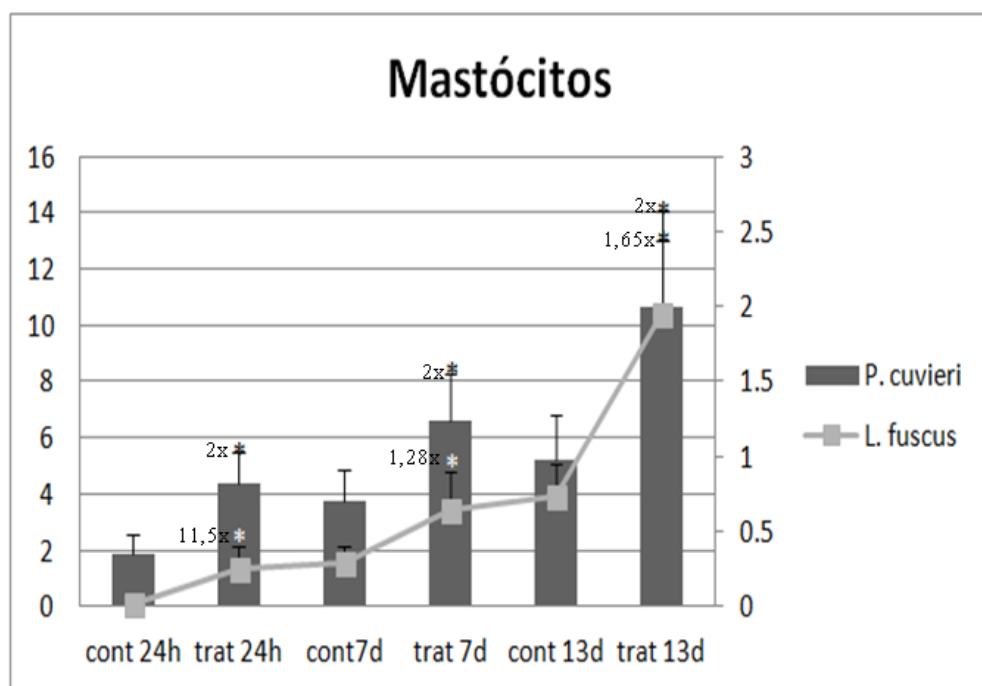


Figura 3. Densidade de mastócitos no fígado de *P. cuvieri* e *L. fuscus* tratados com 2mg/kg de benzo[α]pireno. O asterisco indica diferença significativa entre os controles e os tratados de um mesmo grupo experimental ($P < 0,05$).

Referências

- Agarwal T. 2009. Concentration level, pattern and toxic potential of PAHs in traffic soil of Delhi, India. *J Hazard Mater.* v171. pp 894–900.
- Agius, C. 1980. Phylogenetic Development of Melano-Macrophage Centers in Fish. *J Zool.* v191, pp 11-31.
- Agius, C. 1981. Preliminary Studies on the Ontogeny of the Melanomacrophages of Teleost Hematopoetic Tissues and Age-Related Changes. *Dev Comparative Immunol.* v5, pp 597-606.
- Agius, C.; Roberts, R.J. 2003. Review: Melano-Macrophage Centres and their Role in Fish Patology. *J Fish Biol.* v26. pp 499-509.
- Bamforth, S.; Singleton, I. 2005. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons: current knowledge and future directions. *Journal of Chemical Tecnology and Biotechnology.* v80, pp723-736.
- Barni, S.; Vaccarone, R.; Bertone, V.; Frascini, A.; Bernini, F.; & Fenoglio, C. 2002. Mechanisms of changes to the liver pigmentary component during the annual cycle (activity and hibernation) of *Rana esculenta* L. *J Anat.* v200(2). pp 185-194.
- Bertilsson S.; Widenfalk A. 2002. Photochemical degradation of PAHs in freshwaters and their impact on bacterial growth – influence of water chemistry. *Hydrobiol.* v469. pp 23–32.
- Blaustein A.R.; Kiesecker J.M. 2002. Complexity in conservation: lessons from the global decline of amphibian populations. *Ecol Lett.* pp 597–608.
- Burlibaşa, L.; & Gavrilă, L. 2011. Amphibians as model organisms for study environmental genotoxicity. *Appl Ecol Environ Res.* v9(1). pp 1-15.
- Çakıcı, Ö. 2015. Histopathologic changes in liver and kidney tissues induced by carbaryl in *Bufotes variabilis* (Anura: Bufonidae). *Exp Toxicol Path.* v67(3). pp 237-243.
- Césarini, J.P.1996. Melanins and their Possible Roles through Biological Evolution. *Adv Space Res.* v18. pp 35-40.
- Collins, J.F.; Brown, J.P.; Dawson, S.V.; & Marty, M.A. 1991. Risk assessment for benzo[a]pyrene. *Regul Toxicol Pharm.* v13(2). pp 170-184.
- Conrad, J. 2010: Amphibians. – Retrieved from The Backyard Nature Website at <http://www.backyardnature.net/amphibs.htm>.

Duellman W.E.; Trueb L. 1994. *Biology of amphibians*. New York, McGraw-hill. pp 405.

Fenoglio C; Boncompagni E; Fasola M; Gandini C; Comizzoli S; Milanesi G; *et al.* 2005. Effects of environmental pollution on the liver parenchymal cells and Kupffer-melanomacrophagic cells of the frog *Rana esculenta*. *Ecotoxicol Environ Saf.* v60. pp259–68.

Fishelson, L. 2006. Cytomorphological alterations of the thymus, spleen, head-kidney, and liver in cardinal fish (Apogonidae, Teleostei) as bioindicators of stress. *J Morphol.* v267. pp 57-69.

Foth, H.; Kahl, R. & KAHL, G.F. 1988. Pharmacokinetics of low doses of benzo[a]pyrene in the rat. *Food ChemToxicol.* v26, pp 45-51.

Fournie J.W; Summers J.K; Courtney L.A; Engle V.D. 2001. Utility of splenic macrophage aggregates as an indicator of fish exposure to degraded environments. *J Aquat Anim Health.* v13. pp 105-116.

Franco-Belussi, L., Leite, G.B., Freitas, J.S., & de Oliveira, C. 2014. Morphological effects of bacterial compounds on the testes of *Eupemphix nattereri* (Anura). *Anim Biol.* v64(3). pp 261-275.

Franco-Belussi, L.; Castrucci, A.M.D.L.; & de Oliveira, C. 2013. Responses of melanocytes and melanomacrophages of *Eupemphix nattereri* (Anura: Leiuperidae) to Nle^4 , D-Phe^7 - α -melanocyte stimulating hormone and lipopolysaccharides. *Zoology.* v116(5). pp 316-324.

Harris K.A.; Yunker M.B.; Dangerfield N.; Ross O.S. 2011. Sediment-associated aliphatic and aromatic hydrocarbons in coastal British Columbia, Canada: concentrations, composition, and associated risks to protected sea otters. *Environ Pollut.* v159. pp 2665–2674.

Hylland, K. 2006. Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) ecotoxicology in marine ecosystems. *J Toxicol Environ Health, Part A.* v69, pp 109-123.

Jiao L.; Zheng G.J.; Minh T.B.; Richardson B.; Chen L.; Zhang Y.; Yeung L.W.; Lam J.C.W.; Yang X.; Lam P.K.S.; Wong M.H. 2009. Persistent toxic substances in remote lake and coastal sediments from Svalbard, Norwegian Arctic: levels, sources and fluxes. *Environ Pollut.* v157. pp1342–1351.

