

**DELIA CAROLINA OLMEDO SANCHEZ**

**Desreguladores endócrinos na indução da vitelogenina  
em peixes nativos**

**Dissertação apresentada como  
requisito parcial à obtenção do grau  
de Mestre, pelo Programa de Pós-  
graduação em Farmacologia, do  
Setor de Ciências Biológicas da  
Universidade Federal do Paraná.**

**Orientadora: Profa. Dra. Helena C. da  
Silva de Assis.**

**CURITIBA  
2006**

*Para tí, Querida Madre...*

## **Agradecimentos**

Como minha orientadora, a Profa. Dra. Helena Cristina da Silva Assis proporcionou-me encorajamento contínuo, ao longo de vários anos, e acomodou, de muito bom grado, os seus planos, aos meus adiantamentos e às minhas delongas. Por isso, confesso-me perenemente agradecida.

Também a minha gratidão especial vai para aqueles que conseguiram tempo para ler porções da dissertação, e para oferecer comentários e observações construtivas. Embora a responsabilidade final, pela exatidão e validade do texto, seja minha, eu não poderia ter completado o curso sem o auxílio generoso destes especialistas: Dra. Lígia Maria Salvo e Dr. João A. Costa.

Ao Prof. Dr. Paulo Carneiro, por ter cedido as instalações do Patronato Santo Antonio (PUC-PR) para a realização dos experimentos e pela sua generosa contribuição e de toda sua equipe.

Ao Prof. Dr. Luis Fernando Fávaro e toda sua equipe, pela contribuição na realização deste trabalho e por lições que não podem ser encontradas em livros.

Ao Prof. Dr. Paulo de Tarso Chaves pela valiosa ajuda na leitura das lâminas histológicas.

Ao Prof. Dr. Roberto Andreatini pelas excelentes sugestões para o Exame de Qualificação.

Ao Prof. Paulo Dalsenter pelo apoio e amizade.

A amiga e colega de laboratório Eliandra, pela amizade e ajuda na realização do Bradford.

Inara, sempre com alegria e responsabilidade, ajudou-me muitíssimo na análise estatística.

À Alessandra e Cris, que por inúmeras vezes me socorreram nos meandros burocráticos, a vocês o meu muito obrigada.

A querida Silvia, quem me auxiliou de diversas formas, inclusive com ótimas sugestões.

Pude contar todas as vezes em que precisei com as amigas Olga, Ana Isabel, Cáthia, Márcia, todas sempre tão dedicadas, me acudiram com sua amizade e competência profissional.

Amanda, sempre tão prestativa, foi indispensável a este trabalho, sem sua colaboração jamais poderia tê-lo realizado.

Não teria sido possível completar o trabalho, sob circunstâncias por vezes difíceis se não houvesse o carinho, a força e o apoio fiel de amigos como: Katty, Alberto, Glauber, Lisi, Maurício, Dudu, Edi, Mucio, Romi e tantos outros...

Agradeço aos meus queridos primos: Carmen e Manolo; Piti e Wal; Raquel, Jorge e Airton que apesar da distância sempre estiveram ao meu lado e contribuíram em diferentes momentos dando-me força, apoio, incentivo e principalmente muito carinho nos momentos difíceis.

Ao meu irmão Rodrigo e minha cunhada Menchi pelo eterno carinho.

Aos professores, funcionários e colegas do Departamento de Farmacologia da UFPR.

Agradeço ao meu pai pelo apoio financeiro.

Durante os anos transcorridos, recebi ajuda e estímulo da parte de tantas pessoas, que não é possível lembrar aqui o nome de todas elas. Os que compartilharam comigo espontaneamente, os frutos desta experiência. A todos eles, aqui consigno os meus mais profundos agradecimentos, pelo tempo e pelo pensamento que tão generosamente me deram.

## EPÍGRAFE

*No fim do túnel havia uma luz...  
No começo, eu.*

*Nem o frio, a sede ou o temor  
Me fizeram desistir...*

*De alcançar a luz, e com ela,  
Adentrar a outro túnel...*

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>viii</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>ix</b>
<b>LISTA DE GRÁFICOS.....</b>	<b>x</b>
<b>LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIATURAS.....</b>	<b>xi</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>xiv</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>xv</b>
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>01</b>
1.1 HISTÓRICO E CONCEITO.....	01
1.2 SISTEMA NEUROENDÓCRINO.....	05
1.3 ENDOCRINOLOGIA DO SISTEMA REPRODUTIVO DE PEIXES.....	06
1.4 DESREGULADORES ENDÓCRINOS.....	09
1.5 VITELOGENINA COMO BIOMARCADOR.....	11
1.6 CÁLCIO.....	15
1.7 TAMARON®.....	15
1.7.1 IMPACTO AMBIENTAL.....	16
1.8 JUNDIÁ ( <i>Rhamdia quelen</i> ).....	17
1.9 CASCUDO ( <i>Ancistrus multispinnis</i> ).....	19
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>21</b>
2.1 OBJETIVO GERAL.....	21
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	21
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>22</b>
3.1 ANIMAIS DE ESTUDO.....	22
3.1.1 Jundiá.....	22
3.1.2 Cascudo.....	22
3.2 DROGAS.....	23
3.2.1 Preparo das soluções.....	23
3.3 DESENHO EXPERIMENTAL.....	24
3.3.1 Jundiá.....	24
3.3.2 Cascudo.....	25

3.4 PRECIPITAÇÃO E PURIFICAÇÃO DA VITELOGENINA.....	25
3.5 ANÁLISE DA VITELOGENINA.....	26
3.6 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE CÁLCIO.....	26
3.7 CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA.....	27
3.8 HISTOLOGIA.....	27
3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	27
<b>4 RESULTADOS.....</b>	<b>28</b>
4.1 PURIFICAÇÃO E ISOLAMENTO DA VITELOGENINA.....	28
4.2 TAMARON.....	32
4.3 PESO E COMPRIMENTO DOS PEIXES.....	33
4.4 CONCENTRAÇÃO DE CÁLCIO.....	33
4.5 HISTOLOGIA.....	35
<b>5 DISCUSSÃO.....</b>	<b>39</b>
<b>6 CONCLUSÃO.....</b>	<b>45</b>
<b>7 REFERENCIAS.....</b>	<b>46</b>

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	CONTROLE HORMONAL DA SÍNTESE DE VTG.....	14
FIGURA 2	ESTRUTURA QUÍMICA DO METAMIDOFÓS.....	15
FIGURA 3	EXEMPLAR DE JUNDIÁ ( <i>Rhamdia quelen</i> ).....	18
FIGURA 4	EXEMPLAR DE CASCUDO ( <i>Ancistrus multispinnis</i> ). BOCA TRANSFORMADA EM VENTOSA COM DOIS BARBILHÕES.....	20
FIGURA 5	EXEMPLAR DE CASCUDO ( <i>Ancistrus multispinnis</i> ).....	20
FIGURA 6	ELETROFORESE DESNATURANTE EM GEL DE POLIACRILAMIDA PARA ANÁLISE DA VITELOGENINA PLASMÁTICA DE <i>Rhamdia quelen</i> DOS GRUPOS FÊMEA CONTROLE, MACHO CONTROLE, EE <sub>2</sub> E E <sub>2</sub> .....	28
FIGURA 7	ELETROFORESE DESNATURANTE EM GEL DE POLIACRILAMIDA PARA ANÁLISE DA VITELOGENINA PLASMÁTICA DE <i>Rhamdia quelen</i> DOS GRUPOS MACHO CONTROLE, EE <sub>2</sub> E E <sub>2</sub> .....	29
FIGURA 8	ELETROFORESE DESNATURANTE EM GEL DE POLIACRILAMIDA PARA ANÁLISE DA VITELOGENINA PLASMÁTICA DE <i>Rhamdia quelen</i> ANTES E APÓS INDUÇÃO COM EE <sub>2</sub> E E <sub>2</sub> .....	30
FIGURA 9	ELETROFORESE DESNATURANTE EM GEL DE POLIACRILAMIDA PARA ANÁLISE DA VITELOGENINA PLASMÁTICA DE <i>Rhamdia quelen</i> DO GRUPO FÊMEAS CONTROLE E E <sub>2</sub> .....	31
FIGURA 10	ELETROFORESE DESNATURANTE EM GEL DE POLIACRILAMIDA PARA ANÁLISE DA VITELOGENINA PLASMÁTICA DE <i>Rhamdia quelen</i> EM MACHOS DO GRUPO EE <sub>2</sub> , E <sub>2</sub> E TAMARON <sup>®</sup> .....	32
FIGURA 11	FOTOMICROGRÁFICA DE CORTE HISTOLÓGICO DE GÔNADA DE FÊMEA DA ESPÉCIE <i>Rhamdia quelen</i> DO GRUPO CONTROLE.....	36
FIGURA 12	FOTOMICROGRÁFICA DE CORTE HISTOLÓGICO DE GÔNADA DE MACHO DA ESPÉCIE <i>Rhamdia quelen</i> DO GRUPO CONTROLE.....	36
FIGURA 13	FOTOMICROGRÁFICA DE CORTE HISTOLÓGICO DE GÔNADA DE MACHO DA ESPÉCIE <i>Rhamdia quelen</i> DO GRUPO E <sub>2</sub> .....	37
FIGURA 14	FOTOMICROGRÁFICA DE CORTE HISTOLÓGICO DE GÔNADA DE MACHO DA ESPÉCIE <i>Rhamdia quelen</i> DO GRUPO EE <sub>2</sub> .....	37
FIGURA 15	FOTOMICROGRÁFICA DE CORTE HISTOLÓGICO DE GÔNADA DE MACHO DA ESPÉCIE <i>Rhamdia quelen</i> DO GRUPO TAMARON <sup>®</sup> .....	38
FIGURA 16	ESTRUTURA QUÍMICA DO 17β-estradiol (E <sub>2</sub> ) E 17α-etinil-estradiol.....	41

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1	PESO (g) E COMPRIMENTO (cm) DOS JUNDIÁS DO GRUPO FÊMEA CONTROLE, MACHO CONTROLE, EE <sub>2</sub> , E <sub>2</sub> E TAMARON <sup>®</sup> ANTES (A) E APÓS (D) 14 DIAS DE EXPOSIÇÃO VIA HÍDRICA.....	33
----------	---	----

## LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1	CONCENTRAÇÃO RELATIVA DE VITELOGENINA NA ESPÉCIE <i>Rhamdia quelen</i> NOS GRUPOS FÊMEA CONTROLE, EE <sub>2</sub> E E <sub>2</sub> .....	32
GRÁFICO 2	CONCENTRAÇÃO DE CÁLCIO PLASMÁTICO DE <i>Rhamdia quelen</i> AVALIADO NO PRIMEIRO DIA DE EXPERIMENTO (PRÉ) E APÓS 14 DIAS (PÓS) DE EXPOSIÇÃO VIA HÍDRICA AO 17 $\alpha$ -etinil-estradiol E 17 $\beta$ -estradiol.....	34
GRÁFICO 3	CONCENTRAÇÃO DE CÁLCIO PLASMÁTICO DE <i>Ancistrus multispinnis</i> AVALIADO NO PRIMEIRO DIA DE EXPERIMENTO (PRÉ) E APÓS 14 DIAS (PÓS) DE EXPOSIÇÃO VIA HÍDRICA 17 $\beta$ -estradiol.....	34

## LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

$\alpha$	Alfa
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ALFAC	Solução (álcool 80%, formol e ácido acético glacial)
$\beta$	Beta
BPA	Bisfenol A
CBB	Coomassie Brilliant Blue
cm	Centímetros
DA	Dopamina
DES	Dietilestilbestrol
DDT	Diclorodifeniltricloreto
DDE	Diclorodifenildicloroetileno
EDSTAC	Endocrine Disruptors Screening and Testing Advisor Committee. Comitê Consultivo sobre Averiguação e Testes dos Disruptores Endócrinos.
ECAs	Substâncias químicas endócrino-ativas
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
E <sub>2</sub>	17 $\beta$ -estradiol
EE <sub>2</sub>	17 $\alpha$ -etinilestradiol
g	Gramas
GH	Hormônio de crescimento
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofina
GtH I	Gonadotrofina I

GtH II	Gonadotrofina II
HE	Hematoxilina-Eosina
kDa	Kilo daltons
kg	kilograma
L	Litros
LAPEP-PUCPR	Laboratório de Piscicultura e Pesquisa da Pontifca Universidade Católica do Paraná.
M	Molar
mg	miligrama
MgCl <sub>2</sub>	Cloreto de Magnésio
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MPM	Marcador de Peso Molecular
NaCl	Cloreto de Sódio
OP	Octilfenol
<i>p</i>	Nível de significância estatística
PAN-UK	<i>Pesticide Action Network – United Kington</i> : Rede de Ação de Pesticida
PRL	Prolactina
PCBs	Bifenilapolicloradas
PUC	Pontífica Universidade Católica
RNA <sub>m</sub>	Ácido ribonucléico mensageiro
RE	Retículo endoplasmático
RIA	Radioimunoensaio
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate - PolyAcrylamide Gel Electrophoresis

SETAC-Brasil	Sociedade Brasileira de Ecotoxicologia
SPZ	Espermatozóide
T <sub>3</sub>	Triiodotironina
T <sub>4</sub>	Tiroxina
USEPA	Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos
WWF	World Wild Foundation
°C	Graus Celsius
®	Marca registrada
μl	Microlitros
μm	Micrômetros
%	Por cento
VTG	Vitelogenina
20β-HDS	20β-hidroxiesteroide dehidrogenase
17αOH-P	17α-hidroxi-4-pregnen-3-ona
17α20β-P	17α-20β-dihidroxi-4-pregnen-3-ona
xg	Gravidade
≈	Aproximadamente

## RESUMO

Alterações biológicas à presença de poluentes podem ser usadas como biomarcadores de contaminação ambiental. O ambiente aquático e os organismos que nele vivem são particularmente importantes nesse sentido. A detecção da vitelogenina (VTG) plasmática, a proteína precursora do vitelo, vem sendo intensamente estudada já que a sua produção no fígado (hepatócitos) é regulada pelo hormônio  $17\beta$ -estradiol e também sofre influência de outras substâncias com ação estrogênica. A VTG é utilizada como biomarcador para detecção *in vivo* dos efeitos estrogênicos em machos ou jovens, ou anti-estrogênicos em fêmeas. Os peixes machos apresentam a expressão hepática da VTG induzida, quando expostos a ambientes contaminados com substâncias estrogênicas. O presente trabalho teve por objetivo constatar a indução da VTG por  $17\beta$ -estradiol ( $E_2$ ) e  $17\alpha$ -etinilestradiol ( $EE_2$ ), em plasma de peixes machos e medir níveis plasmáticos de cálcio em *Ancistrus multispinnis* (cascudo) e *Rhamdia quelen* (jundiá), espécies nativas encontradas em vários rios da nossa região. Os cascudos foram divididos em três grupos e os jundiás em cinco: um grupo de fêmeas, um grupo de machos, um grupo de machos expostos via hídrica ao  $E_2$  ( $120\mu\text{l } E_2 \cdot L^{-1}$ ),  $EE_2$  ( $120\mu\text{l } E_2 \cdot L^{-1}$ ) e grupo TAMARON<sup>®</sup> ( $50\mu\text{l}$ ) em sistema semi-estático, durante 14 dias. O sangue dos peixes foi coletado por punção cardíaca (cascudo) e punção na veia caudal (jundiá) com heparina e aprotinina (inibidor de protease). O plasma dos peixes tratados e não tratados obtidos por centrifugação foi previamente lavado com solução de EDTA e  $MgCl_2$ : isolamento da VTG por precipitação nas razões molares ([EDTA]:[ $Mg^{++}$ ]) de 1,0:2,0; 1,0:1,5 e 1,0:1,0. As gônadas foram retiradas para análise histológica. A VTG foi analisada por SDS-PAGE. A concentração plasmática de cálcio foi analisada por eletrodo seletivo. O TAMARON<sup>®</sup> não induziu a VTG. O método de precipitação seletiva da VTG foi utilizado com êxito para a espécie *Rhamdia quelen* verificando-se a indução da VTG em peixes machos expostos tanto ao hormônio endógeno como o sintético, sem observar um aumento de cálcio. O mesmo não foi possível observar com a espécie *Ancistrus multispinnis*, com a qual ocorreu apenas um aumento de cálcio. Os resultados indicam que para determinadas espécies não é possível utilizar esta metodologia, pois depende da presença de uma alta concentração de VTG.

Palavras-chave: vitelogenina, peixes,  $17\beta$ -estradiol,  $17\alpha$ -etinilestradiol, cálcio.

## ABSTRACT

Biological answers towards the presence of xenobiotics could be useful biomarkers of environmental contaminants. The aquatic environment and the organisms that live in it turn out to be particularly important. The detection of vitellogenin (VTG), the yolk protein precursor, has been used as a biomarker to monitor exposure to estrogens and estrogen-like substances in fish since its synthesis in the liver (hepatocytes) is regulated by the  $17\beta$ -estradiol and is influenced by other estrogenic compounds. VTG is used as a biomarker for detection *in vivo* of estrogenic effects in males or juveniles, or anti-estrogenics in females. Males present hepatic expression of VTG and can be induced under estrogenic exposure. The aims of this study were to investigate the relation between plasma VTG and plasma calcium and to uncover the estrogenic sensitivity of male fish in terms of the VTG induction towards  $17\beta$ -estradiol ( $E_2$ ) and  $17\alpha$ -ethynylestradiol ( $EE_2$ ) in *Ancistrus multispinnis* (cascudo) and *Rhamdia quelen* (jundiá), fresh water fish found in several rivers around the country. Cascudos were separated in three groups and jundiás in five groups: females, males, males exposed via water to  $E_2$  ( $120\mu\text{l } E_2.L^{-1}$ ),  $EE_2$  ( $120\mu\text{l } E_2.L^{-1}$ ) and TAMARON<sup>®</sup> ( $50\mu\text{l}$ ) under semi-static conditions for 14 days. Blood was collected by cardiac puncture (cascudo) and caudal vein (jundiá) with heparinized and aprotinin treated syringe. The blood from the groups were directly centrifuged and the resulting plasma was immediately precipitated with  $MgCl_2$  in the presence of EDTA and redissolved with NaCl: VTG isolation by precipitation in the molar ratios ( $[EDTA]:[Mg^{++}]$ ) of 1,0:2,0; 1,0:1,5 and 1,0:1,0. Gonads were removed for histological examination. SDS-PAGE was performed to measure VTG. The serum calcium concentration was analysed by selective electrode. TAMARON<sup>®</sup> did not induce VTG. The VTG precipitation technique was efficient for *Rhamdia quelen*, the tested compounds showed a clear estrogenic activity since a highly significant amount of VTG was found but no increase of calcium. However the same technique was not adequate for *Ancistrus multispinnis*, but showed an increase of calcium. These experimental results suggest that isolation techniques that depend on the relatively high amount of VTG present are less suitable for some teleost species.

Keywords: vitellogenin, fish,  $17\beta$ -estradiol ( $E_2$ ),  $17\alpha$ -ethynylestradiol ( $EE_2$ ), calcium.



# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 HISTÓRICO E CONCEITO

A história da Toxicologia acompanha a história da humanidade. Desde épocas remotas o homem já possuía conhecimentos sobre os efeitos tóxicos provenientes de determinados animais, plantas e metais.

