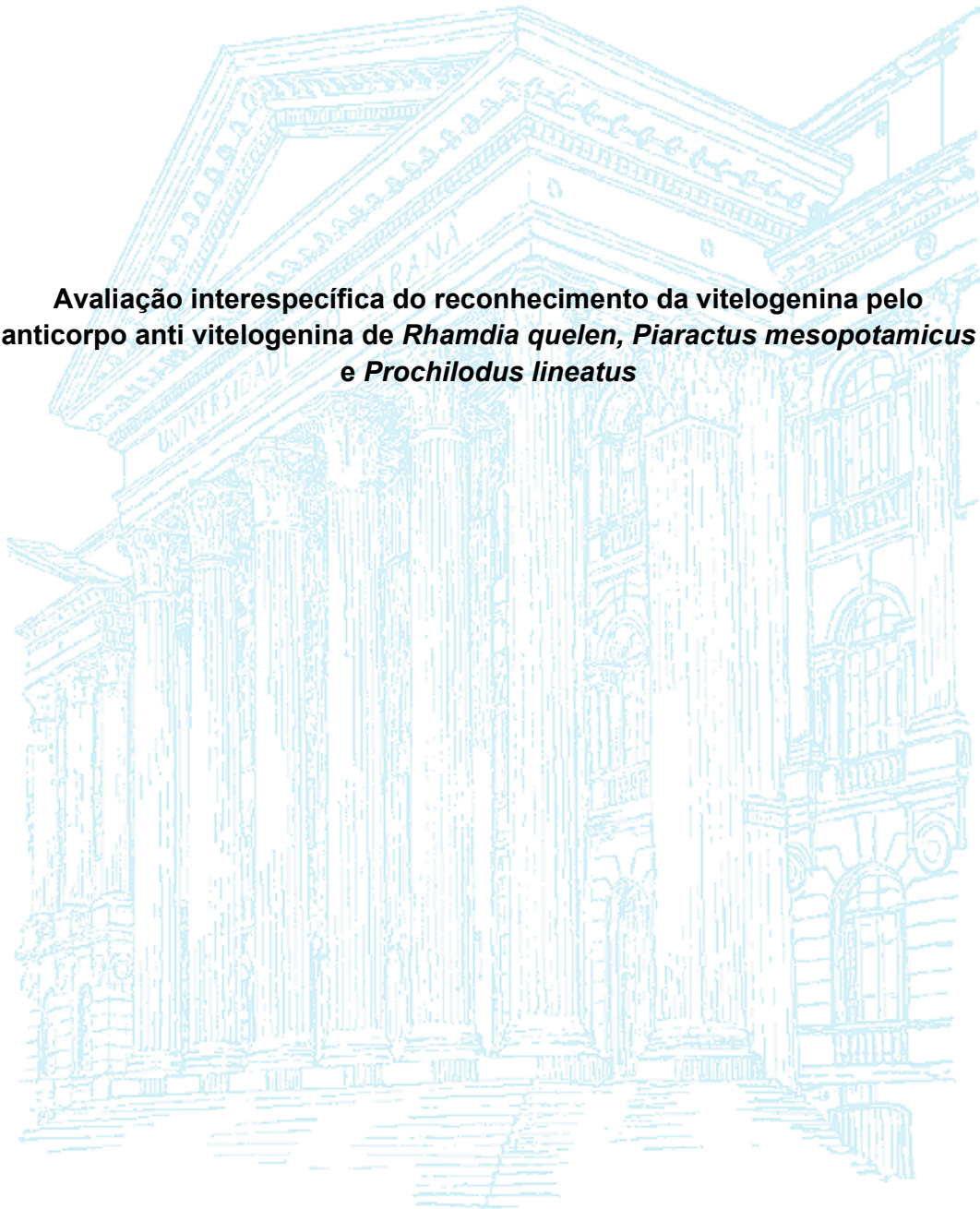


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

DANDIE ANTUNES BOZZA

Avaliação interespecífica do reconhecimento da vitelogenina pelo anticorpo anti vitelogenina de *Rhamdia quelen*, *Piaractus mesopotamicus* e *Prochilodus lineatus*



CURITIBA

2013

DANDIE ANTUNES BOZZA

Avaliação interespecífica da vitelogenina de espécies nativas pelo anticorpo anti vitelogenina de *Rhamdia quelen*, *Piaractus mesopotamicus* e *Prochilodus lineatus*

Monografia apresentada ao Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro

Co-orientadora: Ms. Daniele Dietrich Moura Costa

CURITIBA

2013

AGRADECIMENTOS

Ao meu pai Odario por ter me criado sozinho desde os 12 anos, desistindo de muitas coisas para poder me oferecer os melhores estudos. Ensinou-me a ser uma pessoa honrada e generosa, assim como ele sempre foi. Sempre me ajudando, tanto na parte financeira, como me esperando todos os dias na frente do portão quando retorno da universidade à noite.

A minha avozinha Holanda que sempre me apoiou e cuidou de mim, me acordando cedo e preparando as comidas maravilhosas.

Ao meu avozinho Florindo (*in memorian*) que nos deixou em 2009, no início da faculdade, e que sempre deixará saudades de seus ensinamentos e seus cuidados.

As minhas tias Estel e Cris meu tio Lauro, que sempre me apoiaram e ajudaram em tudo o que eu precisei até hoje.

Aos meus padrinhos/tios Gloria e Ivo por sempre serem meus amigos e pela ajuda e apoio que me deram todos esses anos.

Aos meus primos Soelen e Marcos pela amizade.

Ao meu cãozinho Paschoal, meu companheirinho há onze anos, que sempre está ao meu lado nas longas horas de estudo.

Ao meu orientador Profº Drº Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro por ter me acolhido no laboratório e ter acreditado e confiado em mim nesses quatro anos. Por ter me ensinado muitas coisas e ajudado nas horas em que precisei.

A Daniele, minha Co-orientadora mais linda desse mundo e minha irmã de coração, por tudo que me ensinou, pela amizade, carinho e dedicação. Por ter chego mais cedo em alguns dias para iniciar meus experimentos e ter me apoiado em tudo.

Ao Profº Drº Francisco (o Chico) pelos ensinamentos, ajudas e pela amizade.

Ao Profº Drº Marco Randi pelos ensinamentos e ajudas. Pelas brigas que as vezes temos e pelos xingos que trocamos (claro que tudo de brincadeira!!!) e por ter me ensinado a não levar tudo o que ele fala, as vezes, a sério.

A Profª Drº Sônia, minha mãe adotiva na universidade, por todos os ensinamentos, conselhos, conversas, broncas e cafezinhos no laminário. Sempre que um problema surgiu a Soninha sempre esteve lá para me ajudar.

Aos meus colegas de laboratório Andressa e Samuel, pela amizade e pelas ajudas que sempre deram.

As minhas colegas de laboratório Flavia, Renata, Halina, Ana Carolina, Izabella, Débora, Maritana, Monica, Elisangela e Ludiana e meu colega Cassio, pela amizade e por toda ajuda que me deram.

Ao pessoal que nesses quatro anos passaram pelo laboratório, Rodrigo, Heloísa, Juliana, Daniel, Inês, Stéfani, Ellie e Izabela pela amizade, pelos ensinamentos e pela ajuda.

Ao longo desses cinco anos de cursos, fiz diversas amizades. Essa dedicatória é especialmente à aqueles que fizeram a diferença. A Angie pelo companheirismo que tivemos ao longo desses anos, fazendo trabalhos juntos e sofrendo por eles no final e nas longas noites de videoconferência para terminá-los. A Anna (e a futura sobrinha Julia) pelo companheirismo e por saber que tenho uma irmã de coração sempre que eu precisar. A Laís por todas as conversas e risadas ao longo desses anos. A Ila, mesmo nos conhecendo a pouco tempo, dividimos alegrias e tristezas ao longo do semestre da licenciatura. Aos meus colegas Renattho, Diego, José, Andressa e Thaís, por todas as risadas, conversas e cafés na hora do intervalo da qual sentirei muitas saudades. A Gisleine pela amizade e por todas as ajudas e dificuldades que passamos ao longo da monografia e sempre enfrentando com muita garra.

Também aos amigos que não são da faculdade, mais que fizeram grande diferença nesses anos. A Jéssica, minha ex-amiga virtual e atualmente amiga presencial, uma pessoa da qual tenho muito carinho, por todas as conversas e risadas. A Solange por todos os papos científicos e pela paciência de me escutar em todas as horas. A Mariana e Carol que, apesar de conhecer a pouco tempo, tenho um grande carinho e admiração.

A todos os professores que ao longo desses cinco anos, não se limitaram apenas a serem professores, e sim verdadeiros mestres.

Aos professores do Dpto. de Biologia Celular pelos ensinamentos.

Aos Funcionários técnico-administrativos da Universidade, em especial a Rosana, Vanessa, Miriam, Herculano (Seu nino) e Julia, por toda a ajuda e dedicação que tiveram (e que continuam a ter).

Ao CNPq pela bolsa de iniciação científica.

A Universidade Federal do Paraná pelo ensino.

*“Nada faz sentido em biologia a
não ser a luz da evolução”*

Theodosius Dobzhansky

RESUMO

O crescimento da população humana e o avanço da indústria e da agricultura geram uma gama de substâncias que potencialmente podem causar diversos problemas aos ambientes naturais. O despejo de substâncias químicas antropogênicas nos corpos d'água é cada vez mais frequente, afetando organismos residentes neles e comprometendo a qualidade da água para o consumo humano. Dentre estas substâncias estão os desreguladores endócrinos (DE's) que afetam a homeostasia endócrina e todas as funções controladas por este sistema. A detecção de DE's no ambiente pode ser verificada pela indução na expressão da fosfolipoglicoproteína vitelogenina em peixes machos. Essa proteína é responsável pela formação do vitelo e é expressa em grande quantidade em fêmeas no período reprodutivo, sendo induzida pelo hormônio 17β -estradiol. Esse hormônio, ou substâncias análogas a ele, quando presentes no ambiente, podem induzir a expressão desta proteína em indivíduos machos. Para a detecção da mesma, pode-se utilizar diversos ensaios de imunomarcção, sendo um deles o *Western blot*. Para sua realização é necessário a utilização de anticorpos. Porém, devido ao elevado custo de aquisição dos mesmos torna-se inviável seu uso em estudos de biomonitoramento, onde grandes quantidades de amostras são coletadas e requerem grandes volumes de anticorpos. Para viabilizar o uso de anticorpos em estudos de biomonitoramento, é frequente que os mesmos sejam produzidos pelo laboratório que faz este tipo de análise. Frente a este cenário, o objetivo desse estudo foi testar a especificidade e a sensibilidade de anticorpos policlonais, produzidos previamente no Laboratório de Toxicologia Celular, para as espécies *Rhamdia quelen*, *Piaractus mesopotamicus* e *Prochilodus lineatus*. O anticorpo de *R. quelen* reagiu especificamente com a vitelogenina correspondente numa diluição de 1:140000, e possui uma sensibilidade de 1 μ g de proteínas totais por poço do gel; reagiu especificamente com a vitelogenina de *P. mesopotamicus* numa concentração de 1:64000, com uma sensibilidade 10 μ g de proteínas totais; reagiu especificamente com a vitelogenina de *P. lineatus* numa diluição variando de 1:32000 a 1:64000, com uma sensibilidade variando de 1 a 50 μ g de proteínas totais; O anticorpo de *P. mesopotamicus* reagiu especificamente com a vitelogenina correspondente numa diluição variando de 1:64000 a 1:80000, com uma sensibilidade variando de 1 a 25 μ g de proteínas totais; reagiu especificamente com a vitelogenina de *P. lineatus* numa diluição, variando de 1:16000 a 1:64000, com uma sensibilidade variando de 1 a 20 μ g de proteínas totais; não houve reação específica entre o anticorpo de *P. mesopotamicus* e a vitelogenina de *R. quelen*. O anticorpo de *P. lineatus* reagiu especificamente com a vitelogenina correspondente numa diluição de 1:64000, com uma sensibilidade variando de 1 a 4 μ g de proteínas totais; reagiu especificamente com a vitelogenina de *P. mesopotamicus* numa diluição variando de 1:32000 a 1:64000, com uma sensibilidade variando de 1 a 20 μ g de proteínas totais; não houve reação específica entre o anticorpo de *P. lineatus* e a vitelogenina de *R. quelen*. A ausência de reação nos anticorpos de *P. mesopotamicus* e *P. lineatus* com a vitelogenina de *R. quelen*, podem ter correlação com questões evolutivas, por serem de ordens diferentes, como também podem ser de origem imunológica advinda do organismo onde foi produzido os anticorpos. Desta forma conclui-se que o anticorpo de *Rhamdia quelen* é o mais adequado para ser utilizado em estudos de biomonitoramento.

Palavras-chave: anticorpo, desreguladores endócrinos, Vitelogenina.

Lista de Imagens

Figura 1 Molécula de colesterol e seus hormônios derivados	12
Figura 2 Mecanismo de ação de uma molécula esteroideal.	13
Figura 3 Substâncias semelhantes em sua estrutura com o hormônio Estradiol	14
Figura 4 Processo de Vitelogênese.....	18
Figura 5 Ordem sequencial de resposta a poluentes	21
Figura 6. Distribuição das espécies na América do Sul.....	24
Figura 7 Estrutura básica de um anticorpo	26
Figura 8. Anticorpo anti-vtg de <i>Rhamdia quelen</i> X Vitelogenina de <i>Rhamdia quelen</i> ...	33
Figura 9. Anticorpo anti-vtg de <i>Rhamdia quelen</i> X Vitelogenina de <i>Rhamdia quelen</i>	33
Figura 10. Anticorpo anti-vtg de <i>P. mesopotamicus</i> X Vitelogenina de <i>R. quelen</i>	34
Figura 11. Anticorpo anti-vtg de <i>P. Lineatus</i> X Vitelogenina de <i>R. quelen</i>	35
Figura 12. Anticorpo anti-vtg de <i>R. quelen</i> X Vitelogenina de <i>P. mesopotamicus</i>	36
Figura 13. Anticorpo anti-vtg de <i>R. quelen</i> X Vitelogenina de <i>P. mesopotamicus</i>	36
Figura 14. Anticorpo anti-vtg de <i>P. mesopotamicus</i> X Vitelogenina de <i>P. mesopotamicus</i>	37
Figura 15. Anticorpo anti-vtg de <i>P. mesopotamicus</i> X Vitelogenina de <i>P. mesopotamicus</i>	37
Figura 16. Anticorpo anti-vtg de <i>P. lineatus</i> X Vitelogenina de <i>P. mesopotamicus</i>	38
Figura 17. Anticorpo anti-vtg de <i>P. lineatus</i> X Vitelogenina de <i>P. mesopotamicus</i>	38
Figura 18. Anticorpo anti-vtg de <i>R. quelen</i> X Vitelogenina de <i>P. lineatus</i>	39
Figura 19. Anticorpo anti-vtg <i>R. quelen</i> X Vitelogenina de <i>P. lineatus</i>	40
Figura 20. Anticorpo de <i>P. mesopotamicus</i> X Vitelogenina de <i>P. lineatus</i>	40
Figura 21. Anticorpo <i>R. quelen</i> X Vitelogenina de <i>P. Lineatus</i>	41
Figura 22. Anticorpo <i>P. lineatus</i> X Vitelogenina de <i>P. lineatus</i>	42
Figura 23. Anticorpo <i>P. lineatus</i> X Vitelogenina de <i>P. lineatus</i>	42