Juhasz, A.L.; & Naidu, R. 2000. Bioremediation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons: a review of the microbial degradation of benzo[a]pyrene. *Int Biodeterior Biodegrad.* v45(1). pp57-88.

- Kanally, R.A.; & Harayama, S. 2000. Biodegradation of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria. *J Bacteriol.* v182. pp2059-2067.
- Kim M.; Kennicutt M.C. II.; Yaorong Q. 2008. Source characterization using compound composition and stable carbon isotope ratio of PAHs in sediments from lakes, harbor and shipping waterway. *Sci Total Environ.* v389. pp 367–377.
- Kranz, H. 1989. Changes in Splenic Melano-Macrophages Centres of Dab, *Limanda limanda* During and After Infection with Ulcer Disease. *Dis Aquat Organ.* v6. p. 167-173.
- Lauriano, E.R.; Calò, M.; Silvestri, G.; Zacccone, D.; Pergolizzi, S.; Lo Cascio, P. 2012. Mast cells in the intestine and gills of the sea bream, *Sparus aurata*, exposed to a polychlorinated biphenyl, PCB126. *Acta Histochem.* v114. pp 166–171.
- Loumbourdis N.S; Vogiatzis A.K. 2002. Impact of cadmium on liver pigmentary system of the frog *Rana ridibunda*. *Ecotoxicol Environ Saf.* v53. pp 52-58.
- Luo X.J.; Chen S.J.; Mai B.X.; Sheng G.Y.; Fu J.M.; Zeng E.Y. 2008. Distribution, source apportionment, and transport of PAHs in sediments from the Pearl River delta and the northern South China Sea. *Arch Environ Contam Toxicol.* v55. pp 11–20.
- Ma, J.Q.; Liu, C.M.; Qin, Z.H.; Jiang, J.H.; & Sun, Y.Z. 2011. *Ganoderma applanatum* terpenes protect mouse liver against benzo (α) pyrene-induced oxidative stress and inflammation. *Environ Toxicol Pharmacology.* v31(3). pp 460-468.
- Malmström, C.M.; Koponen, K.; Lindström-Seppä, P.; & Bylund, G. 2004. Induction and localization of hepatic CYP4501A in flounder and rainbow trout exposed to benzo[a]pyrene. *Ecotoxicol Environ Saf.* v58(3). pp 365-372.
- Möller, A. M.; Korytář, T.; Köllner, B.; Schmidt-Posthaus, H.; & Segner, H. 2014. The teleostean liver as an immunological organ: Intrahepatic immune cells (IHICs) in healthy and benzo [a] pyrene challenged rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Develop Compar Immun.* v46(2). pp 518-529.
- Morillo E.; Romero A.S.; Madrid L.; Villaverde J.; Maqueda C. 2008a. Characterization and sources of PAHs and potentially toxic metals in urban environments of Sevilla (Southern Spain). *Water Air Soil Pollut.* v187. pp 41–51.
- Ou S.; Zheng J.; Zheng J.; Richardson B.J.; Lam P.K.S. 2004. Petroleum hydrocarbons and polycyclic aromatic hydrocarbons in the surficial sediments of Xiamen Harbour and Yuan Dan Lake China. *Chemosphere.* v56. pp107–112.

- Padrós, J.; Pelletier, É.; & Ribeiro, C.O. 2003. Metabolic interactions between low doses of benzo[a]pyrene and tributyltin in arctic charr (*Salvelinus alpinus*): a long-term in vivo study. *Toxicol and Appl Pharm.* v192(1). pp 45-55.
- Paetow, L. J., McLaughlin, J. D., Cue, R. I., Pauli, B. D., & Marcogliese, D. J. 2012. Effects of herbicides and the chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* on the health of post-metamorphic northern leopard frogs (*Lithobates pipiens*). *Ecotoxicol Environ Saf*, 80, 372-380.
- Passantino, L.; Santamaria N.; Zupa R.; Pousis C.; Garofalo R.; Cianciotta A.; Jirillo E.; Acone F.; Corriero A. 2013. Liver melanomacrophage centres as indicators of Atlantic bluefin tuna, *Thunnus thynnus* L. well-being. *J Fish Dis.* pp 1-10.
- Payne, J.F.; Fancey, L.F. 1989. Effect of polycyclic aromatic hydrocarbons on immune responses in fish: Change in melanomacrophage centers in flounder (*Pseudopleuronectes americanus*) exposed to hydrocarbon-contaminated sediments. *Mar Environ Res.* v28(1). pp 431-435.
- Pickford, G.W. 1953. Fish endocrinology. A study of the hypophysectomized male killifish, *Fundulus Heteroclitus* (L.). *Bull. Bingham Oceanogr. Coll.* v14. pp 5-41.
- Pronina, S.V.; Batueva, M.D.; Pronin, N.M. 2014. Characteristics of melanomacrophage centers in the liver and spleen of the roach *Rutilus rutilus* (Cypriniformes: Cyprinidae) in Lake Kotokel during the Haff disease outbreak. *J Ichthyol.* v54(1). pp 104-110.
- Rabb G.B. 1990. Declining amphibian population. *Species.* v13. pp 33-34.
- Regnault, C.; Worms, I.A.; Oger-Desfeux, C.; MelodeLima, C.; Veyrenc, S.; Bayle, M. L.; & Reynaud, S. 2014. Impaired liver function in *Xenopus tropicalis* exposed to benzo[a]pyrene: transcriptomic and metabolic evidence. *BMC genomics.* v15(1). pp 666.
- Santos, L.R.S; Franco-Belussi, L.; Zieri, R.; Borges, R.E.; & Oliveira, C. 2014. Effects of Thermal Stress on Hepatic Melanomacrophages of *Eupemphix nattereri* (Anura). *Anat Rec.* v297. pp 864-875.
- Shakoory, B., Fitzgerald, S.M., Lee, S.A., Chi, D.S., Krishnaswamy, G. 2004. The role of human mast cell-derived cytokines in eosinophil biology. *J. Interf. Cytok. Res.* v24. pp 271-281.
- Stark A.; Abrajano T.; Hellou J.; Metcalf-Smith J.L. 2003. Molecular and isotopic characterization of polycyclic aromatic hydrocarbon distribution and sources at

the international segment of the St. Lawrence River. *Org Geochem.* v34. pp 225–237.

Stogiannidis E.; & Laane R. 2015. Source Characterization of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Using Their Molecular Indices: An Overview of Possibilities. In *Rev Environ Contam Toxicol.* pp. 49-133.

Ulger, M. 2003: Fundamental in Ecotoxicology. – Second Ed., Lewis Publisher.

Weeks, B.A.; Warinner, J.E. 1984. Effects of toxic chemicals on macrophage phagocytosis in two estuarine fishes. *Mar Environ Res.* v14(1). pp 327-335.

Wolke, R.E. 1992. Piscine macrophage aggregates: a review. *Annual Rev Fish Dis.* v2. pp 91-108.

Zakaria M.P.; Takada H.; Tsutsumi S.; Ohno K.; Yamada J.; Kound E.; Kumata H. 2002. Distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in rivers and estuaries in Malaysia: a widespread input of petrogenic PAHs. *Environ Sci Technol.* v36. pp1907–1918.

Zieri, R., Franco-Belussi, L., de Souza Santos, L. R., Taboga, S. R., & de Oliveira, C. 2015. Sex hormones change visceral pigmentation in *Eupemphix nattereri* (Anura): effects in testicular melanocytes and hepatic melanomacrophages. *Anim Biol.* v65(1). pp 21-32.