Entretanto, na Idade Média aconteceu o aprimoramento da arte de envenenar. Os envenenamentos criminosos e secretos eram geralmente associados aos Bórgias, Lucrecia Borgia XV e seu pai o Papa Alexandre VI, Teofanía d'Adamo (La Toffana), inventora da “água toffana” (cosméticos contaminados com arsênico) e Catherine de Medici (1519 – 1589), também conhecida como “Madame Snake”.

Durante a Idade da Civilização, Paracelsus (1493-1541), famoso médico alemão e hoje considerado o “pai da toxicologia” pronunciou a célebre expressão: “nenhuma substância é um veneno por si só. A dose transforma essa substância em um veneno ou em um remédio: a dose certa diferencia um veneno de um medicamento” (DAVIS et al., 2000).

Já na Idade Moderna, os métodos experimentais utilizados pelo espanhol Mateo J. B. Orfila (1787 – 1853) para detectar veneno nas pessoas tanto vivas como mortas, ajudaram no tratamento e na prevenção de intoxicações e desta forma permitiram o desenvolvimento das técnicas forenses. Em 1814, publicou o Tratado de Toxicologia, que é hoje reconhecido como um clássico. Era um experimentador e desenvolveu certo número de testes para identificação de agentes tóxicos (MANAHAN, 1989).

A Toxicologia teve um crescimento significativo depois da Segunda Guerra Mundial (1939-1945), pois ocorreu um aumento na produção de moléculas orgânicas como drogas, pesticidas e substâncias químicas de uso industrial (COLBORN; VOM-SAAL; SOTO, 1993). Passou-se a utilizar, cada vez mais, não só fertilizantes, como também pesticidas, incluindo os inseticidas, herbicidas e fungicidas, para defender as lavouras de insetos, ervas daninhas e fungos.

No final da Segunda Guerra Mundial, o mundo ocidental passava por um período de reconstrução e de recuperação econômica, durante o qual as

prioridades do desenvolvimento eram centradas no incentivo à produção, garantia dos postos de trabalho, satisfação das necessidades alimentares e promoção das condições de conforto e bem-estar sociais. O desenvolvimento era prioritário e, sendo nessa época ainda pouco conhecidos os potenciais efeitos prejudiciais destes novos compostos para a saúde humana, não existia a preocupação de que tal desenvolvimento fosse sustentável. Desde então, a utilização exagerada e sem critérios dessas novas substâncias vem comprometendo seriamente o meio ambiente (REYS, 2001).

Embora o desenvolvimento mundial seja indispensável, causou danos ao meio ambiente, em decorrência da falta de conhecimento e planejamento, o que gerou até mesmo uma certa despreocupação para com as futuras gerações. Um exemplo foi o uso indevido de alguns pesticidas organoclorados, altamente tóxicos e de alta persistência no meio ambiente, os quais contaminaram fontes de água próximas aos locais de aplicação, além de terem causado toxicidade ou morte às espécies residentes (CARSON, 1962; COLBORN; VOM-SAAL; SOTO, 1993).

Em 1938, um ano antes do início da Segunda Guerra Mundial, foi descoberto pelo cientista e médico britânico Edward Charles Dodds o primeiro estrógeno sintetizado pelo homem, o dietilestilbestrol (DES). Esta substância estrogênica foi utilizada terapêuticamente por mais de 5 milhões de mulheres grávidas entre o final da década de 40 e o início da década de 70 para prevenir abortos e complicações da gravidez (MARKEY et al., 2003). Anos depois, seu uso foi abandonado, por ser considerada uma substância que de fato mimetizava o estrógeno natural causando anomalias no feto ou ainda câncer de próstata, de mama, entre outros, em filhos de DES, ou seja, filhos cujas mães administraram DES durante a gestação (DAVIS et al., 1993; COLBORN; VOM-SAAL; SOTO, 1993; MCLACHLAN, 2001). Um estudo realizado em 2000 por NEWBOLD e colaboradores com ratos machos constatou que enquanto a fertilidade dos netos parecia permanecer inalterada, um aumento à suscetibilidade a tumores era transmitida para as gerações subsequentes. Em humanos, a exposição ao dietilestilbestrol (DES) é o principal exemplo do potencial deletério de substâncias endócrinas sobre o sistema reprodutivo (GRAY, 1998; LATHERS, 2002).

Nos anos 60, Rachel Carson publicou seu famoso livro considerado um marco na história da poluição ambiental, *Silent Spring* (Primavera Silenciosa), chamando a atenção para a insuficiência reprodutiva em aves e peixes, provocada pela bioacumulação de pesticidas organoclorados persistentes como o DDT (diclorodifeniltricloroetano). Além disso, ela sugeriu que tais efeitos poluentes na vida silvestre poderiam estar afetando de alguma forma a saúde humana (DASTON; COOK; KAVLOCK, 2003; MARKEY et al., 2003). Esta obra trouxe à tona o temor da sociedade moderna com relação à introdução de substâncias sintéticas no ambiente e renovou o interesse público e governamental na ciência da toxicologia.

Em meados da década de 70, pesquisadores descobriram que outros agentes químicos, como por exemplo, o kepone (princípio ativo do agrotóxico MIREX<sup>®</sup>) e os PCBs (bifenila policloradas), também apresentavam efeitos hormonais (DAVIS et al., 1993; PENTEADO; VAZ, 2001; ULBRICH et al., 2004). A partir daí os efeitos toxicológicos da mistura de congêneres individuais tem sido estudados principalmente em peixes (BILSSON et al., 1998), células de mamíferos e até mesmo no homem.

O comprometimento da função reprodutiva de seres humanos e de espécies animais tem sido motivo de especial preocupação nos últimos anos. Muitos fatores podem interagir com os componentes e com a função reprodutiva e ocasionar infertilidade e outras alterações funcionais e estruturais. Doenças, fatores psicológicos, estresse, variações hormonais e exposição a substâncias químicas, são alguns dos fatores que contribuem para o surgimento de distúrbios no sistema reprodutivo masculino e feminino.

Os compostos tóxicos naturais ou antropogênicos são chamados de xenobióticos. Com o início das investigações epidemiológicas, foi-se confirmando a hipótese de muitos xenobióticos serem perigosos para os seres vivos, bem como para a sua respectiva descendência, exercendo efeitos tóxicos em curto, médio ou longo prazo (REYS, 2001). Essas substâncias por serem persistentes no ambiente, acabaram por ser absorvidas e acumuladas pelos seres vivos, produzindo efeitos tóxicos em vários órgãos e sistemas. Com isso, percebeu-se que a utilização de compostos químicos desacompanhada da avaliação dos riscos para o ecossistema, constituía uma potencial ameaça para a saúde de pessoas, animais e vegetais. A partir de

então, iniciou-se o desenvolvimento de estudos dos efeitos das novas substâncias introduzidas na biosfera, bem como seus respectivos produtos de degradação, com o intuito de minimizar os danos ambientais.

Em vários países, criaram-se grupos de trabalho nos órgãos responsáveis pela proteção do meio ambiente, sendo uma das mais antigas a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA), criada em 1970 com o objetivo de reparar os danos já realizados contra o meio ambiente e estabelecer novos critérios para que a conquista de um meio ambiente limpo e saudável se tornasse uma realidade.

A partir de então, pesquisas realizadas nas universidades, nas indústrias químicas e em laboratórios privados estimularam o surgimento de uma nova área da toxicologia, a Ecotoxicologia ou Toxicologia ambiental.

A Sociedade Brasileira de Ecotoxicologia (SETAC-Brasil) define ecotoxicologia como “a ciência que tem como princípio básico o estudo dos efeitos dos agentes físicos, químicos e biológicos sobre os organismos vivos, particularmente sobre populações e comunidades em seus ecossistemas, incluindo as formas de transporte, distribuição, transformação, interações e destino final desses agentes nos diferentes compartimentos do ambiente”. Já a Toxicologia ambiental incluiria ainda os efeitos dos contaminantes ambientais e outros agentes no homem. Entretanto, estes termos são geralmente utilizados como sinônimos.

Algum tempo depois surgiu a Toxicologia Aquática, que foi definida como o estudo dos efeitos de substâncias químicas e outros compostos de origem antrópica (ação humana) ou natural sobre organismos aquáticos, com ênfase especial nos efeitos adversos ou danosos (TOMITA; BEYRUTH, 2002). O efeito destas substâncias passou a ser estudado, assim como, a influência de fatores naturais sobre as respostas fisiológicas, buscando um meio de prever impactos ambientais.

O ambiente aquático é um meio invariavelmente atingido pelos poluentes ambientais. Isto pode ocorrer pela evaporação e posterior precipitação com as chuvas, ou pelo escoamento superficial ou despejo direto de efluentes em corpos d'água.

Uma vez na água, dependendo das características físico-químicas, o resíduo pode tanto se ligar ao material particulado em suspensão, como se

depositar no sedimento do fundo ou ser absorvido por organismos, podendo então ser detoxificados ou bioacumulados (TOMITA; BEYRUTH, 2002).

A bioacumulação é um conceito que, por extensão, pode ser aplicado a toda a biota, considerando-se as definições propostas por VAN DER OOST e VERMEULEN (2003):

- a) Bioconcentração: acúmulo direto do xenobionte a partir da água, pelas brânquias ou pela pele, que pode ser mensurado como o fator de bioconcentração, ou seja, a razão entre a concentração da substância no organismo pela concentração da mesma na água;
- b) Biomagnificação: acúmulo por via trófica, a partir da alimentação, que pode ser mensurado como o fator de biomagnificação, ou seja, a razão no equilíbrio entre a taxa constante de acúmulo pela taxa constante de eliminação (por excreção ou metabolismo).

A introdução de substâncias tóxicas no ambiente aquático causa não somente efeitos locais e imediatos, mas podem levar a alterações sistêmicas como a contaminação de bacias hidrográficas e o comprometimento de reservatórios subterrâneos através da infiltração pelo solo. Inúmeros compostos já foram detectados em águas superficiais, em águas subterrâneas e de abastecimento (MALLET, C. M.; MALLET, V. N., 1989; BALINOVA, 1993; BRAMBILLA et al., 1993) relacionando atividades humanas e agrícolas com os casos de contaminação ambiental.

## **1.2 SISTEMA NEUROENDÓCRINO**

A comunicação entre células e órgãos é essencial para a coordenação de processos fisiológicos, incluindo aqueles que adaptam os animais no tempo e espaço. Classicamente, o sistema nervoso e o sistema endócrino são considerados complementares para a comunicação em um organismo complexo. Os descobrimentos das últimas duas décadas não somente demonstraram que ambos os sistemas operam de maneira altamente integrada, assim como também agem os mecanismos e mensageiros utilizados (EVANS, 1993).

O sistema endócrino é um dos componentes indispensáveis do processo de adaptação do organismo humano às mudanças nos meios internos e externos. É um sistema diverso e complexo, com mecanismos variados e sofisticados que controlam a síntese, a liberação e a ativação hormonal, o transporte na circulação, bem como o metabolismo e a distribuição para a superfície ou o interior das células nas quais atuam.

O sistema endócrino pode atuar independentemente ou de forma integrada com o sistema nervoso. Apesar de o sistema endócrino responder com mais frequência a estímulos químicos, e o sistema nervoso, na maioria das vezes, a estímulos físicos ou mecânicos, existe considerável sobreposição entre ambos (LEHNINGER; NELSON; COX, 2000).

Células individuais num tecido sentem uma alteração nas circunstâncias do organismo e respondem secretando um mensageiro químico extracelular. As células endócrinas secretam hormônios; os neurônios secretam neurotransmissores. Em cada caso, o mensageiro extracelular passa a uma outra célula onde se liga a uma molécula receptora específica e desencadeia uma alteração na atividade da segunda célula (LEHNINGER; NELSON; COX, 2000).

Estas mudanças são percebidas por células endócrinas específicas, geralmente agrupadas em glândulas, que secretam substâncias químicas denominadas hormônios.

A princípio o hormônio foi definido com uma substância elaborada por um tipo celular específico carreando um sinal por meio da corrente sanguínea até as células-alvo distantes (BERNE; LEVY, 1990).

A secreção dos hormônios está relacionada às suas funções na manutenção da homeostasia. Por conseguinte, a retroalimentação negativa (feedback negativo) constitui o mecanismo dominante de regulação. Se a ação do hormônio A consistir em elevar a concentração plasmática do substrato B, a ocorrência de diminuição do substrato B irá estimular a secreção do hormônio A, enquanto o aumento do substrato B vai suprimir a secreção do hormônio A. Assim, as condições fisiológicas que exigem a ação de um hormônio também estimulam a sua liberação; as condições ou produtos decorrentes da ação hormonal anterior suprimem a liberação do hormônio. Também se pode observar uma retroalimentação positiva, quando um produto de ação hormonal

estimula a maior secreção do hormônio. Quando o produto atinge as concentrações apropriadas, pode passar a exercer retroalimentação negativa sobre a secreção hormonal (BERNE; LEVY, 1990).

### **1.3 ENDOCRINOLOGIA DO SISTEMA REPRODUTIVO DE PEIXES**

A transdução de informações provocada por mudanças no fotoperíodo ou odores específicos, se iniciam com a ativação de sensores específicos como os fotoreceptores na retina ou quimiorreceptores do epitélio olfatório. Estes sensores transformam os estímulos ambientais em sinais eletroquímicos, os quais são propagados via neurônios para sítios específicos no Sistema Nervoso Central dos peixes onde, estes sinais são processados e interpretados de acordo com sua relevância fisiológica. Caso necessário, respostas específicas surgem dentro ou fora do Sistema Nervoso Central, levando a produção de efeitos fisiológicos e comportamentais pertinentes (EVANS, 1993; CONNAUGHTON; AIDA, 1999).

O sistema hipotálamo-hipófise é um dos componentes mais complexos do sistema endócrino. Localizado na base do cérebro é fundamental na coordenação de toda a resposta endócrina, estabelecendo relações de controle mútuo sobre a maioria das glândulas endócrinas e controlando, por si só, muitos aspectos da homeostasia corporal.

O hipotálamo produz entre outros, o hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) e a dopamina (DA). O GnRH estimula a liberação das gonadotrofinas pela adeno-hipófise, enquanto a DA inibe a liberação destas gonadotrofinas, de modo direto ou indireto (inibindo o efeito estimulatório do GnRH). As gonadotrofinas estimulam a maturação gonadal e a liberação de hormônios esteróides das gônadas. Os hormônios esteróides e os adeno-hipofisários determinam o desenvolvimento de vários caracteres sexuais e influenciam o cortejo e cuidados parentais. Quando os hormônios gonadais aumentam seu nível no plasma, exercem um efeito inibitório sobre a liberação das gonadotrofinas, de modo que há sempre uma oscilação. Aparentemente, este efeito inibitório dos esteróides sobre as gonadotrofinas se deve ao efeito estimulatório dos esteróides sobre a liberação de DA, ou através de uma inibição de GnRH (BALDISSEROTTO, 2002).

Muitos dos processos relacionados com a reprodução envolvem mudanças na secreção hipotalâmica do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) e alterações dos efeitos da glândula pituitária (EVANS, 1993).

Nos teleósteos, existem duas gonadotrofinas: gonadotrofina I (GtH I) e gonadotrofina II (GtH II). Nas fêmeas, a GtH I estimula o crescimento gonadal, a gametogênese e a entrada de vitelogenina no oócito. A GtH II é importante para a maturação final dos oócitos e desova (CONNAUGHTON; AIDA, 1999; MONCAUT; LO NOSTRO; MAGGESE, 2003).

Os níveis de GtH I são elevados durante as primeiras fases do desenvolvimento ovariano incluindo a vitelogênese. Como resposta a este estímulo, o ovário produz  $17\beta$ -estradiol o qual estimula a síntese hepática e liberação de vitelogenina (VTG) pelo fígado e sua entrada no oócito. A GtH I também é responsável pela produção e armazenamento da GtH II na pituitária (CONNAUGHTON; AIDA, 1999).

Nos machos, a GtH II age nos testículos, aumentando a atividade da enzima  $20\beta$ -HDS ( $20\beta$ -hidroxiesteroide dehidrogenase), que atua na conversão do colesterol em  $17\alpha$ OH-P ( $17\alpha$ -hidroxi-4-pregnen-3-ona). Sendo esta enzima precursora da testosterona, um aumento na sua produção faz com que aumente a formação da testosterona através da atuação da enzima C17-20 liase. Este aumento na síntese da  $17\alpha$ OH-P e da testosterona leva ambas a se difundirem para fora do tecido testicular. Ao atingir as células espermáticas, a  $17\alpha$ OH-P funciona como substrato para a formação de  $17\alpha20\beta$ -P ( $17\alpha$ - $20\beta$ -dihidroxi-4-pregnen-3-ona). A  $17\alpha20\beta$ -P é secretada nas células espermáticas e inibe a enzima C17-20liase no tecido testicular, de modo que a  $17\alpha$ OH-P não é mais utilizada na produção da testosterona. Com isso, aumenta a difusão desta substância para as células espermáticas, aumentando ainda mais a produção da  $17\alpha20\beta$ -P e reduzindo drasticamente a produção de testosterona (BALDISSEROTTO, 2002).

Nas fêmeas, a GtH II estimula a produção da substância indutora da maturação de oócitos, a  $17\alpha20\beta$ -P, nas células dos folículos ovarianos, através de um processo em duas etapas. Na primeira etapa, a GtH II estimula a síntese da  $17\alpha$ OH-P a partir do colesterol nas células da teça. Na segunda etapa, também sob influencia da GtH II, o  $17\alpha$ OH-P é convertido nas células da

granulosa em  $17\alpha20\beta$ -P. Uma parte da  $17\alpha$ OH-P produzida nas células da teca é convertida em testosterona, a qual se difunde para as células da granulosa e, sob a ação da enzima aromatase, é transformada em estradiol. Portanto, no início da liberação da GtH II, tanto a  $17\alpha20\beta$ -P como o estradiol são formados e secretados nas células da granulosa. Parte da  $17\alpha20\beta$ -P formada difunde-se para as células da teca e, do mesmo modo que nos testículos, inibe a enzima C17-20 liase, reduzindo a produção de testosterona e aumentando a quantidade de  $17\alpha$ OH-P disponível para a formação da  $17\alpha20\beta$ -P. Como resultado, há um aumento na produção da  $17\alpha20\beta$ -P e uma redução da produção de estradiol nas células da granulosa (EVANS, 1993; BALDISSEROTTO, 2002).

Existem outros hormônios além dos liberados nas gônadas que podem participar da reprodução, como os hormônios tireoidianos. Esses hormônios, principalmente a Triiodotironina ( $T_3$ ) potencializam a ação das GtH I e II no início do desenvolvimento ovariano. Com o aumento dos ovários, aumenta a secreção do  $17\beta$ -estradiol, o qual inibe a liberação dos hormônios tireoidianos. Deste modo, a energia do peixe será destinada para o crescimento gonadal e não para o crescimento corporal. Contudo, em algumas espécies, os hormônios tireoidianos aumentam novamente no final da vitelogênese, da maturação gonadal e na desova, indicando que as reservas corporais são suficientes para a conclusão da maturação gonadal (EVANS, 1993; BALDISSEROTTO, 2002).

