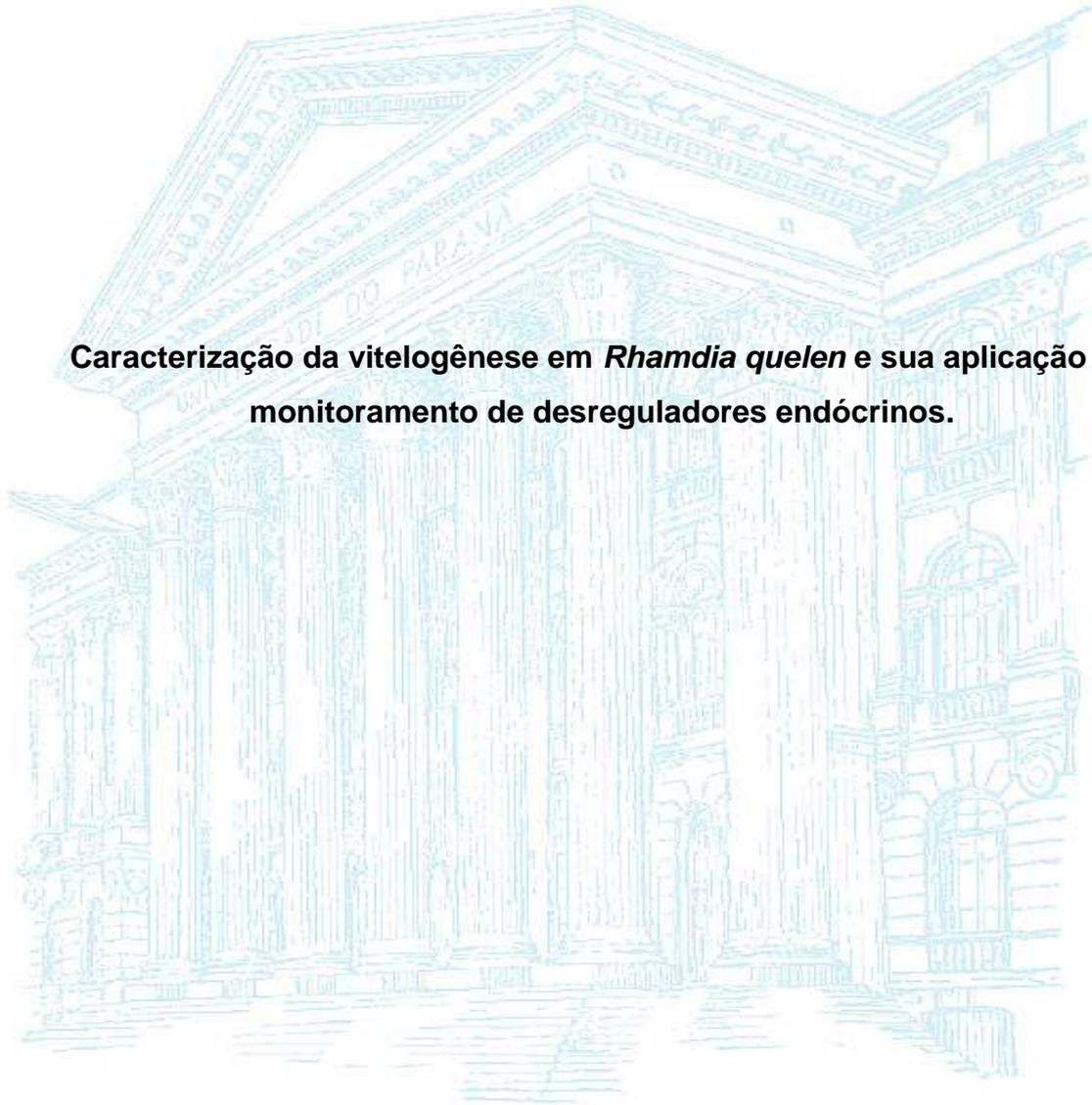


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

DANIELE DIETRICH MOURA COSTA

**Caracterização da vitelogênese em *Rhamdia quelen* e sua aplicação no monitoramento de desreguladores endócrinos.**



CURITIBA

2012

DANIELE DIETRICH MOURA COSTA

**Caracterização da vitelogenese em *Rhamdia quelen* e sua aplicação no monitoramento de desreguladores endócrinos.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, Departamento de Biologia Celular da Universidade Federal do Paraná como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro.

CURITIBA

2012

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTA DISSERTAÇÃO POR MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, APENAS PARA FINS ACADÊMICOS E CIENTÍFICOS.

#### Catálogo na publicação

Costa, Daniele Dietrich Moura

**Caracterização da vitelogenese em *Rhamdia quelen* e sua aplicação no monitoramento de desreguladores endócrinos./** Daniele Dietrich Moura Costa/  
Orientador: Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro. Curitiba, 2012.

149p.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.  
Área de concentração: Toxicologia Celular) – Universidade Federal do Paraná.

**1. *Rhamdia quelen* 2. Desreguladores endócrinos 3. Vitelogenina**

## PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Departamento de Biologia Celular e Departamento de Fisiologia  
Setor de Ciências Biológicas/ Universidade Federal do Paraná  
Instituto Carlos Chagas (ICC/FIOCRUZ)

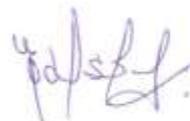
### DECLARAÇÃO

Declaramos para os devidos fins que **Daniele Dietrich Moura Costa**, no dia 07 de Março de 2012, no Setor de Ciências Biológicas (UFPR) defendeu sua Dissertação de Mestrado em Biologia Celular e Molecular, intitulada: "**Caracterização da vitelogênese em *Rhombia quelen* e sua aplicação no monitoramento de desreguladores endócrinos**", com a banca examinadora constituída, pelos professores: Dr. Jaime Paba Martinez (Universidade Federal do Paraná), Dra. Helena Cristina Silva de Assis (Universidade Federal do Paraná), e Dr. Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro (da Universidade Federal do Paraná, como orientador e presidente da Banca Examinadora), e foi Aprovada.

A solicitação de emissão do Diploma de Mestre em Biologia Celular e Molecular ficará condicionada à implementação das correções sugeridas pelos membros da banca examinadora e ao cumprimento integral das exigências estabelecidas no Regimento interno deste Programa de Pós-Graduação.

Esta declaração tem validade de 60 (sessenta) dias.

Curitiba, 07 de Março de 2012



Prof. Dr. Edvaldo da Silva Trindade  
Coordenador do Programa de Pós-Graduação  
em Biologia Celular e Molecular - UFPR  
Mestr. 155795

A Deus, por todas as vezes que sacrifiquei seus menores a mais indefesos filhos. Prometo-te Pai que estes jamais se foram em vão.

A meus pais, João e Sueli, pela educação de qualidade e por me incentivarem tanto a seguir a vida acadêmica.

## AGRADECIMENTOS

No decorrer dos anos que pareciam não passar e que repentinamente estão no final, gostaria de ter a lembrança muito viva para individualmente agradecer a todos que de alguma forma estiveram comigo. Nesta impossibilidade, gostaria, desde já, de agradecer a tantos quantos, de alguma forma contribuíram para a realização e finalização deste estudo.

Contudo, algumas pessoas estão bem presentes em minha memória. A elas o meu carinho e agradecimento:

A Deus, que sem dúvidas nenhuma foi a presença mais constante ao meu lado ao longo destes anos. Que meu deus me dê forças para não desistir e que me amparou em todas as quedas.

Aos meus pais, João e Sueli por sempre se fazerem presentes. A essas duas pessoas que abdicaram muitas vezes de seus sonhos para que eu realizasse os meus um muito obrigado e a minha gratidão eterna não seriam o suficiente.

Ao meu orientador Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro, não só pela orientação acadêmica e científica, mas pela paciência e carinho. Por sempre confiar e acreditar nas idéias, projetos e experimentos.

Ao professor Francisco Filipak Neto (que pra mim vai ser sempre o Chico), por todas as discussões e conselhos científicos e não científicos também.

A minha mãe de laboratório, professora Sonia Regina Groztner, por todas as longas horas de conversa, pelos conselhos, por ter sempre um ombro amigo e ouvidos pacientes a me oferecer.