Zuasti, A.; Jara, J.R.; Ferre, C.; Solano, F. 1989. Occurrence of Melanin Granules and Melanosynthesis in the Kidney of *Sparus auratus*. *Pig Cell Res.* pp 93-100.

Capítulo 3

**Efeitos do benzo[α]pireno nas células sanguíneas de *Physalaemus*
cuvieri e *Leptodactylus fuscus* (Anura: Leptodactylidae)**

**Efeitos do benzo[*a*]pireno nas células sanguíneas de *Physalaemus cuvieri* e
Leptodactylus fuscus (Anura: Leptodactylidae)**

Lara Zácari Fanali¹, Lilian Franco-Belussi², Cláudia Regina Bonini-Domingos²,
Classius de Oliveira²

¹Programa de Pós-graduação em Biologia Animal - IBILCE - UNESP / São José do Rio Preto - SP

²Departamento de Biologia - IBILCE - UNESP / São José do Rio Preto - SP

Manuscrito a ser submetido ao periódico *Journal of Zoology*

Resumo

O declínio dos anfíbios está relacionado com vários fatores, entre eles, a poluição em decorrência de contaminantes como o benzo[α]pireno. A distribuição dos contaminantes nos organismos é feita por meio do fluxo sanguíneo. A exposição a poluentes químicos ou a hipóxia ambiental pode induzir alterações nos parâmetros hematológicos dos animais à formação de micronúcleos. Dessa forma, os objetivos do trabalho foram avaliar os efeitos do benzo[α]pireno nos eritrócitos e leucócitos de *Physalaemus cuvieri* e *Leptodactylus fuscus*. Foram utilizados o sangue de 36 *P. cuvieri* e 36 *L. fuscus*. Para cada espécie havia 6 tratamentos, com 6 animais em cada um: cont 24h, cont 7d, cont 13d, trat 24h, trat 7d e trat 13d. Os tratados receberam injeção subcutânea com 2mg/kg de BaP, diluído em óleo mineral e os controles receberam apenas óleo mineral. Seguiram-se os processos para análise sanguínea. Os animais tratados não apresentaram alteração na frequência dos MN em nenhuma das duas espécies, provavelmente porque as células mais danificadas sofreram morte celular ou perderam capacidade de entrar em mitose. Na contagem diferencial de leucócitos, somente eosinófilos e neutrófilos de *L. fuscus* mostraram alteração sob efeito do BaP, em 13d. A diminuição percentual dos eosinófilos pode estar relacionada com alteração da função imune e o aumento dos neutrófilos à sua função em resposta inflamatória.

Palavras-chave: micronúcleo, leucócitos, benzo[α]pireno, anuros.

Introdução

Os anfíbios são considerados um grupo em declínio (Stuart *et al.* 2004; Wake & Vredenburg 2008; Hayes *et al.* 2010; Blaustein *et al.* 2011). Dentre os motivos para o declínio podemos citar a introdução de espécies exóticas, alterações climáticas, destruição do habitat e a poluição do ambiente em decorrência de contaminantes (Wake & Vredenburg 2008) provenientes da agricultura, esgoto doméstico e dejetos industriais (Desbrow *et al.* 1998; Snyder *et al.* 1999; Boyd *et al.* 2003).

Formado a partir da combustão incompleta de matéria orgânica, o benzo[*a*]pireno (BaP) é um poluente orgânico pertencente à classe dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos que pode ser produzido de forma natural ou antrópica (Jiao *et al.* 2009; Stogiannidis & Laane 2015). Capaz de bioacumular no organismo, o BaP é considerado um composto de risco devido a suas características hepatotóxicas, teratogênicas, carcinogênicas e mutagênicas (Madureira *et al.* 2014; Pastore *et al.* 2014; IARC 2012). Poluentes genotóxicos podem afetar os ecossistemas aquáticos diretamente, mas a sua presença na água pode também afetar espécies não aquáticas por meio das cadeias alimentares ou simplesmente pela ingestão de água contaminada (Mouchet *et al.* 2005).

O sangue é de fundamental importância para a avaliação das condições biológicas, bioquímicas e patológicas nos animais, pois está em contato com órgãos, tecidos e células e reage sensivelmente a todas as alterações que aí ocorrem (Ranzani-Paiva & Godinho 1985; Oliveira-Ribeiro *et al.* 1996; Ribeiro *et al.* 1999).

A distribuição dos contaminantes nos organismos é feita por meio do fluxo sanguíneo (Who 1995). A exposição a poluentes químicos ou a hipóxia ambiental pode induzir alterações nos parâmetros hematológicos dos animais (Winkaler *et al.* 2008) e refletir em mudanças no estado fisiológico, por isso parâmetros hematológicos fornecem informações sobre o nível de dano e também são considerados importantes indicadores da saúde dos anuros e outros animais (Sayed 2015).

Dentre os parâmetros hematológicos podem ser contabilizados os diferentes tipos de leucócitos. Essas células podem ser divididas em granulócitos (quando apresentam grânulos citoplasmáticos), como os neutrófilos, basófilos e eosinófilos, e agranulócitos (ausência de grânulos no citoplasma), como os monócitos, linfócitos e azurófilos (Campbell 2007; Claver & Quaglia 2009; Arikan & Çiçek 2014).

Nas últimas décadas, algum tipo de anomalia nuclear, como formação de micronúcleo (MN) foi detectado em eritrócitos maduros de diferentes espécies de peixes (Pastore *et al.* 2014) e de anfíbios quando expostos, por exemplo, ao BaP ou pesticidas (Grinfeld *et al.* 1986; Candioti *et al.* 2010; Pérez-Iglesias *et al.* 2014). Micronúcleos são originados a partir de fragmentos de cromossomos ou cromossomo inteiro em anáfase refletindo eventos respectivamente, clastogênicos e aneugênicos (Fortin *et al.* 2015).

BaP é um poluente genotóxico (Mouchet *et al.* 2005) que pode induzir a formação de micronúcleo nos eritrócitos por evento clastogênico, aneugênico (Fortin *et al.* 2015) e pode alterar os padrões das células leucocitárias (Sorensen 1991; Sayed 2015). Dessa forma os objetivos do trabalho foram avaliar os efeitos do benzo[α]pireno nos eritrócitos e leucócitos de *Physalaemus cuvieri* e *Leptodactylus fuscus*.

Material e Métodos

Coleta dos animais

Foram analisados 36 espécimes adultos de *Physalaemus cuvieri* e 36 de *Leptodactylus fuscus* (projeto aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais, protocolo 094 e RAN/IBAMA/MMA 18573- 1), todos do sexo masculino.

Os animais foram coletados em brejos próximos à região de São José do Rio Preto, com pouca influência antrópica. Após a coleta, os animais foram levados ao laboratório de Anatomia Comparada do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto, onde, primeiramente, passaram por um processo de aclimação por sete dias, com fotoperíodo de 12:12

claro/escuro e temperatura de $25\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ e posteriormente injeção subcutânea do composto. As injeções ocorreram no dorso do animal, próximas do membro inferior, a fim de evitar perfurações nos órgãos.

Todos os animais foram alimentados com drosófilas durante o período experimental e o alimento era ofertado logo após as injeções para evitar mais períodos de estresse.