#### **1.4 DESREGULADORES ENDÓCRINOS**

Sabe-se há muito tempo que diversos compostos xenobióticos quando ministrados em doses suficientes, podem interagir com uma série de sistemas endócrinos, inclusive com o eixo hipotalâmico-hipofisário, tireóide e órgãos sexuais (REYS, 2001). Por exemplo, em 1957, estudos de laboratório, feitos pelo Departamento de Pesca do Canadá observaram que quase todos os peixes na área norte da Ilha de Vancouver acusaram sintomas de cegueira, com opacidade do cristalino devido à exposição a baixas concentrações de diclorodifeniltricloroetano (DDT) (CARSON, 1962).

Os agentes químicos capazes de interferir no sistema endócrino foram chamados de substâncias químicas endócrino-ativas (ECAs), expressão adaptada para a língua portuguesa como “desreguladores endócrinos” (EDSTAC, 1998).

Os desreguladores endócrinos podem ser definidos como “agentes exógenos que interferem na produção, liberação, transporte, metabolismo, ligação, ação e eliminação de hormônios naturais no corpo humano responsáveis pela manutenção da homeostasia e na regulação de processos de desenvolvimento” (KAVLOCK et al., 1996). SCHETTLER e colaboradores, no seu livro “Generations at risk” publicado em 1999, definem desreguladores endócrinos como agentes químicos que em doses extremamente pequenas imitam, bloqueiam ou ainda interferem na atividade hormonal normal.

A Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA) alternativamente define os desreguladores endócrinos como sendo agentes químicos que conduzem a resultados tóxicos como vários tipos de câncer e a uma vasta gama de efeitos adversos no sistema reprodutivo (KAVLOCK et al., 1996).

Estudos mostram que a exposição de diversas espécies animais a um ou mais compostos químicos estrogênicos é capaz de induzir uma gama de efeitos adversos como hermafroditismo, hipospádia, criptorquidismo, redução do tamanho normal dos testículos, comprometimento do funcionamento normal das células de Leydig, redução da qualidade e quantidade de espermatozóides, alteração do ciclo estral, entre outros (WITORSCH, 2002; LATHERS, 2003). Talvez um dos exemplos mais bem documentados de efeitos ecológicos causados pela interferência na função endócrina tenha ocorrido com os crocodilos do Lago Apopka na Flórida, Estados Unidos. Estudos realizados por GUILLETTE e colaboradores (1994) indicaram que o vazamento de uma mistura dos pesticidas diclorodifeniltricloroetano (DDT) e diclorodifenildicloroetileno (DDE), em 1980, foi o responsável por uma variedade de efeitos adversos como a “desmasculinização” de crocodilos machos e “superfeminilização” de fêmeas. Outros efeitos incluíram diminuição na capacidade de chocar ovos e decréscimo dos níveis populacionais. Em outro estudo realizado por PURDOM e colaboradores (1994), foi demonstrado que o estradiol e outros hormônios naturais contidos em contraceptivos orais

descarregados nas estações de tratamento de esgoto do Reino Unido causaram a feminilização de peixes machos.

De acordo com a World Wild Fundation (WWF, 2000) e MARKEY e colaboradores (2003), os prováveis mecanismos de ação dos desreguladores endócrinos são:

- a) Mimetizando o próprio hormônio, ou seja, interagindo com o receptor específico para desencadear as alterações que seriam provocadas pelo hormônio naquele sítio de atuação;
- b) Bloqueando a ação do hormônio ao ocupar os receptores que seriam destinados especificamente a ele, impedindo, desta forma, que sua função seja exercida. Assim agem os agentes químicos que interferem na ação do hormônio masculino, impedindo a sua ação androgênica. Exemplo: DDE (metabólito do DDT);
- c) Causando danos no metabolismo dos hormônios, isto é, na sua síntese ou na sua destruição e eliminação fisiológica ou natural. Os organoclorados, como o DDE, por exemplo, podem alterar, dessa forma, o metabolismo dos estrógenos;
- d) Afetando o Sistema Nervoso Central, onde está o principal controle de produção hormonal, a hipófise, que, por sua vez, é regulada principalmente pelo hipotálamo. Todos os hormônios são regulados também por mecanismos de retroalimentação, isto é, são produzidos de acordo com os níveis detectados na corrente sanguínea, constantemente monitorados pelo hipotálamo. Por isso uma interferência em nível central afeta o controle de diversos hormônios. Esse mecanismo de controle pode estar alterado tanto por receber informação errada quanto a níveis sanguíneos, como por ações deletérias sofridas diretamente pelo próprio sistema nervoso central.

## **1.5 VITELOGENINA COMO BIOMARCADOR**

Os biomarcadores podem ser definidos como respostas biológicas aos poluentes ambientais que podem ser mensuradas indicando a presença, o efeito e, em alguns casos, o grau de contaminação (WALKER et al., 1996). Portanto os biomarcadores integram sistemas biológicos operacionais

indicando processos de contaminação ou intoxicação, em diferentes níveis de organização biológica. Ao representar um processo constitutivo do organismo, o biomarcador compreende uma resposta biológica que pode ser mensurada ou detectada por diversos métodos como, por exemplo, a expressão de uma proteína ou alguma atividade catalítica, ou que se utiliza de alguma estrutura do sistema biológico para se inferir alterações na organização do organismo, como uma alteração morfológica em nível tecidual, celular ou até molecular. Os métodos no campo da bioquímica e da biologia molecular são, portanto, os mais utilizados para o estabelecimento e uso de uma resposta biomarcadora (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003).

Conforme a revisão realizada por VAN DER OOST, BEYER e VERMEULEN em 2003, os biomarcadores podem ser subdivididos em três categorias:

- a) *Biomarcadores de exposição*: detecta e quantifica em compartimentos do organismo a presença do xenobionte, de seus metabólitos ou de sua interação com componentes moleculares ou celulares; infere exposição prévia e fornece os índices de bioacumulação da biota, estes determinados por métodos bioquímicos e de química analítica; ou seja; são aqueles que indicam se um indivíduo foi ou está exposto a alguma espécie de poluente sem, no entanto, permitir qualquer interferência a respeito de grau de efeitos adversos causados.
- b) *Biomarcadores de efeito*: parâmetros bioquímicos ou fisiológicos mensuráveis que correspondam a alterações em níveis molecular, celular ou tecidual que permitam inferir efeito adverso, prejudicial ao operar normal do organismo saudável, efeito pré-clínico, subletal ou até letal. Ou ainda, segundo WALKER e colaboradores (1996) são aqueles que demonstram a ocorrência de um efeito tóxico no organismo estudado. Geralmente as alterações químicas podem ser consideradas marcadores tanto de exposição como de efeito (HUGGETT et al., 1992).
- c) *Biomarcador de susceptibilidade*: indica a habilidade inerente ou adquirida por um organismo de responder à exposição a um xenobionte; elucida variações no grau de resposta diferencial entre

organismos e demonstra a tolerância fisiológica adquirida ou controlada por expressão gênica hereditária.

A vitelogenina é considerada um biomarcador de exposição estrogênica em machos ou jovens, ou anti-estrogênica em fêmeas ovíparas. Geralmente só é encontrada nas fêmeas, porém os peixes machos podem apresentar a expressão hepática da vitelogenina induzida, quando expostos a ambientes contaminados com substâncias estrogênicas (KRAMER et al., 1998; ROSE et al., 2002; Versonnen et al., 2003, VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003; WEBER et al., 2004).

A detecção da vitelogenina (VTG) plasmática ou a supressão da mesma vem sendo intensamente estudada já que a sua produção no fígado (hepatócitos) é regulada pelo hormônio  $17\beta$ -estradiol e também sofre influência de outras substâncias com ação estrogênica e antiestrogênicas (KRAMER et al., 1998; MONCAUT; LO NOSTRO; MAGGESE, 2003).

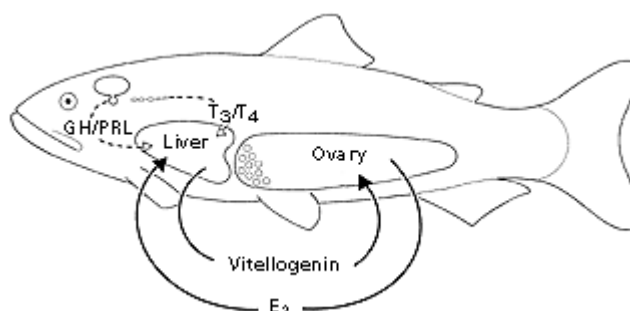
Existe uma enorme quantidade de trabalhos científicos relacionando a expressão de VTG em peixes como resposta biológica para exposição a substâncias que são desreguladoras endócrinas. Alguns relatos com o uso da expressão da VTG de peixes como resposta biomarcadora, *in vivo* ou *in vitro* podem ser encontrados em; ROSE et al., 2002; MONCAUT; LO NOSTRO; MAGGESE, 2003; VAN DEN BELT et al., 2003a; BRION et al., 2004; MARIN; MATOZZO, 2004; Versonnen et al., 2004; RANKOUHI et al., 2004; WESTER; VAN DER VEN; VOS, 2004.

Na maioria dos peixes, o ovo apresenta o vitelo, que é um material nutriente composto por lipídios e proteínas, e que será utilizado pelo embrião desde a fecundação até o momento em que for capaz de capturar alimento exógeno. A VTG é sintetizada pelos hepatócitos no fígado e levada até o sangue e transportada até os ovários onde é incorporada ao oócito e subsequentemente processada para formar o vitelo (SILVERSAND; HYLLNER; HAUX, 1993) (FIGURA 1).

A vitelogenina é uma glico-fosfo-lipoproteína de alto peso molecular (170–200 kDa dependendo da espécie) sintetizada em hepatócitos sob controle multi-hormonal: a transcrição de seu RNA<sub>m</sub> é ativada por estrógenos, principalmente o  $17\beta$ -estradiol ( $E_2$ ) após ligação com o receptor nuclear (RE). A VTG é o principal constituinte do vitelo de vertebrados ovíparas, sendo liberada

no sangue (após exocitose nos hepatócitos) e incorporada pelo oócito sob controle da gonadotrofina I (em peixes) (MILLS et al., 2003; MAGALHÃES et al., 2004; MARIN; MATOZZO, 2004).

FIGURA 1 - CONTROLE HORMONAL DA SÍNTESE DE VTG



FONTE: SUMPTER, J. P.; JOBLING, S.; Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. **Environmental Health Perspectives**, vol. 103 (7), p. 173-178, 1995.

NOTAS: O 17β-estradiol (E<sub>2</sub>) presente nas células granulosas do folículo ovariano é considerado o principal hormônio para estimulação da síntese da vitelogenina pelos hepatócitos. Nos anfíbios, existem evidências de que o hormônio de crescimento (GH) e a prolactina (PRL) da glândula pituitária e a Triiodotironina (T<sub>3</sub>) e a Tiroxina (T<sub>4</sub>) da glândula tireóide aumentem os efeitos do estradiol. O mesmo é verdadeiro em peixes.

Segundo MARIN e MATOZZO (2004) a vitelogenina pode ser medida por várias técnicas (diretas ou indiretas) como: radioimunoensaio (RIA), Western blot, Northern Blot, eletroforese, entre outros. A maioria destes testes citados são considerados caros, pois consomem muito tempo e ainda são necessários anticorpos específicos para cada espécie animal. Este fato se torna uma desvantagem quando se trabalha com peixes nativos, pois não existe anticorpo específico disponível (SILVERSAND; HYLLNER; HAUX, 1993; VERNONNEN et al., 2003).

Dentre as técnicas acima propostas, neste trabalho optou-se pela determinação eletroforética do conteúdo de VTG, a qual possui vantagens quando comparada com outras metodologias. Teoricamente é aplicável para todas as espécies de peixes e apenas uma pequena quantidade de amostra é necessária para realização do ensaio (SILVERSAND; HYLLNER; HAUX, 1993; ALLNER et al., 1999).

## 1.6 CÁLCIO

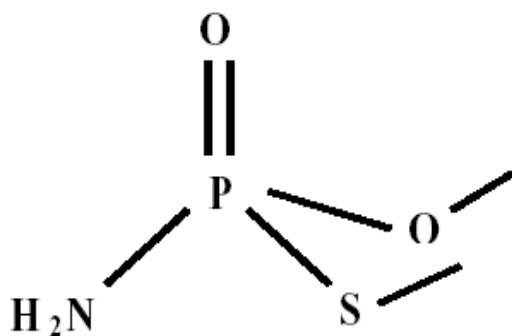
Em alguns estudos realizados com *Oncorhynchus mykiss*, *Salmo trutta* (BJORNSSON; HAUX, 1985; CARRAGHER; SUMPTER, 1991) e *Pimephales promelas* (GILLESPIE; DE PEYSTER, 2004) observou-se que a concentração plasmática de cálcio aumentou significativamente nos peixes tratados com o hormônio 17 $\beta$ -estradiol em relação aos outros grupos. Estes estudos preliminares demonstraram que é possível detectar níveis de vitelogenina nestas espécies de peixes e que a concentração plasmática de cálcio pode ser um parâmetro bioquímico indireto para a detecção da vitelogenina em peixes (GILLESPIE; DE PEYSTER, 2004).

A vitelogenina é um fosfolipídio rico em cálcio, quando ela é induzida uma grande quantidade de cálcio é incorporada a sua molécula. O cálcio possui uma alta capacidade de ligação na molécula de vitelogenina, assim como o fosfato.

## 1.7 TAMARON<sup>®</sup>

O metamidofós (O,S dimetilfosforamidotoiato; C<sub>2</sub>H<sub>8</sub>NO<sub>2</sub>OS) é o principal princípio ativo do produto conhecido comercialmente como TAMARON<sup>®</sup>. É um pesticida organofosforado (inseticida e acaricida) de largo espectro de ação (FIGURA 2). Trata-se de sólido cristalino de cor acre, com peso molecular de 141,12g. Segundo a ANVISA esta incluído na classe toxicológica II (altamente tóxica).

FIGURA 2 - ESTRUTURA QUÍMICA DO METAMIDOFÓS



Segundo a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA) este pesticida é aplicado efetivamente no controle de insetos e pestes, tais como besouros, pulgas, minhocas, carrapatos, ácaros, lagartas, moscas e percevejos, bem como na proteção de diversas culturas como: algodão, feijão, tomate, tabaco, pimentão, milho, brócolis, couve-flor, repolho, morango, pêssego e soja.

No trabalho intitulado “Relatório do programa de análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos no estado do Paraná”, realizado pela Secretária de estado da Saúde do Paraná – Instituto de Saúde do Paraná, entre o período de junho de 2001 a junho de 2002, foi observado que o tomate foi o alimento que mais apresentou resíduos de produtos agrotóxicos; 52 dentre as 53 amostras analisadas (98%) apresentaram resíduos. Resíduos de TAMARON® foram encontrados em 15 (28,3%) amostras, sendo que destas 12 (80%) apresentaram resíduos acima dos limites máximos permitidos.

A concentração do ingrediente ativo no produto formulado varia conforme o fabricante, sendo comercializado em formulações não-aquosas concentradas, concentrados emulsificantes, granulados e sprays.

Os organofosforados foram desenvolvidos em 1930, na Alemanha. A ação tóxica de grande parte deles, incluindo o metamidofós, se dá diretamente pela inibição da atividade da acetilcolinesterase, potencializando a transmissão colinérgica nas sinapses autônomas colinérgicas e na junção neuromuscular. Estes agentes penetram livremente na barreira hematoencefálica e afetam o cérebro. O resultado consiste em excitação inicial, que pode resultar em convulsões, seguidas de depressão, podendo produzir perda na consciência e insuficiência respiratória (LIMA et al., 2001; RANG et al., 2003).

O metamidofós é listado como possível desregulador endócrino pela PESTICIDE ACTION NETWORK – UK (PAN-UK, 2001).

### **1.7.1 IMPACTO AMBIENTAL**

Os impactos na natureza devido ao uso indevido de agrotóxicos e pesticidas ocorrem desde o processo de manipulação, sua aplicação até o destino das embalagens e resíduos tóxicos. Estas substâncias afetam diretamente as espécies alvo que são pragas para as culturas, porém, também

podem impactar o meio ambiente e o homem de diversas formas (KOVACH et al., 1992):

- Lixiviar para os rios e mares atingindo peixes;
- Atingir espécies animais benéficas que estejam na área aplicada ou ao redor da plantação;
- Exposição do trabalhador, o aplicador e colhedor gerando insalubridade;
- Sujeitar ao consumidor final aos resíduos de agrotóxicos e pesticidas que permanecem no produto final.

A prática inadequada de produtos químicos acarreta diversos danos ao agricultor quem muitas vezes não possui parâmetros para aplicação do produto e, freqüentemente, ultrapassa os limites mínimos aceitáveis.

Mesmo com a aplicação dos agrotóxicos em conformidade com as recomendações agronômicas aprovadas nos Ministérios da Agricultura, da Saúde e do Meio Ambiente, cada agente químico apresenta as suas especificidades, causando assim, conseqüências diversas ao meio ambiente.

### **1.8 JUNDIÁ (*Rhamdia quelen*)**

Jundiá é o nome comum dado a diversos peixes do gênero *Rhamdia*. Existem outros nomes como: bagre, nhurundia, mandi, mandí-guaru, e bagre sapo (NAKATANI et al., 2001). O *R. quelen*, é uma espécie de peixe nativo ainda pouco conhecido cientificamente, mas que tem atraído a atenção de produtores e pesquisadores devido a várias características favoráveis à sua inclusão na lista de peixes criados comercialmente no país, principalmente na região sul do Brasil (CARNEIRO; SCHORER; MIKOS, 2005a).

O *R. quelen* (Quoy e Gaimard, 1824), possui uma ampla distribuição geográfica e é encontrado desde o sudeste do México ao centro da Argentina. No Brasil este bagre de água doce é conhecido também como jundiá cinza. A coloração varia com a subespécie, indo do pardo a diversos tons de cinza, mas em geral com o ventre mais claro.

O hábito alimentar desta espécie é onívoro, alimentando-se de peixes, crustáceos, insetos, restos de vegetais, sementes e detritos orgânicos, tendo preferência por se alimentar no escuro (MEYER; FRACALLOSSI, 2005). Morfologicamente, o jundiá caracteriza-se por possuir boca sem dentes e corpo

sem escamas, possuindo barbilhões de forma cilíndrica com comprimento variando proporcionalmente ao tamanho do espécime (FIGURA 3).

FIGURA 3 – EXEMPLAR DE JUNDIÁ (*Rhamdia quelen*)



FONTE: APTA REGIONAL: [www.aptaregional.sp.gov.br/.../jundia1.jpg](http://www.aptaregional.sp.gov.br/.../jundia1.jpg). Acesso em: 26 de fevereiro de 2008.

Como as demais espécies de peixes tropicais, o ritmo do crescimento do jundiá aumenta com o incremento da temperatura o qual é bastante pronunciado nos primeiros anos de vida. As fêmeas crescem de 20 a 30% mais rapidamente que os machos, que amadurecem cedo gastando conseqüentemente parte da energia para o desenvolvimento gonadal (ESQUIVEL, 2005).