Lista de Tabelas

Tabela 1. Características gerais da vitelogênese em diferentes espécies.....	20
Tabela 2. Ensaio em diferentes níveis de resposta	22
Tabela 3. Concentração de proteínas utilizadas.....	31
Tabela 3. Titulação do anticorpo.....	40
Tabela 4. Sensibilidade do anticorpo	40

Sumário

1. INTRODUÇÃO	11
1.2 DESREGULADORES ENDÓCRINOS	11
1.3 SISTEMA ENDÓCRINO DE PEIXES.....	14
1.4 VITELOGENINA	15
1.4.1 Histórico	16
1.4.2 Características do vitelo	16
1.4.3 Vitelogênese.....	16
1.4.4 História evolutiva	18
1.5 VITELOGENINA COMO BIOMARCADOR.....	21
1.5.1 Bioindicadores.....	22
1.6 IMUNOLOGIA	24
1.6.1 Antígeno e Anticorpo.....	25
1.6.2 Produção de anticorpos.....	26
1.6.3 Imunoensaios	27
1.7 USO DE IMUNOMARCADORES NO BIOMONITORAMENTO.....	28
2. OBJETIVOS	29
2.1 OBJETIVO GERAL	29
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
3. MATERIAIS E MÉTODOS	29
3.1 INDUÇÃO ESTROGÊNICA	29
3.2 COLETA E PROCESSAMENTO DO MATERIAL BIOLÓGICO.....	30
3.3 PRODUÇÃO DO SORO POLICLONAL.....	30
3.4 ENSAIO DE TITULAÇÃO DO ANTICORPO.....	31
3.5 TESTE DA SENSIBILIDADE DOS ANTICORPOS.....	32
4. RESULTADOS.....	32
4.1 REAÇÃO ENTRE O ANTICORPO ANTI-VTG DE <i>R. quelen</i> E A VTG DE <i>R. quelen</i> (TITULAÇÃO E SENSIBILIDADE).....	32
4.3 REAÇÃO ENTRE O ANTICORPO ANTI-VTG DE <i>P. lineatus</i> E A VTG DE <i>R. quelen</i> (TITULAÇÃO E SENSIBILIDADE).....	35
4.4 REAÇÃO ENTRE O ANTICORPO ANTI-VTG DE <i>R. quelen</i> E A VTG DE <i>P. mesopotamicus</i> (TITULAÇÃO E SENSIBILIDADE).....	35
4.5 REAÇÃO ENTRE O ANTICORPO ANTI-VTG DE <i>P. mesopotamicus</i> E A VTG DE <i>P. mesopotamicus</i> (TITULAÇÃO E SENSIBILIDADE).....	36

4.6	REAÇÃO ENTRE O ANTICORPO ANTI-VTG DE <i>P. lineatus</i> A VTG DE <i>P. mesopotamicus</i> (TITULAÇÃO E SENSIBILIDADE).....	38
4.7	REAÇÃO ENTRE O ANTICORPO ANTI-VTG DE <i>R. quelen</i> E A VTG DE <i>P. lineatus</i> (TITULAÇÃO E SENSIBILIDADE).....	39
4.8	REAÇÃO ENTRE O ANTICORPO ANTI-VTG DE <i>P. mesopotamicus</i> E A VTG DE <i>P. lineatus</i> (TITULAÇÃO E SENSIBILIDADE).....	40
4.9	REAÇÃO ENTRE O ANTICORPO ANTI-VTG DE <i>P. lineatus</i> E A VTG DE <i>P. lineatus</i> (TITULAÇÃO E SENSIBILIDADE).....	41
4.10	RESUMO DOS RESULTADOS	43
5.	DISCUSSÃO	43
6.	CONCLUSÃO	46
7.	REFERÊNCIAS	47

1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento tecnológico e industrial tem proporcionado conforto a população humana por todo o mundo. Com isso, a demanda por bens de consumo têm crescido exponencialmente e a indústria é impelida a produzir uma quantidade maior de novas substâncias para atender a demanda. Em setembro de 2012, segundo o site da *Chemical Abstract Service*, havia cerca de 64 milhões de substâncias químicas registradas no mundo. Em maio de 2013 este número já chegou a quase 71 milhões de substâncias; um aumento de 10% em apenas oito meses. Dentre todas essas substâncias, 15% estão disponíveis comercialmente, 0,13% são usadas no cotidiano e apenas 0,003% possuem efeito tóxico comprovado (CAS, acesso em 2013). A grande maioria dessas substâncias depois de utilizadas não possui uma destinação correta sendo muitas vezes despejadas indiscriminadamente nos ambientes naturais. Estas substâncias atingem os ecossistemas aquáticos causando efeitos adversos aos organismos que vivem nesses ambientes, podendo constituindo riscos saúde humana.

1.2 DESREGULADORES ENDÓCRINOS

A presença de substâncias no ambiente e os seus efeitos nocivos não é um fenômeno novo. Há relatos da década de 40, onde ornitólogos amadores e profissionais observaram o declínio da população de águias carecas, na costa leste dos Estados Unidos, devido a mudanças no comportamento de corte e o cuidado parental, em áreas próximas a plantações (Markey *et al.* 2003). No final dessa década, estudos demonstraram redução na produção de espermatozoides em animais residentes próximos a áreas agrícolas, onde se utilizavam aviões pulverizadores com diclorodifeniltricloroetano (DDT), além da presença de características femininas no trato reprodutivo de ratos e pássaros machos (Pait and Nelson 2002). Em 1967 o DDT entra novamente em cheque quando Rachel Carson publica seu livro Primavera Silenciosa (*Silent Spring* originalmente), relacionando mais uma vez a utilização do DDT sem nenhuma restrição com a diminuição do número de aves devido à fragilização dos ovos.

Desde então, um grupo específico de substâncias começaram a ser estudadas. Estas receberam o nome de desreguladores endócrinos (DE's) (do inglês *endocrine disruptors*), definidos como substâncias exógenas que interagem e interferem na produção, liberação, transporte, metabolismo, ligação, ação ou eliminação de hormônios naturais do organismo, responsável pela manutenção da homeostase e da regulação dos processos de desenvolvimento (Kavlock *et al.* 1996). Esse sistema é essencial, juntamente com o sistema nervoso, para a comunicação e regulação dos demais tecidos do corpo, atuando desde a diferenciação sexual na fase intrauterina em mamíferos até a maturação sexual do indivíduo, atuando também na reprodução, crescimento, digestão, funções cardiovasculares e excreção (Witorsch 2002).

Os desreguladores endócrinos podem ser encontrados naturalmente, como é o caso dos antioxidantes flavonoides, encontrados em frutas e vegetais, fitoestrogênios encontrados na soja e hormônios excretados por animais. Porém, algumas substâncias utilizadas pela indústria, ou liberadas pela sua atividade podem agir de forma a mimetizar os efeitos dos hormônios naturais. As mais conhecidas são as substâncias com ações esteroidais, ou seja, substâncias, derivadas do colesterol, onde na sua composição possuem três anéis hexagonais e um anel pentagonal. (Figura 1)(Witorsch 2002).

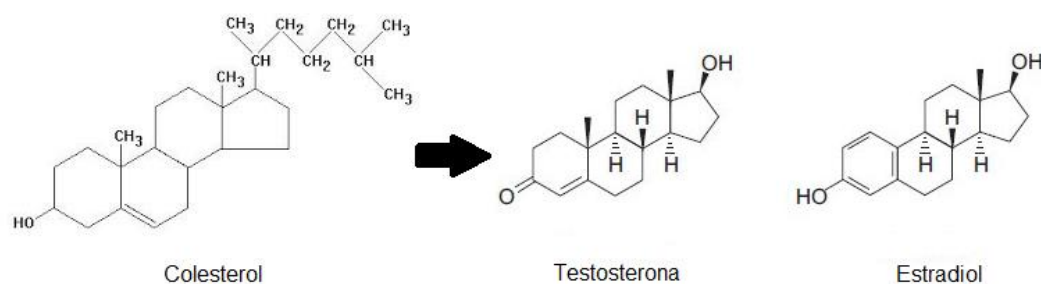


Figura 1 Molécula de colesterol e seus hormônios derivados.
 Fonte: O autor.(2013)

Por serem moléculas lipofílicas, o hormônios podem cruzar livremente a membrana celular, ligando-se ao seu receptor que pode ser citosólico ou nuclear. Existem diversos mecanismos de atuação dos DE's: um deles seria a passagens pela membrana, por serem lipofílicos, ligando-se ao receptor

intracelular formando um complexo DE-receptor, que irá atuar diretamente no DNA, promovendo a transcrição de genes (Figura 2). Este mecanismo de ação é chamado de agonismo do receptor onde a ação do composto é idêntica ao mecanismo descrito para um hormônio natural (Waring and Harris 2005).

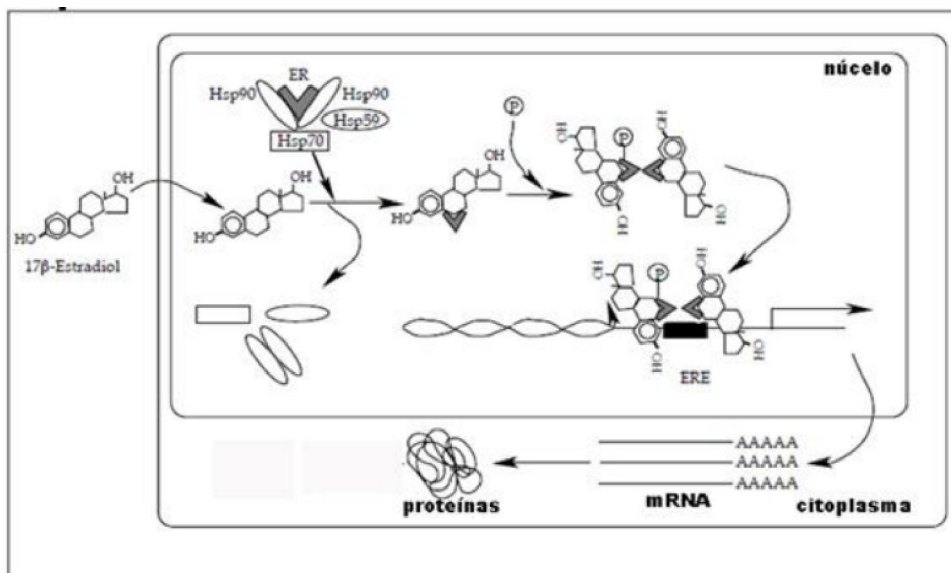


Figura 2 Mecanismo de ação de uma molécula esteroide.
 Fonte: Adaptado de Zacharewski (1997) *apud* Costa (2012).

A síntese de hormônios esteroides inicia-se com a captura do colesterol pelas células, que então passa por uma série de reações envolvendo uma classe de enzimas denominada Citocromo P450 (CYP). Suas isoformas CYP 2C11, 2A1, 2B1, 3A1 e 2C19 possuem papel crucial nos estágios de catálise. A isoforma CYP2C19, também chamada de aromatase, é a enzima que regula a formação do estrogênio. Alguns poluentes possuem a capacidade de inibir essa enzima como o TBT (Tributilestanho) e fungicidas como Cetaconazol e Feranimol, fazendo com que haja uma diminuição na produção de hormônios estrogênicos (Waring and Harris 2005).

Na figura 3 nota-se que há muitos compostos semelhantes em sua estrutura ao hormônio estradiol, sendo que, quanto maior a semelhança, mais provável é a substância ser desreguladora endócrina.

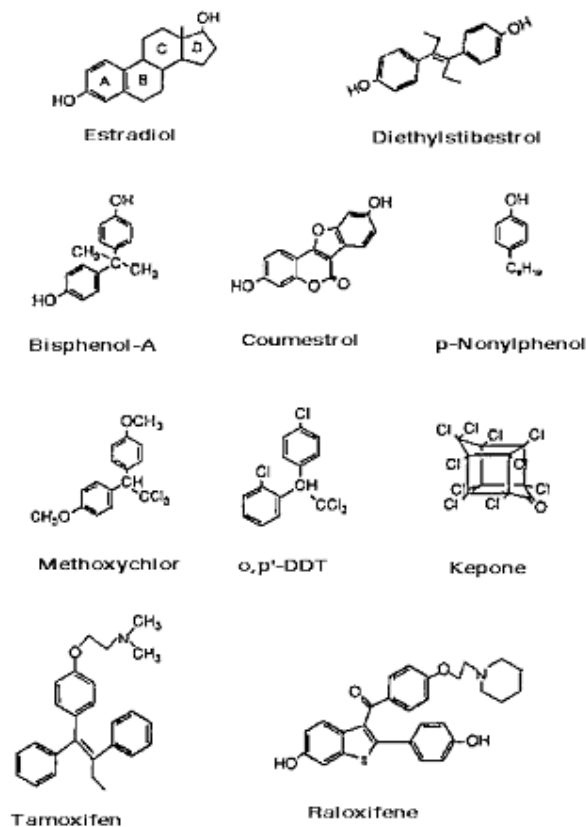


Figura 3 Substâncias semelhantes em sua estrutura com o hormônio Estradiol
FONTES: Witorsch 2002

1.3 SISTEMA ENDÓCRINO DE PEIXES

O sistema endócrino em peixes é composto por várias glândulas localizadas ao longo do corpo que sintetizam e secretam hormônios relacionados a processos biológicos. Por exemplo, a tireóide secreta os hormônios T3 e T4 que estão relacionados à adaptação dos peixes a diferentes temperaturas. O corpúsculo de Stanius secreta a hipocalcinina que está envolvida na homeostase do cálcio e que também pode estar relacionado ao controle das taxas de cálcio, sódio e potássio no plasma (Bone *et al.*, 1995). O pâncreas secreta insulina e glucagon que estão envolvidos no metabolismo de glicose. A hipófise produz e secreta vários hormônios envolvidos no crescimento, metabolismo energético e principalmente na reprodução (*Idem*).

O sistema reprodutor em peixes é regulado pelo eixo Hipotalâmico-hipofisário-gonadal, também conhecido como eixo neuroendócrino. Na maioria dos peixes teleósteos, os gametas aparecem primeiramente como células

germinativas primordiais, sendo que a maturação ocorre pela ação hormonal. Alterações nas condições ambientais (temperatura, fotoperíodo e etc) são detectadas pelo sistema nervoso, levando a uma cascata de reações hormonais que culmina com a produção e maturação dos gametas. O hipotálamo é o elemento neural do sistema endócrino e é ele que secreta o hormônio liberador das gonadotrofinas (GnRH) que irá estimular a hipófise a secretar os hormônios folículo estimulante (FSH) e luteinizante (LH). O FSH é responsável pela estimulação do crescimento gonadal, indução de produção de hormônios esteroides sexuais e a gametogênese. Já o LH estimula a maturação do ovócito e a sua liberação (Bone *et al.*, 1995).