Ao professor Marco Randi por ter sempre uma crítica construtiva, além do bom humor e é claro das aventuras off road (Paulo Lopes adventure).

A todos os amigos e colegas do Laboratório de Toxicologia Celular que ao longo destes anos compartilharam não só o espaço e reagentes, mas ideais!

Ao meu I.C. e protegido, Dandie Bozza, por todos os galhos que me quebrou, soluções que preparou e é claro pela amizade incondicional.

Ao grande amigo Samuel Liebel, por estar sempre presente, ajudando e pipetando!

Ao Rodrigo de Cássio da Silva, por todos os Bradfords e é claro pelo carinho e amizade!

A minha amora, Andressa Glinski, pela amizade, carinho!! E é claro por todas as fofocas e docinhos que compartilhamos neste período.

A Maritana Mella, por ser uma grande amiga, por sempre ter algo a compartilhar, além é claro de ser um ombro pra dividir o peso dos experimentos e experiências (de vida)!

A Inês da Silva Rabitto, por ser um exemplo de superação, mãe, mulher e amiga!! Por todos esses anos me ajudando, por todas as festas e farras! Amiga, agradeço em especial por você existir na minha vida!

A todos os alunos do laboratório de Neurobiologia, Depto Patologia/ UFPR por toda ajuda científica e por terem sempre algo pra essa aluna piduncha!! Em especial ao Luiz Eduardo Rizzo de Sousa, por tudo que me ensinou e por ter despertado em mim a paixão pela proteômica! Ao professor Silvio Marques Zanatta que sempre abriu as portas do seu laboratório sem nunca esperar nada em troca.

A minha irmã Michele Dietrich Moura Costa por estar sempre ao meu lado, por dividir os problemas (que muitas vezes pareciam não ter fim). Agradeço a ela também toda a orientação científica, todos os experimentos e técnicas que me ensinou, todas as discussões de resultados e tudo mais que ela fez que sempre me ajudou a crescer cientificamente.

Ao meu irmão Rafael Dietrich Moura Costa, por não ter nada a ver com a vida científica, mas por sempre ter uma boa piada e pelo bom humor que sempre me alegrava ao final de mais um dia de experimentos que deram errado.

Ao meu noivo Geison D'alessandro Corrêa, por todos esses anos de amor incondicional, carinho e confiança. Por entender pacientemente a minha ausência e por partilhar dos meus ideais e sempre me incentivar a prosseguir na jornada.

A minha segunda família, Dona Vera e Seu Corrêa, por estarem sempre me esperando de braços abertos e com uma comidinha gostosa.

Ao meu tchutchuquinho Kauã, por ser a coisa mais rica da minha vida, por todas as risadinha e traquinagens que só me trouxeram alegria desde a sua chegada.

Ao meu avô Antônio Martins (*in memorian*) e a minha avó Lídia (*in memorian*) pois independente de onde estivessem sempre conduziram meus passos e olharam por mim. Por terem, em vida, me ensinado o que verdadeiro amor não tem preço.

Aos meus amigos de longa data, Simone, Gabriel, Bruno e Renata, por todos esses anos de amizade sincera, por estarem sempre por perto quando precisei (e quando não precisei também). Pelos momentos de descontração e gargalhadas que sempre deixavam saudades.

A Marlene, secretária do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de Mestrado e pelo apoio nos projetos científicos.

Ao Grupo de fixação de nitrogênio do Depto. de Bioquímica da UFPR, pelo uso do espectrômetro massa.

*"É melhor tentar e falhar,  
que preocupar-se e ver a vida passar;  
é melhor tentar, ainda que em vão,  
do que sentar-se fazendo nada até o final.  
Eu prefiro na chuva caminhar,  
que em dias tristes em casa me esconder.  
Prefiro ser feliz, embora louco,  
que em conformidade viver . . ."*

*Martin Luther King*

## RESUMO

A vitelogenina (VTG) é uma glicolipofosfoproteína expressa pelas fêmeas de ovíparos em resposta ao hormônio endógeno 17βestradiol (E<sub>2</sub>). Machos ovíparos somente expressam essa proteína quando expostos ao E<sub>2</sub> ou a compostos que mimetizem o mesmo. Alguns poluentes provenientes do despejo industrial, urbano e resíduos da atividade agrícola possuem estrutura semelhante a do E<sub>2</sub>, sendo capazes de afetar o sistema endócrino sendo considerados desreguladores endócrinos, levando machos a expressarem a VTG. Visto o aumento destes poluentes no ambiente natural e o seu potencial tóxico, torna-se necessário caracterizar processos e moléculas indicadores deste tipo de disfunção. Frente a tal cenário, o objetivo do presente trabalho foi caracterizar o processo de vitelogênese e a molécula de vitelogenina expressa por machos de *Rhamdia quelen*, produzir anticorpos policlonais que reconheçam a vitelogenina da espécie em questão e a aplicação dos mesmos no biomonitoramento de reservatórios de abastecimento de água urbanos. Para a caracterização do processo de vitelogênese machos de *R. quelen* foram injetados com E<sub>2</sub> e comparados a fêmeas naturalmente vitelogênicas e machos adultos. Após 15 dias de exposição tecidos-chaves para o processo de vitelogênese foram coletados e analisados. O fígado demonstrou aspecto vacuolizado tanto em fêmeas quanto em machos expostos ao E<sub>2</sub>, sendo tais vacúolos compostos de lipídeos. O teor de carboidratos também se apresentou aumentado em machos estrógeno induzidos. Indivíduos expostos ao estrógeno apresentaram ainda um aumento no índice hepatossomático e não apresentaram alteração no índice gonadossomático. As gônadas de fêmeas e machos controle apresentaram morfologia padrão para tal tecido; já nos machos expostos as gônadas apresentaram-se em estágio iniciais de maturação. Verificou-se no plasma a presença de uma molécula, de alta massa molecular, estrógeno induzível em machos e naturalmente presente em fêmeas que foi caracterizada como uma glicolipofosfoproteína. A espectrometria de massa não identificou a proteína, porém verificou-se alta similaridade entre o mapa de massas peptídicas da molécula considerada como vitelogenina das fêmeas e dos machos induzidos. Através de ensaios de *western blot* foi possível identificar tal proteína como sendo a vitelogenina. Técnicas imunológicas também foram utilizadas para marcar a vitelogenina no fígado e nas gônadas de machos expostos e fêmeas. Tais resultados demonstram que a vitelogenina é produzida no fígado, secretada para a corrente sanguínea e incorporada às gônadas. Para a produção dos anticorpos policlonais, machos adultos de *R. quelen* foram injetados com 10 mg EE<sub>2</sub>.kg<sup>-1</sup> (17αetinil-estradiol). A VTG foi isolada diretamente do gel de poliácridamida e coelhos machos foram imunizados. A especificidade dos anticorpos produzidos foi verificada por *western blot*, imuno-histoquímica e imunofluorescência. Para avaliar a presença de desreguladores endócrinos nos reservatórios do Iraí e do Passaúna, animais da espécie em questão foram mantidos por 3 e 6 meses, em tanques redes em cada um dos reservatórios. Em ambas as exposições e em ambos os reservatórios não foi detectada a VTG no plasma de machos adultos, indicando que nestes reservatórios não há poluentes que afetem o sistema endócrino da espécie estudada, ou a quantidade de poluentes existentes não foram capazes de induzir tal resposta.

Palavras chave: Vitelogenina, desregulador endócrino, *Rhamdia quelen*.