A maturidade sexual é atingida por volta de um ano de idade nos dois sexos. Segundo NARAHARA e colaboradores (1985) e NAKATANI e colaboradores (2001) a primeira maturação sexual ocorre quando o animal atinge um comprimento entre 13,4cm à 16,5cm para machos e 16,5cm à 17,5cm para fêmeas. Apresentam dois picos reprodutivos por ano (um no verão e outro na primavera), com desova parcelada. Não apresentam cuidado com a prole e os cardumes desovam em locais com água limpa, calma e de fundo pedregoso. Os machos liberam com facilidade o líquido espermático quando o abdome é pressionado. O orifício genital dos machos é protraído e das fêmeas maduras hepitrênico avermelhado, com dilatação ventral (MARDINI et al., 1981).

O fenômeno do dimorfismo sexual ou diferenciação morfológica entre sexos pode ser muito evidente. Este mecanismo de diferenciação entre parceiros chega a ser tão elaborado entre certas espécies de peixes, que acredita-se que o dimorfismo sexual tenha tido uma importância decisiva no

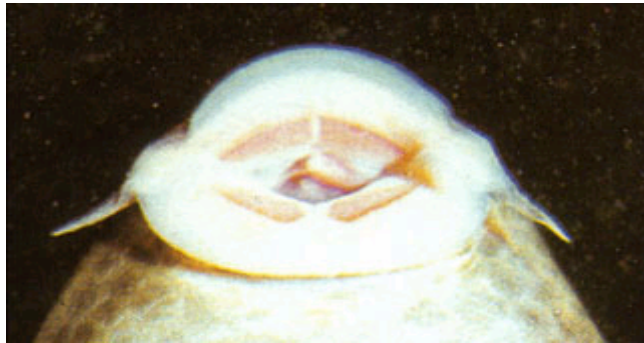
sucesso e diferenciação específica de grandes grupos. Na Amazônia, bagres (Siluriformes) e peixes-elétricos (Gymnotiformes) são os peixes que apresentam maior diversificação de atributos sexualmente dimórficos. As diferenças entre os genitores podem ser claras, como em certos besouros, certas aves e alguns peixes, ou não tão claras ao menos externamente nos quais é difícil distinguir o macho da fêmea, a exemplo do que ocorre nos ouriços do mar e no cascudo. Já o jundiá possui uma grande vantagem, pois apresenta um dimorfismo sexual externo facilitando desta forma a separação de machos e fêmeas para a realização dos experimentos, quando utilizados exemplares adultos.

### **1.9 CASCUDO (*Ancistrus multispinnis*)**

O cascudo, *Ancistrus multispinnis* é a espécie mais comum da família Loricaridae, que habita exclusivamente a América do Sul, preferencialmente as regiões tropicais do Brasil. É um peixe inofensivo e muito útil para a manutenção do equilíbrio biológico de um ambiente aquático. Tem boca transformada em ventosa (FIGURA 4) o que possibilita aderir nas pedras dos riachos onde vivem. Revestido por placas ósseas, o seu corpo dificilmente é atacado por outros peixes.

O cascudo tem hábitos noturnos, é ativo e se alimenta neste período. Sendo onívoro, come de tudo um pouco, mas tem predileção pelas algas que encontra sobre a superfície dos vidros, pedras, troncos, folhas das plantas, e até do cascalho do aquário (FIGURA 5).

FIGURA 4 – EXEMPLAR DE CASCUDO (*Ancistrus multispinnis*). BOCA TRANSFORMADA EM VENTOSA COM DOIS BARBILHÕES QUE POSSIBILITAM ADERIR-SE NAS PEDRAS DOS RIACHOS.



FONTE: [br.geocities.com/peixe\\_beta/cascudo2.jpg](http://br.geocities.com/peixe_beta/cascudo2.jpg). Acesso em: 26 de fevereiro de 2008.

Pouco se sabe sobre sua reprodução em cativeiro, mas na natureza, a fêmea deposita seus ovos e logo após o macho os fecunda e depois ficam "de guarda" durante a incubação. A exemplo dos outros peixes de sua família, os ovos são grandes e demoram em torno de uma semana para eclodir, sendo que os alevinos já nascem com mais de 1cm de comprimento.

FIGURA 5 – EXEMPLAR DE CASCUDO (*Ancistrus multispinnis*)



FONTE: [www.sobrepeixes.com](http://www.sobrepeixes.com). Acesso em: 26 de fevereiro de 2008.

## 2. OBJETIVOS:

### 2.1 GERAL:

Verificar a indução da VTG em peixes expostos a possíveis desreguladores endócrinos.

### 2.2 ESPECÍFICOS:

- Padronizar técnica de eletroforese para a VTG em duas espécies de peixes nativos: *Ancistrus multispinnis* e *Rhamdia quelen*;
- Purificar e isolar a vitelogenina com uma solução de EDTA e MgCl<sub>2</sub>;
- Correlacionar os níveis plasmáticos de cálcio em *Ancistrus multispinnis* (cascudo) e *Rhamdia quelen* (jundiá) com a indução da VTG;
- Verificar a ocorrência de alteração histológica nas gônadas dos peixes induzidos com os hormônios 17 $\alpha$ -etinilestradiol e 17 $\beta$ -estradiol; através da análise histopatológica;
- Verificar os níveis de VTG de peixes expostos a um pesticida com efeito estrogênico.

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 ANIMAIS DE ESTUDO**

##### **3.1.1 Jundiá**

Foram coletados aproximadamente 100 exemplares de jundiás machos e fêmeas com redes nos tanques do Laboratório de Piscicultura e Pesquisa – da Pontífica Universidade Católica (LAPEP-PUCPR). Os peixes foram aclimatados em um tanque de concreto de 1000L onde permaneceram durante 7 dias sendo tratados imediatamente com antibióticos e NaCl para prevenir a infestação por bactérias oportunistas e *Ichthyophthirius multifiliis*, um protozoário que causa a doença dos pontos brancos ou ictiofitiríase (CARNEIRO; MIKOS, 2005b), podendo causar mortalidade em uma semana.

Foi utilizada água filtrada e desclorada. A temperatura da água foi mantida constante variando entre  $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ; com fotoperíodo de 12 horas claro / 12 horas escuro com aeração constante. Essas condições foram mantidas e controladas até o fim do experimento.

Os peixes foram alimentados com ração comercial uma vez ao dia. No oitavo dia após a coleta os peixes foram divididos em 5 grupos (n= 15), controles machos e fêmeas e experimentais e transferidos para aquários de 100L previamente preparados sob as mesmas condições descritas anteriormente, onde permaneceram para um período de aclimação durante 9 dias antes de começar o experimento.

Os peixes não receberam alimento durante o experimento, sendo assim previamente medidos e pesados.

##### **3.1.2 Cascudo**

Cascudos machos e fêmeas (n= 20) foram adquiridos em lojas de aquários e aclimatados no Laboratório de Toxicologia Ambiental do Departamento de Farmacologia da Universidade Federal do Paraná, durante uma semana, em aquários de 16L previamente preparados com água filtrada, desclorada e aeração constante. A temperatura da água foi mantida constante

em  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ; com fotoperíodo de 12 horas claro / 12 horas escuro. Essas condições foram mantidas e controladas até o fim do experimento.

Os peixes foram alimentados com ração comercial uma vez ao dia até início do experimento. Os peixes não foram alimentados durante o experimento.

Após o período de aclimação, um total de 3 aquários de 16L foram montados com as mesmas condições estabelecidas anteriormente para os jundiás, para formar os grupos controles machos e fêmeas e experimentais.

### **3.2 DROGAS:**

- Nos peixes machos foram utilizados o  $17\alpha$ -etinilestradiol ( $\text{EE}_2$ ) (Sigma) e o  $17\beta$ -estradiol ( $\text{E}_2$ ) (Sigma), hormônios sintético e natural que induzem a VTG respectivamente;
- Acetona e água destilada foram utilizadas para dissolução dos hormônios e como controle;
- Heparina sódica foi utilizada como anticoagulante;
- Cocktel de inibidor de proteases (Sigma) foi utilizado com o intuito de aumentar o rendimento e obter a VTG intacta inibindo enzimas como proteases e fosfatases capazes de degradar proteínas presentes na amostra;
- Produto comercial: TAMARON<sup>®</sup> 600 BR cujo principal princípio ativo é o metamidofós foi utilizado como possível desregulador endócrino;
- Marcador de peso molecular (Sigma);
- EDTA ( $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_8\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ );
- $\text{MgCl}_2$ ;
- $\text{NaCl}$ .

#### **3.2.1 Preparo das soluções**

Foram pesados 0,01mg de cada hormônio e diluídos em 600 $\mu\text{l}$  de acetona e 400 $\mu\text{l}$  de água destilada. Em seguida foram aliquotados em

microtubos as quantidades necessárias a serem diluídas nos aquários durante os 14 dias de experimento.

O TAMARON<sup>®</sup> também foi previamente aliquotado em microtubos com um volume de 50µl em cada tubo, equivalente a 0,03µg/L de metamidofós para os 14 dias de experimento.

### **3.3 DESENHO EXPERIMENTAL**

#### **3.3.1 Jundiá**

Antes dos experimentos os jundiás foram divididos em cinco grupos com quinze exemplares em cada aquário:

*GRUPO 1:* controle fêmea;

*GRUPO 2:* controle macho;

*GRUPO 3:* machos expostos via hídrica ao EE<sub>2</sub> (120µl E<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup>);

*GRUPO 4:* machos expostos via hídrica ao E<sub>2</sub> (120µl E<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup>);

*GRUPO 5:* machos expostos ao TAMARON<sup>®</sup> (50µl/L).

Inicialmente, os animais de cada grupo foram pesados e medidos. O sangue foi coletado com heparina (0,01mL) por punção na veia caudal, obtendo um volume aproximado de 500µL de sangue por peixe. Em seguida foram adicionados 5µL de uma solução antiproteolítica conforme procedimento descrito por SILVERSAND; HYLLNER e HAUX (1993), centrifugado durante 4 minutos à 10.400xg à 4°C. Com o plasma obtido por centrifugação foi realizada a purificação da VTG e análise de cálcio. O plasma não utilizado para o procedimento imediato foi aliquotado e mantido a -75°C para análises posteriores.

O bioensaio foi realizado no sistema semi-estático, em aquários de 100L onde 40% d'água foram retiradas a cada 48 horas sendo feita reposição com a quantidade correspondente de hormônio e/ou solvente.

Após 14 dias de exposição, cada peixe foi pesado e retirado o sangue como descrito anteriormente e a seguir sacrificado por lesão do tecido cerebral. Imediatamente foram retiradas as gônadas e fixadas em solução ALFAC para

análise histopatológica para comprovação do sexo e posterior verificação de possíveis alterações.

### **3.3.2 Cascudo**

Os cascudos foram divididos em três grupos com quatro exemplares em cada aquário:

*GRUPO 1*: controle fêmea;

*GRUPO 2*: controle macho;

*GRUPO 3*: machos expostos via hídrica ao E<sub>2</sub> (120µl E<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup>).

O bioensaio foi realizado no sistema semi-estático, em aquários de 16L onde 40% da água foram retirados a cada 48 horas e feita a reposição com a quantidade correspondente de hormônio e/ou solvente.

Após 14 dias de exposição o sangue de cada peixe foi retirado por punção cardíaca e sacrificado por lesão do tecido cerebral. Foi utilizado o mesmo procedimento descrito para os jundiás para o processamento do sangue no item 3.3.1.

### **3.4 PRECIPITAÇÃO E PURIFICAÇÃO DA VITELÓGENINA:**

O plasma das fêmeas e machos tratados e não tratados obtido após centrifugação foram previamente lavados com solução de EDTA (C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub>Na<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O) e MgCl<sub>2</sub> segundo método descrito por SILVERSAND, HYLLNER e HAUX (1993): isolamento da VTG por precipitação na razão molar ([EDTA]:[Mg<sup>++</sup>]) de 1,0:1,0 para jundiás e 1,0:2,5; 1,0:2,0 e 1,0:1,5 para cascudos.

Após a mistura do plasma com diferentes volumes das soluções estoques de EDTA a 20 mM e MgCl<sub>2</sub> a 500 mM, em microtubos de 1,5 ml, estes foram centrifugados à 4°C, sob a força de 5000×g por 15 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado foi ressuspensão em 50 µl de NaCl a 1 M. Em cada tubo foram adicionados 1 ml de H<sub>2</sub>O destilada para nova precipitação, esta seguida de centrifugação à 4°C, sob a força de 5000×g por

15 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado foi ressuspenso em 50 µl de NaCl a 1 M.

### **3.5 ANÁLISE DA VITELOGENINA**

Amostras de plasma dos animais induzidos (VTG) e não induzidos foram analisadas após eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida (doravante abreviado por *SDS-PAGE*) a 4% (empilhamento) e a 8% (separação), com aplicação de campo elétrico vertical segundo LAEMMLI (1970), seguida de coloração com *Coomassie Brilliant Blue* (doravante abreviado por *CBB*).

O tempo de polimerização para cada gel foi de aproximadamente 10 minutos.

A voltagem utilizada foi de aproximadamente 122 Volts, para um tempo de corrida de aproximadamente uma hora e quarenta minutos.

O tempo de coloração com *Coomassie Brilliant Blue* (*CBB*) 0,1% foi realizado em 2 horas.

A descoloração foi realizada com uma solução contendo 5% metanol e 7,5% de ácido acético por um período aproximadamente de 2 dias.

A secagem foi realizada em estufa à uma temperatura de aproximadamente 30°C.

O padrão de corrida foi feito com controle positivo (macho induzido) e negativo (sem indução). O conteúdo relativo de VTG no plasma foi constatado pela utilização de um marcador de peso molecular (Sigma).

Os géis foram digitalizados em scanner e analisadas com auxílio do software Image Tool. A concentração relativa de VTG foi determinada por comparação da densidade integrada por mg de proteína de cada amostra.

### **3.6 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE CÁLCIO**

O cálcio do plasma coletado dos peixes controle e tratados antes e depois da exposição foi determinado pelo método de eletrôdo seletivo medido no aparelho: AVL 9180.

### **3.7 CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA**

A concentração de proteína das amostras utilizadas nas diferentes análises realizadas neste trabalho foi determinada segundo o método de BRADFORD (1976), utilizando a soro albumina bovina para a curva padrão.

### **3.8 HISTOLOGIA**

As gônadas foram fixadas em solução ALFAC (álcool 80%, formol e ácido acético glacial) por 16 horas. Posteriormente, foram desidratadas em álcoois (70%, 80%, 90% e 100%), diafanizadas em xilol e incluídas em parafina, sendo este processamento de rotina em laboratórios de Histologia para confecção das lâminas histológicas. Após o material ser cortado em micrótono manual na espessura de 5 $\mu$ m, o mesmo foi corado com Hematoxilina-Eosina (HE). Posteriormente, as lâminas histológicas foram analisadas em microscopia de luz para descrição morfológica das diferentes fases de desenvolvimento sexuais.

A determinação das fases de desenvolvimento dos folículos ovarianos ocorreu de acordo com VAZZOLER (1996).

As gônadas femininas foram utilizadas neste estudo para uma possível comparação, no caso de alguma alteração nas gônadas masculinas.

### **3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Os resultados das análises de cálcio e peso dos peixes obtidos nos experimentos foram analisados estatisticamente por teste “t” de student para comparação entre os grupos.

Os resultados da VTG foram analisados estatisticamente por teste ANOVA seguido da Prova de Dunnett.

Para a análise estatística e a confecção dos gráficos utilizou-se o programa Graphpad Prism<sup>®</sup> versão 3.0.

## 4 RESULTADOS

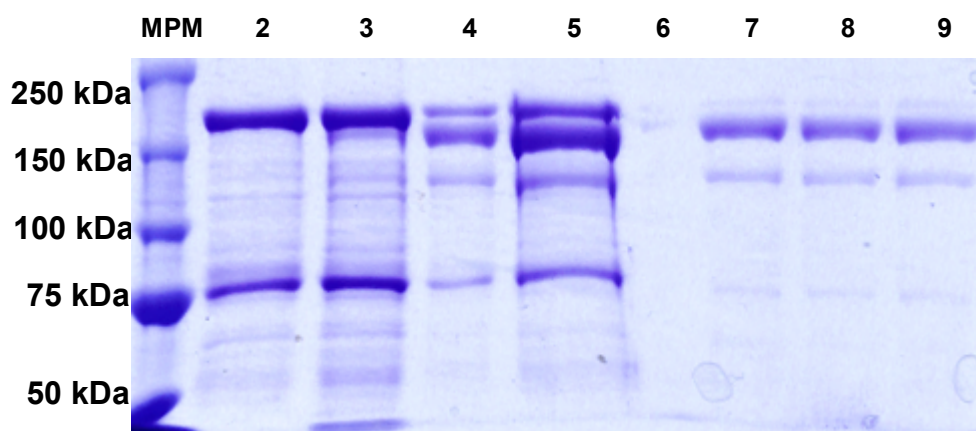
### 4.1 PURIFICAÇÃO E ISOLAMENTO DA VITELOGENINA

A purificação e isolamento da VTG com solução de EDTA e  $MgCl_2$  foram realizados primeiramente com cascudo, mas não obtivemos resultados satisfatórios.

Foram realizadas várias diluições do plasma do cascudo nas razões molares 1,0:2,5; 1,0:2,0 e 1,0:1,5. Não foi possível a precipitação seletiva da VTG com EDTA e  $MgCl_2$  em nenhuma das razões molares.

Desta forma foi realizado um experimento testando a metodologia de precipitação e purificação da VTG em jundiás. O resultado obtido foi bastante satisfatório como pode-se observar na FIGURA 6 no gel de eletroforese.

FIGURA 6 - ELETROFORESE DESNATURANTE EM GEL DE POLIACRILAMIDA PARA ANÁLISE DA VITELOGENINA PLASMÁTICA DE *Rhamdia quelen* DOS GRUPOS FÊMEA CONTROLE, MACHO CONTROLE E  $E_2$



LEGENDA: Gel de empilhamento com acrilamida a 4% e gel de separação a 8%. Coloração por *Coomassie Brilliant Blue*. O plasma de machos e fêmeas coletado antes e após 14 dias de indução por 17 $\beta$ -estradiol ( $E_2$ ) 120 $\mu$ l  $E_2 \cdot L^{-1}$  administrado via hídrica.