Experimentos com benzo[α]pireno

O experimento foi realizado em 3 tempos: 24h, 7 e 13 dias, onde os animais receberam uma concentração de 2mg/kg de benzo[α]pireno, diluída 0,02ml de óleo mineral Nujol. Para cada espécie havia 6 grupos experimentais com 6 animais em cada grupo: controle de 24h (cont24h), tratado de 24h (trat24h), controle de 7 dias (cont7d), tratado de 7 dias (trat7d), controle 13 dias (cont13d), tratado de 13 dias (trat13d). Os grupos controles receberam apenas óleo mineral. A aplicação do composto e do óleo ocorreu a cada 48h, até o final do experimento. As concentrações foram escolhidas com base nos artigos de Padrós *et al.* (2003) e Malmstrom *et al.* (2004), com adaptações.

Após o período experimental os animais foram anestesiados com xilocaína (excesso foi retirado com algodão para não interferir) na articulação do membro posterior para retirada do sangue pela veia femoral com auxílio de agulha e seringa heparinizadas. Devido à pequena quantidade de sangue e à rápida coagulação, foi feito esfregaço no momento em que o sangue foi retirado.

Análise de Micronúcleo

Para o teste de micronúcleo foi feito esfregaço sanguíneo e, após secagem do material, as lâminas foram fixadas em metanol, coradas com Giemsa 7,5% por 15 min e observadas em microscópio (Leica DM4000 B). Para cada animal foram contabilizados 1000 eritrócitos.

Devido à dificuldade de se estabelecer o que realmente é um micronúcleo, que muitas vezes pode ser confundido com precipitados decorrentes de artefatos ou de agregação de outras substâncias, foram utilizados os seguintes critérios: o

micronúcleo deve ter o diâmetro menor que 1/3 do núcleo principal; não ter birrefringência; ter a mesma intensidade de coloração ou coloração mais clara que a do núcleo principal; não ter nenhuma conexão ou ligação com o núcleo; não se sobrepor ao núcleo principal; ser bem arredondado (Fenech 2007; Candioti *et al.* 2010)

Análise dos Leucócitos

Para contagem diferencial dos leucócitos foi feito esfregaço sanguíneo e posteriormente foi corado com Panótico (Hematocor-Biológica®), que permite identificar a variedade de leucócitos e estabelecer suas proporções relativas. Para cada animal foram contabilizados 100 leucócitos observados em microscópio (Leica DM4000 B). Foi estabelecido o valor percentual de cada tipo de leucócito no sangue circulante, para depois, conhecendo-se o total de leucócitos circulantes, obteve-se o total de cada tipo celular.

Análises estatísticas

Para avaliar se a quantidade de micronúcleo (variável dependente) variou com o tempo de administração do benzo[α]pireno (variável independente) em cada espécie, foi utilizado Análise de Variância Um Critério (ONE WAY ANOVA).

Para inferir se houve variação na porcentagem de leucócitos (variável dependente) com a administração do benzo[α]pireno (variável independente) em cada espécie, foi utilizado Teste G com correção de Yates (Sokal & Rohlf 1995). Este teste foi implementado utilizando o código fornecido por Peter Hurd (disponível em <http://www.psych.ualberta.ca/~phurd/cruft/g.test.r>). Todos os dados foram previamente transformados pelo Log para corroborar com o pressuposto de homogeneidade e variância e complementados com o teste de Tukey. O programa de estatística utilizado foi o R 3.0.

Resultados

Teste de micronúcleo

A figura 1A ilustra as hemáceas de anuros, de forma oval e nucleada. Na figura 1B temos uma hemácea com micronúcleo.

Não houve alteração na frequência de micronúcleo em *P. cuvieri* ($F= 0,71$; $P>0,05$) tampouco em *L. fuscus* ($F= 2,874$; $P>0,05$) (Fig 2).

Porcentagem de Leucócitos

No sangue periférico dos anuros *P. cuvieri* e *L. fuscus* foram encontrados os seguintes leucócitos: linfócitos, azurófilos, neutrófilos, monócitos, eosinófilos, e apenas um basófilo entre os 72 animais analisados.

Os linfócitos são leucócitos basofílicos, com citoplasma escasso e núcleo ocupando praticamente a célula toda (Fig 3A). Azurófilos são células bastante semelhantes aos linfócitos, mas o citoplasma apresenta-se em maior quantidade, o núcleo é excêntrico e levemente de forma ameboide (Fig 3A). Neutrófilos são leucócitos com citoplasma rosa-acizentado e núcleo segmentado (Fig 3B). Basófilos possuem grânulos basofílicos dispersos por toda a célula, muitas vezes dificultando a aparência do núcleo (Fig 3C). Eosinófilos são leucócitos granulados, eosinofílicos e com núcleo excêntrico (Fig 3D). Monócitos são semelhantes aos linfócitos, mas apresentam bastante citoplasma e normalmente vacuolizado (Fig 3E).

Em *Leptodactylus fuscus* a quantidade de neutrófilos ($G= 13.271$; $df= 4$; $P<0,05$) e eosinófilos ($G= 10.241$; $df= 4$; $P<0,05$) sofreu influência do BaP, mas somente em 13 dias de tratamento. Os outros leucócitos não tiveram alteração (Monócito: $G= 5,890$; $df= 4$; $P>0,05$; Linfócito: $G= 4.527$; $df= 4$; $P>0,05$; Azurófilo: $G= 7.527$; $df= 4$; $P>0,05$). Os neutrófilos aumentaram aproximadamente 9% e os eosinófilos diminuíram aproximadamente 56% (Fig 4).

Não houve alteração da porcentagem de leucócitos em *Physalaemus cuvieri* em nenhum tratamento com BaP (Eosinófilo: $G= 4.713$; $df= 4$; $P>0,05$; Neutrófilo: $G= 3.121$; $df= 4$; $P>0,05$; Monócito: $G=3.242$; $df= 4$; $P>0,05$; Linfócito: $G= 5. 271$; $df= 4$; $P>0,05$; Azurófilo: $G= 5.527$; $df= 4$; $P>0,05$) (Fig 4).

Discussão

O teste de micronúcleo é bastante utilizado para estimar danos citogenéticos induzidos por agentes físicos ou químicos (Udroiu 2006) e vários estudos corroboram esse fato. Um deles se baseia no urodela *Pleurodeles waltl* experimentalmente contaminado com o benzo[α]pireno. A concentração de 0,05ppm do composto mostrou que a quantidade de micronúcleo era dependente do tempo de exposição, sendo o pico no sexto dia de tratamento (Grinfeld *et. al.* 1986).

Embora seja comum o aumento de micronúcleo, nosso trabalho mostrou que não houve alteração na frequência de micronúcleo em nenhuma das duas espécies expostas ao BaP e em nenhum dos tratamentos. Karahalil *et. al.* (1999), mostraram a partir de esfoliação de células bucais que, trabalhadores de reparação de motores (grupo experimental do estudo), que estavam constantemente expostos ao benzo[α]pireno não tiveram alteração na quantidade de micronúcleo em relação ao grupo controle, do qual faziam parte indivíduos que não foram expostos ocupacionalmente aos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. Outros trabalhos com outras classes de poluentes, mas que usaram anuros como modelo experimental também retratam que não há variação na frequência dos micronúcleos.