## ABSTRACT

Vitellogenin (VTG) is a glycolipophosphoprotein expressed by oviparous females in response to endogenous hormone 17 $\beta$ estradiol (E<sub>2</sub>). Oviparous males only express this protein when exposed to E<sub>2</sub> or compounds that mimic it. Some pollutants from urban sewage, industrial and agriculture dumps have a structure similar to E<sub>2</sub>, being able to affect the endocrine system and therefore considered endocrine disruptors, turning males to express VTG. Considering the increase of these pollutants in natural environment and its potential toxicity, it is necessary to characterize processes and molecules as indicators of endocrine dysfunction. Considering the previous scenario described, the aim of this study is to characterize the process of vitellogenesis and vitellogenin molecule expressed by males of *Rhamdia quelen*, producing polyclonal antibodies that recognize the vitellogenin of this specie and applying them in biomonitoring water urban reservoirs for human supply. To characterize the process of vitellogenesis males of *R. quelen* were injected with E<sub>2</sub> and compared with naturally vitellogenic females and adult males. After 15 days of exposure important tissue for the vitellogenesis processes were collected and analyzed. Liver showed vacuolated aspect in both males exposed to E<sub>2</sub> and females, and these vacuoles where lipid composed. The carbohydrate content also showed increased in males estrogen-induced. Individuals exposed to estrogen showed a further increase in hepatosomatic index and no change in the gonadosomatic index. The gonads of males and females controls showed normal morphology, whereas in males exposed, gonads were in the initial stage of maturation. It was found in plasma the presence of a molecule with high molecular mass, estrogen inducible in males and naturally present in females and it was characterized as a glycolipophosphoprotein. Mass spectrometry did not identify the protein, but it showed a high similarity between the structure of the female protein and male induced protein. Through *western blot* assays this protein was identified as vitellogenin. Immunological techniques were also used to locate the vitellogenin in liver and gonads of exposed males and females. These results demonstrate that vitellogenin is produced by liver, secreted into the bloodstream and incorporated into the gonads. For the production of polyclonal antibodies, adult males of *R. quelen* were injected with 10 mg EE<sub>2</sub>.kg<sup>-1</sup> (17 $\alpha$ etininil-estradiol). VTG was isolated directly from the polyacrylamide gel and male rabbits were immunized. The specificity of the antibodies produced was verified by western blot, immunohistochemistry and immunofluorescence. To evaluate the presence of endocrine disruptors in the Iraí and Passaúna water reservoirs, animals were exposed for 3 and 6 months in fish cages in both reservoirs. In both expositions and in both reservoirs VTG was not detected in plasma of adult males, leading us to believe in the absence of pollutants that affect the endocrine system of this specie in these two water reservoirs.

Key-words: vitellogenin, endocrine disruptors, *Rhamdia quelen*.

## LISTA FIGURAS/TABELAS

### CAPÍTULO I

**Figura 1.** Estrutura química do estradiol e de alguns desreguladores endócrinos.

**Figura 2.** Mecanismo de ação do 17- $\beta$ estradiol.

**Figura 3.** Reação de imunodeteção da vitelogenina no plasma.

**Figura 4.** Padrão eletroforético das proteínas do plasma.

**Figura 5.** Espectros de massa da proteína considerada como vitelogenina.

**Figura 6.** Índice hepatossomático.

**Figura 7.** Histologia e histoquímica do tecido hepático.

**Figura 8.** Reação de imuno-histoquímica para localização da vitelogenina em tecido hepático.

**Figura 9.** Reação de imunofluorescência para localização da vitelogenina em tecido hepático.

**Figura 10.** SDS-PAGE e reação de *western blot* com amostras de tecido hepático.

**Figura 11.** Índice gonadossomático.

**Figura 12.** Histologia dos ovários.

**Figura 13.** Histologia dos testículos.

**Figura 14.** Histoquímica de ovários.

**Figura 15.** Histoquímica de testículos.

**Figura 16.** Reação de imuno-histoquímica para localização da vitelogenina nas gônadas.

**Figura 17.** Reação de imunofluorescência para localização da vitelogenina nas gônadas.

**Figura 18.** SDS-PAGE e reação de *western blot* com amostras de tecido gonadal.

**Tabela 1.** Relações de massa/carga semelhantes entre a proteína considerada vitelogenina de fêmeas e machos expostos ao estrógeno.

### CAPÍTULO II

**Figura 1.** Estrutura geral das imunoglobulinas do tipo G (IgG).

**Figura 2.** Diluição dos anticorpos policlonais anti-vitelogenina de *R. quelen*.

**Figura 3.** Reação de *western blot* utilizando o anticorpo anti-vitelogenina de *R. quelen*.

**Figura 4.** Comparação entre as reações de *western blot* utilizando os anticorpos anti-vitelogenina de *Spaurus aurata* e *Rhamdia quelen*.

**Figura 5.** Ensaio de bloqueio.

**Figura 6.** Imuno-histoquímica do fígado utilizando anticorpos policlonais anti-vitelogenina de *R. quelen*.

**Figura 7.** Imuno-histoquímica das gônadas utilizando anticorpos policlonais anti-vitelogenina de *R. quelen*.

**Figura 8.** Imunofluorescência do fígado utilizando anticorpos policlonais anti-vitelogenina de *R. quelen*.

**Figura 9.** Imunofluorescência das gônadas utilizando os anticorpos policlonais anti-vitelogenina de *R. quelen*.

### **CAPÍTULO III**

**Figura 1.** Reação de *western blot* para detecção da vitelogenina em exemplares de *R. quelen* expostos por três meses no reservatório do Iraí.

**Figura 2.** Reação de *western blot* para detecção da vitelogenina em exemplares de *R. quelen* expostos por seis meses no reservatório do Iraí.

**Figura 3.** Reação de *western blot* para detecção da vitelogenina em exemplares de *R. quelen* expostos por três meses no reservatório do Passaúna.

**Figura 4.** Reação de *western blot* para detecção da vitelogenina em exemplares de *R. quelen* expostos por seis meses no reservatório do Passaúna.

## LISTA ABREVIações E/OU SIGLAS

- $\mu\text{g}$  – microgramas  
 $\mu\text{m}$  – micrometros  
10 mg E<sub>2</sub> – grupo de machos injetados com 10 mg E<sub>2</sub>. Kg<sup>-1</sup>  
BSA – albumina do soro bovino  
C- – grupo de machos adultos  
C+ – grupo de fêmeas vitelogênicas  
cm – centímetros  
CTF – grupo controle de fêmeas em vitelogênese  
CTM – grupo controle de machos adultos  
Da – Daltons  
DAB – diaminobenzidina  
DAPI – 4',6-diaminidino-2-phenylindole  
DDT - Dicloro-Difenil-Tricloroetano  
DTT – 4-Dithiothreitol  
E<sub>2</sub> – 17 $\beta$ estradiol  
EE<sub>2</sub> – 17 $\alpha$ etnil-estradiol  
ELISA – *enzyme linked immunossorbent assay*  
EPA USA – Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos da América  
FSH – hormônio folículo estimulante  
FSSP – proteína específica do plasma de fêmeas (*female-specific serum protein*)  
GnRh – hormônio liberador das gonadotrofinas  
GtH1 – gonadotrofina tipo I  
GtH2 – gonadotrofina tipo II  
h – hora  
HRP – peroxidase de raiz forte (*horseradish peroxidase*)  
HSP – proteínas de choque térmico (*heat shock proteins*)  
IAP – Instituto Ambiental do Paraná  
Ig – imunoglobulina  
IGS – índice gonadossomático  
IHS – índice hepatossomático  
IQAR – índice de qualidade de água de reservatório

IUPAC - *International Union of Pure and Applied Chemistry*  
kDa – quilo Daltons  
kg – quilogramas  
LH – hormônio luteinizante  
M – molar  
MALDI – *matrix assisted laser desorption ionization*  
mg – miligramas  
min – minutos  
mM – milimolar  
MS – espectro de massa (*mass spectrum*)  
ng – nanogramas  
°C – graus Celsius  
PB – tampão salino  
PBS – tampão fosfato salino  
PFA – paraformaldeído  
PI – soro pré-imune  
PMF – *peptide mass fingerprint*  
PMSF - phenylmethylsulfonyl fluoride  
ppb – partes por bilhão  
ppt – partes por trilhão  
RE – receptor de estrógeno  
RIA – radio imuno ensaio (*radioimmuno assay*)  
RMC – Região Metropolitana de Curitiba  
SANEPAR – Companhia de Saneamento do Estado do Paraná  
SBB – Sudan Black B  
SDS-PAGE – *sodium dodecyl-sulfate poliacrylamide gel electrophoresis*  
seg – segundos  
SSA – ácido sulfosalicílico  
T<sub>3</sub> – triiodotironina  
T<sub>4</sub> – tiroxina  
TBS-T – solução de Tris 20 mM, pH 7.4, 120mM NaCl e 0.05% Tween 20  
TFA – ácido trifluoroacético  
TOF – *time of flight*  
VTG – vitelogenina