*Linha 1:* marcador de peso molecular (MPM)

*Linha 2:* 15 $\mu$ l de plasma de fêmea controle 1 sem precipitação;

*Linha 3:* 15 $\mu$ l de plasma de fêmea controle 2 sem precipitação;

*Linha 4:* 15 $\mu$ l de plasma de macho induzido 17 $\beta$ -estradiol ( $E_2$ ) sem precipitação;

*Linha 5:* 15 $\mu$ l de plasma de macho induzido 17 $\beta$ -estradiol ( $E_2$ ) sem precipitação;

*Linha 6:* 15 $\mu$ l de plasma de macho controle;

*Linhas 7 a 9:* 15 $\mu$ l de precipitado protéico redissolvido em NaCl a 1 M, após

precipitação do plasma de macho do grupo 17 $\beta$ -estradiol (E<sub>2</sub>) em solução de Na<sub>2</sub>EDTA.2H<sub>2</sub>O adicionada de MgCl<sub>2</sub>, gerando as seguintes razões molares finais:

$$\text{Linha 7: [EDTA]} \div [\text{Mg}^{++}] = 1,0 \div 2,0$$

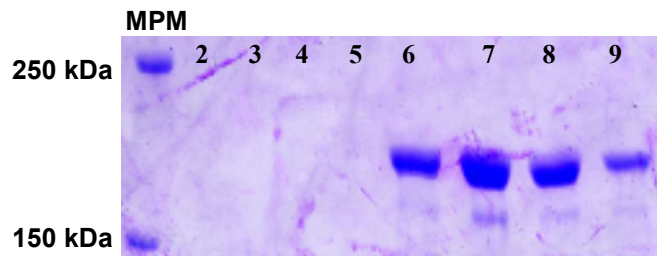
$$\text{Linha 8: [EDTA]} \div [\text{Mg}^{++}] = 1,0 \div 1,5$$

$$\text{Linha 9: [EDTA]} \div [\text{Mg}^{++}] = 1,0 \div 1,0$$

A precipitação do plasma de jundiá foi realizada nas razões molares de 1,0:2,0; 1,0:1,5 e 1,0:1,0. Não observou-se diferenças no gel entre as razões molares, sendo assim, a razão molar 1,0:1,0 foi utilizada em todos os testes demonstrando a VTG induzida *in vivo* analisadas por SDS-PAGE.

O E<sub>2</sub> e o EE<sub>2</sub> administrados via hídrica na dose de 120 $\mu$ L, induziu a expressão da VTG em machos da espécie *Rhamdia quelen*, 14 dias após a exposição, como demonstrado com a VTG plasmática analisada por SDS-PAGE, seguida de coloração com CBB (FIGURAS 7 e 8).

FIGURA 7 - ELETROFORESE DESNATURANTE EM GEL DE POLIACRILAMIDA PARA ANÁLISE DA VITELOGENINA PLASMÁTICA DA ESPÉCIE *Rhamdia quelen* DOS GRUPOS MACHO CONTROLE, EE<sub>2</sub> E E<sub>2</sub>



LEGENDA: Gel de empilhamento com acrilamida a 4% e de separação a 8%. Coloração por *Coomassie Brilliant Blue*. O plasma foi coletado após 14 dias de indução por 17 $\beta$ -estradiol (E<sub>2</sub>) 120 $\mu$ L E<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup> e 17 $\alpha$ -etinil-estradiol (EE<sub>2</sub>) 120 $\mu$ L EE<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup>, administrados via hídrica.

*Linha 1*: marcador de peso molecular (MPM)

*Linhas 2 a 5*: 15 $\mu$ L de plasma de macho controle;

*Linha 6*: 15 $\mu$ L de plasma de macho induzido 17 $\beta$ -estradiol (E<sub>2</sub>)\*;

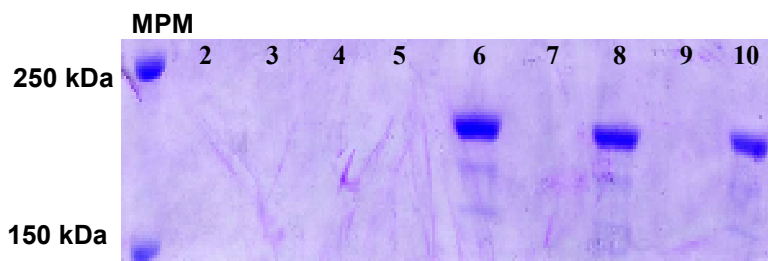
*Linha 7*: 15 $\mu$ L de plasma de macho induzido 17 $\beta$ -estradiol (E<sub>2</sub>)\*;

*Linha 8*: 15 $\mu$ L de plasma de macho induzido 17 $\alpha$ -etinil-estradiol (EE<sub>2</sub>)\*;

*Linha 9*: 15 $\mu$ L de plasma de macho induzido 17 $\alpha$ -etinil-estradiol (EE<sub>2</sub>)\*;

\* Precipitado protéico redissolvido em NaCl a 1 M, após precipitação do plasma de macho em solução de Na<sub>2</sub>EDTA.2H<sub>2</sub>O adicionada de MgCl<sub>2</sub>, na razão molar de 1,0:1,0.

FIGURA 8 - ELETROFORESE DESNATURANTE EM GEL DE POLIACRILAMIDA PARA ANÁLISE DA VITELOGENINA PLASMÁTICA EM MACHOS DA ESPÉCIE *Rhamdia quelen* ANTES E APÓS INDUÇÃO COM  $EE_2$  E  $E_2$



LEGENDA: Gel de empilhamento com acrilamida a 4% e gel de separação a 8%. Coloração por *Coomassie Brilliant Blue*. O plasma foi coletado antes e após 14 dias de indução por 17 $\beta$ -estradiol ( $E_2$ ) 120 $\mu$ l  $E_2.L^{-1}$  e 17 $\alpha$ -etinil-estradiol ( $EE_2$ ) 120 $\mu$ l  $EE_2.L^{-1}$ , administrados via hídrica.

*Linha 1*: marcador de peso molecular (MPM);

*Linhas 2 a 4*: 15 $\mu$ l de plasma de macho controle\*;

*Linha 5*: 15 $\mu$ l de plasma de macho antes da indução por 17 $\beta$ -estradiol ( $E_2$ )\*;

*Linha 6*: 15 $\mu$ l de plasma de macho induzido 17 $\beta$ -estradiol ( $E_2$ )\*;

*Linha 7*: 15 $\mu$ l de plasma de macho antes da indução por 17 $\alpha$ -etinil-estradiol ( $EE_2$ )\*;

*Linha 8*: 15 $\mu$ l de plasma de macho induzido 17 $\alpha$ -etinil-estradiol ( $EE_2$ )\*;

*Linha 9*: 15 $\mu$ l de plasma de macho antes da indução por 17 $\beta$ -estradiol ( $E_2$ )\*;

*Linha 10*: 15 $\mu$ l de plasma de macho induzido 17 $\beta$ -estradiol ( $E_2$ )\*;

\* Precipitado protéico redissolvido em NaCl a 1 M, após precipitação do plasma de macho em solução de  $Na_2EDTA.2H_2O$  adicionada de  $MgCl_2$ , na razão molar de 1,0:1,0.

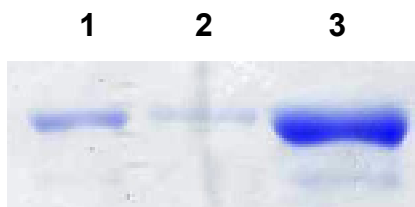
O método de SILVERSAND, HYLLNER e HAUX (1993) de purificação parcial da VTG, aqui utilizado mostrou-se simples e eficaz. Tal método consiste da precipitação da proteína *on bath*, dispensando procedimentos cromatográficos e tem como princípio algumas propriedades moleculares da VTG, determinadas pelo orto-fosfato em interações eletrofílicas com o magnésio adicionado, permitindo assim o isolamento por centrifugação.

O plasma de macho controle de *Rhamdia quelen* analisado por *SDS-PAGE-CBB*, não apresentou a banda correspondente à VTG ( $\approx 200$  kDa), como ilustrado nas FIGURAS 7 e 8 .

O plasma de fêmea de *Rhamdia quelen*, analisado por *SDS-PAGE-CBB*, apresentou a banda correspondente à VTG, mas com fraca intensidade antes da indução com  $E_2$ , indicando que o animal estava em estágios iniciais de vitelogênese, fato confirmado pela análise macroscópica das gônadas. É provável, devido ao tamanho da fêmea que ela estivesse entrando no seu

primeiro período de vitelogênese, no início de sua maturação sexual (FIGURA 9).

FIGURA 9 - ELETROFORESE DESNATURANTE EM GEL DE POLIACRILAMIDA PARA ANÁLISE DA VITELOGENINA PLASMÁTICA DE *Rhamdia quelen* DOS GRUPOS FÊMEA CONTROLE E E<sub>2</sub>



LEGENDA: Gel de empilhamento com acrilamida a 4% e gel de separação a 8%. Coloração por *Coomassie Brilliant Blue*. Plasma das fêmeas coletado antes e após 14 dias de indução por 17 $\beta$ -estradiol (E<sub>2</sub>) 120 $\mu$ l E<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup> administrados via hídrica.

*Linha 1*: 15 $\mu$ l de plasma de fêmea antes da indução por 17 $\beta$ -estradiol (E<sub>2</sub>)\*;

*Linha 2*: 15 $\mu$ l de plasma de fêmea antes da indução por 17 $\beta$ -estradiol (E<sub>2</sub>)\*;

*Linha 3*: 15 $\mu$ l de plasma de fêmea após indução por 17 $\beta$ -estradiol (E<sub>2</sub>)\*;

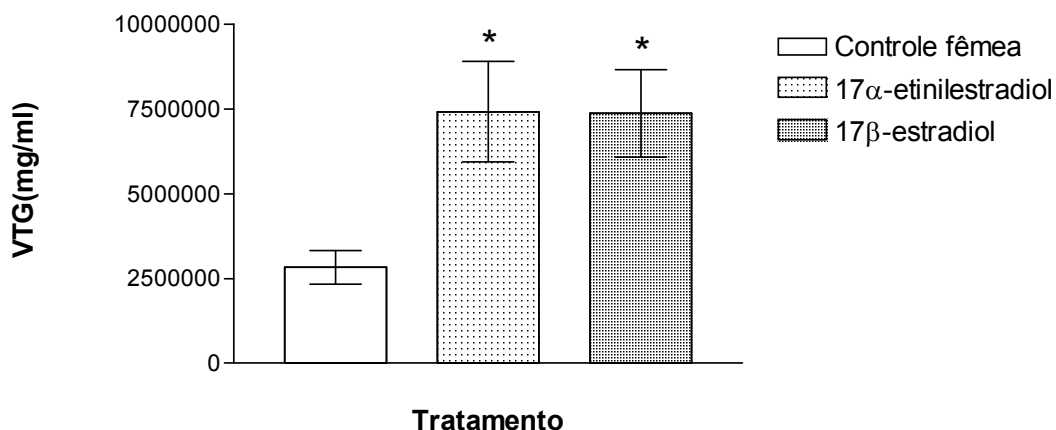
\* Precipitado protéico redissolvido em NaCl a 1 M, após precipitação do plasma de fêmea em solução de Na<sub>2</sub>EDTA.2H<sub>2</sub>O adicionada de MgCl<sub>2</sub>, na razão molar de 1,0:1,0.

O padrão eletroforético de todas as amostras não pôde ser repetido e atribui-se a isso o congelamento do plasma que, mesmo sendo realizado apenas uma vez, degradou a VTG.

Durante os 14 dias de experimento houve a morte de aproximadamente 3 peixes por grupo, tanto controle como induzido.

No GRÁFICO 1 pode-se observar que a concentração relativa de VTG nos grupos induzidos aumentou significativamente quando comparado com o controle fêmea.

GRÁFICO 1 – CONCENTRAÇÃO RELATIVA DE VITELÓGENINA NA ESPÉCIE *Rhamdia quelen* NOS GRUPOS FÊMEA CONTROLE, EE<sub>2</sub> E E<sub>2</sub>

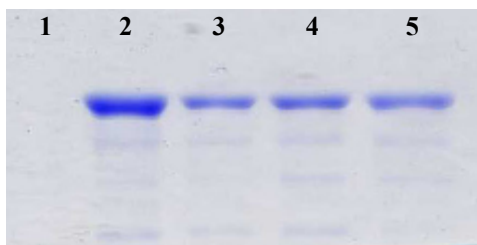


NOTA: Concentração relativa de VTG após 14 dias de exposição dos machos aos hormônios 17 $\alpha$ -etinil-estradiol (EE<sub>2</sub>) e 17 $\beta$ -estradiol (E<sub>2</sub>). ANOVA seguido de DUNNETT. Os dados representam as médias  $\pm$  EP \*  $p < 0,05$ .  $N = 15$

#### 4.2 TAMARON<sup>®</sup>

O TAMARON<sup>®</sup> não induziu a VTG nos peixes machos como pode ser observado na FIGURA 10, ao contrário dos hormônios EE<sub>2</sub> e E<sub>2</sub> que induziram a proteína.

FIGURA 10 - ELETROFORESE DESNATURANTE EM GEL DE POLIACRILAMIDA PARA ANÁLISE DA VITELÓGENINA PLASMÁTICA DE *Rhamdia quelen* EM MACHOS DO GRUPO EE<sub>2</sub>, E<sub>2</sub> E TAMARON<sup>®</sup>



LEGENDA: Gel de empilhamento com acrilamida a 4% e gel de separação a 8%. Coloração por *Coomassie Brilliant Blue*. Plasma de machos coletado após 14 dias de indução por 17 $\beta$ -estradiol (E<sub>2</sub>) e 17 $\alpha$ -etinil-estradiol (EE<sub>2</sub>) e exposição ao pesticida TAMARON<sup>®</sup> (50 $\mu$ l.L<sup>-1</sup>), administrados via hídrica.

*Linha 1:* 15µl de plasma de macho após a exposição ao TAMARON \*;  
*Linha 2:* 15µl de plasma de macho após indução por 17β-estradiol (E<sub>2</sub>)\*;  
*Linha 3:* 15µl de plasma de macho após indução por 17β-estradiol (E<sub>2</sub>)\*;  
*Linha 4:* 15µl de plasma de macho após indução por 17α-etinil-estradiol (EE<sub>2</sub>)\*;  
*Linha 5:* 15µl de plasma de macho após indução por 17α-etinil-estradiol (EE<sub>2</sub>)\*;  
 \* Precipitado protéico redissolvido em NaCl a 1 M, após precipitação do plasma de fêmea em solução de Na<sub>2</sub>EDTA.2H<sub>2</sub>O adicionada de MgCl<sub>2</sub>, na razão molar de 1,0:1,0.

#### 4.3 PESO E COMPRIMENTO DOS PEIXES

A redução de peso dos jundiás antes e após o experimento não foi estatisticamente significativa, apesar de apresentar uma leve tendência de diminuição do peso nos grupos tratados com hormônios.

Como pode-se observar na TABELA 1, tanto os machos como as fêmeas encontravam-se em idade de maturação segundo NARAHARA e colaboradores (1985) e NAKATANI e colaboradores (2001).

TABELA 1 - PESO (g) E COMPRIMENTO (cm) DOS JUNDIÁS DO GRUPO FÊMEA CONTROLE, MACHO CONTROLE, EE<sub>2</sub>, E<sub>2</sub> E TAMARON® ANTES (A) E APÓS (D) 14 DIAS DE EXPOSIÇÃO VIA HÍDRICA

	<i>Fêmea</i>	<i>Macho</i>			
	<i>Controle</i>	<i>Controle</i>	<i>17α-etinilestradiol</i>	<i>17β-estradiol</i>	<i>TAMARON®</i>
Peso(g) A	53,90±4,51	48,48±3,84	50,58±1,97	50,58±3,35	51,33±3,60
Peso (g) D	51,24±4,36	47,69±4,57	42,33±2,58	41,95±4,30	41,15±3,02
Comprimento(cm)	17,54±0,59	16,75±0,42	16,10±0,30	17,07±0,44	16,73±0,35

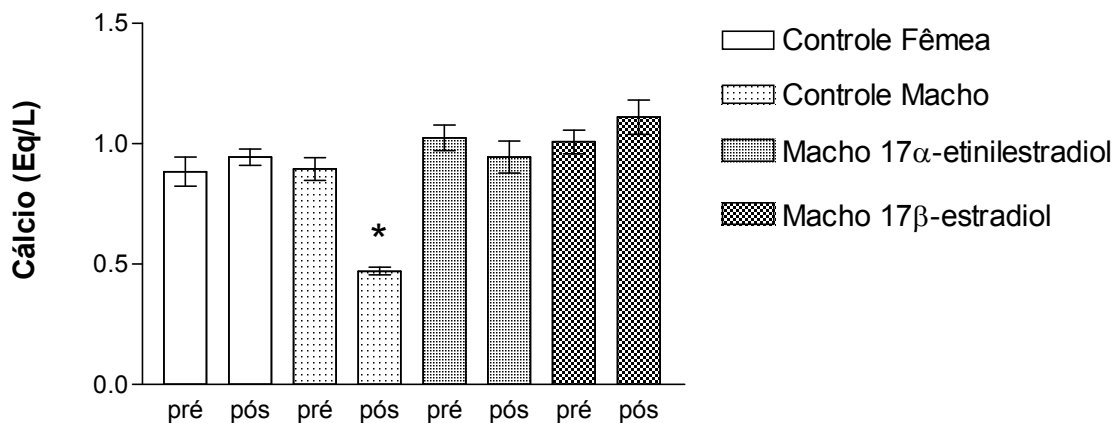
NOTA: Os resultados expressam as médias ± erro padrão da média. (n= 15)

#### 4.4 CONCENTRAÇÃO DE CÁLCIO

A concentração de cálcio plasmático da espécie *Rhamdia quelen* após o experimento foi estatisticamente significativo no grupo controle macho quando comparado com a concentração plasmática de cálcio no início do experimento (GRÁFICO 2).

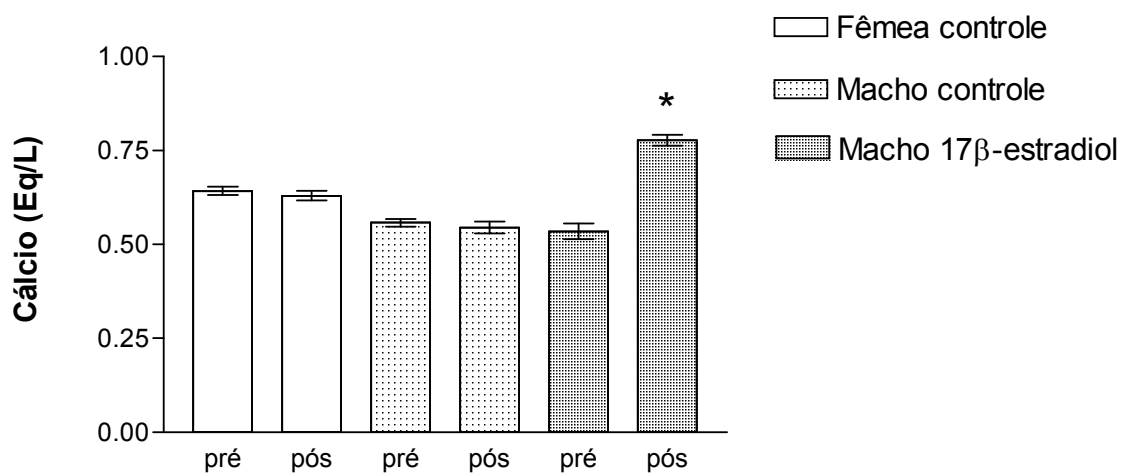
Na espécie *Ancistrus multispinnis* houve um aumento da concentração plasmática de cálcio após 14 dias de exposição via hídrica ao hormônio 17 $\beta$ -estradiol como pode ser observado no GRÁFICO 2.

GRÁFICO 2 - CONCENTRAÇÃO DE CÁLCIO PLASMÁTICO DE *Rhamdia quelen* AVALIADO NO PRIMEIRO DIA DE EXPERIMENTO (PRÉ) E APÓS 14 DIAS (PÓS) DE EXPOSIÇÃO VIA HÍDRICA AO 17 $\alpha$ -etinil-estradiol (EE<sub>2</sub>) E 17 $\beta$ -estradiol (E<sub>2</sub>).