Pérez-Iglesias *et. al.* (2014) revelaram que a frequência de micronúcleo em girinos de *Hypsiboas pulchellus* expostos ao inseticida imidacloprida por 48h não diferiu dos controles negativos, independentemente da concentração analisadas dentro de 12,5-37,5mg/L. O pirimicarb, também inseticida, foi utilizado por Candioti *et al.* (2010) em girinos da espécie *Rhinella Arenarum* e os resultados também mostraram que não houve aumento na frequência de micronúcleo nas concentrações de 160 mg/L e 250 mg/L do composto. Essa resposta é suportada por algumas hipóteses, dentre elas: as células mais danificadas sofreram morte celular após exposição ao contaminante, permanecendo no sangue somente os eritrócitos que não tiveram danos graves; as células gravemente danificadas perderam a capacidade de entrar em mitose e conseqüentemente impossibilitou a formação dos micronúcleos e por último, os animais possuem um mecanismo de reparo eficaz capaz de remediar os danos induzidos pelo contaminante (Udroiu

2006; Candioti *et. al.* 2010). Essas três hipóteses relacionadas aos pesticidas podem ser extrapoladas ao HPA benzo[α]pireno, tendo em vista sua capacidade de mutagenicidade.

A descrição da hematologia dos anuros é escassa e ainda soma-se o fato de existir uma grande diversidade nesse grupo de vertebrados, mas pouco conhecida morfofuncionalmente. A grande maioria dos trabalhos que existem estão relacionados com a contagem de células totais (eritrócitos e leucócitos) e morfometria das células vermelhas do sangue (Cabagna Zenklusen *et al.* 2011).

O sangue dos anfíbios apresenta variações em termos quantitativos dependendo do sexo, espécie, fases da metamorfose, estado nutricional, sazonalidade e temperatura (Jirgensen & Larsen 1967). Em nosso estudo não foi possível estabelecer um padrão para os diferentes tipos de leucócitos porque os animais estavam sob influência de variáveis que não são encontradas em seu ambiente natural. Supomos que o controle é o nosso padrão.

A compreensão de respostas leucocitárias de anfíbios a doenças é limitada. No entanto, sabe-se que neutrofilia e monocitose são considerados consistentes com a inflamação; eosinofilia é consistente com o parasitismo; e linfocitose é considerado consistente com excitação, imunidade ou neoplasia linfóide (Campbell 2007); azurófilo é conhecido por aumentar quando há estímulo antigênico e doenças infecciosas (Mader 2000).

O contaminante benzo[α]pireno alterou o percentual dos leucócitos do tipo neutrófilos e eosinófilos de *L. fuscus* em 13 dias de exposição. Peixes expostos a xenobiontes podem apresentar alterações nos valores hematológicos (Affonso *et al.* 2002). Essas alterações também são vistas em anfíbios como mostra o trabalho de Kiesecker (2002). Nosso trabalho também mostrou alterações nos padrões leucocitários, mas apenas em *L. fuscus*, com 13 dias de exposição.

Foi encontrada diminuição dos eosinófilos com 13 dias de tratamento com BaP. Kiesecker (2002) em seu trabalho com *Rana sylvatica* expostas a pesticidas mostrou diminuição dos eosinófilos. O autor afirma que o contaminante alterou a resposta imune das rãs e que exposição a baixas concentrações de contaminantes tem efeitos dramáticos na resposta imunitária. Davis & Maerz (2010) mostraram

que os eosinófilos de *Ambystoma talpoideum* (salamandra) diminuem sob efeito da corticosterona, mostrando que o estresse está relacionado com a diminuição desse leucócito.

Tem sido relatado que, mudanças nos tipos de células brancas do sangue ocorrem dependendo do pesticida e essa resposta está relacionada com o estresse. Esta condição pode aumentar a sensibilidade contra doenças por enfraquecimento do sistema imune (Rehulka & Minarik 2004; Wedemeyer 1997) e estas alterações são caracterizadas com a diminuição da taxa de linfócitos e aumento da taxa e neutrófilos (Modesto & Martinez 2010; Witeska 2005).

Nosso trabalho mostrou aumento dos neutrófilos em 13 dias. Tulgar & Celik (2015) em estudo com carpa expostas ao pesticida propargite também mostraram aumento de neutrófilos. Esse aumento pode estar relacionado em resposta à diminuição dos eosinófilos, que, no nosso estudo pode ter diminuído devido à toxicidade e estresse causado pelo benzo[α]pireno, mas também, o aumento dos neutrófilos pode estar relacionado com respostas inflamatórias.

Pelo fato do BaP ser conhecido por causar inflamação (Moller *et al.* 2014; Zena *et al.* 2015) é possível que o aumento dos neutrófilos esteja associado com resposta inflamatória decorrente da exposição ao BaP.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Victor Yunes Guimarães por ajudar na caracterização dos leucócitos e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado em São Paulo – FAPESP pelo apoio financeiro concedido na forma de bolsa de mestrado à aluna Lara Zácari Fanali (Proc. 2014/07466-8).

Figuras

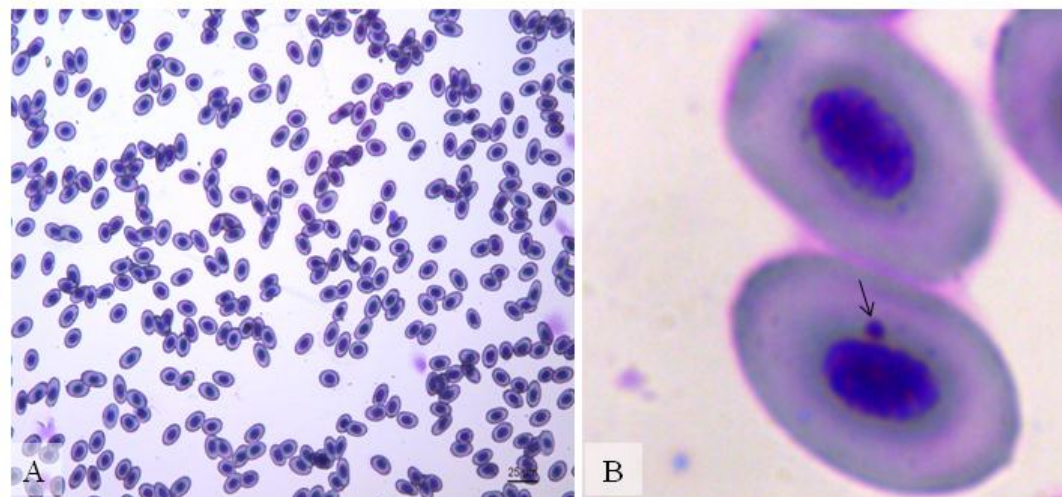


Figura 1. A: Hemácias de *Physalaemus cuvieri*. B: Hemácia com micronúcleo (seta).

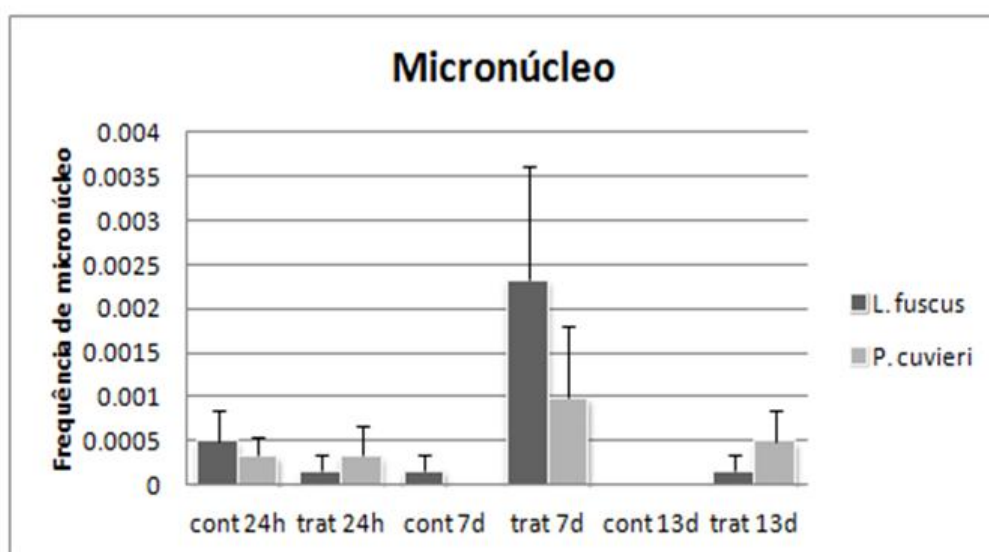


Figura 2. Frequência de micronúcleo no fígado de *P. cuvieri* e *L. fuscus* tratados com 2mg/kg de benzo[a]pireno. Não houve diferença significativa entre os controles e os tratados de um mesmo grupo experimental ($P > 0,05$).