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	<b>18</b>
<b>CAPÍTULO I</b> .....	<b>21</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>22</b>
<b>1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>23</b>
1.1 MODOS DE AÇÃO DOS DESREGULADORES ENDÓCRINOS .....	25
1.2 SISTEMA NEURO-ENDÓCRINO-REPRODUTOR EM PEIXES .....	28
1.2.1 Sistema reprodutor masculino .....	29
1.2.2 Sistema reprodutor feminino .....	30
1.3 VITELOGÊNESE .....	31
1.3.1 A descoberta da vitelogenina .....	31
1.3.2 Vitelogenina e vitelogênese .....	32
1.3.3 Expressão de vitelogenina com o biomarcador .....	33
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>35</b>
2.1 OBJETIVO GERAL .....	35
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	35
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>36</b>
3.1 INDUÇÃO ESTROGÊNICA .....	36
3.2 COLETA E PROCESSAMENTO DO MATERIAL BIOLÓGICO .....	36
3.3 ÍNDICES BIOMÉTRICOS .....	37
3.4 PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO .....	37
3.4.1 Coloração Hematoxilina-Eosina .....	37
3.4.2 Coloração de ácido periódico de Schiff .....	38
3.4.3 Imuno-histoquímica .....	38
3.5 CRIOPROCESSAMENTO .....	39
3.5.1 Coloração de Sudan Black B .....	39
3.5.2 Imunofluorescência .....	40
3.6 SDS PAGE .....	40
3.6.1 Coloração de glicoproteínas .....	41
3.6.2 Coloração de fosforpoteínas .....	41
3.6.3 Coloração de lipoproteínas .....	42
3.7 WESTERN BLOT .....	42

3.8 ESPECTROMETRIA DE MASSA .....	43
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>45</b>
4.1 CARACTERIZAÇÃO DA VITELOGENINA NO PLASMA.....	45
4.2 CARACTERIZAÇÃO DO FÍGADO EM PROCESSO DE VITELOGÊNESE.....	50
4.3 CARACTERIZAÇÃO DAS GÔNADAS EM PROCESSO DE VITELOGÊNESE.....	57
<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>70</b>
<b>6. CONCLUSÕES .....</b>	<b>79</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>80</b>
<b>CAPÍTULO II .....</b>	<b>85</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>86</b>
<b>1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>87</b>
1.1 ANTÍGENOS E ANTICORPOS .....	87
1.2 ANTICORPOS POLICLONAIS vs ANTICORPOS MONOCLONAIS .....	90
1.3 PRODUÇÃO DE ANTICORPOS POLICLONAIS .....	92
1.4 IMUNOENSAIOS NA IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS.....	94
1.4.1 RIA e ELISA .....	94
1.4.2 <i>Western blot</i> .....	95
1.4.3 Imunofluorescência .....	96
1.4.4 Imuno-histoquímica .....	96
1.4.5 Imunoprecipitação .....	97
1.5 ANTICORPOS NO BIOMONITORAMENTO .....	97
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>99</b>
2.1 OBJETIVO GERAL.....	99
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	99
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>100</b>
3.1 INDUÇÃO DA EXPRESSÃO DA VITELOGENINA .....	100
3.2 COLETA E PROCESSAMENTO DO MATERIAL BIOLÓGICO .....	100
3.3 PRODUÇÃO DO SORO POLICLONAL.....	101
3.3.1 Isolamento da vitelogenina plasmática .....	101
3.3.2 Imunização dos coelhos .....	101
3.3.3 Processamento do soro imune.....	102
3.4 TESTE DO SORO POLICLONAL .....	102
3.4.1 Diluição do anticorpo .....	102
3.4.2 Ensaio de <i>Western blot</i> .....	102

3.4.3 Ensaio de bloqueio.....	103
3.4.4 Processamento histológico e ensaio de imuno-histoquímica.....	104
3.4.5 Crioprocessamento e ensaio de imunofluorescência.....	104
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>106</b>
4.1 TESTE DO ANTICORPO PRODUZIDO .....	106
4.2 ENSAIO DE <i>WESTERN BLOT</i> .....	106
4.3 ENSAIO DE BLOQUEIO .....	108
4.4 ENSAIO DE IMUNO-HISTOQUÍMICA .....	109
4.4.1 Imuno-histoquímica de fígado .....	109
4.4.2 Imuno-histoquímica de gônada.....	110
4.5 ENSAIO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA.....	111
4.5.1 Imunofluorescência de fígado .....	111
4.5.2 Imunofluorescência de gônada .....	112
<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>114</b>
<b>6. CONCLUSÕES .....</b>	<b>120</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>121</b>
<b>CAPÍTULO III .....</b>	<b>124</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>125</b>
<b>1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>126</b>
1.1 RESERVATÓRIOS DE ABASTECIMENTO URBANOS .....	127
1.1.1 Reservatórios de abastecimento de Curitiba e Região Metropolitana.....	128
1.2 DESREGULADORES ENDÓCRINOS EM ECOSSISTEMAS AQUÁTICOS .....	131
1.3 ESTUDOS DE BIOMONITORAMENTO .....	132
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>134</b>
2.1 OBJETIVO GERAL.....	134
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	134
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>135</b>
3.1 EXPOSIÇÃO DE EXEMPLARES DE <i>R. QUELEN</i> NOS RESERVATÓRIOS .....	135
3.2 COLETA E PROCESSAMENTO DO MATERIAL BIOLÓGICO .....	135
3.3 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DA VITELOGENINA.....	135
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>137</b>
4.1 EXPOSIÇÃO DE TRÊS MESES NO RESERVATÓRIO DO IRAÍ .....	137
4.2 EXPOSIÇÃO DE SEIS MESES NO RESERVATÓRIO DO IRAÍ.....	137
4.3 EXPOSIÇÃO DE TRÊS MESES NO RESERVATÓRIO DO PASSAÚNA .....	138
4.4 EXPOSIÇÃO DE SEIS MESES NO RESERVATÓRIO DO PASSAÚNA.....	139

<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>141</b>
<b>6. CONCLUSÕES .....</b>	<b>145</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>146</b>
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>149</b>

## INTRODUÇÃO GERAL

A revolução industrial, as melhorias na agricultura e na medicina propiciaram um aumento populacional, que requer não somente mais alimentos como também mais água potável. Este aumento populacional associado ao crescimento da indústria e da agricultura aumentaram a quantidade de resíduos gerados pelas mesmas, sendo que muitas vezes tais resíduos são lançados nos corpos hídricos inviabilizando seu uso para consumo humano. Desta forma a sociedade humana vive um paradoxo, onde seu crescimento e desenvolvimento requerem mais água ao mesmo tempo que este crescimento e desenvolvimento degradam e inviabilizam o uso da mesma (WWI, 2010).

Dentre os resíduos das diversas atividades antropogênicas tais como a indústria e a agricultura, estão as dioxinas, pesticidas, hormônios sintéticos, anabolizantes e quimioterápicos conhecidos por seus efeitos sobre o sistema endócrino de humanos e animais. Poluentes capazes de afetar o sistema endócrino são conhecidos como desreguladores endócrinos e seus efeitos podem causar danos a saúde, alterações no comportamento, crescimento e no desenvolvimento, no metabolismo e anomalias na função reprodutiva e na homeostase. Vale ressaltar que o sistema endócrino nos organismos é estimulado por baixíssimas concentrações hormonais, sendo essa a principal razão porque teores vestigiais de químicos orgânicos antropogênicos poderem ser tão perniciosos (WITOSRCH, 2002).

Um biomarcador é uma resposta fisiológica, morfológica, molecular ou genética individual mensurável, alterada num organismo e, é a consequência da exposição do mesmo a um agente exógeno, substância química poluente ou contaminante. Uma questão que pode ser respondida por biomarcadores é se há contaminação ambiental em grau suficiente para causar efeitos deletérios. Se a resposta for positiva, investigações adicionais podem ser justificadas para determinar a natureza e o grau de contaminação (OLIVEIRA RIBEIRO *et al.*, 2002).