NOTA: Teste *t* de student. Os dados representam a média  $\pm$  EP \**p* < 0,001. *N* = 15

GRÁFICO 3 - CONCENTRAÇÃO DE CÁLCIO PLASMÁTICO DE *Ancistrus multispinnis* AVALIADO NO PRIMEIRO DIA DE EXPERIMENTO (PRÉ) E APÓS 14 DIAS (PÓS) DE EXPOSIÇÃO VIA HÍDRICA 17 $\beta$ -estradiol (E<sub>2</sub>).



NOTA: Teste *t* de student. Os dados representam médias  $\pm$  EP \**p* < 0,001. *N* = 4

#### 4.5 HISTOLOGIA

A morfologia das gônadas das fêmeas, analisadas histologicamente, caracterizou as cinco fases de desenvolvimento dos folículos ovarianos (ovogênese) para *Rhamdia quelen* (FIGURA 11). Folículo atrésico e vazios não foram considerados como fase de desenvolvimento no processo de ovogênese e sim como estruturas derivadas do referido processo.

Nos peixes machos não se observou nenhuma alteração entre as gônadas do grupo controle, E<sub>2</sub>, EE<sub>2</sub> e TAMARON<sup>®</sup>. Todos os cortes histológicos mostraram o mesmo desenvolvimento e estruturas quanto à organização da gônada, morfologia das células e afinidade por corantes (FIGURAS 12 a 15).

O pre-experimento com os cascudos teve por objetivo testar a metodologia de purificação e isolamento da proteína. Como isso não foi possível as gônadas dos cascudos não foram retiradas para análise histológica.

FIGURA 11 - FOTOMICROGRÁFICA DE CORTE HISTOLÓGICO DE GÔNADA DE FÊMEA DA ESPÉCIE *Rhamdia quelen* DO GRUPO CONTROLE, EVIDENCIANDO DIFERENTES FASES DE DESENVOLVIMENTO DO FOLÍCULO OVARIANO. FOLÍCULOS OVARIANOS NAS FASES II (FII), FASE III (FIII), FASE IV (FIV) E FASE V (FV). ESCALA = 180 $\mu$ M. COLORAÇÃO H.E.

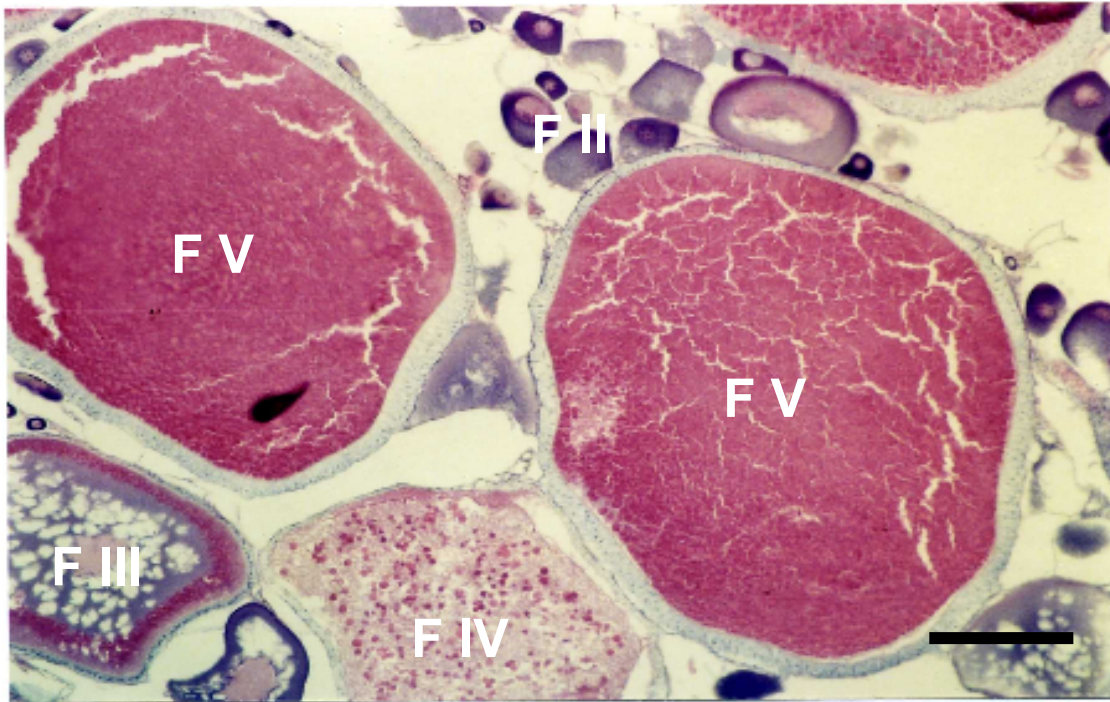


FIGURA 12 - FOTOMICROGRÁFICA DE CORTE HISTOLÓGICO DE GÔNADA DE MACHO DA ESPÉCIE *Rhamdia quelen* DO GRUPO CONTROLE, EVIDENCIANDO DIFERENTES FASES DE DESENVOLVIMENTO DAS CÉLULAS DA LINHAGEM ESPERMÁTICA. ESPERMATOZÓIDE (SPZ). ESCALA = 45 $\mu$ M. COLORAÇÃO H.E.

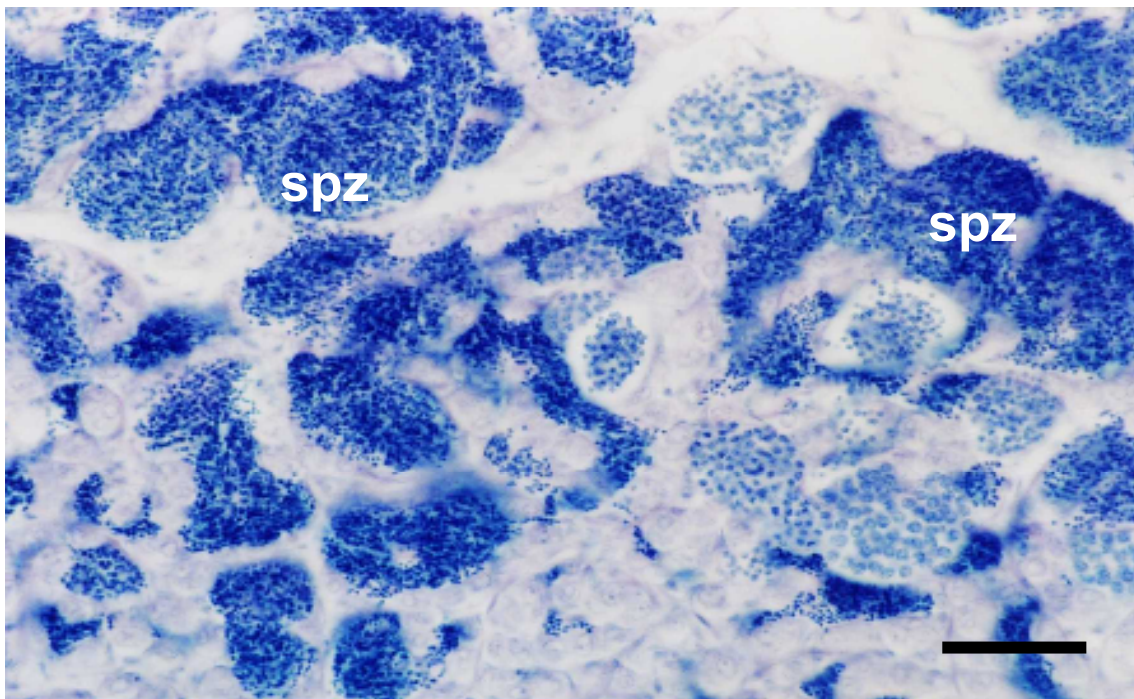


FIGURA 13 - FOTOMICROGRÁFICA DE CORTE HISTOLÓGICO DE GÔNADA DE MACHO DA ESPÉCIE *Rhamdia quelen* DO GRUPO E<sub>2</sub>. ESPERMATOZÓIDE (SPZ). ESCALA = 45μM. COLORAÇÃO H.E.

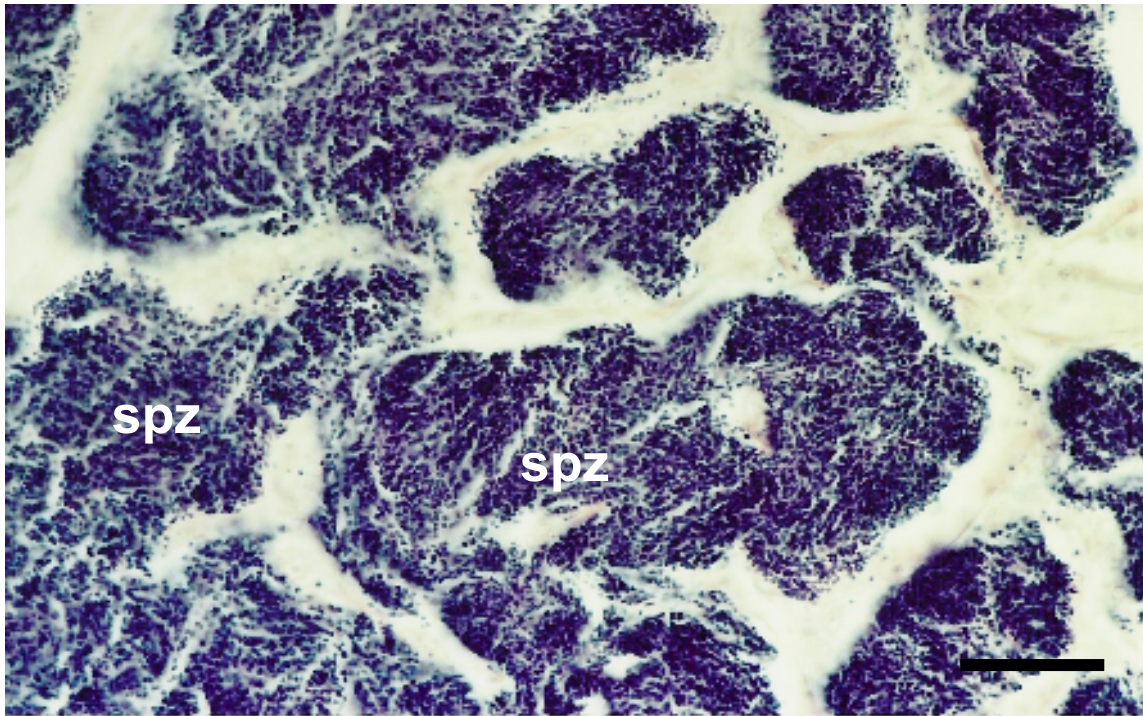


FIGURA 14 - FOTOMICROGRÁFICA DE CORTE HISTOLÓGICO DE GÔNADA DE MACHO DA ESPÉCIE *Rhamdia quelen* DO GRUPO EE<sub>2</sub>. ESPERMATOZÓIDE (SPZ). ESCALA= 45μM. COLORAÇÃO H.E.

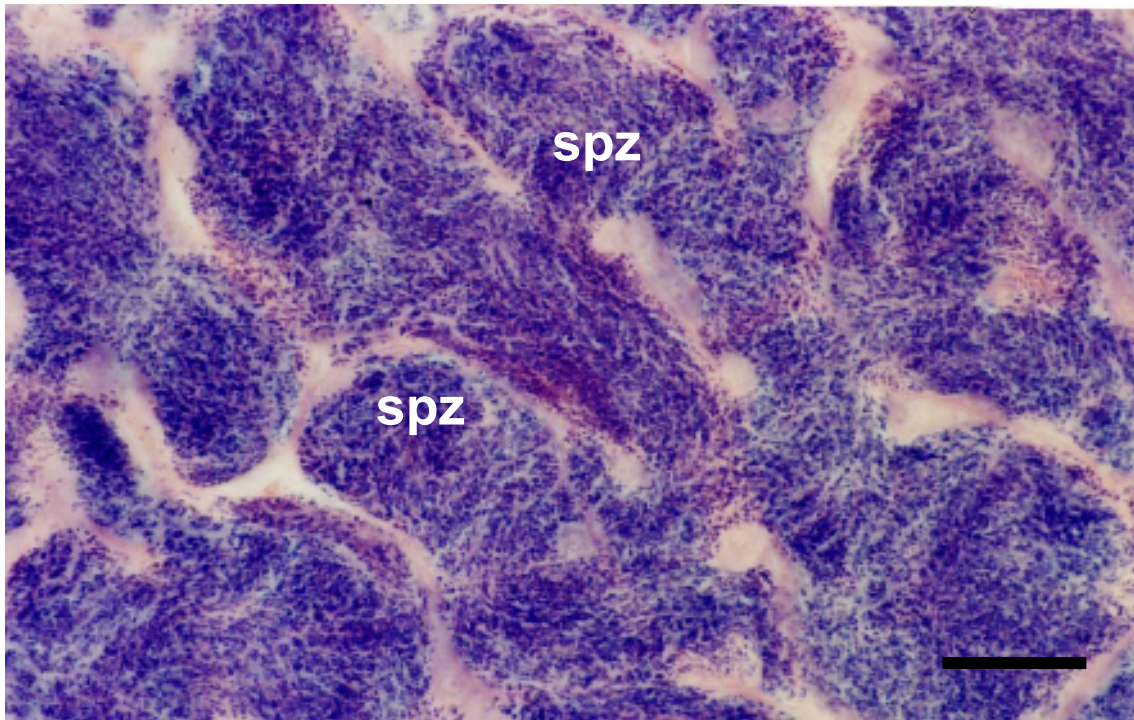
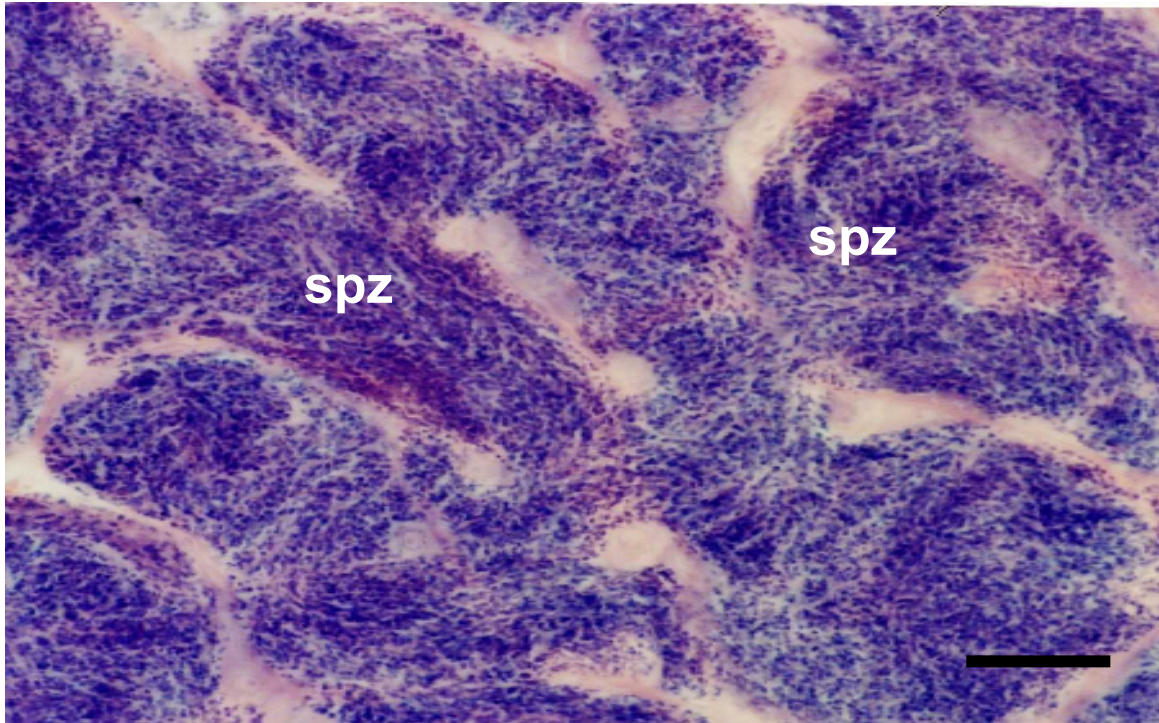


FIGURA 15 - FOTOMICROGRÁFICA DE CORTE HISTOLÓGICO DE GÔNADA DE MACHO DA ESPÉCIE *Rhambdia quelen* DO GRUPO TAMARON®. ESPERMATOZÓIDE (SPZ). ESCALA= 45µM. COLORAÇÃO H.E.



## 5 DISCUSSÃO

Os desreguladores endócrinos vêm sendo muito difundidos e estudados devido ao seu potencial de causar efeitos fisiológicos deletérios em humanos e animais.

Existem numerosos trabalhos científicos relacionados a estudos com a VTG de vertebrados, e principalmente com a expressão da VTG de peixes, a qual vem sendo utilizada como resposta biológica para exposição a agentes estrogênicos (VAN DEN BELT; VERHEYEN; WITTERS, 2003b; WILLIAMS; KITAYSKY; VÉZINA, 2004).

O método de precipitação seletiva da VTG com EDTA:Mg<sup>2+</sup> proposto por SILVERSAND, HYLLNER e HAUX (1993) foi utilizado neste experimento com êxito para a espécie *Rhamdia quelen* variando a razão molar final entre EDTA<sup>-</sup> e Mg<sup>++</sup> na precipitação. O mesmo não aconteceu para a espécie *Ancistrus multispinnis*, porém os mesmos autores citam trabalhos em que, com outras espécies de peixes, não foi possível a precipitação da VTG. A VTG dos teleósteos é menos fosforilada quando comparada com a VTG de outros vertebrados, o que, resulta em uma menor quantidade de cargas negativas presentes na proteína de teleósteos (SILVERSAND; HYLLNER; HAUX, 1993). As técnicas de isolamento da VTG que dependem da presença de um número de cargas relativamente altas na molécula da proteína vem sendo consideradas menos apropriadas para certas espécies de teleósteos (DE VLAMING; WILEY; WALLACE, 1980; SELMAN; WALLACE, 1983). Desta forma, a precipitação com EDTA:Mg<sup>2+</sup> talvez não ocorra ou ocorra somente quando uma alta concentração de VTG esteja presente no plasma (NORBERG; HAUX, 1985).

Resultados provenientes de trabalhos realizados por DE VLAMING, WILEY e WALLACE (1980) e TYLER e SUMPTER (1990) demonstraram que a VTG de teleósteos pode ser altamente sensível à degradação, motivo pelo qual, todas as precauções como controle da temperatura, congelar e evitar a reutilização das amostras, devem ser tomadas durante o processo de purificação para obtenção da VTG intacta. Se estas precauções são ignoradas, a VTG pode ser facilmente degradada em várias pequenas porções da proteína o que pode interferir na interpretação dos resultados.

Experimentos realizados com *Carrasius auratus* (goldfish), *Fundulus heteroclitus* (kilifish), *Salmo trutta* (truta marrom), *Cyprinus carpio* (carpa) e *Oncorhynchus mykiss* (rainbow trout) demonstraram que a estabilidade da VTG pode variar conforme a espécie, sendo algumas mais sensíveis à sofrer proteólise do que outras (DE VLAMING; WILEY; WALLACE, 1980; TYLER; SUMPTER, 1990).