Sob ação do FSH e LH o colesterol é captado pelas gônadas e convertido em progesterona. Posteriormente esta progesterona sofre uma série de reações enzimáticas e é convertida em 17 α -hidroxiprogesterona e em seguida em testosterona. Nessa etapa enzimática, ambos os sexos possuem esse hormônio. A testosterona pode ser convertida em 17 β -estradiol nas fêmeas e 11 α -testosterona em machos. O que determina a produção desses hormônios é a carga genética. Machos possuem uma baixa expressão da enzima CYP aromatase que é responsável pela conversão de testosterona em 17 β -estradiol e uma alta expressão da enzima 11 β -hidroxiesteróides desidrogenase, responsável pela conversão de testosterona em 11 α -testosterona. Em fêmeas ocorre o contrário, alta expressão de CYP aromatase e baixa expressão de 11 β -hidroxiesteróides desidrogenase. Ao serem expostos a contaminantes com efeitos estrogênicos, peixes juvenis, mesmo geneticamente determinados a serem machos, irão diferenciar-se em adultos fêmeas. O inverso ocorre quando o contaminante tiver efeito androgênico (Moura Costa, 2012; Bone e Moore, 2008).

1.4 VITELOGENINA

A vitelogenina é uma proteína que possui um peso molecular de aproximadamente 140 kDa, sendo ela de extrema importância para animais ovíparos, ao qual está associada com uma série de mudanças no perfil proteico do plasma em fêmeas. A secreção dessa proteína está sob controle do eixo hipotálamo-hipófise-gônada, sendo o hormônio 17 β -estradiol o responsável pela indução da transcrição da mesma (Hiramatsu 2005a).

1.4.1 Histórico

A cerca de um século, Uhlenhuth e Kodama (1914) encontraram uma proteína específica no plasma de carpas fêmeas sexualmente maduras, dando a ela o nome de “Ovomina”. Laskowski (1936) e Roepke e Hughes (1935) encontraram fosfoproteínas no plasma de aves fêmeas, sendo que a mesma não era encontrada em aves machos e mamíferos, recebendo o nome de “Vitelinina”.

O termo “Vitelogenina” foi utilizado pela primeira vez por Pan *et al* (1967) para descrever uma proteína específica das fêmeas de um mariposa do gênero *Hyalophora*. Desde então o termo tem sido empregado para proteínas do plasma que possuem as mesmas características. A partir de então, vários pesquisadores estudaram a vitelogenina, dando a ela a seguinte definição: proteína produzida por órgãos somáticos (no caso dos vertebrados o fígado), circulantes pelo plasma e o principal precursor do vitelo do ovo (Hiramatsu 2005a).

1.4.2 Características do vitelo

O vitelo consiste em um acúmulo de nutrientes necessários para o crescimento e desenvolvimento do embrião. Portanto, o vitelo possui uma série de componentes endógenos fornecidos maternamente tais como açúcares, proteínas, lipídeos, vitaminas e minerais. Além disso, os ovos de teleósteos contêm compostos reguladores, tais como os esteroides sexuais e outros hormônios lipofílicos, anticorpos tais como a imunoglobulina M (IgM), mRNA's, enzimas de processamento de gema e outras moléculas bioativas. Em algumas espécies, a vitelogenina chega a ocupar cerca de 80% - 90% da massa seca do vitelo (Hiramatsu 2005a).

1.4.3 Vitelogênese

A vitelogênese consiste na síntese de vitelogenina pelo fígado sob a regulação do sistema neuroendócrino (Funkenstein *et al.* 2000). Devido a fatores ambientais, ocorre a produção e liberação do hormônio GnRh pelo hipotálamo, que estimula a hipófise a produzir e secretar o hormônio folículo

estimulante (FSH). Uma vez liberado na corrente sanguínea, esse hormônio irá ativar células foliculares dos ovócitos a produzirem o hormônio 17β -estradiol (E_2). Esse por sua vez é transportado até o fígado, onde atravessa a membrana celular, ligando-se aos receptores e ativando a transcrição do gene da vitelogenina. Ao final da tradução, a vitelogenina passa por uma série de modificações pós-traducionais, como fosforilações, glicosilações e lipidações e em seguida é secretada para a corrente sanguínea e transportadas até os ovócitos, aos quais é incorporada (Figura 4)(Funkenstein *et al.* 2000; Hiramatsu 2005a).

Ao ser incorporada, a vitelogenina sofre um processo enzimático, sendo clivada em três subunidades: Lipovitelina (LV), Fosfovítina (PV) e componente β (Anderson, 1998; Mouchel *et al.*, 1996). Em vertebrados a Lipovitelina é composta por uma cadeia pesada (LVI) com aproximadamente 120 kDa, e uma cadeia leve (LVII) com aproximadamente 30 kDa. Essa subunidade carrega até 20% de sua massa em moléculas de lipídio, que será utilizada para reserva energética para o embrião. A Fosfovítina possui altas concentrações de serina em sua composição, chegando a 50% em alguns vertebrados, sendo que a maioria dos resíduos são fosforilados. Isso confere uma afinidade por cátions, principalmente o Ca^{++} , importante na formação do esqueleto. O componente β é uma subunidade terminal da proteína e, ao contrário das outras, não possui lipídios e nem cátions associado. Pouco se sabe de sua função, tendo evidências de que possua um alto poder antígeno dessa subunidade, sendo provavelmente um dos principais indutores de anticorpos específicos para a vitelogenina (Anderson, 1998; Hiramatsu, 2005).

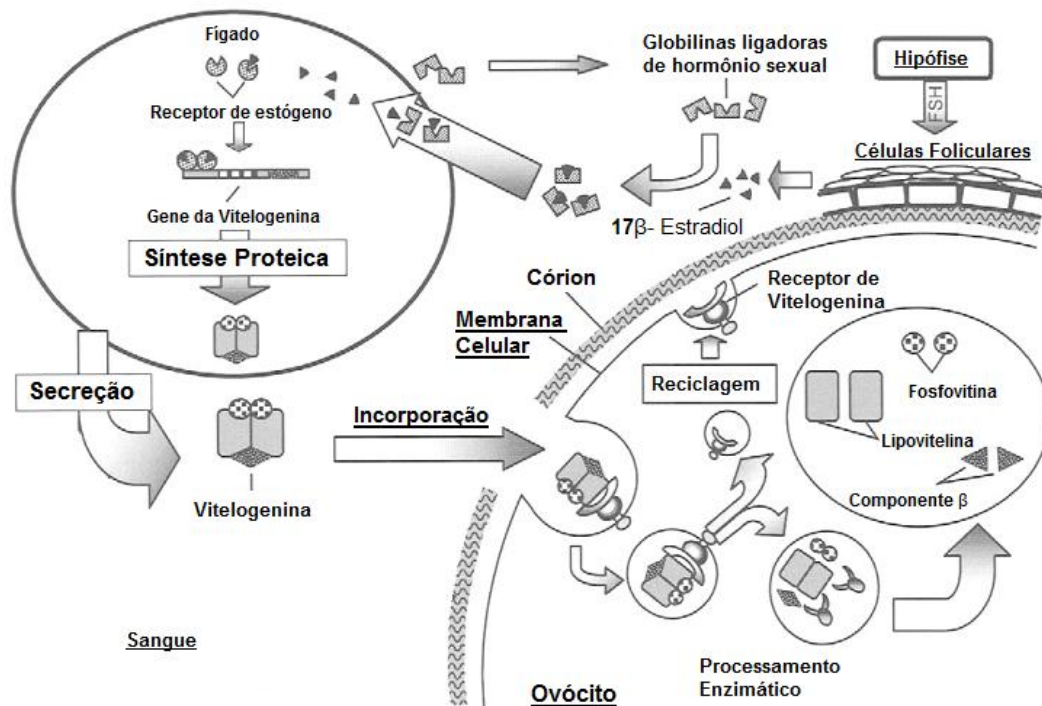


Figura 4 Processo de Vitelogenese
 Fonte: modificado de Hiramatsu, 2000

1.4.4 História evolutiva

A superfamília de proteínas de transferência de lipídios (LLTP) é um grupo antigo, onde estão inclusas a vitelogenina, apolipoproteínas (apolipoproteína I e II em invertebrados e a apolipoproteína B em vertebrados) e a proteína microsomal de transferência de triglicerídeos (MTP).

A vitelogenina é codificada por um pequeno número variável de genes, sendo um em ouriço-do-mar e no bicho da seda, três em aves, quatro em alguns anfíbios como a rã albina, seis em alguns nematelmintos ou de quatro a oito em peixes. Estudos comparativos anteriores baseados na sequência de aminoácidos e na organização dos genes, suportam a hipótese de uma origem evolutiva em comum da vitelogenina em invertebrados e vertebrados (Mouchel *et al.* 1996). Estima-se a origem por volta de 550 milhões de anos (Pré-cambriano), fazendo com que a vitelogenina seja um excelente marcador para estudos de evolução molecular (Byrne *et al.*, 1989).

Em invertebrados, a vitelogenese é induzida por hormônios esteroides semelhantes aos dos vertebrados. Os dois principais são: hormônio juvenil (JH) e o ecdisteroide. Ambos estão relacionados a mudanças importantes do

reprodutivo e a produção de vitelo. A semelhança entre invertebrados e vertebrados encontra-se no receptor para hormônios esteroides, uma vez que eles se encontram em uma superfamília e possuem um ancestral em comum. A grande diferença está na forma como a vitelogênese é induzida. Em vertebrados, dependendo do nível de estrógeno, é possível obter uma expressão tanto em fêmeas, quanto em machos e juvenis. Em invertebrados (principalmente insetos) a concentração de hormônio JH é a mesma tanto para machos, quanto para fêmeas. A expressão de vitelogenina é governada pela diferenciação sexual, sendo apenas as fêmeas capazes disso. Além da expressão, o órgão onde ocorrerá a síntese da vitelogenina muda conforme o filo (Tabela 1)(Byrne *et al*, 1989).

A estrutura da vitelogenina em diferentes filios é extremamente variada, apesar de apresentarem uma origem em comum. Na tabela 1 fica evidente a variedade de peso molecular que elas possuem. Em nematóides, a proteína é a mais simples encontrada. *C. elegans*, apesar de ser um organismo extremamente simples, possui seis subfamílias de VTG, com aproximadamente 95% de conservação entre mRNA's. Entre os invertebrados, os insetos possuem a vitelogenina mais semelhante com a dos vertebrados. Possuem um variado número de subfamílias entre as espécies, e a duplicação de VTG parece ser específica a uma ordem ou mesmo gênero, indicando duplicações múltiplas entre linhagens independentes (Byrne *et al*, 1989; Wuet *al*, 2013). Apesar de ainda haverem poucos dados na literatura comparando genes da vitelogenina entre espécies de invertebrados, sabe-se que o domínio fosfovitina aparece na linhagem dos vertebrados.

Em vertebrados, o padrão é o mesmo para insetos, possuindo um variado número de subfamílias. A presença da subunidade fosfovitina foi o marco evolutivo da VTG em vertebrados. Esta região está ausente no gene de *C. elegans*, e não há qualquer menção de uma proteína altamente fosforilada no vitelo de outros invertebrados. Desde o seu aparecimento em peixes, a região codificadora dessa subunidade expandiu-se em tamanho, provavelmente por sucessivos eventos crossing-over desiguais levando a duplicações, que são particularmente evidentes no gene *VtgII* de *Galus. galus*. Uma hipótese que se sugere é o fato dessa ser a subunidade responsável pela ligação de Ca^{++} , importante, no desenvolvimento embrionário, para a formação do esqueleto (Byrne *et al*, 1989).

Tabela 1 Características gerais da vitelogenese em diferentes espécies

Espécie	Tecido	Forma nativa (kDa)	Fosfovitina (kDa)
Invertebrados			
Nematódea <i>C. elegans</i>	Intestino	170-180	-
Poliqueta <i>P. cultifera</i>	Coelomocytes	530	-
Equinodermata <i>S. purpuratus</i>	Intestino (hermafroditas) Ovários Testículos	195	-
Insetos <i>M. sexta</i> <i>L. Migratória</i>	Gordura	500-550	-
Vertebrados			
Lampreia <i>I. unicuspis</i>	Não determinado	352	35
Carpas <i>C. auratus</i>	Fígado	380	7,6 – 14,5
Sapos <i>X. leavis</i>	Fígado	460	13 – 34
Galinha <i>G. galus</i>	Fígado	450-500	13 - 34

Fonte Byrne et al(1989)

Em *D. rerio*, a isoforma VTG III não possui a subunidade fosfovitina, sendo ela muito similar a dos invertebrados (Wang et al. 2000). Sua expressão encontrada no fígado de fêmeas é baixa e não possui regulação por ação de estrógenos. Sua função ainda não está bem elucidada, porém tem sido mostradas funções como participação na coagulação e na atividade antibacteriana (Wu et al, 2013).

1.5 VITELOGENINA COMO BIOMARCADOR

Define-se ecotoxicologia como um ramo da ciência, que avalia os efeitos dos poluentes ambientais para populações naturais nos diversos níveis de organização biológica, incluindo também as análises de risco para exposição humana. O biomonitoramento é o método utilizado para a observação dos fenômenos relacionados aos impactos de fatores externos nos ecossistemas e seu desenvolvimento temporal. Através do biomonitoramento é possível avaliar comparativamente áreas impactadas em diferentes níveis com áreas isentas. Para realizar um estudo de biomonitoramento, são utilizados os bioindicadores, que são representados por organismos de uma dada espécie ou uma comunidade de organismos que contém informações sobre a qualidade daquele ambiente (ou parte dele) (Lazorchak *et al.* 2003). Biomarcadores por sua vez são definidos como mudanças no padrão de um determinado tipo resposta biológica relacionado com a exposição a agentes químicos xenobióticos. Os biomarcadores podem estar representados em diferentes níveis de organização biológica, desde repostas moleculares ou variações do número de indivíduos em uma dada população. A degradação dos ambientes monitorados podem ser quantificada, conforme o nível de complexidade, variando de efeitos precoces (nível molecular) à efeitos tardios (nível de ecossistemas) (Figura 5) (Oost, 2003).

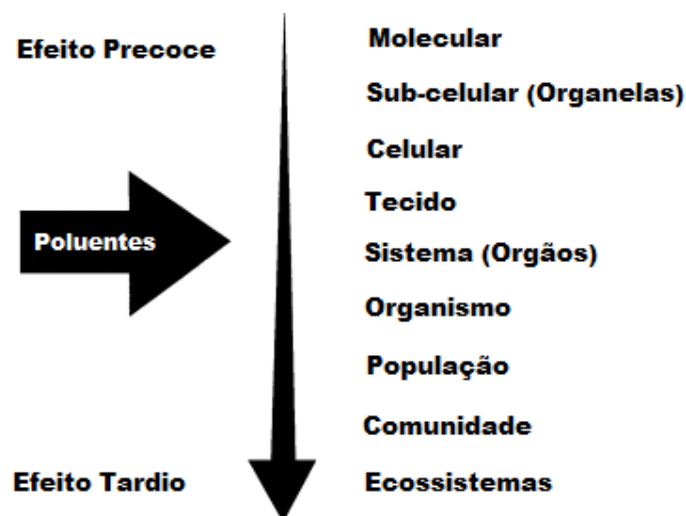


Figura 5 Ordem sequencial de resposta a poluentes.
Modificado de Oost, 2003.

Para um estudo de biomonitoramento é desejável que sejam utilizados diferentes tipos de biomarcadores, o que vai possibilitar um diagnóstico mais preciso e confiável. Neste contexto são vários os tipos de biomarcadores que podem ser utilizados (Tabela 2)

Tabela 2. Ferramentas para estudos de biomonitoramento em seus níveis.