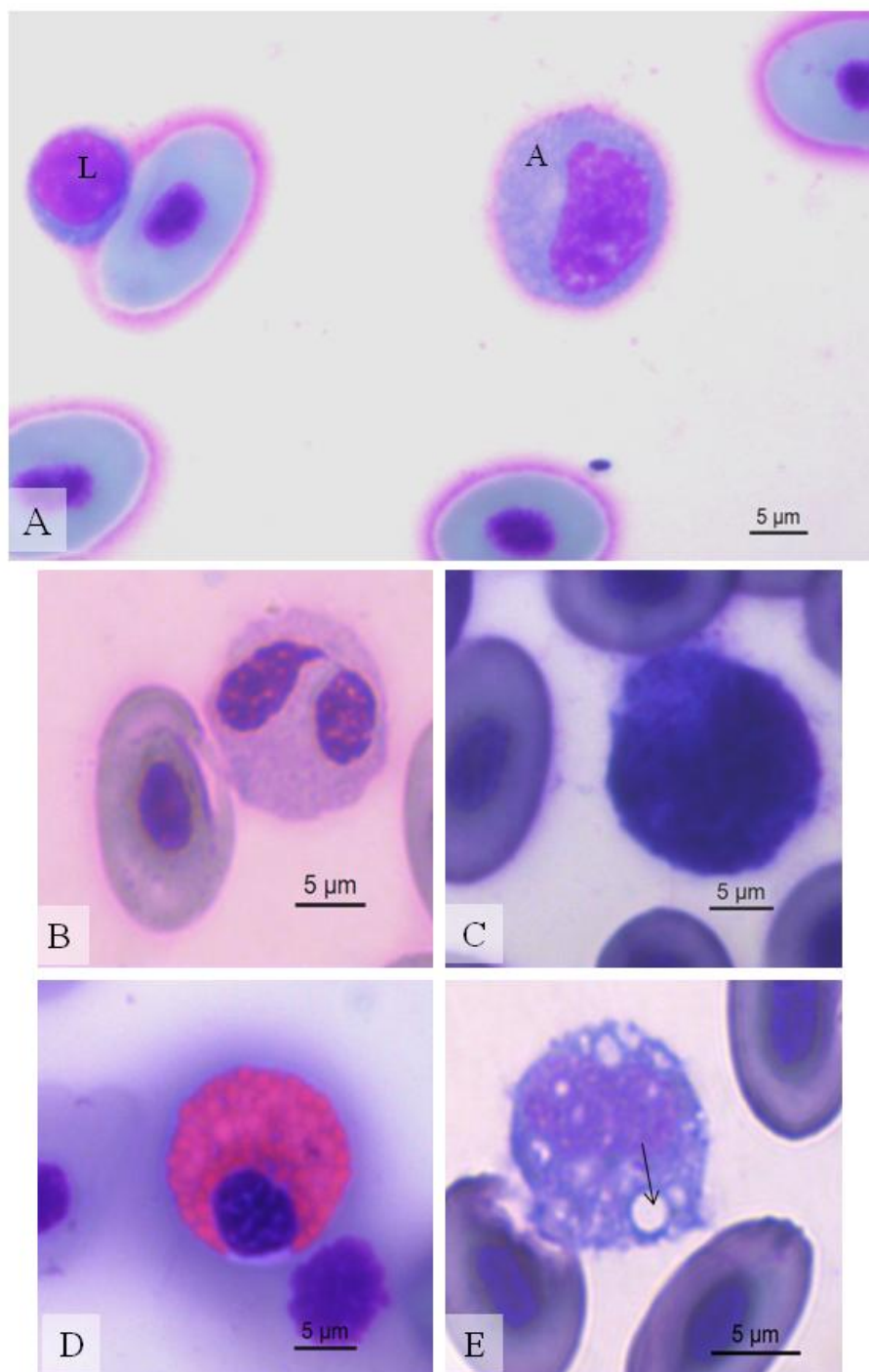


Figura 3. Morfologia dos leucócitos de *P. cuvieri* e *L. fuscus*. **A:** Linfócito (L) e Azurófilo (A) de *L. fuscus*. **B:** Neutrófilo de *P. cuvieri*. **C:** Basófilo de *L. fuscus*. **D:** Eosinófilo de *P. cuvieri*. **E:** Monócito de *P. cuvieri* com vacúolo (seta).