O fato da VTG de algumas espécies de teleósteos ser extremamente susceptível à proteólise durante o processo de isolamento implica que a degradação da VTG pode ser interpretada como a existência de várias outras formas de VTG (ANSARI et al., 1971; SILVERSAND; HYLLNER; HAUX, 1993).

A VTG de *Rhamdia quelen* demonstrou a instabilidade estrutural reportada por SILVERSAND, HYLLNER e HAUX (1993) com estudos cromatográficos, sendo susceptível a degradação por sua alta massa molecular (FIGURA 6).

Conhecendo as características da proteína, sugere-se que a técnica de isolamento seja modificada conforme a espécie de peixe em estudo. Entretanto, o método de isolamento e purificação da VTG foi alterado para a espécie *Ancistrus multispinnis*, testando várias razões molares de EDTA:Mg<sup>2+</sup>, e aumentando o volume de água destilada utilizada para a re-precipitação e mesmo assim não foi possível a precipitação da proteína.

Existem poucos trabalhos relacionando a VTG com peixes nativos, desta forma, não tivemos outros parâmetros para comparar a proteína entre as espécies aqui utilizadas.

Além das diferenças existentes com relação às formas de VTG nas diversas espécies de peixes, também existe a variabilidade entre as espécies com relação a sua sensibilidade frente à exposição à substâncias estrogênicas e a conseqüentemente indução da VTG. Como exemplo podemos citar, o estudo realizado por ROUTLEDGE e colaboradores (1998) expondo *Oncorhynchus mykiss* e *Rutilus rutilus* durante 21 dias à mesma concentração de E<sub>2</sub> (10ng/L) obtendo como resultado a indução da VTG apenas na espécie *Oncorhynchus mykiss*. Outro estudo similar foi realizado por ALLNER e colaboradores (1999) com *Oncorhynchus mykiss*, *Danio rerio* e *Leuciscus idus*.

Outros estudos que relatam o uso da expressão da VTG de peixes como resposta biomarcadora, *in vivo* ou *in vitro*, podem ser encontrados também em

PANTER; THOMPSON; SUMPTER, 1998; KRAMER et al., 1998; HASHIMOTO et al., 2000; PAIT; NELSON, 2003; VAN DEN BELT et al., 2003a; MONCAUT; LO NOSTRO; MAGGESE, 2003.

Para a realização destes experimentos foram escolhidos o hormônio endógeno ( $E_2$ ) e o hormônio sintético ( $EE_2$ ), substâncias conhecidas pela sua atividade estrogênica ou anti-estrogênica (RANKOUHI et al., 2004) que vem sendo constantemente encontradas em estações de tratamento de esgoto em vários países em diferentes concentrações (SNYDER et al., 1999; BARONTI et al., 2000; METCALFE et al., 2001; KOLPIN et al., 2002) inclusive no Brasil (TERNES et al., 1999). Dentre os principais efeitos detectados em machos teleósteos relacionados à exposição à agentes químicos estrogênicos provenientes de efluentes de estações de tratamento de esgoto estão: a indução da VTG (FOLMAR et al., 1996; HARRIES et al., 1997), alteração nos níveis plasmáticos de esteróides sexuais (FOLMAR et al., 2001), alta prevalência de gônadas intersexuadas (JOBILING et al., 1998) e redução no tamanho dos testículos (HARRIES et al., 1997). Mais recentemente, alterações estruturais na estrutura das gônadas femininas foram encontradas (SEKI et al., 2002).

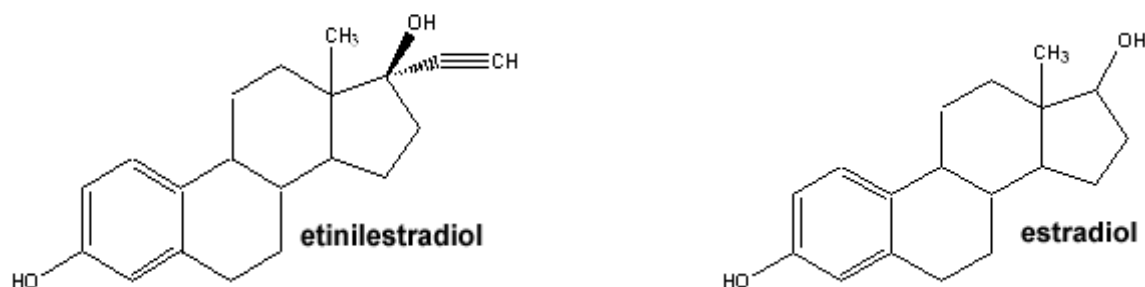
Verificou-se a indução da VTG plasmática no experimento realizado com os jundiás nos grupos  $E_2$  e  $EE_2$  como esperado. O mesmo resultado foi obtido também por outros autores realizando experimentos com outras espécies (ROUTLEDGE et al., 1998; BRION et al., 2004; CARBALLO et al., 2005).

O resultado demonstra ainda que não houve diferenças entre os grupos  $E_2$  e  $EE_2$  na indução da VTG, apesar da mais rápida metabolização e excreção do  $E_2$  (FIGURA 16) em comparação com o  $EE_2$ , o qual foi especialmente desenhado para resistir por um tempo maior ao processo de metabolização *in vivo*, devido ao grupamento  $17\alpha$ -etnil na posição dos carbonos 16 e 17. Como resultado apenas pequenas quantidades do hormônio sintético são necessárias para induzir a VTG *in vivo* (ALLNER et al., 1999).

O  $E_2$  tem papel importante no desenvolvimento, crescimento, diferenciação sexual e na reprodução. A vitelogênese inicia-se com a produção do  $E_2$ , o qual estimula a síntese e liberação da VTG pelo fígado, sendo em seguida transportada pelo sangue até os oócitos em

desenvolvimento no ovário, onde é clivada em dois componentes primários, a fosfovítina e a vitelina (CONNAUGHTON; AIDA, 1999).

FIGURA 16 – ESTRUTURA QUÍMICA DO 17 $\beta$ -estradiol (E<sub>2</sub>) E 17 $\alpha$ -etinil estradiol.



O hormônio sintético EE<sub>2</sub> é amplamente utilizado em contraceptivos orais e também na terapia de reposição hormonal. Experimentos com peixes demonstram que o mesmo atua como um estrógeno altamente potente (ALLNER et al., 1999; VAN DEN BELT et al., 2003a). Vários estudos com pequenas espécies como *Danio rerio*, *Pimephales promelas* e *Oryzias latipes* demonstraram que o EE<sub>2</sub> causa desregulação endócrina, mesmo em pequenas concentrações, levando à indução da VTG, aparecimento de ovo-testes e reversão sexual em machos (KIME; NASH; SCOTT, 1999; LANGE et al., 2001).

Tanto estes estrógenos supracitados assim como também outros como a estrona e o estriol, que são hormônios endógenos e substâncias como bisfenol A (BPA), octilfenol (OP) e DDT (SEGNER et al., 2003), se ligam aos receptores de estrógenos dos organismos expostos com uma afinidade idêntica ou similar ao hormônio endógeno, E<sub>2</sub>, e possuem o potencial de exercer efeitos a extremamente baixas concentrações (MILLS et al., 2005). Os receptores de estrógenos também estão presentes no fígado de peixes jovens ou machos, desta forma, a indução não-fisiológica da VTG causada por esteróides exógenos pode ocorrer (PANTER; THOMPSON; SUMPTER, 1998; ALLNER et al., 1999). Além disso, os peixes machos carregam o gene da VTG, ativando-o quando expostos à substâncias estrogênicas (FLOURIOT et al., 1993).

O TAMARON<sup>®</sup> após um período de 14 dias não induziu a síntese de VTG na espécie *Rhamdia quelen*. Uma das possíveis causas seria o tempo de

exposição ou concentração insuficiente da substância. Em estudos em ratos o metamidofós não apresentou ação estrogênica, somente quando associado a outros pesticidas (ARAÚJO, 2005). Em peixes existem poucos trabalhos relacionando este inseticida organofosforado com a indução plasmática da VTG.

Foi observado um aumento na concentração plasmática de cálcio na espécie *Ancistrus multispinnis* após 14 dias de exposição ao E<sub>2</sub>. O mesmo não foi observado na espécie *Rhamdia quelen* exposta ao E<sub>2</sub> e ao EE<sub>2</sub> durante o mesmo período de tempo mesmo resultando na indução da VTG e uma diminuição da concentração de cálcio no grupo controle macho. O que sugere diferenças entre as espécies aqui utilizadas.

Talvez o método utilizado para avaliação do cálcio plasmático não foi sensível o suficiente como foi a técnica utilizada para medir a vitelogenina, sendo assim, grande quantidade de proteína pode ser anteriormente induzida sem ao menos promover mudanças relacionadas aos níveis de cálcio plasmático (GILLESPIE; DE PEYSTER, 2004).

Vários trabalhos como, por exemplo de Versonnen et al., 2004; Gillespie; De Peyster, 2004 demonstraram um aumento da concentração plasmática de cálcio após a indução ou aumento da vitelogenina com o hormônio endógeno. Nenhum trabalho foi encontrado relacionando o aumento da concentração plasmática de cálcio e o hormônio sintético EE<sub>2</sub>.

Nos teleósteos fêmeas, o cálcio plasmático manifesta uma variação sazonal e um aumento a medida que a maturação ovariana acontece (Fleming; Stangle; Meier, 1964; Balbontin; Espinosa; Pang, 1978), enquanto que nos machos, os níveis de cálcio plasmático não demonstram alteração durante os diferentes estágios de maturação gonadal.

Tsai e Wang (2000) expuseram tilápias (*Oreochromis mossambicus*) machos e fêmeas gonadotomizados ao E<sub>2</sub> durante 21 dias obtendo como resultado a diminuição de cálcio plasmático nas fêmeas e nenhuma alteração nos machos. No mesmo experimento a mesma espécie foi exposta a uma dieta contendo 50 ou 100 mg/kg de E<sub>2</sub> resultando em um aumento na concentração plasmática de cálcio em ambos os sexos, sugerindo que o hormônio possui um efeito hipercalcémico em ambos os sexos, sendo maior em machos.

Através da histologia foi possível confirmar o sexo dos animais. Quanto as alterações histológicas das gônadas masculinas, dos grupos expostos ao  $17\alpha$ -etinil-estradiol ( $EE_2$ ) e  $17\beta$ -estradiol ( $E_2$ ) durante 14 dias, não foram visualizadas alterações nas células da linhagem espermática quando comparadas com o grupo controle, isto indica que as concentrações utilizadas não causaram alterações microscópicas nas gônadas dos peixes dos diferentes grupos. O mesmo resultado foi obtido por PAWLOWSKI e colaboradores (2004) após exposição ao  $EE_2$  em *Pimephales promelas* durante 15 dias. Em contraste estudos realizados com medakas *Oryzias latipes* por KANG e colaboradores (2002) expostas ao  $E_2$  por 21 dias resultou em alterações nas gônadas masculinas com a presença de intersexualidade. METCALFE e colaboradores (2001) também observaram a presença de intersexualidade em medakas expostas durante 100 dias a quatro diferentes estrógenos entre eles o  $EE_2$  e  $E_2$ . O mesmo efeito foi constatado por GIMENO e colaboradores (1998) em carpas *Cyprinus carpio* expostas durante 3 meses ao  $17\beta$ -estradiol ( $E_2$ ). Sendo assim pode-se concluir que há necessidade de uma exposição mais prolongada para se obter efeitos morfológicos nos peixes. Além disso, a formação de ovo-testes talvez ocorra somente após a exposição durante um estágio específico de desenvolvimento (PAWLOWSKI et al., 2004).

Segundo LEINO, JENSEN e ANKLEY (2005) os desreguladores endócrinos atuam em baixas concentrações e de maneira sutil, afetando o comportamento e as características sexuais secundárias, assim como as próprias gônadas.

Devido à importância das substâncias com potencial de desregular o sistema endócrino é necessário continuar com os estudos sobre as metodologias de detecção e suas ações no sistema reprodutivo.

## 6 CONCLUSÃO

Nas condições descritas e com base nos resultados obtidos, podemos concluir que:

- O SDS-PAGE foi padronizado para determinação da indução da VTG plasmática na espécie *Rhamdia quelen*;
- O método de purificação e isolamento da VTG com EDTA e  $MgCl_2$  é satisfatório para *Rhamdia quelen*;
- Não há uma relação entre a indução da VTG e o aumento da concentração de cálcio plasmático nas espécies aqui estudadas;
- Tanto o hormônio sintético  $EE_2$  quanto o hormônio endógeno  $E_2$  induzem a VTG, comprovando assim seus efeitos estrogênicos;
- O TAMARON<sup>®</sup> não induz a VTG em *Rhamdia quelen*.
- Quanto à histologia das gônadas de machos e fêmeas, não há alteração significativa entre os grupos.

## 7 REFERENCIAS:

ALLNER, B.; WEGENER, G.; KNACKER, T.; SATHLSCHMIDT-ALLNER, P. Electrophoretic determination of estrogen-induced protein in fish exposed to synthetic and naturally occurring chemicals. **The Science of the Total Environment**, v. 233, p. 21-31, 1999.

ANSARI, A. Q.; DOLPHIN, P. J.; LAZIER, C. B.; MUNDAY, K. A. Chemical composition of an Oestrogen-induced calcium-binding Glycolipophosphoprotein in *Xenopus laevis*. **Biochemistry Journal**, v. 122, p. 107-113, 1971.

ANVISA. Agrotóxicos e Toxicologia: monografia de produtos agrotóxicos. **Citação e referências a documentos eletrônicos**. Disponível em <http://www.anvisa.gov.br> Acesso em: 08 maio, 2006.

ARAÚJO, S. L. de. Exposição de ratos wistar aos inseticidas Lambda-cialotrina, Carbaril e Metamidofós. Dissertação (Mestrado em Farmacologia), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

BALDISSEROTTO, B. **Fisiologia de Peixes aplicada à Psicultura**. Editora UFSM, Santa Maria-RS, 2002.

BALINOVA, A. A solid-phase extraction followed by high performance liquid chromatographic analysis for monitoring herbicides in drinking water. **Journal of Chromatography**, v. 643, p. 203-207, 1993.

BALBONTIN, F.; ESPINOSA, X.; PANG, P. K. T. Gonadal maturation and serum calcium levels in two teleosts, the hake and the killifish. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 61A, p. 617-621, 1978.

BARONTI, C.; CURINI, R.; D'ASCENZO, G.; DI CORCIA, A.; GENTILI, A.; SAMPERI, R. Monitoring Natural and Synthetic Estrogens at activated sludge sewage treatment plants and in a receiving river water. **Environmental Science and Technology**, v. 34, no. 24, 2000.

BERNE, R. M.; LEVY, M. N. Princípios gerais de Fisiologia endócrina. IN: BERNE, R. M.; LEVY, M. N.; **Princípios de Fisiologia**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, p. 417-427, 1990.

BILSSON, K.; WESTERLUND, L.; TYSKLIND, M.; OLSSON, P. E. Developmental disturbances caused by polychlorinated biphenyls in zebrafish (*Brachydanio rerio*). **Marine Environmental Research**, v. 46, p. 461-464, 1998.

BJORNSSON, B. T.; HAUX, C. Distribution of calcium, magnesium and inorganic phosphate in plasma of estradiol-17 $\beta$  treated rainbow trout. **Journal of Comparative Physiology**, v. 155B, p. 347-352, 1985.

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

BRAMBILLA, A.; RINDONE, B.; POLESELLO, S.; GALASSI, S.; BALESTRINI, R. The rate of triazine pesticides in river po water. **Science of Total Environment**, v. 132, p. 339-348, 1993.

BRION, F.; TYLER, C. R.; PALAZZI, X.; LAILLET, B.; PORCHER, J. M.; GARRIC, J.; FLAMMARION, P. Impacts of 17 $\beta$ -estradiol, including environmentally relevant concentrations, on reproduction after exposure during embryo-larval-, juvenile- and adult-life stages in zebrafish (*Danio rerio*). **Aquatic Toxicology**, 2004.

CARBALLO, M.; AGUAYO, S.; DE LA TORRE, A.; MUÑOZ, M. J. Plasma vitellogenin levels and gonadal morphology of wild carp (*Cyprinus carpio*) in a receiving rivers downstream of sewage treatment plants. **Science of the Total Environment**, v. 341, p. 71-79, 2005.

CARNEIRO, P. C. F.; SCHORER, M.; MIKOS, J. D. Tratamentos terapêuticos convencionais no controle do ectoparasita *Ichthyophthirius multifiliis* em jundiá (*Rhamdia quelen*). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 40, n<sup>o</sup> 1, p. 99-102, 2005a.

CARNEIRO, P. C. F.; MIKOS, J. D. Freqüência alimentar e crescimento de alevinos de jundiá (*Rhamdia quelen*). **Ciência Rural**, v. 35, n<sup>o</sup> 1, p. 187-191, 2005b.

CARSON, R. **Silent Spring**. Boston: Houghton Mifflin, 1962.

CARRAGHER, J. F.; SUMPTER, J. P. The mobilization of calcium from calcified tissues of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) induced to synthesize vitellogenin. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. A 99, p. 169-172, 1991.

COLBORN, T.; VOM-SAAL, F. S.; SOTO, A. M. Development effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. **Environmental Health Perspectives**, v. 101, p. 378-384, 1993.

CONNAUGHTON, M. A.; AIDA, K. Female Reproductive System, Fish. **Encyclopedia of Reproduction**, v. 2, p. 193-204, 1999.

DASTON, E. P.; COOK, J. C.; KAVLOCK, R. J. Uncertainties for Endocrine Disrupters: Our view on progress; **Toxicological Sciences**, v. 74, p. 245-252, 2003.

DAVIS, D. L.; BRADLOW, H. L.; WOLFF, M.; WOODRUFF, T.; HOEL, D. G.; ANTON-CULVER, H. Medical hypothesis: xenoestrogens as preventable causes of breast cancer. **Environmental Health Perspectives**, v. 101, p. 372-377, 1993.

DAVIS, J. E.; STERNBACH, G. L.; VARON, J.; FROMAM, R. E. J. Paracelsus and medical ventilation. **Resuscitation**, v. 47, p. 3-5, 2000.

DE VLAMING, V. L.; WILEY, G. D.; WALLACE, R. A. Goldfish (*Carassius auratus*) vitellogenin: induction, isolation, properties and relationship to yolk proteins. **Comparative Biochemistry and Physiology B**, v. 67, p. 613-623, 1980.

ENDOCRINE DISRUPTOR SCREENING AND TESTING ADVISORY COMMITTEE (EDSTAC). **EPA/743/R-98/003**: Final report. Washington, 1998.

ESQUIVEL, B. M. Produção do jundiá (*Rhamdia quelen*) em áreas de entorno do Parque Estadual da Serra do Tabuleiro em Paulo Lopes – SC. Tese (Doutorado em Engenharia de Produção), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.

EVANS, D. H. **The Physiology of fishes**. CRC Press, 1993.

FLEMING, W. R.; STANGLEY, J. G.; MEIER, A. H. Seasonal effects of external calcium, estradiol, and ACTH on the serum calcium and sodium levels of *Fundulus kansae*. **Gen. Comp. Endocrinol**, v. 4, p. 61-67, 1964.