Níveis	Tipos de ensaios
Molecular	
Danos a Macromoléculas	Ensaio Cometa (DNA) (Duez <i>et al.</i> 2003) Peroxidação lipídica (JIANG <i>et al.</i> , 1991, 1992) Carbonilação de proteínas (LEVINE <i>et al.</i> , 1994)
Desregulação endócrina	Detecção de vitelogenina (D D Moura Costa <i>et al.</i> 2010) Atividade da aromatase (Benachour <i>et al.</i> , 2007)
Defesas antioxidantes	Atividade da GST (KEEN <i>et al.</i> , 1976) Concentração de tióis não proteicos (SEDLAK e LINDSAY, 1968) Atividade da Catalase (AEBI, 1984)
Celular	Cultivo celular e citotoxicidade (Liebel <i>et al.</i> , 2011)
Tecidual	Análises histopatológicas em tecidos alvos (OLIVEIRA RIBEIRO <i>et al.</i> , 2002)
Organismo	Índices somáticos (hepatosomático, fator de condição, gonadosomático e morfometria) (Osório <i>et al.</i> , 2013)
População	Mensuração de variações populacionais (Saravanabhavan <i>et al.</i> 2013)

Fonte: O autor (2013)

1.5.1 Bioindicadores

Os peixes podem ser considerados bons bioindicadores, pois além de apresentarem características que colaborem com seu uso em diferentes desenhos experimentais, eles estão em contato direto com o ambiente aquático, o qual pode apresentar elevadas concentrações e diversidade de poluentes. Além disso, várias espécies de peixes se posicionam em diferentes níveis tróficos da cadeia alimentar, podendo bioacumular uma maior concentração destes compostos em relação a outros modelos animais (Yamamoto, 2011). Com relação ao presente trabalho, os peixes possuem o sistema endócrino semelhante à maioria dos mamíferos, e são portanto, organismos ideais para estudos com DE's tanto em laboratório como em ambientes naturais (Pait and Nelson 2002).

A detecção da vitelogenina no plasma de peixes é, provavelmente, a técnica mais utilizada para estudos de DE's em biomonitoramento. Um ambiente contaminado com substâncias estrogênicas pode induzir a produção de vitelogenina em machos adultos e juvenis, podendo ser detectado a partir de níveis mRNA's que codificam para a vitelogenina à imunodeteção por ELISA e Western Blot (Daniele Dietrich Moura Costa 2012b; Viarengo *et al.* 2007).

No presente estudo, foram utilizadas três espécies de peixes nativas: *Rhamdia quelen*, *Piaractus mesopotamicus* e *Prochilodus lineatus*.

A espécie *Rhamdia quelen* pertence à ordem dos Siluriformes e família Heptapteridae. É uma espécie de água doce distribuída desde a América central à região central da Argentina. Apresenta hábito noturno, é bentônica, possui hábito alimentar forrageiro com preferências por zooplânctos e crustáceos bentônicos (Fishbase, acesso em 2013).. A espécie *Piaractus mesopotamicus* pertence a ordem dos Characiformes e família Serrasalminidae. É uma espécie de água doce distribuída nas bacias do rio Paraná a bacia do rio Paraguai. Apresenta hábito diurno, migratório, vivendo em grupos de 7 a 10. Possui um hábito alimentar bastante diversificado, variando as fontes em função da sazonalidade, predominando a herbivoria (Abimorad e Carneiro, 2004). A espécie *Prochilodus lineatus* pertence a ordem dos Characiformes e família Prochilodontidae. É uma espécie de água doce distribuída nas bacias do rio Paraíba, passando pela bacia do rio Paraná e bacia do rio Paraguai. Possui um hábito alimentar detritívoro, dando a ele um comportamento bentônico forrageiro (Galdioli *et al.*, 2002). A figura 6 mostra a distribuição dessas espécies na América do Sul.

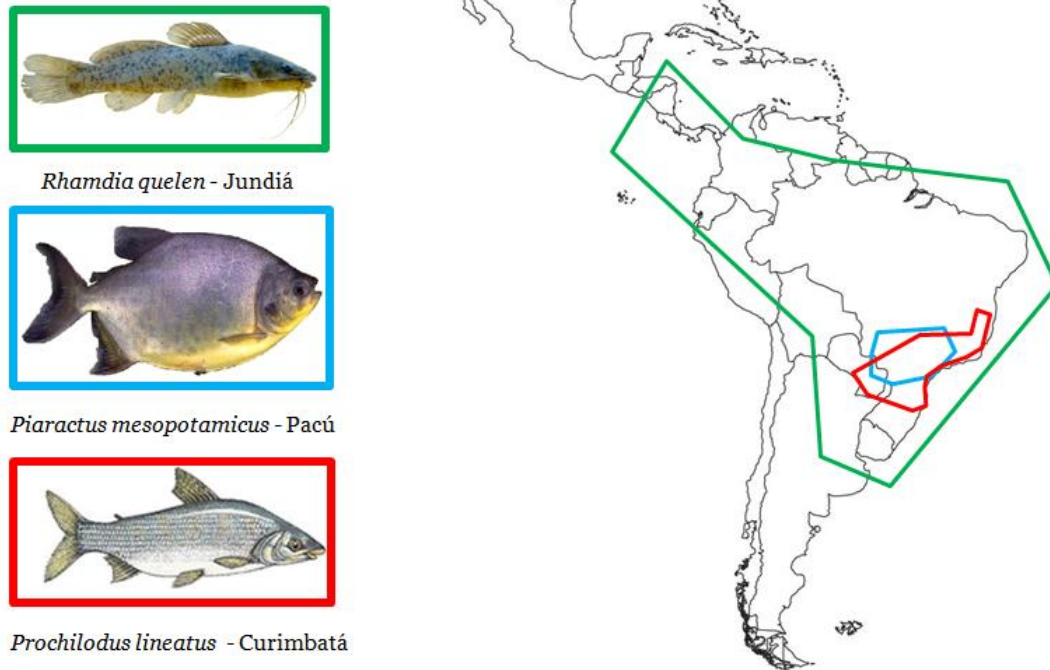


Figura 6. Distribuição das espécies na América do Sul.
Fonte: O autor

1.6 IMUNOLOGIA

A função do sistema imune nos seres vivos é fundamental para sua sobrevivência, sendo ele responsável pela defesa contra moléculas e organismos estranhos ao organismo. Pode ser dividido em dois tipos: inato e adaptativo.

O sistema imune inato, também conhecido como sistema imune natural, é a linha de defesa inicial contra microrganismos, consistindo em mecanismos celulares e bioquímicos. Os principais componentes desse sistema são: barreiras físicas (ex. epitélios), células fagocitárias (neutrófilos e macrófagos), células *natural killers* (NK), proteínas plasmáticas que formam o sistema complemento, citocinas que regulam e comandam as demais células. O sistema imune inato é fixo, ou seja, não possui capacidade de adaptar-se ao ambiente (Abbas *et al.*, 2008; Conroy *et al.*, 2009).

O sistema imune adaptativo, ao contrário do inato, possui capacidade de adaptar-se. A exposição a antígenos faz com que uma série de reações seja desencadeada. A mediação fica a cargo dos linfócitos, células capazes de atacar o agente infeccioso (Linfócitos T) e a produção de moléculas específicas a eles denominada imunoglobulinas ou anticorpos (Linfócitos B)

1.6.1 Antígeno e Anticorpo

Antígeno é definido como qualquer substância capaz de ativar uma resposta imune. Essa resposta vai depender do receptor em células de linfócitos ao qual o antígeno será apresentado. Essa capacidade ativação do sistema imune é denominada imunogenicidade. Quando se refere à capacidade de um antígeno ligar-se a um anticorpo ou receptor de linfócito T, denomina-se antigenicidade. Somente macromoléculas são capazes de ativar linfócitos B a produzirem anticorpos e somente antígenos proteicos são ligados a linfócitos T. Outros tipos de substâncias podem ligar-se a anticorpos, mais por si só não são capazes de estimular sua produção. A reatividade dos antígenos reside em uma pequena porção da molécula, denominada epítopo. Quando se trata de uma proteína, o epítopo geralmente possui de 5 a 7 resíduos de aminoácidos (Abbas *et al* 2008; Van Regenmortel, 1982).

As imunoglobulinas ou anticorpos são moléculas exclusivas de vertebrados e que são produzidas mediante a exposição de antígenos, ligando-se a uma grande variedade de antígenos. Os anticorpos possuem duas formas: a primeira fica ancorada a membrana celular dos linfócitos, sendo esse responsável pelo reconhecimento inicial do antígeno fazendo assim a ativação da célula. A segunda forma é, depois de ativada, secretada para o soro, ligando-se aos seus antígenos correspondentes. A função efetora dos anticorpos incluem neutralização de microrganismos ou seus produtos, ativação de sistema complemento, opsonização dos patógenos a fim de aumentar a fagocitose, citotoxicidade mediada por anticorpos e hipersensibilidade imediata via ativação de mastócitos (Abbas *et al* 2008).

A molécula de anticorpo possui uma estrutura básica, formada por quatro cadeias polipeptídicas, sendo duas pesadas (50 kDa cada) e duas leves (25 kDa cada). As cadeias têm ambas as regiões constantes e variáveis. A cadeia pesada tem uma região variável (VP), que é responsável pela ligação de antígenos e três regiões constantes (CP₁, CP₂ e CH₃). A cadeia leve possui uma região variável (VL), que é uma parte importante do sítio de ligação ao antígeno e uma região constante (CL) (Figura 6)(Conroy *et al.* 2009).

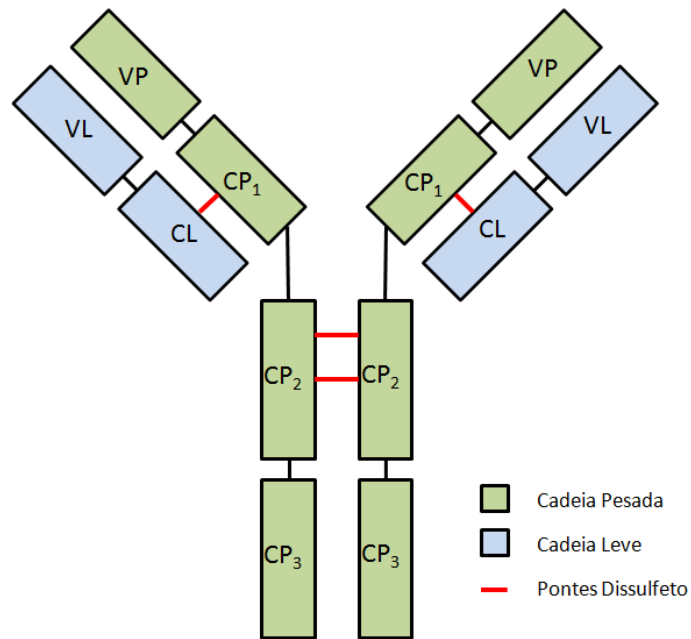


Figura 7 Estrutura básica de um anticorpo.
Modificado de Conroy *et al* (2009).

Existem cinco classes de imunoglobulina, que se distinguem pelas suas cadeias pesadas: IgA, IgG, IgM, IgD e IgE. A troca de classe de cadeia pesada durante o rearranjo do gene dá origem ao isotipo da imunoglobulina. A região CH1, CH2 e CH3 confere as funções efetoras, tais como a ativação do complemento no anticorpo. A ligação do antígeno é mediada pela variável leve (VL) e pesada (domínios VP), que unem as regiões hipervariáveis do anticorpo conhecido como regiões determinantes de complementaridade (RDC's). As regiões constantes dos anticorpos são geralmente conservadas com apenas pequenas diferenças na sequência encontradas para as diferentes classes de anticorpos. No entanto, as RDC apresentam um nível elevado de diversidade de sequências(Conroy *et al.* 2009).

1.6.2 Produção de anticorpos

A produção de anticorpos tornou-se essencial para estudos em diversas áreas do conhecimento, desde estruturas moleculares em células a tratamento de várias doenças (Ishida *et al.* 2002).

Existem basicamente dois tipos de anticorpos: os policlonais e os monoclonais, diferenciando-se pela forma de produção e número de epítomos

que reconhecem. Um antígeno pode possuir vários epítomos diferentes. Ao entrar em contato com o sistema imune de um determinado organismo, vários desses epítomos irão ser apresentados, produzindo uma população de Linfócitos B que secretará anticorpos para os vários epítomos do antígeno. Esse tipo de anticorpo é denominado policlonal, uma vez que cada Linfócito B produz um tipo de anticorpo que reconhece um dado epítomo do antígeno. O conjunto desses anticorpos pode também ser denominado soro policlonal (Costa 2012a).

Os soros policlonais são amplamente utilizados em estudos em biologia molecular, sendo eles de fácil produção e com custos menores, quando comparados à produção de anticorpos monoclonais. Outra vantagem na produção do soro policlonal é o fato de que quando se trata de técnicas que necessitam alterar a estrutura da proteína de interesse, como por exemplo a desnaturação e a fixação, a probabilidade de que algum anticorpo se ligue é alta, melhorando a sensibilidade do método. Esse tipo de soro é limitado a alguns procedimentos, como kits de diagnósticos e tratamento de doenças (Costa 2012a).

Os antissoros são produzidos através da imunização de animais com antígenos total ou parcialmente purificados, sendo que tais antígenos em geral são proteínas estranhas ao animal. Hoje em dia, normalmente se purificam e concentram as proteínas, quando se pretende imunizar animais para obtenção de antissoro. No entanto, se a proteína em questão for sensível a degradação durante sua purificação, outros métodos para seu isolamento podem ser alternativas. Proteínas que são difíceis de serem purificadas em suas formas nativas podem ser separadas por SDS-PAGE e a banda correspondente a proteína de interesse pode ser recortada diretamente do gel e homogeneizada em solução tamponante para proceder-se a imunização (Costa 2012).

1.6.3 Imunoensaios

Os imunoensaios dependem do tipo de experimento que se quer realizar e do objetivo a ser encontrado. Eles podem ser quantitativos (Ex. RIA e ELISA) e qualitativos (Ex. *Western Blot* e imunohistoquímica). O *western blot* é uma técnica desenvolvida em 1975 e envolve primeiramente a separação das proteínas de acordo com seu peso molecular em um gel de poliacrilamida; estas são então transferidas para uma membrana de nitrocelulose, sendo

depois feita uma reação antígeno-anticorpo que visa o reconhecimento de uma proteína específica. A reação é evidenciada por um sistema de detecção que envolve o uso de imunoglobulinas específicas para o anticorpo anteriormente utilizado, conjugadas a uma enzima e também o uso de substrato específico para a enzima em questão (Abbas *et al.*, 2008; Costa, 2012).

1.7 USO DE IMUNOMARCADORES NO BIOMONITORAMENTO

Os anticorpos podem ser considerados biossensores, e segundo Conroy (2009) e colaboradores estes são moléculas biológicas capazes de se ligarem a outras, gerando um sinal.

Sua utilização no biomonitoramento é recente e ainda carece de vários fatores. No caso da vitelogenina, a ocorrência em peixes machos pode indicar a presença de desreguladores endócrinos no meio. A produção de anticorpos e para a detecção da vtg têm sido amplamente utilizadas em estudos de biomonitoramento da presença de DE's estrogênicos (Prakash *et al.*, 2007).