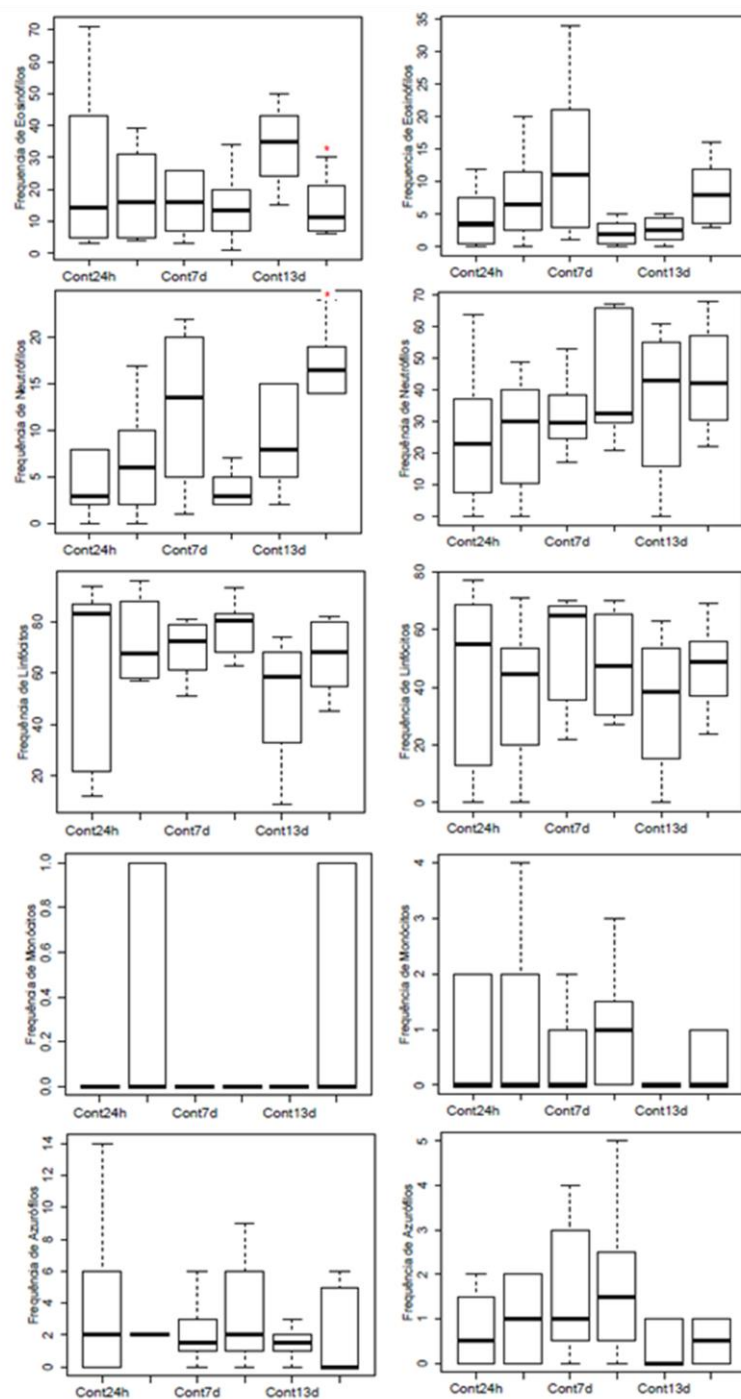


Figura 4. Frequência de leucócitos de *Leptodactylus fuscus* (lado esquerdo) e *Physalaemus cuvieri* (lado direito) tratados com 2mg/kg de benzo[a]pireno. O asterisco indica diferença significativa entre os controles e os tratados de um mesmo grupo experimental ($P < 0,05$).

Referência

- Affonso, E.G; Polez, V.L.P; Correa, C.F.; Mazon, A.F; Araujo, M.R.R; Moraes, G. & Rantin, F.T. 2002. Blood parameters and metabolites in the teleost fish *Colossoma macropomum* exposed to sulfide or hipoxia. *Comp Biochem Physiol.* v133. pp 375-382.
- Arikan, H; & Çiçek, K. 2014. Haematology of amphibians and reptiles: a review. *North-Western J Zool.* v10(1). pp 190-209.
- Blaustein, A.R.; Han, B.A.; Relyea, R.A.; Johnson, P.T.J.; Julia C. Buck, J.C.; Gervasi, S.S.; Kats, L.B. 2011. The complexity of amphibian population declines: understanding the role of cofactors in driving amphibian losses. *Ann NY Acad Sci* ISSN. The Year in *Ecol Conserv Biol.* v1223. pp 108-119.
- Boyd, G.R.; Reemtsma, H.; Grimm, D.A.; Mitra, S. 2003. Pharmaceuticals and Personal Care Products (PPCPs) in Surface and Treated Waters of Louisiana, USA and Ontario, Canada. *Sci Total Environ.* v311. pp135–149.
- Cabagna Zenklusen, M.C.; Lajmanovich, R.C.; Attademo, A.M.; Peltzer, P.M.; Junges, C.M.; Fiorenza Biancucci, G.; & Bassó, A. 2011. Hematología y citquímica de las células sanguíneas de *Rhinella fernandezae* (Anura: Bufonidae) en Espinal y Delta-Islands del río Paraná, Argentina. *Rev Biol Trop.* v59(1). pp 17-28.
- Campbell, T.W; Ellis, C.K. 2007. Hematology of amphibians. In: Avian and exotic animal hematology and cytology. Ames (IA): Blackwell Publishing. pp 83–91.
- Candioti, J. V., Natale, G. S., Soloneski, S., Ronco, A. E., & Larramendy, M. L. 2010. Sublethal and lethal effects on *Rhinella Arenarum* (Anura, Bufonidae) tadpoles exerted by the pirimicarb-containing technical formulation insecticide Aficida®. *Chemosphere.* v78(3). pp 249-255.
- Claver, J.A.; & Quaglia, A.I. Comparative morphology, development, and function of blood cells in nonmammalian vertebrates. 2009. *J Exot Pet Med.* v18. n2. pp 87-97.
- Davis, A.K.; & Maerz, J.C. 2010. Effects of exogenous corticosterone on circulating leukocytes of a salamander (*Ambystoma talpoideum*) with unusually abundant eosinophils. *Int J Zool.* pp 2010.
- de Arcaute, C. R., Pérez-Iglesias, J. M., Nikoloff, N., Natale, G. S., Soloneski, S., & Larramendy, M. L. 2014. Genotoxicity evaluation of the insecticide imidacloprid on circulating blood cells of Montevideo tree frog *Hypsiboas pulchellus* tadpoles (Anura, Hylidae) by comet and micronucleus bioassays. *Ecol Indic.* v45. pp 632-639.

Desbrow C.; Routledge E.J.; Brighty G.C.; Sumpter J.P.; Waldock M. 1998. "Identification of Estrogenic Chemicals in STW Effluent. 1. Chemical Fractionation and in Vitro Biological Screening". *Environ Sci Technol.* v32(11). pp1549-1558.

Fenech, M. 2007. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nat Protoc.* v2 pp 1084-1104.

Fortin, F.; Bonvalot, Y.; Pham, T.C.V.; Ouellet, N.; Ayotte, P.; Viau, C.; & Lemieux, N. 2015. Biomarkers of genotoxicity measured in human lymphocytes exposed to benzo[a]pyrene: Aneugenic effect, and involvement multiple primary DNA lesions. *Integr Pharm Toxicol Gentoxicol.* v1(1). pp 21-32.

Grinfeld, S.; Jaylet, A.; Siboulet, R.; Deparis, P.; & Chouroulinkov, I. 1986. Micronuclei in red blood cells of the newt *Pleurodeles waltl* after treatment with benzo(a)pyrene: dependence on dose, length of exposure, posttreatment time, and uptake of the drug. *Environ Mutagen.* v8(1). pp 41-51.

Hayes, T.B.; Falso P.; Gallipeau S.; Stice, M. 2010. The cause of global amphibian declines: a developmental endocrinologist's perspective. *J Exp Biol.* v213. pp 921-933.

IARC, International Agency for Research on Cancer, 2012. A review of human carcinogens: chemical agents and related occupations. In: IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans and their supplements. Lists of evaluations. IARC v100. pp 111-114.

IUCN (International Union for Conservation of Nature). <http://www.iucn.org/>. Visto em: 8 de janeiro de 2016.

Jiao L.; Zheng G.J.; Minh T.B.; Richardson B.; Chen L.; Zhang Y.; Yeung L.W.; Lam J.C.W.; Yang X.; Lam P.K.S.; Wong M.H. 2009. Persistent toxic substances in remote lake and coastal sediments from Svalbard, Norwegian Arctic: levels, sources and fluxes. *Environ Pollut.* v157. pp 1342–1351.

Jirgensen, C.B.; Larsen, L.O. 1967. Neuroendocrine mechanism in lower vertebrates. *Neuroendocrinology.* v2. pp 485-528.

Karahalil, B., Karakaya, A. E., & Burgaz, S. 1999. The micronucleus assay in exfoliated buccal cells: application to occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Mutat Res-Gen Tox Em.* v442(1). pp 29-35.

Kiesecker, J. M. 2002. Synergism between trematode infection and pesticide exposure: a link to amphibian limb deformities in nature? *Proc Natl Acad Sci.* v99(15). pp 9900-9904.