Dentre os biomarcadores mais utilizados para a verificação de efeitos desreguladores endócrinos está a glicolipofosfoproteína vitelogenina, que é sintetizada pelo fígado de fêmeas ovíparas em resposta ao hormônio endógeno 17 $\beta$ estradiol. Depois de sintetizada, a vitelogenina é secretada para a corrente sanguínea e transportada até os ovócitos em maturação, onde é incorporada e no interior destes é clivada nos componentes do vitelo que servirão de reserva energética ao embrião em desenvolvimento (HIRAMATSU *et al.*, 2005).

A vitelogênese é o processo de produção, transporte, incorporação ao ovócito e clivagem da vitelogenina. Tal processo compreende ainda outras características envolvidas com a homeostase do fígado e sanguínea. Indivíduos machos e juvenis são capazes de sintetizar a vitelogenina, no entanto não possuem concentrações circulantes de estrógenos suficientes para induzir a síntese da mesma. A presença de hormônios estrógenos no ambiente, ou de compostos que mimetizem os mesmos, promove o processo de vitelogênese em machos adultos e juvenis, sendo que este processo, bem como a molécula de vitelogenina, são bons biomarcadores para disfunções estrogênicas do sistema endócrino em machos adultos e juvenis (HIRAMATSU *et al.*, 2005).

Sabendo que os ambientes aquáticos encontram-se seriamente afetados por químicos de origem antrópica, a escolha de peixes como modelo biológico deve-se ao fato de os mesmos estarem sob constante influência destes poluentes (HONTELA *et al.*, 1993; KAVLOCK *et al.*, 1996). O modelo biológico deste trabalho é a espécie *Rhamdia quelen* (Teleostei, Heptapteridae), cujo nome popular é jundiá. O jundiá tem distribuição neotropical e habita lugares calmos como o leito de rios e lagos (SILFVERGRIP, 1996). Esta espécie vive associada ao sedimento e seu hábito alimentar é omnívoro, com tendência detritívora. A maturidade sexual é atingida no primeiro ano de vida, sendo que há dimorfismo sexual (MARDINI *et al.*, 1981).

A consciência de que muitos compostos liberados no meio ambiente têm potências perturbadoras do sistema endócrino cresce e torna-se cada vez mais urgente a necessidade de desenvolverem-se e caracterizarem-se biomarcadores que detectem os efeitos destes compostos em exemplares de espécies não só de peixes, mas também de aves, répteis e especialmente mamíferos, podendo assim avaliar os efeitos destes compostos também em humanos.

No Brasil, onde os casos de contaminação ambiental ainda não são biomonitorados adequadamente, pois não existem dados pretéritos sobre o impacto antrópico sobre os ecossistemas brasileiros, há a necessidade da obtenção de tais dados objetivando um diagnóstico evolutivo das alterações nestes ambientes.

Frente a tal cenário a presente proposta tem como objetivos principais caracterizar o processo de vitelogênese e a vitelogenina em machos de *R. quelen*, produzir anticorpos policlonais contra esta molécula e aplicá-los no biomonitoramento de reservatórios de água utilizados para abastecimento urbano. Para cumprir tais objetivos foram realizados diversos experimentos que foram

divididos em três capítulos. No primeiro capítulo estão relatados os dados obtidos para a caracterização do processo de vitelogênese e da vitelogenina. No segundo, os procedimentos adotados para a produção dos anticorpos policlonais bem como para testar a eficácia dos mesmos. Já o terceiro e último capítulo, demonstra a aplicação dos anticorpos no biomonitoramento da presença de desreguladores endócrinos estrogênicos na água utilizada para abastecer Curitiba e Região Metropolitana.

## **CAPÍTULO I**

**Caracterização do processo de vitelogênese e da molécula de vitelogenina em machos de *Rhamdia quelen***

## RESUMO

O objetivo do presente capítulo foi caracterizar a molécula de vitelogenina, bem como o processo de vitelogênese em machos de *R. quelen*. Tal caracterização se faz necessária uma vez que, embora a vitelogenina (VTG) seja um biomarcador amplamente utilizado para verificar efeitos de desreguladores endócrinos estrogênicos, pouco se sabe sobre a mesma em espécies nativas brasileiras. Para tal caracterização 3 grupos experimentais foram estabelecidos: um de fêmeas em período de vitelogênese (denominado controle fêmeas – CTF), um de machos adultos não expostos ao 17 $\beta$ estradiol (denominado controle machos – CTM) e um terceiro grupo composto de machos adultos expostos a 10 mg de 17 $\beta$ estradiol por quilograma de massa corpórea (denominado 10 mg E<sub>2</sub>). Quinze dias após a indução experimental fígado, gônadas e plasma foram coletados. A análise do plasma demonstrou a presença de uma molécula, de alta massa molecular, estrógeno induzível em machos expostos e em fêmeas em vitelogênese, sendo que tal molécula foi caracterizada como uma glicolipofosfoproteína. A espectrometria de massa não identificou tal molécula, no entanto demonstrou similaridade entre a molécula expressa por fêmeas e machos expostos ao estrógeno. A identificação da molécula se deu através de ensaios envolvendo o uso de anticorpos comerciais específicos para a molécula de vitelogenina. Tal molécula foi também detectada e localizada no fígado e nas gônadas de fêmeas e machos expostos. Este resultado já era esperado uma vez que o fígado produz, secreta para o sangue e as gônadas incorporam a VTG. Também foram verificadas alterações histológicas, tais como vacuolizações lipídicas no tecido hepático, relacionadas ao processo de vitelogênese. Atualmente não só o processo de vitelogênese, mas também a molécula de vitelogenina apresentam-se bem caracterizados para a espécie *R. quelen* que é nativa, tornando-os biomarcadores de disfunção endócrina estrogênica plausíveis de serem utilizados no biomonitoramento.

Palavras chave: desreguladores endócrinos, vitelogenina, *Rhamdia quelen*.

## 1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Há uma preocupação crescente com a ação perturbadora que diversos poluentes orgânicos desencadeiam no sistema endócrino dos animais. A constatação repetida de efeitos nefastos, causados em várias populações da fauna selvagem e até no próprio homem, foi o ponto de partida para a eclosão mundial de inúmeras pesquisas em busca dos designados desreguladores endócrinos. A Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos da América (USA EPA) define desreguladores endócrinos como sendo “agentes exógenos que interferem na produção, transporte, metabolismo, processos de interação, ação, degradação ou eliminação dos hormônios naturais” (KAVLOCK *et al.*, 1996).

Estas substâncias são na sua maioria poluentes químicos e derivados de químicos antropogênicos que constituem diversos tipos de resíduos industriais, agrícolas ou domésticos. As substâncias causadoras de disfunções endócrinas são classificadas como hormônios naturais ou como substâncias artificiais. Os hormônios naturais incluem aqueles que ocorrem naturalmente no corpo humano e dos animais, como o estrogênio, a progesterona e a testosterona, e os fitoestrogênios, substâncias contidas em algumas plantas, como os rebentos de alfafa e as sementes de soja, que apresentam uma atividade semelhante aos estrogênios quando ingeridas pelo organismo. As substâncias artificiais contemplam os hormônios sintéticos, incluindo os hormônios idênticos aos hormônios naturais, como os contraceptivos orais, as terapias hormonais de substituição e alguns aditivos utilizados na alimentação animal, e substâncias químicas artificiais, concebidas para utilizações na indústria como em alguns produtos de limpeza, na agricultura e nos bens de consumo. Incluem também as substâncias químicas que são subprodutos de processos industriais, como as dioxinas, que atualmente são conhecidas por interferirem com o sistema endócrino dos seres humanos e dos animais (SAFEA, 2004; MONCAUT, *et al.*, 2002). Entre os desreguladores endócrinos de origem antropogênica estão os ftalatos, utilizados na fabricação de plásticos, os bisfenóis, alguns pesticidas como o DDT, DDE e atrazina, compostos orgânicos de estanho como o TBT, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos como o benzo(a)pireno, metais pesados como cádmio e chumbo e alguns medicamentos como por exemplo o tamoxifem utilizado na quimioterapia (BILA e DEZOTTI, 2007). Em geral os desreguladores endócrinos são compostos muito estáveis e, portanto

persistentes; o fato de tais poluentes serem em geral lipofílicos facilita a rápida e vasta dispersão via cadeia trófica além de permitir a sua bioacumulação (KAVLOCK *et al.*, 1996).