FLOURIOT, G.; VAILLANT, C.; SALBERT, G.; PELISSERO, C.; GUIRAUD, J. M.; VALOTAIRE, Y. Monolayer and aggregate cultures of rainbow trout hepatocytes: long-term and stable liver-specific expression in aggregates. **Journal of Cell Science**, v. 105, p. 407-416, 1993.

FOLMAR, L. C.; DENSLOW, N. D.; RAO, V.; CHOW, M.; CRAIN, D. A.; ENBLOM, J.; MARCINO, J.; GUILLETTE Jr., L. J. Vitellogenin induction and reduced serum testosterone concentrations in feral male carp (*Cyprinus carpio*) captured near a major metropolitan sewage treatment plant. **Environmental Health Perspectives**; v. 104, p. 1096-1101, 1996.

GIMENO, S.; KOMEN, H.; GERRITSEN, A. G. M.; BROWMER, T. Feminisation of young males of the common carp, *Cyprinus carpio*, exposed to 4-tert-pentylphenol during sexual differentiation. **Aquatic Toxicology**, v. 43, p. 77-92, 1998.

GRAY Jr., L. E. Xenoendocrine disruptors: laboratory studies on male reproductive effects. **Toxicology Letters**, v. 102-103, p. 331-335, 1998.

GILLESPIE, D. K.; DE PEYSTER, A. Plasma calcium as a surrogate measure for vitellogenin in fathead minnows (*Pimephales promelas*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 58, p. 90-95, 2004.

GUILLETTE Jr., L. J.; GROSS, T. S.; MASSON, G. R.; MATTER, J. M.; PERCIVAL, H. F.; WOODWARD, A. R. Developmental abnormalities of the gonad and abnormal sex hormone concentrations in juvenile alligators from contaminated and control lakes in Florida. **Environmental Health Perspectives**, v. 102(8), p. 680-688, 1994.

HARRIS, J. E.; SHEAHAN, D. A.; JOBLING, S.; MATTHIESSEN, P.; NEALL, P.; SUMPTER, J. P.; TYLOR, T.; ZAMAN, N. Estrogenic activity in five United Kingdom rivers detected by measurement of vitellogenesis in caged male trout. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 16, p. 534-542, 1997.

HASHIMOTO, S.; BESSHO, H.; HARA, A.; NAKAMURA, M.; IGUCHI, T.; FUJITA, K. Elevated serum vitellogenin levels and gonadal abnormalities in wild male flounder (*Pleuronectes yokohamae*) from Tokyo Bay, Japan. **Marine Environmental Research**, v. 49, p. 37-53, 2000.

HUGGET, R. J.; KIMERIE, R. A.; MEHRIE Jr., P. M.; BERGMAN, H. L. **Biomarkers: Biochemical, Physiological and Histological Markers of Anthropogenic Stress**. Boca Raton: Lewis Publishers, 1992.

JOBLING, S.; NOLAN, M.; TYLER, C. R.; BRIGHTY, G.; SUMPTER, J. P. Widespread sexual disruption in wild fish. **Environmental Science & Technology**, v. 32, p. 2498-2506, 1998.

KANG, I. J.; YOKOTA, H.; OSHIMA, Y.; TSURUDA, Y.; YAMAGUCHI, T.; MAEDA, M. Effects of 17 $\beta$ -estradiol on the reproduction of Japanese medaka (*Oryzias latipes*). **Chemosphere**, v. 47, p. 71-80, 2002.

KAVLOCK, R. J.; DASTON, G. P.; DEROSA, C.; FENNER-CRISP, P.; GRAY, L. E.; KAATTARI, S.; LUCIER, G.; LUSTER, M.; MAC, M. J.; MACZKA, C.; MILLER, R.; MOORE, J.; ROLLAND, R.; SCOTT, G.; SHEEHAN, D. M.; SINKS, T.; TILSON, H. A. 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, supplement 4, 1996.

KOVACH, J.; PETZOLDT, C.; DEGNI, J.; TETTE, J. **A method to measure the environmental impact of Pesticides**. New York: Cornell University, 2007. Disponível em: <http://nysipm.cornell.edu/publications/eiq/default.asp>. Acesso em: 26 fevereiro 2009.

KIME, D. E.; NASH, J. P.; SCOTT, A. P. Vitellogenesis as a biomarker of reproductive disruption by xenobiotics. **Aquaculture**, v. 177, p. 345-352, 1999.

KOLPIN, D. W.; FURLONG, E. T.; MEYER, M. T.; THURMAN, E. M.; ZAUGG, S. D.; BARBER, L. B. Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in US streams, 1999-2000: a national reconnaissance. **Environmental Science & Technology**, v. 36, p. 1202-1211, 2002.

KRAMER, V. J.; MILES-RICHARDSON, S.; PIERENS, S. L.; GIESY, J. P. Reproductive impairment and induction of alkaline-labile phosphate, a biomarker of estrogen exposure, in fathead minnows (*Pimephales promelas*) exposed to waterborne 17 $\beta$ -estradiol. **Aquatic Toxicology**, v. 40, p. 335-360, 1998.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature** **22**, p. 680–685, 1970.

LANGE, R.; HUTCHINSON, T. H.; CROUDACE, C. P.; SIEGMUND, F.; SCHEWINFURTH, H.; HAMPE, P. Effects of the synthesis estrogen 17 $\alpha$ -ethinylestradiol on the life-cycle of the fathead minnow (*Pimephales promelas*). **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 20, p. 1216-1227, 2001.

LATHERS, C. M. Endocrine Disruptors: A new scientific role for clinical pharmacologists? Impact on human health, wildlife, and the environment. **Journal of Clinical Pharmacology**, v. 42, p. 7-23, 2002.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. Lehninger Principles of Biochemistry. Sarvier – Editora de Livros Médicos Ltda., 3<sup>a</sup> ed., 2000.

LIMA, F. J. C.; MARQUES, R. B. O.; NUNES, G. S.; TANAKA, S. M. C. N. Inseticida organofosforado metamidofós: aspectos toxicológicos e analíticos. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 11, p. 17-34, 2001.

LEINO, R. L.; JENSEN, K. M.; ANKLEY, G. T. Gonadal histology and characteristic histopathology associated with endocrine disruption in the adult fathead minnow (*Pimephales promelas*). **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 19, p. 85-98, 2005.

MAGALHÃES, I.; LEDRICH, M.; PIHAN, J. C.; FALLA, J. One-step, non-denaturing purification method of carp (*Cyprinus carpio*) vitellogenin. **Journal of Chromatography B**, v. 799, p. 87-93, 2004.

MALLET, C.; MALLET, V. N. Conversion of a conventional packet-column gas chromatograph to accommodate megabore columns. Determination of organophosphorus pesticides in environmental water. **Journal of Chromatography**, v. 481, p. 37-44, 1989.

MANAHAN, S. E. **Toxicological Chemistry. A guide to toxic substances in chemistry**. Chelsea: Lewis Publishers, 1989.

MARDINI, C.V. et al. **Técnica de indução da desova em jundiá (*Rhamdia quellen*) empregada na estação experimental de piscicultura da Lagoa dos Quadros**; Porto alegre: Secretaria da Agricultura, p. 14, 1981.

MARKEY, C. M.; RUBIN, B. S.; SOTO, A. M.; SONNENSCHNEIN, C. Endocrine disruptors: from wingspread to environmental developmental biology. **Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology**, v. 83, 235-244, 2003.

MARIN, M. G.; MATOZZO, V. Vitellogenin induction as a biomarker of exposure to estrogenic compounds in aquatic environments. **Marine Pollution Bulletin**, v. 48, p. 835-839, 2004.

MCLACHLAN, J. A. Environmental signaling: What embryos and evolution teach us about endocrine disrupting chemicals. **Endocrine Reviews**, v. 22(3), p. 319-341, 2001.

METCALFE, C. D.; METCALFE, T. L.; KIPARISSIS, Y.; KOEING, B. G.; KHAN, C.; HUGHES, R. J. Estrogenic potency of chemicals detected in sewage treatment plant effluents as determined by in vivo assays with Japanese medaka (*Oryzias latipes*). **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 20, p. 297-308, 2001.

MEYER, G.; FRACALOSSO, D. M. Estimation of Jundiá (*Rhamdia quelen*) dietary amino acid requirements based on muscle amino acid composition. **Scientia Agricola**, v. 62, nº 4, p. 401-405, 2005.

MILLS, L. J.; GUTJAHR-GOBELL, R. E.; HOROWITZ, D. B.; DENSLOW, N. D.; CHOW, M. C.; ZAROOGIAN, G. E. Relationship between reproductive success and male plasma vitellogenin concentrations in cunner, *Tautoglabrus adspersus*. **Environmental Health Perspectives**, v. 111, nº 1, 2003.

MILLS, L. J.; CHICHESTER, C. Review of evidence: Are endocrine-disrupting chemicals in the aquatic environment impacting fish populations?. **Science of the Total Environment**, v. 343, p. 1-34, 2005.

MONCAUT, N.; LO NOSTRO, F.; MAGGESE, M. C. Vitellogenin detection in surface mucus of the South American cichlid fish *Cichlasoma dimerus* (Heckel, 1840) induced by estradiol-17 $\beta$ . Effects on liver and gonads. **Aquatic Toxicology**, v. 63, p. 127-137, 2003.

NAKATANI, K.; AGOSTINHO, A. A.; BAUMGARTNER, G.; BIALETZKI, A.; SANCHES, P. V.; MAKRRARIS, M. C.; PAVANELLI, C. S. **Ovos e larvas de peixes de água doce: desenvolvimento e manual de identificação**. Maringá: EDUEM, 378 p., 2001.

NARAHARA, M.Y. et al. Estrutura da população de *Rhamdia hilarii* (Valenciennes, 1840) (Osteichthyes, Siluriformes, Pimelodidae). **Boletim do Instituto de Pesca**, v.12(3): 123-137, 1985.

NEWBOLD, R. R.; HANSON, R. B.; JEFFERSON, W. N.; BULLOCK, B. C.; HASEMAN, J.; MCLACHLAN, J. A. Proliferative lesions and reproductive tract tumors in male descendants of mice exposed developmentally to diethylstilbestrol. **Carcinogenesis**, v. 21, p. 1355-1363, 2000.

NORBERG, B.; HAUX, C. Induction, isolation and characterization of the lipid content of plasma vitellogenin from two *Salmo* species: Rainbow trout (*Salmo gairdneri*) and sea trout (*Salmo trutta*). **Comparative Biochemistry and Physiology B**, v. 81, p. 869-876, 1985.

PAIT, A. S.; NELSON, J. O. Vitellogenesis in male *Fundulus heteroclitus* (killifish) induced by selected estrogenic compounds. **Aquatic Toxicology**, v. 64, p. 331-342, 2003.

PAWLOWSKI, S.; AERLE, R. V.; TYLER, C. R.; BRAUNBECK, T. Effects of 17 $\alpha$ -ethinylestradiol in a fathead minnow (*Pimephales promelas*) gonadal recrudescence assay. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 57, p. 330-345, 2004.

PANTER, G. H.; THOMPSON, R. S.; SUMPTER, J. P. Adverse reproductive effects in male fathead minnows (*Pimephales promelas*) exposed to environmentally relevant concentrations of the natural oestrogens, oestradiol and oestrone. **Aquatic Toxicology**, v. 42, p. 243-253, 1998.

PARANÁ. Secretária de estado da Saúde – Instituto de Saúde do Paraná: Relatório do programa de análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos no estado do Paraná (período de junho de 2001 a junho de 2002), 2003.

PENTEADO, J. C. P.; VAZ, J. M. O legado das bifenilas policloradas (PBCs); **Química Nova**, v. 24, n° 3, p. 390-398, 2001.

PESTICIDE ACTION NETWORK – UK (PAN-UK). **A catalogue of lists of pesticides identifying those associated with particularly harmful health or environmental impacts**. Briefing Paper List of Lists. Reino Unido, 2001.

PURDOM, C. E.; HARDIMAN, P. A.; BYE, V. J.; ENO, N. C.; TYLER, C. R.; SUMPTER, J. P. Estrogenic effects of effluents from sewage treatment works. **Chemistry and Ecology**, v. 8(4), p. 275-285, 1994.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; MOORE, P. K. **Farmacologia**. Rio de Janeiro: Elsevier Editora Ltda., 5° ed., 904 p., 2003.

RANKOUHI, T. R.; SANDERSON, J. T.; HOLSTEIJN, I. V.; LEEUWEN, C. V.; VETHAAK, A. D.; VAN DEN BERG, M. Effects of natural and synthetic estrogens and various environmental contaminants on vitellogenesis in fish primary hepatocytes: comparison of bream (*Abramis brama*) and carp (*Cyprinus carpio*). **Toxicological Sciences**, v. 81, p. 90-102, 2004.

REYS, L. L. dos. Tóxicos ambientais desreguladores do sistema endócrino. **RFML**, Grupo de Medicina Preventiva e Ciências Sociais, Faculdade de Medicina de Lisboa, Série III, p. 213-225, 2001.

ROSE, J.; HOLBECH, H.; LINDHOLST, C.; NORUM, U.; POVLSEN, A.; KORSGAARD, B.; BJERREGAARD, P. Vitellogenin induction by 17 $\beta$ -estradiol and 17 $\alpha$ -ethinylestradiol in male zebrafish (*Danio rerio*). **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 131, p. 531-539, 2002.

ROUTLEDGE, E. J.; SHEAHAN, D.; DESBROW, C.; BRIGHTY, G. C.; WALDOCK, M.; SUMPTER, J. P. Identification of Estrogenic Chemicals in STW Effluent. 2. In vivo responses in Trout and Roach. **Environmental Science & Technology**, v. 32, p. 1559-1565, 1998.

SCHETTLER, T.; SOLOMON, G.; VALENTI, M.; HUDDLE, A. **Generations at Risk. Reproductive Health and the Environment**. Cambridge, Massachusetts: MIT Press, 1999.

SEKI, M.; YOKOTA, H.; MATSUBARA, H.; TSURUDA, Y.; MAEDA, M.; TADOKORO, H. Effect of thinylestradiol on the reproduction and induction of vitellogenesis and testis-ova in medaka (*Oryzias latipes*). **Environmental Toxicology and Chemistry**; v. 21, p. 1692-1698, 2002.

SELMAN, K.; WALLACE, R. A. Oogenesis in *Fundulus heteroclitus*. III. Vitellogenesis. **The Journal of Experimental Zoology**, v. 226, p. 759-766, 1983.

SILVERSAND, C.; HYLLNER, S. J. E HAUX, C. Isolation, immunochemical detection, and observations of the instability of vitellogenin from four teleosts. **The Journal of Experimental Zoology**, v.267, p.587-597. 1993.

SNYDER, S. A.; KEITH, T. L.; VERBRUGGE, D. A.; SNYDER, E. M.; GROSS, T. S.; KANNAN, K.; GIESY, J. P. Analytical Methods for detection of selected Estrogenic Compounds in Aquaqueous mixtures. **Environmental Science & Technology**, v. 33, p. 2814-2820, 1999.

SUMPTER, J. P.; JOBLING, S. Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. **Environmental Health Perspectives**, v. 103 (7), p. 173-178, 1995.

TERNES, T. A.; STUMPF, M.; MUELLER, J.; HABERER, K.; WILKEN, R. D.; SERVOS, M. Behavior and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants — I. Investigations in Germany, Canada and Brazil. **Science of the Total Environment**, v. 225, p. 81-90, 1999.

TOMITA, R. Y.; BEYRUTH, Z. Toxicologia de agrotóxicos em ambiente aquático. **Biológico**; v. 64; n° 2; p. 135-142; 2002.

TSAI, C.; WANG, L. Sex differences in the responses of serum calcium concentrations to temperature and estrogen in Tilapia, (*Oreochromis mossambicus*). **Zoological Studies**, v. 39 (1), p. 55-60, 2000.

TYLER, C. R.; SUMPTER, J. P. The purification and partial characterization of carp, *Cyprinus carpio*, vitellogenin. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 8, p. 111-120, 1990.

ULBRICH, B.; STAHLMMAN, R. Developmental toxicity of polychlorinated bisphenyls (PCBs): a systematic review of experimental data. **Archives of Toxicology**, v. 78, p. 252-268, 2004.

**U. S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (USEPA)**. Disponível em: <http://www.epa.gov/epahome/aboutepa.htm>. Acesso em 15/04/2006.

**U. S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (USEPA).** EPA Chemical Profile. Disponível em: <http://yosemite.epa.gov/oswer/ceppoehs.nsf/profiles/10265-926?opendocument>. Acesso em: 23/04/2006.

VAN DEN BELT, K.; BERCKMANS, P.; VANGENECHTEN, C.; VERHEYEN, R.; WITTERS, H. Comparative study on the in vitro/in vivo estrogenic potencies of 17 $\beta$ -estradiol, estrone, 17 $\alpha$ -ethynylestradiol and nonylphenol. **Aquatic Toxicology**, v. 66, p. 183-195, 2003a.

VAN DEN BELT, K.; VERHEYEN, R.; WITTERS, H. Comparison of vitellogenin responses in zebrafish and rainbow trout following exposure to environmental estrogens. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 56, p. 271-281, 2003b.

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

VAZZOLER, A. E. A. M. **Biologia da reprodução de peixes teleósteos: teoria e pratica**. Maringá: Editora da Universidade Estadual de Maringá (EDUEM), 169 p. 1996.

VERSONNEN, B. J.; ARUS, K.; VERSLYCKE, T.; LEMA, W.; JANSSEN, C. R. In vivo and in vitro estrogenicity and toxicity of *o*-, *m*-, and *p*-dichlorobenzene. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 22, p. 329-335, 2003.

VERSONNEN, B. J.; GOEMANS, G.; BELPAIRE, C.; JANSSEN, C. R. Vitellogenin content in European eel (*Anguilla anguilla*) in Flanders, Belgium. **Environmental Pollution**, v. 128, p. 363-371, 2004.

WALKER, C. M.; HOPKIN, S. P.; SIBLY, R. M.; PEAKALL, D. B. **Principles of Ecotoxicology**. Bristol, PA: Taylor & Francis, 1996.

WEBER, L. P.; GORDON, C. B.; METCALFE, C. D.; JANZ, D. M. Increased kidney, liver, and testicular cell death after chronic exposure to 17 $\alpha$ -ethynylestradiol in medaka (*Oryzias latipes*). **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 33, p. 792-797, 2004.

WESTER, P. W.; VAN DER VEN, L. T. M.; VOS, J. G. Comparative toxicological pathology in mammals and fish: some examples with endocrine disrupters. **Toxicology**, v. 205, p. 27-32, 2004.

WILLIAMS, T. D.; KITAYSKY, A. S.; VÉZINA, F. Individual variation in plasma estradiol-17 $\beta$  and androgen levels during egg formation in the European starling *Sturnus vulgaris*: implications for regulation of yolk steroids. **General and Comparative Endocrinology**, 2004.

WITORSCH, R. J. Endocrine Disruptors: can biological effects and environmental risks be predicted?. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 36, p. 118-130, 2002.

**World Wild Found** (WWF, 2000) [www.wwf.org](http://www.wwf.org). Acesso em: 07/072008