A produção de anticorpos é um processo demorado e caro, que depende de uma série de fatores como a obtenção da proteína purificada e a obtenção de animais para serem imunizados. Estudos de biomonitoramento dependem da obtenção de indivíduos residentes no local de estudo, onde na maioria das vezes são espécies nativas, podendo chegar a dezenas delas. Devido ao fato da proteína vitelogenina ser conservada, o reconhecimento da vitelogenina de uma dada espécie pelo anticorpo anti-vitelogenina produzido para outras espécies pode ser possível, minimizando gastos e esforço, uma vez que a obtenção de anticorpos para todas as espécies é inviável.

Em face disso, o mais comum é verificar se os anticorpos produzidos contra uma dada proteína de uma espécie são capazes de reconhecer esta mesma proteína em outras espécies. Caso o reconhecimento seja adequado não há a necessidade de se produzirem anticorpos para estas segundas espécies. Caso a reação não se mostre satisfatória é um indicativo de que possivelmente será necessário produzir um novo anticorpo que seja capaz de reconhecer a proteína desta segunda espécie. O presente trabalho tem como hipótese que anticorpos policlonais anti-vitelogenina das espécies *Rhamdia*

quelen, *Prochilodus lineatus* e *Piaractus mesopotamicus* poderão reconhecer entre si e de forma inespecífica a vitelogenina desta espécie

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Verificar se o anticorpo anti-vitelogenina de *Rhamdia quelen*, *Prochilodus lineatus* e *Piaractus mesopotamicus* reconhecem de forma específica e interespecie a vitelogenina destas espécies entre si, utilizando ensaios de *western blot*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Utilizar os anticorpos policlonais anti-vitelogenina de *Rhamdia quelen* para verificar se os mesmos reconhecem a vtg de *Rhamdia quelen*, *Prochilodus lineatus* e *Piaractus mesopotamicus*.

Utilizar os anticorpos policlonais anti-vitelogenina de *Piaractus mesopotamicus* para verificar se os mesmos reconhecem a vtg de *Rhamdia quelen*, *Prochilodus lineatus* e *Piaractus mesopotamicus*,

Utilizar os anticorpos policlonais anti-vitelogenina de *Prochilodus lineatus* para verificar se os mesmos reconhecem a vtg de *Rhamdia quelen*, *Prochilodus lineatus* e *Piaractus mesopotamicus*,

Caso o reconhecimento seja positivo, verificar qual a diluição mais adequada dos anticorpos (ensaio de titulação) e qual concentração total de proteínas em que a diluição testada anteriormente é capaz de reconhecer a vitelogenina (ensaio de sensibilidade).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 INDUÇÃO ESTROGÊNICA

Essa etapa foi desenvolvida por Costa (2012). Para a indução estrogênica do processo de vitelogênese, foram utilizados 30 animais experimentais, todos provenientes da Piscicultura Panamá, sendo todos

adultos (1ano). Foram utilizados 10 indivíduos de cada espécie estudada (*R. quelen*, *P. mesopotamicus* e *P. lineatus*). Todos eram machos injetados intraperitonealmente com 10 mg de 17 β estradiol por quilograma de massa corpórea (10 mg.kg⁻¹E₂) (CARRERA et al.,2007;PAIT e NELSON, 2003; ZAROOGIANet al.,2001). O hormônio 17 β estradiol foi escolhido para a indução da vitelôgenese por ser o hormônio endógeno de fêmeas e que portanto, representa a mais realística condição fisiológica. Para a exposição o hormônio foi solubilizado em óleo de canola devido às suas propriedades lipofílicas. Durante o período experimental os animais forma alimentados diariamente, uma vez ao dia, *ad libitum*.

3.2 COLETA E PROCESSAMENTO DO MATERIAL BIOLÓGICO

Essa etapa foi desenvolvida por Moura Costa (2012). A coleta do material biológico foi realizada 15 dias após a indução estrogênica experimental (CARRERAet al.,2007;PAIT eNELSON, 2003,MOURA-COSTA et al.,2010). O sangue foi coletado com o animal ainda vivo,conforme procedimento descrito por Silversand et al.(1993), e ao sangue total foi acrescentado o anti-proteolítico PMSF a 1mM. A mistura foi centrifugada a 4°C, sob a força de 3000 g por 30 min para obtenção do plasma, que foi alíquotado, e mantido a temperatura de-75°C para análises posteriores por SDS-PAGE e western blot.

Amostras de plasma de indivíduos de todos os grupos tiveram sua quantificação proteica previamente determinada pelo método de BRADFORD (1976) e foram preparadas em tampão de amostra redutor. As amostras de plasma de todos os indivíduos foram analisadas por eletroforese por SDS-PAGE a 4% (gel de empilhamento) e a 8% (separação), com aplicação de campo elétrico vertical (LAEMMLI, 1970).

3.3 PRODUÇÃO DO SORO POLICLONAL

Essa etapa foi desenvolvida por Moura Costa (2012). Após o SDS-PAGE, o gel foi corado com Azul de Comassie e descorado em solução de Destain (metanol 40%, ácido acético 10% em água). O gel foi então lavado 3 vezes de 1 h cada com água destilada e a banda correspondente a vitelogenina foi recortada do gel e macerada com auxílio de grau e pistilo em

PBS. Um coelho macho da raça New Zeland foi mantido no biotério do Setor de Ciências Biológicas para a produção do soro policlonal. O coelho foi então imunizado, com aproximadamente 0,5 mg da VTG isolada do gel, distribuída por duas vias (mesma seringa): intramuscular e subcutânea. Após 15 dias a mesma dose foi administrada como descrito acima. Quinze dias após a segunda inoculação foi realizada uma terceira com cerca de 0,25 mg de VTG conforme descrito anteriormente. Finalmente, quinze dias após a terceira inoculação, uma quarta foi realizada da mesma forma que a terceira. Logo após a segunda e terceira inoculações foram coletados cerca de 5 ml de sangue do animal pela veia auricular marginal, para verificação da produção dos anticorpos. Ao final de 60 dias o sangue do animal foi coletado pela veia auricular marginal.

Os procedimentos descritos nos itens 3.1, 3.2 e 3.3 obedeceram às normas propostas pelo Comitê de Ética do Setor de Ciências Biológicas (Certificado número 314).

3.4 ENSAIO DE TITULAÇÃO DO ANTICORPO

O ensaio de titulação dos anticorpos visa verificar se os anticorpos produzidos reconhecem a vitelogenina das espécies em questão e em qual diluição.

Amostras de plasma dos indivíduos de todos os grupos foram submetidas ao processo de imunodeteção da vitelogenina por western blot. Primeiramente proteínas totais do plasma foram resolvidas por SDS-PAGE. A concentração utilizada está descrita na tabela 3. Após a corrida eletroforética, as proteínas foram eletrotransferidas para uma membrana de nitrocelulose (poro 0,45µm). Após a transferência a membrana foi corada com Ponceau's para análise da eletroforese e da transferência. Após a retirada total do corante, a membrana foi bloqueada por 1 h com 5% leite sem gordura e incubada por 16 h a 4°C com o anticorpo anti-vitelogenina (como descrito nos objetivos específicos) em diluições descritas no anexo 1. A membrana foi então lavada três vezes com TBS-T para a remoção dos anticorpos não ligados e incubada por 1 h com anti-imunoglobulina de coelho conjugada à peroxidase (KPL®), em uma diluição de 1:4000. A reação foi evidenciada utilizando substrato quimioluminescente (Pierce ECL, AmershamBiosciences,

Piscataway, NJ) sobre a membrana, que exposta a um filme de raio-X sensível (Amershambiosence).

Tabela 3 Concentração de proteínas utilizadas.

Anticorpo anti-vtg	Proteínas totais do plasma		
	<i>R. quelen</i>	<i>P. mesopotamicus</i>	<i>P. lineatus</i>
<i>R. quelen</i>	10 µg	100 µg	50 µg
<i>P. mesopotamicus</i>	100 µg	50 µg	100 µg
<i>P. lineatus</i>	100 µg	100 µg	12,5 e 25 µg

Fonte: O autor (2013)

3.5 TESTE DA SENSIBILIDADE DOS ANTICORPOS

Após a escolha da diluição dos anticorpos onde os mesmo reconheciam de forma específica a vtg das espécies em questão, as amostras de plasma dos indivíduos de todos os grupos foram submetidas ao processo de imunodeteção da vitelogenina por western blot, onde concentração de proteína foi variada de 1 a 100 µg. O procedimento 3.4 foi repetido.

4. RESULTADOS

4.1 REAÇÃO ENTRE O ANTICORPO ANTI-VTG DE *R. quelen* E A VTG DE *R. quelen* (TITULAÇÃO E SENSIBILIDADE)

O teste de titulação do anticorpo mostrou uma alta taxa de inespecificidade nas diluições de 1:500 á 1:64000, utilizando 100 µg totais de proteína. Foram necessários testes com 50µg e 10µg de proteínas, sendo necessário aumentar a diluição até 1:160000. A especificidade inicia-se na diluição de 1:120000.

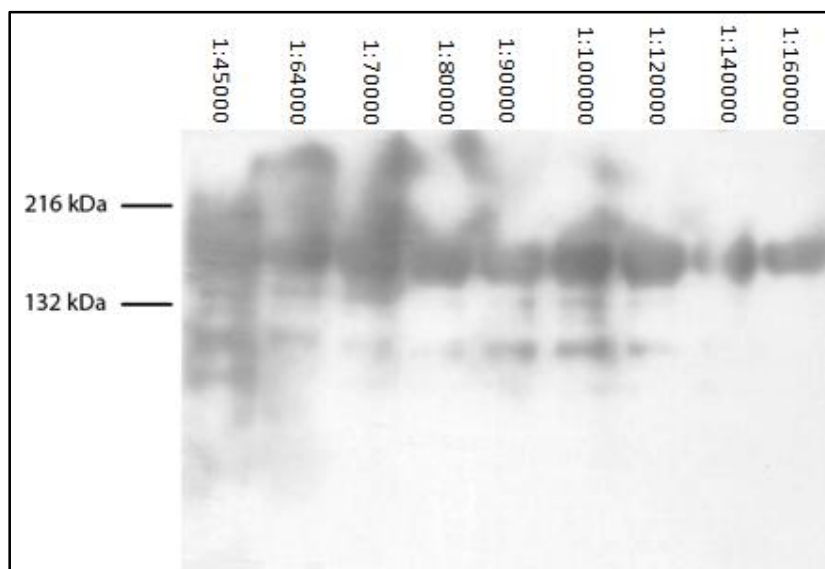


Figura 8. Anticorpo anti-vtg de *Rhamdia quelen* X Vitelogenina de *Rhamdia quelen*. Diluições de 1:45000 a 1:160000, utilizando 10 µg de proteínas totais. 40 minutos de revelação

Para o teste de sensibilidade, foi utilizada a diluição de 1:140000, variando a concentração de 1 a 10 µg de proteínas totais. A especificidade ocorre em 1 µg de proteínas totais, sendo que pode haver especificidade em quantidades menores.

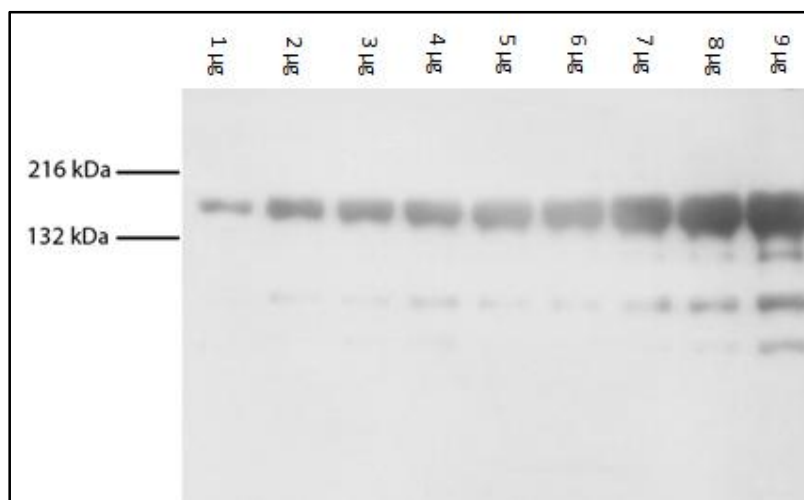


Figura 9. Anticorpo anti-vtg de *Rhamdia quelen* X Vitelogenina de *Rhamdia quelen*. Concentrações de 1 µg a 9 µg de proteínas totais, utilizando diluição de 1:140000 5 minutos de revelação.

4.2 REAÇÃO ENTRE O ANTICORPO ANTI-VTG DE *P. mesopotamicus* E A VTG DE *R. quelen* (TITULAÇÃO E SENSIBILIDADE)

O teste de titulação do anticorpo mostrou uma alta taxa de inespecificidade nas diluições de 1:500 á 1:16000, utilizando 100µg totais de proteína. Não houve reação de 1:32000 a 1:64000.

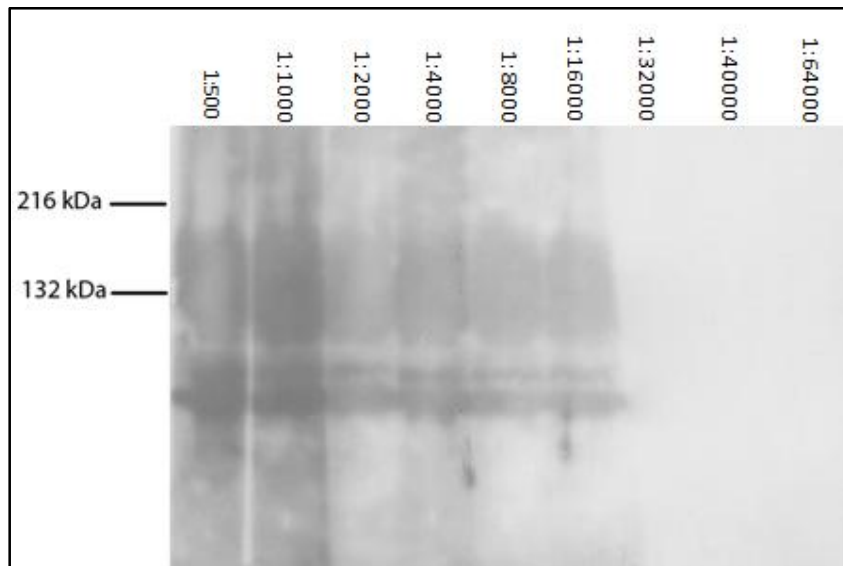


Figura 10. Anticorpo anti-vtg de *P. mesopotamicus* X Vitelogenina de *R. quelen*. Diluições de 1:500 a 1:64000 utilizando 100 µg de proteínas totais. 40 minutos de revelação.

Devido à ausência de reação específica, não foi realizado o teste de sensibilidade.

4.3 REAÇÃO ENTRE O ANTICORPO ANTI-VTG DE *P. lineatus* E A VTG DE *R. quelen* (TITULAÇÃO E SENSIBILIDADE)

O teste de titulação do anticorpo mostrou uma alta taxa de inespecificidade nas diluições de 1:500 á 1:16000, utilizando 100µg totais de proteína. Não houve reação de 1:32000 a 1:64000.