- Mader, D.R. 2000. Normal hematology of reptiles. *Schalms' Veterinary Hematology*, 5th edition. Lippincott Williams & Wilkins: PA. pp 1126-1132.
- Madureira, D. J., Weiss, F.T.; Van Midwoud, P.; Helbling, D.E.; Sturla, S.J.; & Schirmer, K. 2014. Systems Toxicology Approach to Understand the Kinetics of Benzo (a) pyrene Uptake, Biotransformation, and DNA Adduct Formation in a Liver Cell Model. *Chem Res Toxicol*. v27(3). pp 443-453.
- Malmström, C.M.; Koponen, K.; Lindström-Seppä, P.; & Bylund, G. 2004. Induction and localization of hepatic CYP4501A in flounder and rainbow trout exposed to benzo[a]pyrene. *Ecotoxicol Environ Saf*. v58(3). pp 365-372.
- Modesto, K.A. and C.B.R. Martinez. 2010. Effects of roundup transorb on Fish: Hematology, antioxidant defenses and acetylcholinesterase activity. *Chemosphere*. v81. pp 781-787.
- Mouchet, F.; Gauthier, L.; Mailhes, C.; Ferrier, V.; & Devaux, A. 2005. Comparative study of the comet assay and the micronucleus test in amphibian larvae (*Xenopus laevis*) using benzo (a) pyrene, ethyl methanesulfonate, and methyl methanesulfonate: establishment of a positive control in the amphibian comet assay. *Environ Toxicol*. v20(1). pp 74-84.
- Oliveira-Ribeiro, C.A.; Guimarães, J.R.D.; Pfeiffer, W.C. 1996 Accumulation and distribution of inorganic mercury in a tropical fish (*Trichomycterus zonatus*). *Ecotoxicol Environ Saf*. v34. pp 190-195.
- Padrós, J.; Pelletier, É.; & Ribeiro, C.O. 2003. Metabolic interactions between low doses of benzo[a]pyrene and tributyltin in arctic charr (*Salvelinus alpinus*): a long-term in vivo study. *Toxicol and Appl Pharm*. v192(1). pp 45-55.
- Pastore, A.S.; Santacroce, M.P.; Narracci, M.; Cavallo, R.A.; Acquaviva, M.I.; Casalino, E.; ... & Crescenzo, G. 2014. Genotoxic damage of benzo [a] pyrene in cultured sea bream (*Sparus aurata* L.) hepatocytes: Harmful effects of chronic exposure. *Mar Environ Res*. v100. pp 74-85.
- Pérez-Iglesias, J.M.; de Arcaute, C.R.; Nikoloff, N.; Dury, L.; Soloneski, S.; Natale, G.S.; & Larramendy, M.L. 2014. The genotoxic effects of the imidacloprid-based insecticide formulation Glacoxan Imida on Montevideo tree frog *Hypsiboas pulchellus* tadpoles (Anura, Hylidae). *Ecotoxicol Environ Saf*. v104. pp 120-126.
- Ranzani-Paiva, M.J.T.; Godinho, H.M. 1985. Estudos hematológicos em curimatá, *Prochilodus scrofa* Steindachner, 1881 (Osteichthyes, Cypriniformes, Prochilodontidae). Série vermelha. *Bol Inst Pesca*. v12(2). pp 25-35.

- Rehulka, J. & B. Minarik B. 2004. Effect of polychlorinated biphenyls (Delor 103) on haematological and enzyme parameters of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Dis Aquat Organ.* v62. pp 147-153.
- Ribeiro, C.A.O.; Rouleau, C.; Pelletier, E.; Audet, C.; Tjalve, H. 1999. Distribution kinetics of dietary methylmercury in the Arctic charr (*Salvelinus alpinus*). *Environ Sci Tech.* v33. pp 902-907.
- Sayed, A.E.D.H. 2015. Hematotoxic and biochemical effects of UVA on the Egyptian toad (*Bufo regularis*). *Int J Rad Biol.* pp 1-7.
- Snyder S.; Keith T.L.; Verbrugge D.A.; Snyder E.M.; Gross T.S.; Kannan K.; Giesy J.P. 1999. Analytical Methods for Detection of Selected Estrogenic Compounds in Aqueous Mixtures. *Environ Sci Tech.* v33. n16. pp2814-2820.
- Sokal, R.R.; Rohlf, F.J. 1995. Biometry: The Principles and Practice of Statistics in Biological Research, 3rd ed. W.H. Freeman &Co., New York.
- Sorensen, E.M.B. 1991 Metal poisoning in fish. Florida: *CRC Press*. 597p.
- Stogiannidis E.; & Laane R. 2015. Source Characterization of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Using Their Molecular Indices: An Overview of Possibilities. In *Rev Environ Contam Ttoxicol.* pp. 49-133.
- Stuart, S.N.; Chanson, J.S.; Cox, N.A.; Young, B.E.; Rodrigues, A.S.L.; Fischman, D.L; Waller R.W. 2004. Status and trends of amphibian declines and extinctions worldwide. *Science.* v306. pp 1783–1786.
- Tulgar, A.; & Celik, E.S. 2015. Effects of sublethal concentrations of propargite to White blood cells of common carp (*Cyprinus carpio*, Linnaeus, 1758). *Mar. Sci. Tech. Bull.* v4(1), pp 13-17.
- Udroiu, I. 2006. The micronucleus test in piscine erythrocytes. *Aquat Toxicol.* v79(2). pp 201-204.
- Wake, D.B.; Vredenburg, V.T. 2008. Are we in the midst of the sixth mass extinction? A view from the world of amphibians. *PNAS.* v105(1). pp 11467.
- Wedemeyer, G.A. 1997. Effects of rearing conditions on the health and physiological quality of fish in intensive culture. In: Iwama, G.K., Pickering, A.D., Sumpter, J.P. and C.B. Chreck. (eds). *Fish stress and health in aquaculture.* Cambridge University Press, Cambridge. pp 35–71.
- WHO. World Health Organization. IPCS.1995 Environmental health criteria 165 – Inorganic Lead. Publish under the joint sponsorship of the United Nations Environment programme, the International Labour Organization, and the World Health Organization, pp 300.

Winkaler, E.U.; Silva, A.D.G.; Galindo, H.C.; & Martinez, C.B.D.R. 2008. Biomarcadores histológicos e fisiológicos para o monitoramento da saúde de peixes de ribeirões de Londrina, Estado do Paraná. *Acta Scient. Biol Sci.* v23. pp 507-514.

Witeska, M. 2005. Stress in fish – hematological and immunological effects of heavy metals. *Electron J Ichthyol.* v1. pp 35–41.

Yadav, S. S., Giri, S., Singha, U., Boro, F., & Giri, A. 2013. Toxic and genotoxic effects of Roundup on tadpoles of the Indian skittering frog (*Euflyctis cyanophlyctis*) in the presence and absence of predator stress. *Aquat Toxicol.* v132. pp 1-8.

Zena, R.; Speciale, A.; Calabrò, C.; Calò, M.; Palombieri, D.; Saija, A.; ... & Cascio, P.L. 2015. Exposure of sea bream (*Sparus aurata*) to toxic concentrations of benzo [a] pyrene: possible human health effect. *Ecotoxicol Environ Saf.* v122. pp 116-125.

Conclusões

O fígado de *P. cuvieri* é estruturalmente similar ao de *L. fuscus*, visto que as duas espécies pertencem à família Leptodactylidae. Essas duas espécies compartilham também, similaridades morfológicas e alimentares, o que reflete na morfologia hepática.

Benzo[α]pireno alterou a quantidade de melanina presente nos melanomacrófagos e a densidade de mastócitos, corroborando a nossa predição. Por outro lado, provavelmente devido a altos danos celulares, a hipótese de que a frequência de micronúcleo aumentaria foi refutada, nas duas espécies estudadas.

Benzo[α]pireno não alterou os diferentes tipos de leucócitos em *P. cuvieri* e em *L. fuscus* alterou somente os neutrófilos e eosinófilos em 13 dias.