Os efeitos dos desreguladores endócrinos manifestam-se, genericamente, ao nível do sistema endócrino, causando efeitos adversos à saúde, alterações no comportamento, crescimento, desenvolvimento, metabolismo e anomalias na função reprodutiva e na homeostase. Em geral os efeitos relacionados ao sistema reprodutivo, tais como baixa motilidade dos espermatozóides, infertilidade, endometriose, má formação genital masculina, entre outros são os mais comuns. No entanto o sistema endócrino é complexo e envolve processos que ocorrem em diferentes níveis de organização biológica, isto é, nos órgãos, tecidos, células e moléculas. Tendo este amplo cenário de efeitos sobre o sistema endócrino, deve-se levar em consideração não somente os efeitos reprodutivos, mas também efeitos sobre a homeostase do organismo como um todo (EERTMANS *et al.*, 2003).

No que diz respeito às espécies animais que vivem em terra, incluindo os mamíferos, pensa-se que a exposição seja, sobretudo, de origem alimentar. A situação é diferente no caso das espécies aquáticas, para as quais a absorção direta de substâncias químicas dissolvidas na água constitui uma via de exposição significativa. Adicionalmente, o ciclo reprodutivo dos organismos aquáticos, com um desenvolvimento não protegido na fase embrionária e nos primeiros estágios de vida no ambiente, torna-os particularmente suscetíveis aos produtos químicos presentes na água. Quanto aos seres humanos, as possíveis vias de exposição aos desreguladores endócrinos incluem a exposição direta no local de trabalho ou através de produtos de consumo como os alimentos, determinados plásticos, tintas, detergentes, cosméticos, e ainda a exposição indireta através do ambiente (EERTMANS *et al.*, 2003).

Durante as duas últimas décadas, diversos relatos têm sido publicados em diferentes países sobre uma ampla gama de modificações nas condições de saúde humana e animal, potencialmente associadas a disfunções no equilíbrio endócrino. Uma das primeiras a chamar a atenção dos pesquisadores foi a diminuição na razão de sexos ao nascimento (razão homens/mulheres), superior à unidade em diferentes populações. A estes fatos se acrescentaram os relatos de modificações na qualidade dos espermatozóides (em termos de concentração, motilidade e anomalias celulares) e aumento na incidência de infertilidade, modificações na libido,

doença nodular da tireoide, precocidade, baixo peso ao nascer, malformações urogenitais masculinas (sobretudo criptorquidia e hipospádia) e alguns tipos de neoplasias como o câncer de testículo e o câncer esporádico da mama em mulheres jovens (IUPAC, 2003; WISTORCH, 2002).

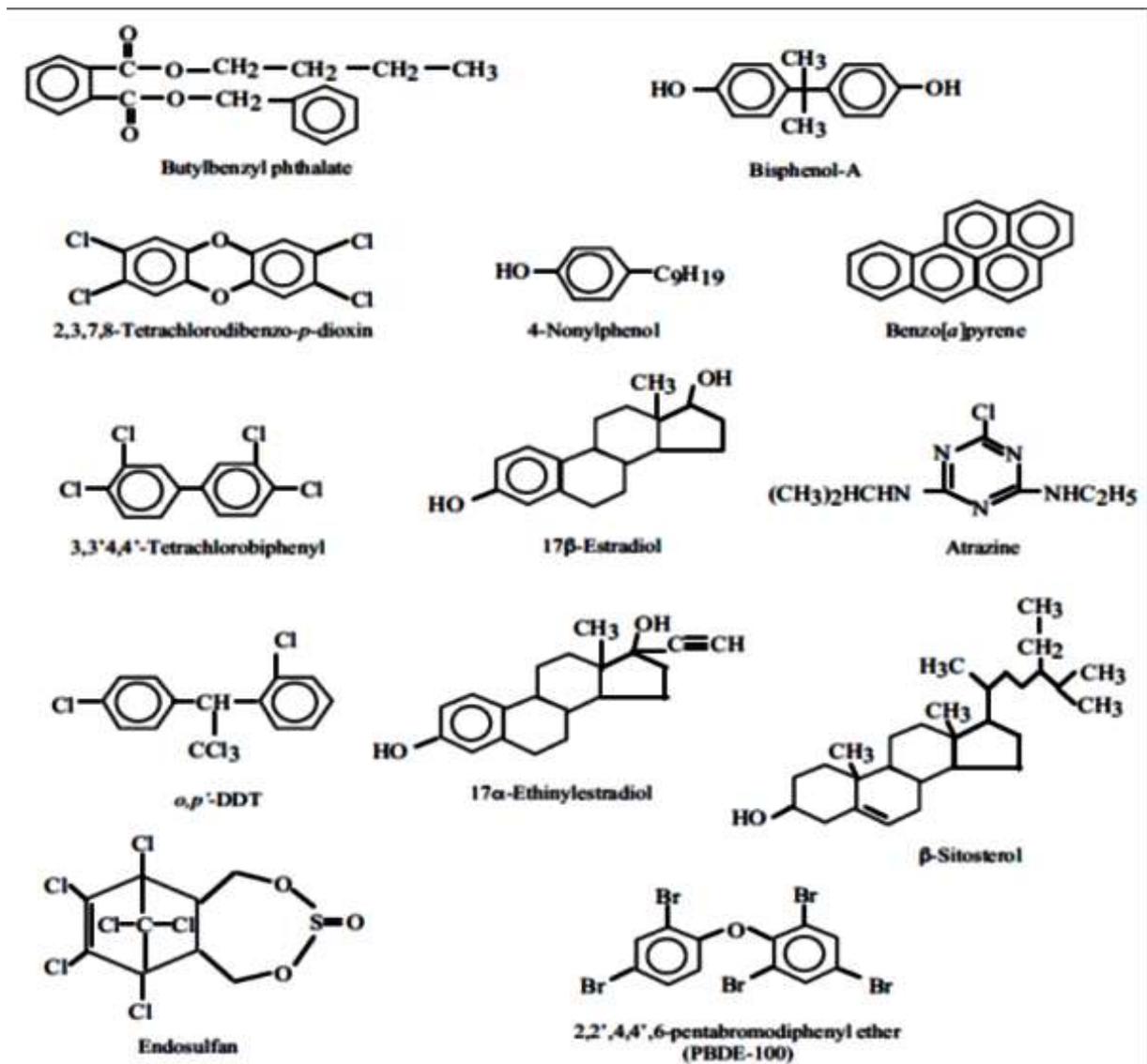
Assume-se hoje que a explicação para a ocorrência conjunta desta série de fenômenos que vêm sendo crescentemente debatidos decorreria da exposição humana e animal a certas substâncias químicas presentes no ambiente. Estas, pela similitude de sua estrutura química com hormônios endógenos, alteram a ação dos mesmos em geral acoplando-se aos receptores hormonais nas células, ou bloqueando a ligação dos mesmos, estimulando assim a atividade hormonal num ritmo independente daquele definido pela homeostasia endócrina (EERTMANS *et al.*, 2003).

Embora estudos relacionando humanos a exposição à desreguladores endócrinos sejam de importância médica, os mesmos são de difícil realização, pois envolvem fatores éticos e o ciclo reprodutivo de um humano leva cerca de 20 anos para se completar e mais cerca de 20 anos para verificar-se a fertilidade da descendência (BOND, 1979). Devido a estes fatores que dificultam os estudos com humanos e até mesmo com mamíferos, muitos dos estudos sobre efeitos de desreguladores endócrinos têm sido realizados em peixes, uma vez que há grande similaridade entre o sistema endócrino de peixes e de vertebrados superiores (PAIT e NELSON, 2002).