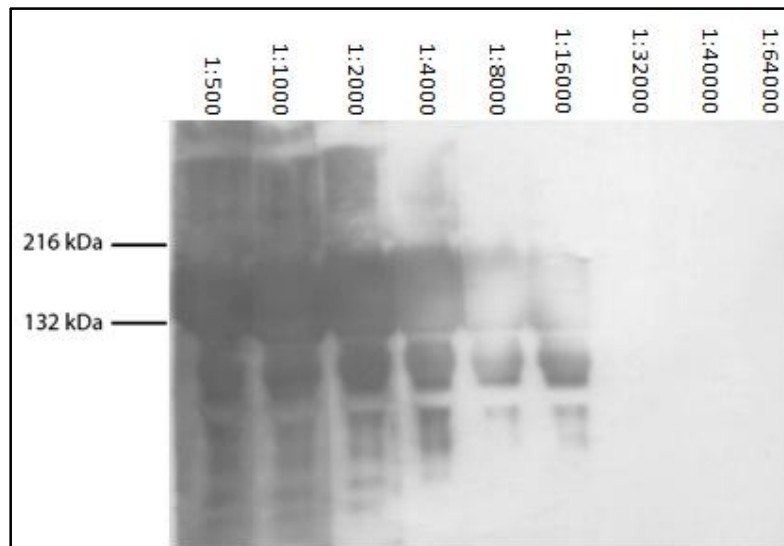


Figura 11. Anticorpo anti-vtg de *P. Lineatus* X Vitelogenina de *R. quelen*. Diluições de 1:500 a 1:64000 utilizando 100 µg de proteínas totais. 40 minutos de revelação.

Devido à ausência de reação específica, não foi realizado o teste de sensibilidade.

4.4 REAÇÃO ENTRE O ANTICORPO ANTI-VTG DE *R. quelen* E A VTG DE *P. mesopotamicus* (TITULAÇÃO E SENSIBILIDADE)

O teste de titulação do anticorpo mostrou uma alta taxa de inespecificidade nas diluições de 1:500 á 1:16000, utilizando 100µg totais de proteína. A especificidade inicia-se na diluição de 1:320000, tendo sua diluição ideal em 1:64000.

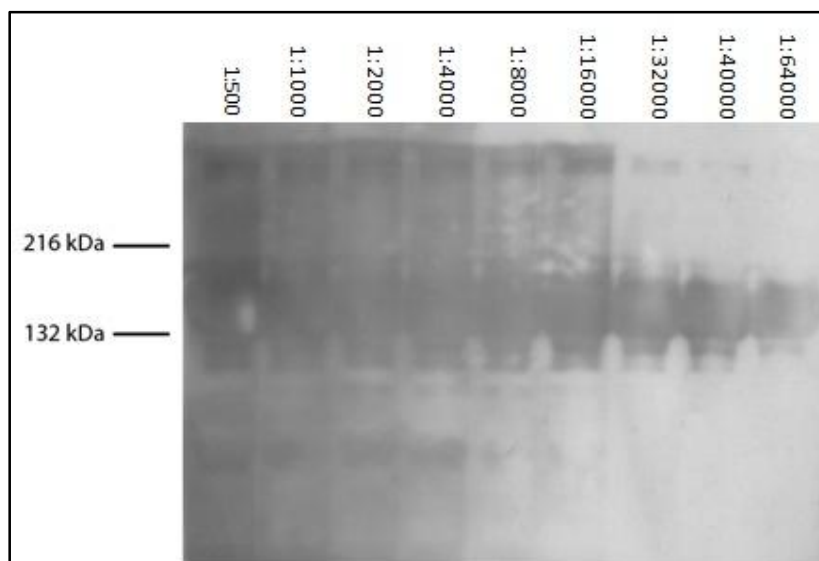


Figura 12. Anticorpo anti-vtg de *R. quelen* X Vitelogenina de *P. mesopotamicus*. Diluições de 1:500 a 1:64000, utilizando 100 µg de proteínas totais. 20 minutos de revelação

Para o teste de sensibilidade, foi utilizada a diluição de 1:64000 variando a concentração de 1 a 100 µg de proteínas totais. A especificidade ocorre em 10 µg e 20 µg de proteínas totais, sendo possível especificidade em quantidades menores que 10 µg.

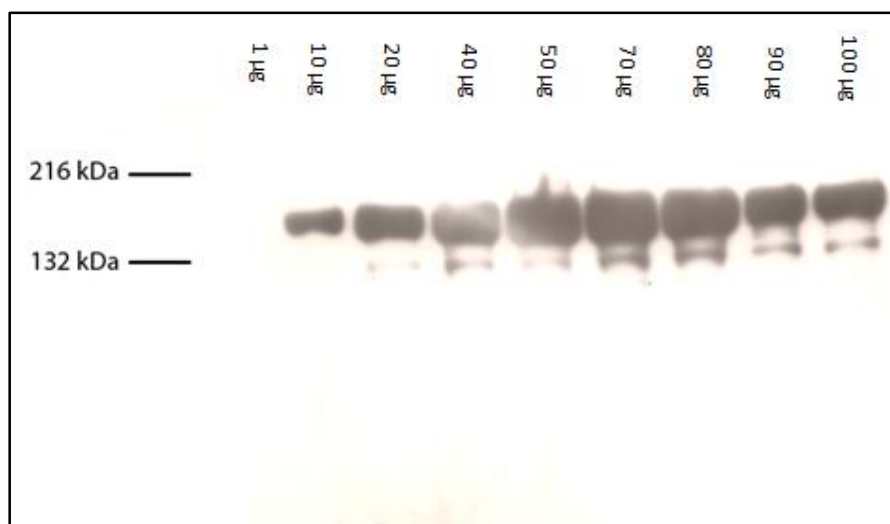


Figura 13. Anticorpo anti-vtg de *R. quelen* X Vitelogenina de *P. mesopotamicus*. Concentrações de 1 µg a 100 µg de proteínas totais, utilizando diluição de 1:640000 15 minutos de revelação.

4.5 REAÇÃO ENTRE O ANTICORPO ANTI-VTG DE *P. mesopotamicus* E A VTG DE *P. mesopotamicus* (TITULAÇÃO E SENSIBILIDADE)

O teste de titulação do anticorpo mostrou uma alta taxa de inespecificidade nas diluições de 1:500 á 1:64000, utilizando 100µg totais de proteína. Foram necessários testes com 50 µg de proteínas, sendo necessário

aumentar a diluição até 1:80000. A especificidade inicia-se na diluição de 1:64000.

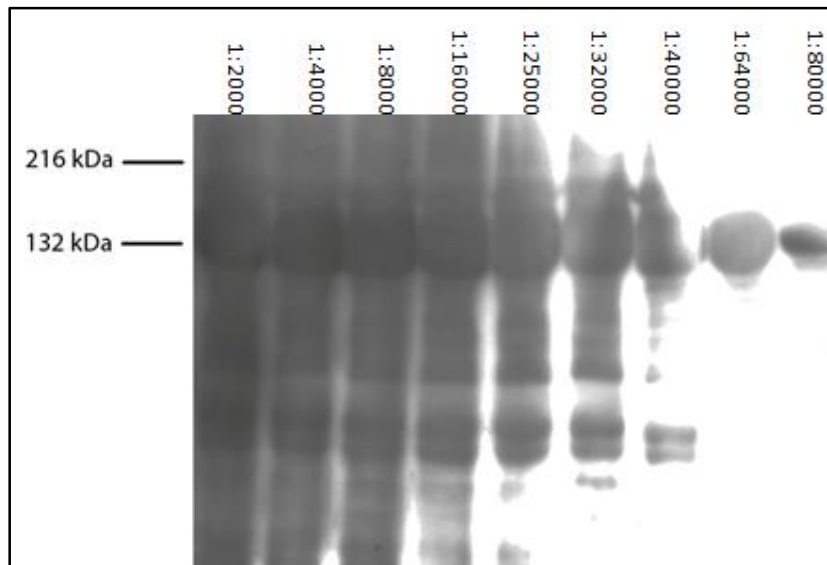


Figura 14. Anticorpo anti-vtg de *P. mesopotamicus* X Vitelogenina de *P. mesopotamicus*.
Diluições de 1:2000 a 1:80000, utilizando 50 µg de proteínas totais.
15 minutos de revelação.

Para o teste de sensibilidade, foi utilizada a diluição de 1:64000, variando a concentração de 1 a 50 µg de proteínas totais. A especificidade ocorre em 25 µg de proteínas totais, sendo possível haver especificidade em quantidades menores que 1 µg de proteínas totais.

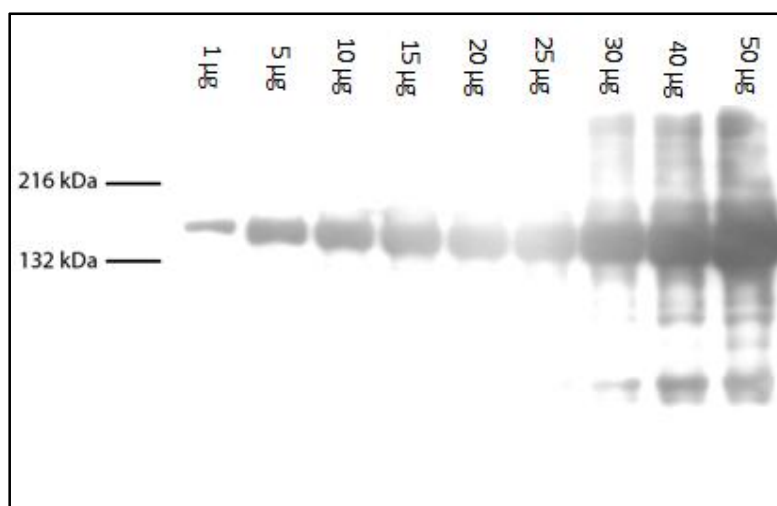


Figura 15. Anticorpo anti-vtg de *P. mesopotamicus* X Vitelogenina de *P. mesopotamicus*.
Concentrações de 1 µg a 50 µg de proteínas totais, utilizando diluição de 1:640000
5 minutos de revelação.

4.6 REAÇÃO ENTRE O ANTICORPO ANTI-VTG DE *P. lineatus* A VTG DE *P. mesopotamicus* (TITULAÇÃO E SENSIBILIDADE)

O teste de titulação do anticorpo mostrou uma alta taxa de inespecificidade nas diluições de 1:500 á 1:16000, utilizando 100µg totais de proteína. A especificidade ideal inicia-se na diluição de 1:320000.

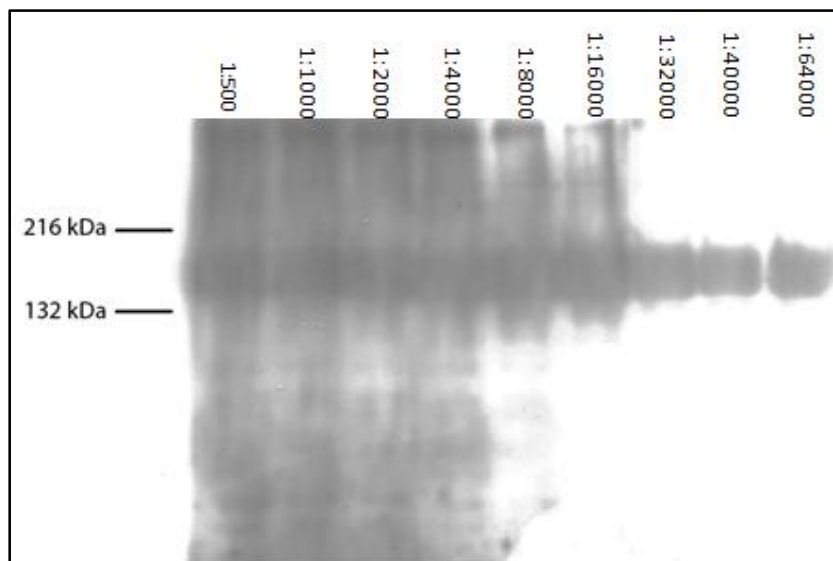


Figura 16. Anticorpo anti-vtg de *P. lineatus* X Vitelogenina de *P. mesopotamicus*. Diluições de 1:500 a 1:64000, utilizando 100 µg de proteínas totais. 40 minutos de revelação.

Para o teste de sensibilidade, foi utilizada a diluição de 1:64000, variando a concentração de 1 a 100 µg de proteínas totais. A especificidade ocorre entre 10 e 20 µg de proteínas totais, sendo possível haver especificidade em quantidades menores que 10 µg.

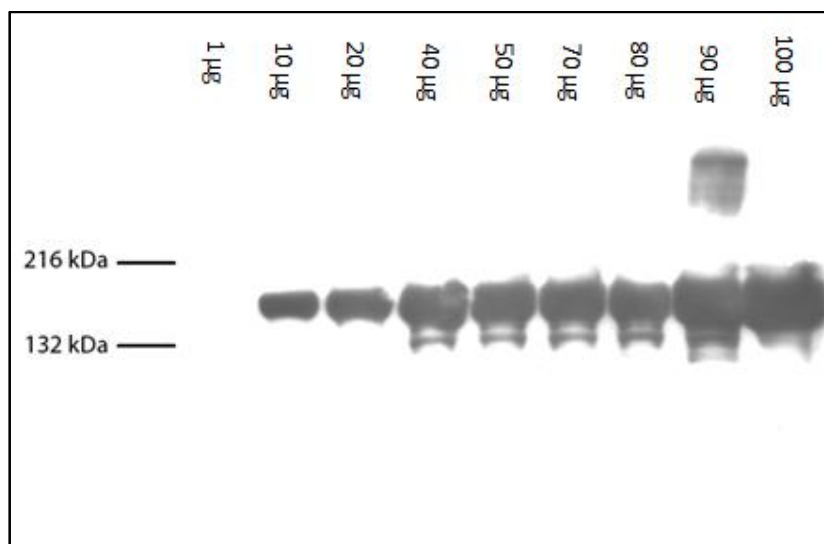


Figura 17. Anticorpo anti-vtg de *P. lineatus* X Vitelogenina de *P. mesopotamicus*. Concentrações de 1 µg a 100 µg de proteínas totais, utilizando diluição de 1:640000. 10 minutos de revelação.

4.7 REAÇÃO ENTRE O ANTICORPO ANTI-VTG DE *R. quelen* E A VTG DE *P. lineatus* (TITULAÇÃO E SENSIBILIDADE)

O teste de titulação do anticorpo mostrou uma alta taxa de inespecificidade nas diluições de 1:500 á 1:64000, utilizando 100µg totais de proteína. Foram necessários testes com 50µg de proteínas, mantendo as diluições. A especificidade inicia-se na diluição de 1:800, tendo seu ideal na diluição de 1:40000.

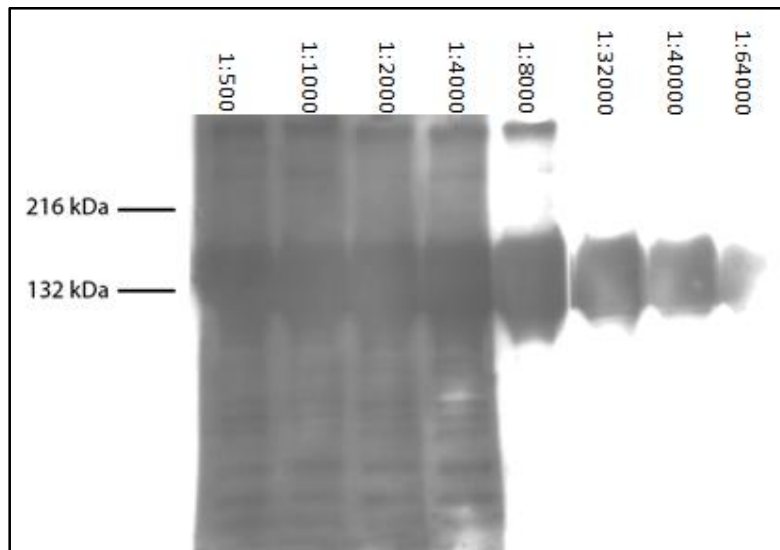


Figura 18. Anticorpo anti-vtg de *R. quelen* X Vitelogenina de *P. lineatus*. Diluições de 1:500 a 1:64000, utilizando 50 µg de proteínas totais. 20 minutos de revelação.

Para o teste de sensibilidade, foi utilizada a diluição de 1:40000, variando a concentração de 1a 50 µg de proteínas totais. A especificidade ocorre em todas as concentrações de proteínas totais, sendo possível haver especificidade em quantidades menores que 1 µg.

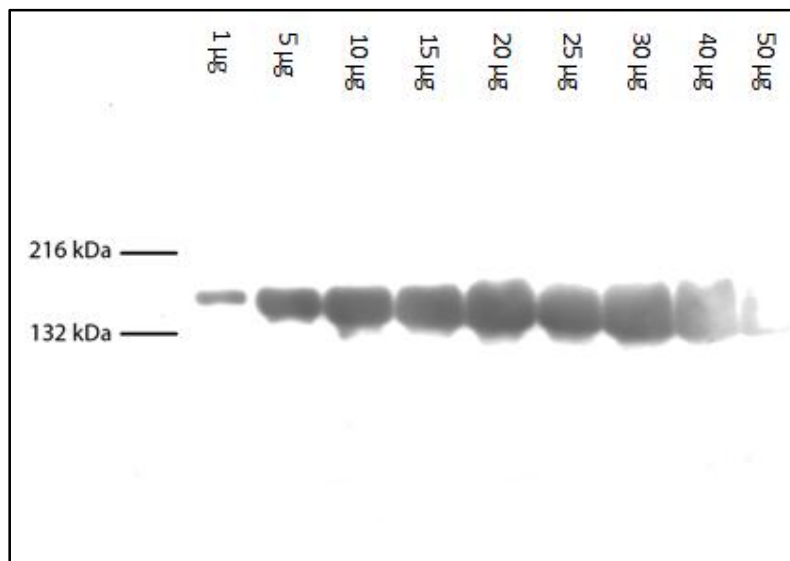


Figura 19. Anticorpo anti-vtg *R. quelen* X Vitelogenina de *P. lineatus*.
Concentrações de 1 µg a 50 µg de proteínas totais, utilizando diluição de 1:400000.
5 minutos de revelação.

4.8 REAÇÃO ENTRE O ANTICORPO ANTI-VTG DE *P. mesopotamicus* E A VTG DE *P. lineatus* (TITULAÇÃO E SENSIBILIDADE)

O teste de titulação do anticorpo mostrou uma alta taxa de inespecificidade nas diluições de 1:500 á 1:8000, utilizando 100µg totais de proteína. A especificidade inicia-se na diluição de 1:16000, chegando no ideal na diluição de 1:40000.

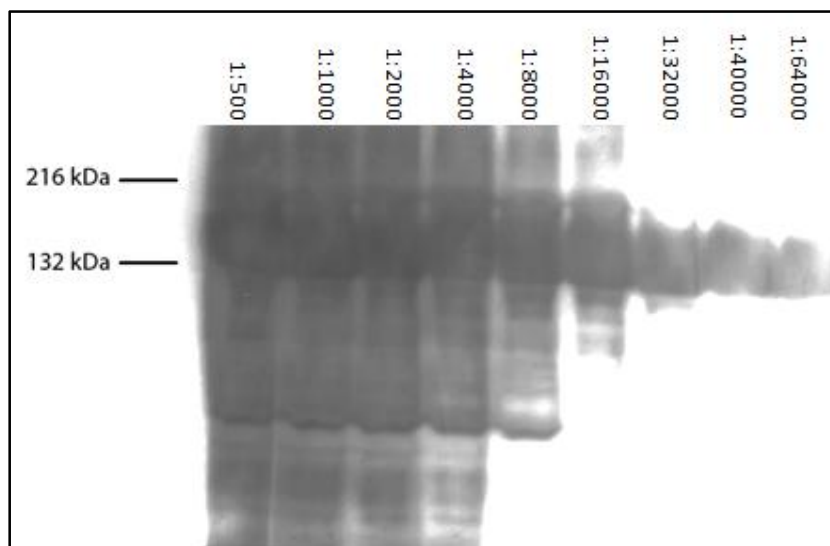


Figura 20. Anticorpo de *P. mesopotamicus* X Vitelogenina de *P. lineatus*.
Diluições de 1:500 a 1:64000, utilizando 100 µg de proteínas totais.
40 minutos de revelação.

Para o teste de sensibilidade, foi utilizada a diluição de 1:40000, variando a concentração de 1a 100 µg de proteínas totais. A especificidade

ocorre em todas as concentrações de proteínas totais, sendo possível haver especificidade em quantidades menores que 1 µg.

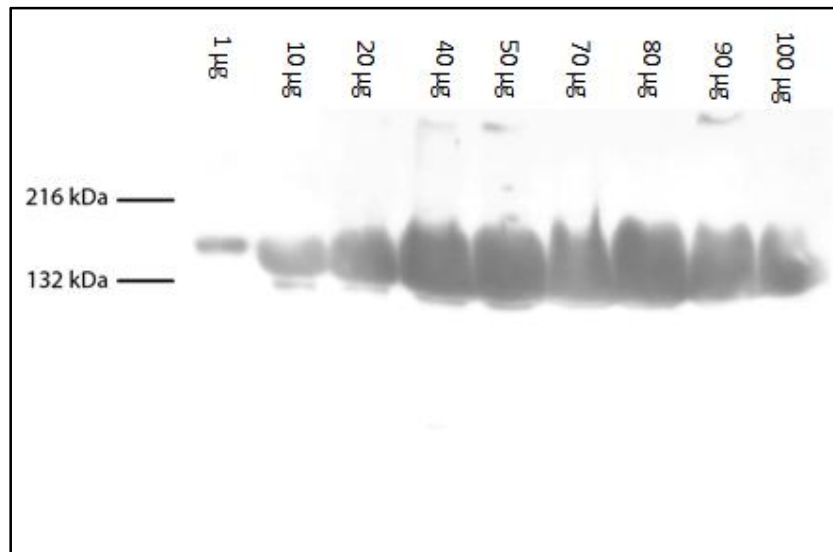


Figura 21. Anticorpo *R. quelen* X Vitelogenina de *P. lineatus*. Concentrações de 1 µg a 100 µg de proteínas totais, utilizando diluição de 1:400000. 5 minutos de revelação.

4.9 REAÇÃO ENTRE O ANTICORPO ANTI-VTG DE *P. lineatus* E A VTG DE *P. lineatus* (TITULAÇÃO E SENSIBILIDADE)

O teste de titulação do anticorpo mostrou uma alta taxa de inespecificidade nas diluições de 1:500 á 1:64000, utilizando 100 µg totais de proteína. Foram necessários testes com 50, 25 e 12,5 µg de proteínas em diluições variando de 1:32000 a 1:80000. A especificidade inicia-se na diluição de 1:64000 nas concentrações de 25 e 12,5 µg proteínas totais.

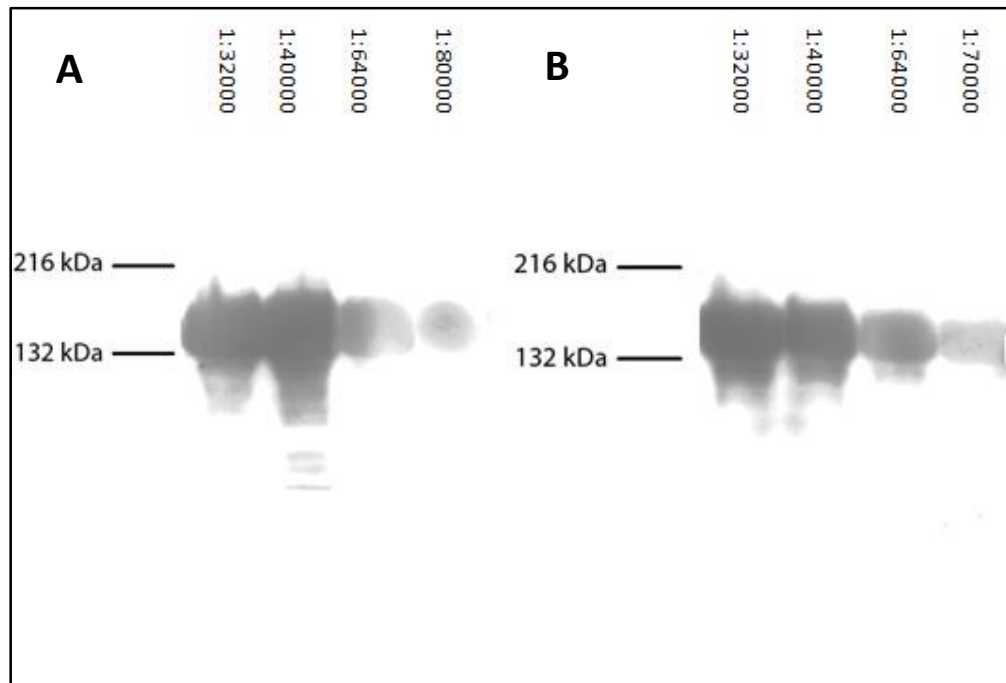


Figura 22. Anticorpo *P. lineatus* X Vitelogenina de *P. lineatus*.
Concentrações de 25 µg (A) e 12,5 µg (B) de proteínas totais, utilizando diluição de 1:320000 a 1:80000.
20 minutos de revelação.

Para o teste de sensibilidade, foi utilizada a diluição de 1:70000, variando a concentração de 1 a 12,5 µg de proteínas totais. A especificidade ocorre entre 1 e 4 µg de proteínas totais, sendo possível haver especificidade em quantidades menores que 1 µg.

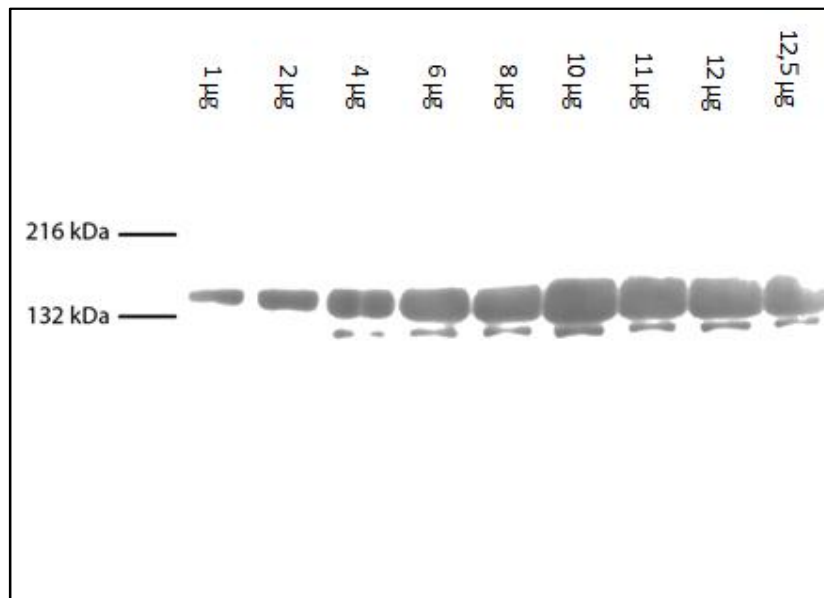


Figura 23. Anticorpo *P. lineatus* X Vitelogenina de *P. lineatus*.
Concentrações de 1 µg a 12,5 µg de proteínas totais, utilizando diluição de 1:700000.
8 minutos de revelação.

4.10 RESUMO DOS RESULTADOS

Os resultados apresentados acima estão resumidos na tabela 4 e 5.

Tabela 4. Titulação do anticorpo

Anticorpo	Vitелогенина		
<i>Rhamdia quelen</i>	<i>Rhamdia quelen</i> 1:140000 - 10 ug 40 min	<i>Piaractus mesopotamicus</i> 1:64000- 100 ug 20 min	<i>Prochilodus lineatus</i> 1:32000-1:64000 -50ug 20 min
<i>Piaractus mesopotamicus</i>	Sem Reação 40 min	1:64000-1:80000 - 50 ug20 min	1:16000-1:64000 - 100 ug 40 min
<i>Prochilodus lineatus</i>	Sem Reação 40 min	1:32000-1:64000 - 100 ug 40 min	1:64000 - 25 e 12,5 ug 20 min

Tabela 5. Sensibilidade do anticorpo

Anticorpo	Vitелогенина		
<i>Rhamdia quelen</i>	<i>Rhamdia quelen</i> 1:40000 1 µg de proteína 5 minutos	<i>Piaractus mesopotamicus</i> 1:64000 10 µg de proteína 5 minutos	<i>Prochilodus lineatus</i> 1:40000 1-50 µg de proteína 5 minutos
<i>Piaractus mesopotamicus</i>	-	1:64000 1-25 µg de proteína 5 minutos	1:40000 1-20 µg de proteína 5 minutos
<i>Prochilodus lineatus</i>	-	1:64000 10-20 µg de proteína 10 minutos	1:704000 1-4 µg de proteína 8 minutos

5. DISCUSSÃO

A vitелогенина é uma proteína extremamente conservada em diferentes filós(Byrne *et al*, 1989). Atualmente vários estudos explicam o fato de ela ser tão bem conservada. A superfamília de proteínas de transferência de lipídios (LLTP) são um dos grupos mais antigos de genes em animais pluricelulares, ausente apenas no grupo dos poríferos. O sucesso reprodutivo dos animais somente foi alcançado devido a uma série de fatores, um deles é o fato de acumular nutrientes em seus ovos, sendo esse o papel primordial da vitелогенина (Prowse e Byrne, 2012).Em seu estudo, Babin (2008) analisou comparativamente genomas completos de vertebrados a fim de determinar a relação filogenética entre os genes da vitелогенина. Esse estudo comparativo revelou a existência de um agrupamento de genes da vitелогенина (VGC – *vitellogenin gene cluster*)conservados nesses genomas. Ainda nesse trabalho, o autor observa conservação em agrupamentos de genes em torno do VGC, sendo essa uma hipótese que explica a conservação desse grupo.