### 1.1 MODOS DE AÇÃO DOS DESREGULADORES ENDÓCRINOS

Os desreguladores endócrinos podem exercer seus efeitos de diversas formas. Uma delas é mimetizando hormônios endógenos, sendo que tais poluentes são ditos agonistas do receptor hormonal. Outra maneira de causar disfunção endócrina é o antagonismo dos hormônios endógenos, impedindo que os mesmos exerçam suas funções, em geral bloqueando o receptor hormonal. Os desreguladores endócrinos são ainda capazes de alterar o padrão de síntese e secreção de hormônios endógenos ou alterar a produção dos receptores hormonais. Um outro modo de ação dos desreguladores endócrinos é ativação ou inibição de enzimas relacionadas a síntese hormonal (PAIT e NELSON, 2002).

Os hormônios são mensageiros químicos secretados por uma glândula endócrina e que tem o seu efeito em tecidos alvos, desde que estes tenham os receptores adequados para o hormônio. Os desreguladores endócrinos geralmente possuem estrutura química semelhante a dos hormônios naturais e podem se ligar aos receptores hormonais endógenos. A figura 1 traz a estrutura química do hormônio natural  $17\beta$ estradiol e de alguns desreguladores endócrinos com estrutura química semelhante ao mesmo (PAIT e NELSON, 2002).



**Figura 1.** Estrutura química do estradiol e de alguns desreguladores endócrinos.

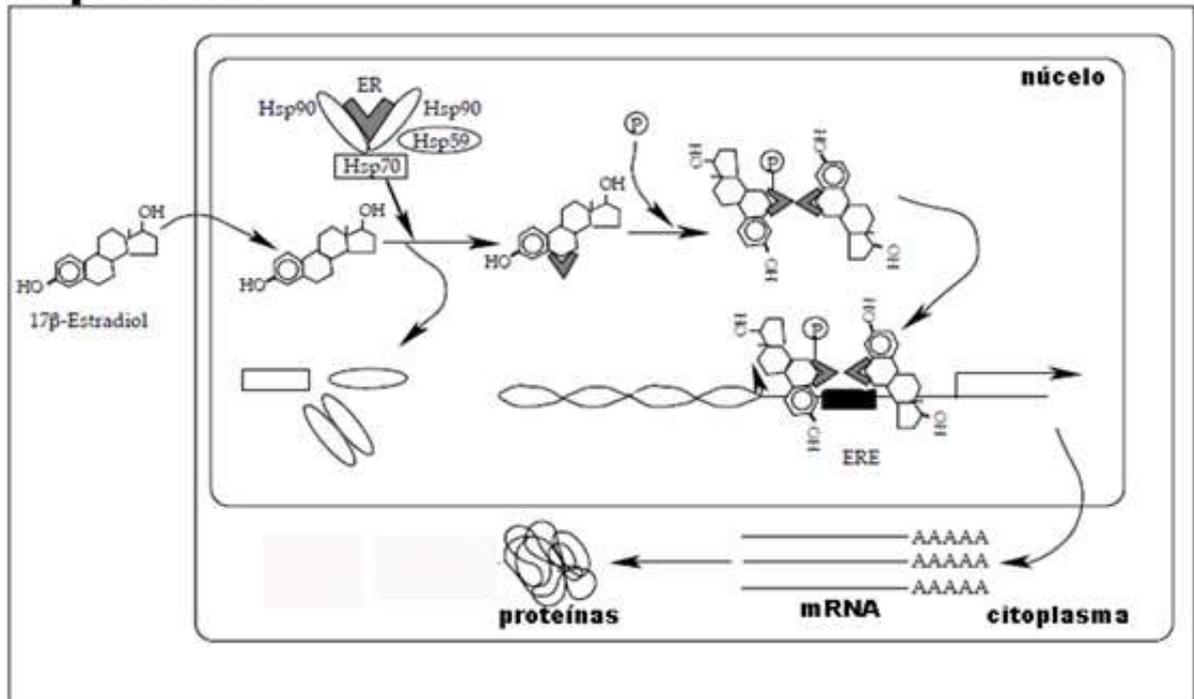
Fonte: PAIT e NELSON, 2002.

Dentre todas as classes de hormônios, os que têm seus mecanismos de disfunção endócrina mais estudados, são os hormônios esteróis, que são derivados

do colesterol. Os hormônios esteroides são moléculas lipofílicas que atravessam as membranas biológicas por difusão, ligando-se a receptores citosólicos ou nucleares. Tais receptores possuem baixa especificidade pelo seu ligante, sendo que substâncias estruturalmente semelhantes ao ligante endógeno são capazes de desencadear os efeitos do mesmo no sistema endócrino. Os desreguladores endócrinos, por apresentarem tal estrutura química e por serem lipofílicos, atingem facilmente o citoplasma ou o núcleo das células e ligam-se aos receptores desencadeando os efeitos dos hormônios endógenos mesmo na ausência dos mesmos. Os efeitos em nível de sistema endócrino são lentos, uma vez que dependem da transcrição de genes que são ativados por hormônios ou por compostos que os mimetizam (FUNKESTEIN *et al.*, 2000). Deve salientar-se que o sistema endócrino é estimulado por baixas concentrações sendo essa a principal razão porque níveis ou teores vestigiais de químicos orgânicos exógenos podem ser tão perniciosos. Níveis mais baixos de desreguladores endócrinos apenas evocam as respostas endócrinas, porém níveis mais elevados alteram a homeostase do organismo podendo levar a patologias (MOURA-COSTA *et al.*, 2010) ou até a morte (HONTELA *et al.*, 1993).

De todos os mecanismos de agonismo o mais conhecido é o do receptor de estrogênio, ilustrado na figura 2. Neste modelo o estradiol, hormônio natural e endógeno, é produzido pelos ovários e transportado via circulação até o tecido hepático, onde é incorporado por simples difusão por ser lipofílico. Ainda devido às suas características lipofílicas, o estradiol atravessa a membrana nuclear e chega ao interior do núcleo. O receptor de estradiol (RE), situado no núcleo, é mantido inativo devido a sua associação a proteínas da família das *Heat shock proteins* (HSPs). Após a ligação do estradiol ao seu receptor, este sofre uma mudança conformacional que libera as HSP; então dois receptores ligados aos seus respectivos ligantes, formam um dímero que é ativo e se liga a uma região do DNA que contém os genes responsivos a estrógenos. A ligação do complexo hormônios-receptores a estes genes leva a transcrição dos mesmos, resultando na produção das proteínas codificadas por tais genes, entre elas a vitelogenina e a coriogenina (PAIT e NELSON, 2002).

## Hepatócito



**Figura 2.** Mecanismo de ação do 17-β-estradiol.

FONTE: Adaptado de Zacharewski (1997).

### 1.2 SISTEMA NEURO-ENDÓCRINO-REPRODUTOR EM PEIXES

O sistema endócrino em peixes é composto por várias glândulas localizadas ao longo do corpo que sintetizam e secretam hormônios relacionados à homeostase, reprodução, osmorregulação entre outros. Por exemplo, a tireoide secreta os hormônios  $T_3$  e  $T_4$  que estão relacionados à adaptação dos peixes a diferentes temperaturas. O corpúsculo de Stanius secreta a hipocalcinina que está envolvida na homeostase do cálcio. O pâncreas secreta insulina e glucagon que estão envolvidos no metabolismo de glicose. A hipófise produz e secreta inúmeros hormônios envolvidos no crescimento, metabolismo energético e principalmente na reprodução (PAIT e NELSON, 2002).

A reprodução em peixes é, como em mamíferos, controlada pelo eixo hipotálamo-hipófise-gônadas, também chamado de eixo neuro-endócrino-reprodutor. Os processos reprodutivos normalmente apresentam ritmos endógenos disparados por sinais ambientais, de modo que o período reprodutivo se encaixa numa época favorável ao desenvolvimento das larvas e alevinos (VAZZOLER, 1996).