Autores como Prakashet *al*(2007),Mosconiet *al* (1998), Holbechet *al* (2001), Ohkuboet *al* (2003) e Herbstet *al* (2007) produziram anticorpos para uso em seus laboratórios, utilizando-os para ensaios *in vitro*. Porém, esse tipo

de estudos geralmente utiliza-se de técnicas padronizadas de ensaio, sendo assim possível a produção ou compra de apenas um tipo de anticorpo. Quando se trata de biomonitoramento, diversas variáveis são constatadas. A primeira delas seria a escolha do local a ser estudado, onde se infere a possibilidade de contaminação. A segunda seria a escolha do bioindicador, sendo ele um organismo nativo do ambiente (Oost *et al.*, 2003). Para tal estudo a compra de anticorpos torna-se economicamente inviável, uma vez que as espécies são específicas de cada lugar e para obter um bom resultado, seriam necessários anticorpos de mais espécies, sendo mais viável se cada laboratório que trabalhasse com esse tipo de estudo produza os seus (Prakash *et al.*, 2007).

Essas três espécies foram escolhidas por Costa (2012) a fim de produzir anticorpos contra vitelogenina para a utilização em biomonitoramento. O primeiro teste foi realizado por Yamamoto (2012), onde se utilizou anticorpo anti-vtg de *Rhamdia quelen* em indivíduos da espécie *Geophagus brasiliensis* coletados no Rio tubarão (SC) e indivíduos da espécie *Tilapia sp.* coletados no reservatório de abastecimento urbano do Iraí (PR). Foi observado especificidade em bandas com massa molecular de aproximadamente 140kDa, correspondente ao peso molecular da vitelogenina, indicando assim a funcionalidade do anticorpo.

Esse estudo teve como objetivo validar a produção desses anticorpos e testá-los em diferentes espécies a fim de obter uma padronização de produção. Os resultados demonstraram eficácia na reação específica do anticorpo de *R. quelen* com vitelogeninas de diferentes espécies. O anticorpo de *P. mesopotamicus* e *P. lineatus* não obtiveram reação específica em vitelogenina de *R. quelen*. Uma hipótese para esse acontecimento está no fato de *P. lineatus* e *P. mesopotamicus* serem da ordem *Characiformes* e *R. quelen* pertencer a ordem *Siluriformes* (Fishbase, acesso em 2013). Esse ocorrido remete ao fato da vitelogenina ser altamente conservada, porém a reação específica do anticorpo, em tese, deveria ter ocorrido. Segundo a nova filogenia de peixes ósseos publicado por Betancur-r *et al.* (2013), *Siluriformes* e *Characiformes* são considerados grupos irmãos, ou seja, possuem um mesmo ancestral em comum. Esse fato indica que após a divergência, esses dois grupos tiveram histórias evolutivas diferentes, levando a crer que a estrutura da vitelogenina mudou a ponto de possuírem uma porção em comum nos dois, e a modificação de porções em *Siluriformes*, fazendo com que o anticorpo de

Characiformes não reconheça. Prowse e Byrne (2012) relatam que a vitelogenina é uma proteína conservada, porém, sofreu pequenas mutações ao longo de sua evolução, modificando estruturas internas. Babin (2008) em seu estudo comparativo, apontou modificações internas do genoma de *D. rerio*, levando a modificações na estrutura do gene da isoforma *vtg III*, modificando drasticamente sua função.

Estudos evolutivos envolvendo vitelogenina levam em consideração poucas ordens de peixes (ex. *Perciformes*, *Siluriformes*), por terem uma vasta distribuição mundial e interesses comerciais (Betancur-r *et al.* 2013). Por outro lado, os Characiformes são peixes neotropicais de água doce, incapazes de sobreviver em ambientes salinos. Possuem uma distribuição na América variando do estado do Texas (EUA) ao sul da América do sul, sendo também encontrados na África. O principal interesse econômico nestes, está na pesca esportiva, sendo que algumas espécies podem chegar a 130 cm e pesar 50Kg (*Tree of life web project*, acesso em 2013). Existem poucos estudos referentes a vitelogenina de *Characiformes*, sendo difícil relacionar sua estrutura com as demais ordens.

Costa (2012) ao produzir os anticorpos utilizados nesse estudo, utilizou uma técnica pouco corriqueira para a produção dos mesmos. Foi utilizada a técnica de isolamento da proteína a partir da separação das proteínas do plasma dos indivíduos por SDS-PAGE, recortada do gel e então utilizada como imunógeno. Essa técnica pode ser utilizada em proteínas sensíveis a purificação ou quando o peso molecular for alto. Ball *et al.* (1990) afirmam que a produção de anticorpos pode variar conforme o sistema imune do animal, sendo necessário levar em conta a concentração de proteína injetada, forma de coleta e métodos de purificação do anticorpo.

Os resultados apresentados demonstraram que os anticorpos produziram se mostraram eficientes para seu uso em biomonitoramento. O fato dos anticorpos de *P. lineatus* e *P. mesopotamicus* não reagirem especificamente com a vitelogenina de *R. quelen* e os anticorpos dessa espécie reagirem com a vitelogenina de *P. lineatus* e *P. mesopotamicus* pode indicar um epítipo em comum entre as três proteínas, podendo mostrar histórias evolutivas diferentes e que estudos moleculares são necessários para averiguar essa possibilidade.

6. CONCLUSÃO

- O fato de não haver reação específica dos anticorpos anti-vitelogenina de *P. mesopotamicus* e *P. lineatus* em vitelogenina de *R. quelen* demonstra a importância de estudos de filogenia na produção de anticorpos
- Nesse estudo foi demonstrado que o anticorpo da espécie *Rhamdia quelen* é o mais indicado para uso em biomonitoramento e estudos com vitelogenina de espécies nativas.

7. REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. 6ª Edição ed. [s.l.] Elsevier, 2008. p. 564
- Abimorad, E. G., Carneiro, J. D. Métodos de Coleta de Fezes e Determinação dos Coeficientes de Digestibilidade da Fração Protéica e da Energia de Alimentos para o Pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887). **Revista Brasileira de Zootecnia**, V. 33, n.5, p. 1101-1109, 2004
- A DIVISION OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY (CAS). **Database counter**. Disponível em < <http://www.cas.org/content/counter>>. Acesso em 06/06/2013
- ANDERSON, T. A; LEVITT, D. G.; BANASZAK, L. J. The structural basis of lipid interactions in lipovitellin, a soluble lipoprotein. **Structure (London, England : 1993)**, v. 6, n. 7, p. 895-909, 15 jul. 1998.
- BALL, E. *et al.* **Polyclonal antibodies**. St Paul, Minnessota: APS Press, 1990. p.33-54.
- BENACHOUR, N. *et al.* Cytotoxic effects and aromatase inhibition by xenobiotic endocrine disrupters alone and in combination. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 222, n. 2, p. 129-140, 2007.
- BETANCUR-R, R. *et al.* The Tree of Life and a New Classification of Bony Fishes. **PLOS Currents Tree of Life**. DOI: 10.1371/currents.tol.53ba26640df0ccee75bb165c8c26288, 2013.
- BYRNE, B. M.; GRUBER, M.; AB, G. THE EVOLUTION OF EGG YOLK PROTEINS. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 53, p. 33-69, 1989.
- CONROY, P. J. *et al.* Antibody production , design and use for biosensor-based applications. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 20, p. 10-26, 2009.
- COSTA, D. D. M. *et al.* Vitellogenesis and other physiological responses induced by 17-beta-estradiol in males of freshwater fish *Rhamdia quelen*. **Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology , Part c**, v. 151, n. 2, p. 248-57, mar. 2010.
- COSTA, D. D. M. **Caracterização da vitelogênese em *Rhamdia quelen* e sua aplicação no monitoramento de desreguladores endócrinos**. 151 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.
- DUEZ, P. *et al.* Statistics of the Comet assay : a key to discriminate between genotoxic effects The alkaline Comet assay is a widely used single cell gel electrophoresis technique for the quantification of DNA strand breaks , crosslinks and alkali-labile sites induced by. **Mutagenesis**, v. 18, n. 2, p. 159-166, 2003.
- FISHBASE. ***Piaractus mesopotamicus***. Disponível em: < <http://www.fishbase.org/summary/Piaractus-mesopotamicus.html>> . Acesso em 23/06/2013
- FISHBASE. ***Rhamdia quelen***. Disponível em: < <http://www.fishbase.org/summary/Rhamdia-lineatus.html>> . Acesso em 23/06/2013
- FISHBASE. ***Prochilodus lineatus***. Disponível em: < <http://www.fishbase.org/summary/Prochilodus-lineatus.html>> . Acesso em 23/06/2013

FUNKENSTEIN, B. *et al.* Contrasting effects of estrogen on transthyretin and vitellogenin expression in males of the marine fish, *Sparus aurata*. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 167, n. 1-2, p. 33-41, 25 set. 2000.

Galdioli, E. M., *et al.* Substituição da Proteína do Farelo de Soja pela Proteína do Farelo de Canola em Rações para Alevinos de Curimatá (*Prochilodus lineatus*V.). **Revista Brasileira de Zootecnia**, V. 31, n. 2, p. 552-559, 2002

HERBST, L. H. *et al.* Induction of vitellogenesis by estradiol-17 β and development of enzyme-linked immunosorbant assays to quantify plasma vitellogenin levels in green turtles (*Chelonia mydas*). **Comp. Biochem. Physiol. B.** v.135, n.3, p.551-563, 2003.

HIRAMATSU, N. Vitellogenesis and endocrine disruption. **Biochemistry and Molecular Biology of Fishes** v. 6, p. 431-471, 2005.

HOLBECH, H. *et al.* Development of an ELISA for vitellogenin in whole body homogenate of zebrafish (*Danio rerio*). **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 130, n.1, p.119-131, 2001.

ISHIDA, I. *et al.* Production of Human Monoclonal and Polyclonal Antibodies in TransChromo Animals. **Cloning and Stem Cells**, v. 4, n. 1, p. 91-102, 2002.

JIANG, Z-Y.; HUNT, J.V.; WOLFF, S.P. Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein. **Analytical Biochemistry**, v. 202, p.384-389, 1992.

JIANG, Z-Y.; WOOLLARD, A.C.S.; WOLFF, S.P. Lipid hydroperoxides measurement by oxidation of Fe²⁺ in the presence of xylenol orange. Comparison with the TBA assay and an iodometric method. **Lipids**, v.26, p.853-856, 1991.

KAVLOCK, R. J. *et al.* Research needs for the risk assessment of health and environmental effects of endocrine disruptors: a report of the U.S. EPA-sponsored workshop. **Environmental health perspectives**, v. 104 Suppl , n. August, p. 715-40, ago. 1996.

LAZORCHAK, J. M. *et al.* USEPA biomonitoring and bioindicator concepts needed to evaluate the biological integrity of aquatic systems. *In: Bioindicators and biomonitoring*. Elsevier, p. 831-874, 2003.

LEVINE, R.L. *et al.* Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. **Methods Enzymol.** v. 233, p.346-357, 1994.

LIEBEL, S. *et al.* Cellular responses of *Prochilodus lineatus* hepatocytes after cy lindrospermopsin exposure. **Toxicology in Vitro**, v. 25, n. 7, p. 1493-1500, 2011.

MARKEY, C. M. *et al.* Endocrine disruptors : from Wingspread to environmental developmental biology & . **Journal of Steroid Biochemistry**, v. 83, p. 235-244, 2003.

MOSCONI, G. *et al.* Gilthead Seabream (*Sparus aurata*) Vitellogenin: Purification, Partial Characterization, and Validation of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). **Gen. Comp. Endocrinol.** v.110, n. 3, p.252-261, 1998.

MOUCHEL, N. *et al.* Characterization of vitellogenin from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **AN INTERNATIONAL JOURNAL ON GENES AND GENOMES**, v. 174, p. 59-64, 1996.

OHKUBO, N. *et al.* Development of enzyme-linked immunosorbent assays for two forms of vitellogenin in Japanese common goby (*Acanthogobius flavimanus*). **Gen. Comp. Endocrinol. C**, v.131, n.3, p.353-364, 2003.

OLIVEIRA RIVEIRO, C. A. *et al.* Histopathological evidence of inorganic mercury and methyl mercury toxicity in the arctic charr (*Salvelinus alpinus*). **Environmental Research**, v.90, p. 217-225, 2002.

OOST, R. VAN DER; BEYER, J.; VERMEULEN, N. P. E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environmental toxicology and pharmacology**, v. 13, n. 2, p. 57-149, mar. 2003.

OSÓRIO, F. H. T. *et al* Water quality assessment of the Tubarão River through chemical analysis and biomarkers in the Neotropical fish *Geophagus brasiliensis*. **Environmental Science and Pollution Research**. DOI 10.1007/s11356-013-1512-5, 2013

PAIT, A. S.; NELSON, J. O. Endocrine Disruption in Fish An Assessment of Recent Research and Results. **Memorando Técnico**, n. June, p. 63, 2002.

PRAKASH, O.; GOSWAMI, S. V.; SEHGAL, N. Establishment of ELISA for murrel vitellogenin and choriogenin, as biomarkers of potential endocrine disruption. **Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology : CBP**, v. 146, n. 4, p. 540-51, nov. 2007.

PROWSE, T. A. A.; BYRNE, M. Evolution of yolk protein genes in the Echinodermata. **Evolution & Development** v. 151, n. 2 p. 139-151, 2012.

QUENTIN BONE; RICHARD H. MOORE. **Biology of Fishes**. 3ª Edição ed. Taylor & Francis Group, 2008. p. 497

SARAVANABHAVAN, G. *et al*. Biomonitoring of phthalate metabolites in the Canadian population through the Canadian Health Measures Survey (2007-2009). **International journal of hygiene and environmental health**, DOI: 10.1016/j.ijheh.2012.12.009, 2013.

SEDLAK, J. e LINDSAY, R.H. Estimation of total protein bound and nonprotein sulphhydryl groups in tissues with Ellman's reagent. **Analytical Biochemistry**, v.25, p.192-205,1968.

THE TREE OF LIFE. **Characiformes**. Disponível em: <<http://tolweb.org/Characiformes>>. Acesso em 23/06/2013

VAN REGENMORTEL, M. **Serology and Immunichemistry of Plant Viruses**. New York Academic, 205 p. 1982.

VIARENGO, A. *et al*. The use of biomarkers in biomonitoring: a 2-tier approach assessing the level of pollutant-induced stress syndrome in sentinel organisms. **Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology : CBP**, v. 146, n. 3, p. 281-300, set. 2007.

WANG, H. *et al*. A zebrafish vitellogenin gene (vg3) encodes a novel vitellogenin without a phosvitin domain and may represent a primitive vertebrate vitellogenin gene. **Gene**, v. 256, n. 1-2, p. 303-10, 3 out. 2000.

WARING, R. H.; HARRIS, R. M. Endocrine disrupters : A human risk ?. **Molecular and Cellular Endocrinology** v. 244, p. 2-9, 2005.

WITORSCH, R. J. Endocrine Disruptors: Can Biological Effects and Environmental Risks Be Predicted? **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 36, n. 1, p. 118-130, ago. 2002.

WU, L. T.; HUI, J. H. L.; CHU, K. H. Origin and Evolution of Yolk Proteins: Expansion and Functional Diversification of Large Lipid Transfer Protein Superfamily. **Biology of reproduction**, v. 88, n. 4, p. 102, 20 fev. 2013.

YAMAMOTO, F. Y. **EFEITOS DO 17 α - ETINILESTRADIOL EM *Geophagus brasiliensis* E EXPRESSÃO DA VITELOGENINA COMO UM BIOMARCADOR DE DESREGULAÇÃO ENDÓCRINA EM PEIXES**. 100 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.