Alterações de fatores ambientais tais como fotoperíodo e temperatura são detectadas por receptores específicos, transmitidas ao cérebro e então para o hipotálamo, alterando a secreção e produção de hormônios pelo mesmo. O hipotálamo é o constituinte neural do sistema endócrino que fica situado na base do cérebro e produz, dentre vários hormônios, o hormônio liberador das gonadotrofinas (GnRH). O GnRH estimula a hipófise a liberar as gonadotrofinas, sendo que estas estimulam a maturação gonadal e a produção e secreção de hormônios esteróis (androgênios e estrogênios) pelas gônadas. Em teleósteos já foi relatada a presença de duas gonadotrofinas: a gonadotrofina I (GtH I) e a gonadotrofina II (GtH II), sendo que estas são análogas ao FSH e LH de mamíferos. A GtH I estimula o crescimento gonadal, a gametogênese, e a entrada da vitelogenina nos ovócitos. A GtH II age na maturação final dos gametas bem como na liberação dos mesmos (BONE *et al.*, 1995).

A diferenciação sexual em peixes não é apenas determinada geneticamente, mas também depende das concentrações hormonais a que as larvas estarão sujeitas. Antes da diferenciação sexual, células indiferenciadas poderão originar tecido ovariano ou testicular, dependendo da carga genética. Peixes predeterminados a se tornarem fêmeas secretam hormônios estrogênios e as células indiferenciadas se tornam ovário; peixes predeterminados a se tornarem machos secretam andrógenos que promove a diferenciação em testículos. Se as larvas forem expostas a estrógenos ambientais, mesmo aquelas que possuem carga genética masculina, irão se desenvolver com fenótipo feminino. O inverso é válido se a exposição for a andrógenos ambientais (BONE *et al.*, 1995).

### 1.2.1 Sistema reprodutor masculino

Em geral os teleósteos possuem um par de testículos separados em vários lóbulos por uma camada de tecido conjuntivo, sendo denominados testículos lobulares. Cada lóbulo possui vários cistos e em cada um deles há um conjunto de células germinativas que se encontram todas no mesmo estágio de maturação. Os testículos também possuem as células de Sertoli, que tem como função a nutrição das células germinais, e as células de Leydig, que se situam no tecido intersticial e que são responsáveis pela produção de hormônios esteróis. Durante o processo de gametogênese, células primordiais denominadas espermatogônias sofrem

sucessivas divisões celulares e originam os espermatozoides, que são liberados para o lúmen central de onde seguem para o ducto espermático, que desemboca na abertura genital (SULLIVAN *et al.*,1997).

### 1.2.2 Sistema reprodutor feminino

As fêmeas possuem dois ovários pareados situados na cavidade abdominal. Os ovários se comunicam com o meio externo por meio de ovidutos, por onde são liberados os ovócitos quando estes estão maduros. Os ovários são recobertos por uma camada de tecido conjuntivo denominada túnica albugínea, que encerra oogônias e ovócitos em diferentes estágios de desenvolvimento (SULLIVAN *et al.*, 1997).

As oogônias são as primeiras células da linhagem germinativa que irão se desenvolver até se tornarem um ovócito maduro. Segundo VAZZOLER (1996), estas células podem ser chamadas de células germinativas jovens ou de cromatina-nucleolar. Tais células aparecem agrupadas em ninhos inseridos nas lamelas ovígeras e possuem citoplasma escasso e núcleo arredondado e com um único nucléolo central. Já os ovócitos de fase II, também denominados de ovócitos de estoque de reserva ou ovócitos perinucleolar, são ovócitos com o volume aumentado em relação aos oogônias, que possuem citoplasma volumoso e basófilo e apresentam 1 ou 2 nucléolos periféricos. Os ovócitos de fase III, também chamados de ovócitos com vitelogênese lipídica ou ainda ovócitos com formação da vesícula vitelínica, se caracterizam por um aumento do citoplasma em relação à fase anterior bem como pela vacuolização do mesmo, que representa a deposição lipídica; o núcleo passa a conter vários nucléolos periféricos e ocorre o surgimento da membrana vitelínica, que é acelular, acidófila e fica situada logo abaixo da membrana plasmática. Nesta fase também se desenvolvem as células foliculares, que compõe uma camada celular sutil ao redor do ovócito. Os ovócitos de fase IV também são chamados de ovócitos com vitelogênese lipídica e proteica ou apenas ovócitos com vitelogênese. Tais ovócitos caracterizam-se pelo aumento ainda mais significativo do citoplasma em relação a fase anterior e pela deposição de placas acidófilas no mesmo. A membrana vitelina se torna mais espessa e as células foliculares se tornam mais alongadas. Nos ovócitos de fase V, conhecidos como ovócitos com vitelogênese completa ou ovócito maduro, o citoplasma aumenta

pouco de tamanho em relação a fase anterior e o núcleo perde sua forma esférica e se contrai. A membrana vitelina aumenta e passa a exibir estrias radiais, passando a chamar-se zona radiata. As células foliculares encontram-se bem desenvolvidas e constituem uma paliçada regular ao redor do ovócito. Estas são as células mais maduras da linhagem reprodutiva e que estão prontas para serem liberadas e dar continuidade ao processo reprodutivo (VAZZOLER, 1995; YAMAMOTO, 1956).

No caso da espécie estudada neste trabalho o desenvolvimento ovocitário é dito assincrônico, uma vez que dentro do ovário há ovócitos em diferentes estágios de desenvolvimento. Isto é comum para espécies que possuem desovas parceladas ao longo do ano.

### 1.3 VITELOGÊNESE

#### 1.3.1 A descoberta da vitelogenina

Em animais ovíparos, a vitelogênese está associada com inúmeras mudanças no perfil de proteínas do plasma em fêmeas. Há quase um século atrás, Uhlenhuth e Kodama (1914), encontraram uma proteína plasmática em carpas fêmeas em maturação e nomearam-na de ovomina. Roepke e Hughes (1935) encontraram no soro de aves fêmeas uma fosfoproteína que nomearam de vitelina, sendo que tal proteína não estava presente em fêmeas imaturas e nem em machos e, que a mesma também não era encontrada no plasma de mamíferos. Nos primeiros estudos com peixes, injeções de estrógenos resultaram num aumento dos níveis totais de proteínas plasmáticas e especialmente as ligantes de fósforo, sendo que tal aumento também foi acompanhado pelo aumento das proteínas dos ovócitos no plasma (BAILEY, 1957). Proteínas específicas observadas no plasma de fêmeas em vitelogênese ou de peixes tratados com estrógenos tiveram vários nomes tais como, vitelina sérica, antígeno SM, fator HM, lipovitelina sérica e proteína específica do plasma de fêmeas (revisado por HIRAMATSU *et al.*, 2005).

O termo vitelogenina foi primeiramente usado por PAN e colaboradores (1969) para descrever uma proteína específica de fêmeas na hemolinfa da mariposa *Cocrepia*. Desde então esta nomenclatura vem sendo amplamente aceita para todas as proteínas plasmáticas específicas de fêmeas em maturação descritas anteriormente. Em peixes teleósteos, Hara e Hirai (1976) descobriram uma proteína

específica do plasma de fêmeas (FSSP) ligante de ferro em *Oncorhincus keta* e em *Oncorhincus mykiss*. Emmersen e Petersen (1979) encontraram uma FSSP similar a uma lipofosfoproteína no soro de fêmeas vitelogênicas de *Platichthys flesus*. A FSSP foi mais tarde purificada a partir do soro de truta arco íris e foi imunologicamente identificada como vitelogenina pela primeira vez em peixes teleósteos por Hara e Hirai em 1978.

### 1.3.2 Vitelogenina e vitelogênese

A vitelogenina é sintetizada pelo fígado de fêmeas ovíparas em resposta ao hormônio endógeno  $17\beta$ estradiol (FUNKESTEIN *et al.* 2000). Este hormônio é secretado pelos ovários que são estimulados a fazê-lo pelo eixo hipotálamo-hipofisário e a secreção depende de fatores ambientais, estando ligada diretamente a época reprodutiva da espécie (SILVERSAND *et al.*, 1993). O estrógeno atravessa a membrana biológica dos hepatócitos, atinge o núcleo onde se liga a seu receptor fazendo com que o mesmo mude de conformação e se ligue a outro complexo estrógeno-receptor. Este homodímero formado age diretamente em regiões específicas do DNA, chamadas de genes responsivos aos estrógenos, onde atua como ativador transcricional, agindo sobre o gene da vitelogenina (MONCAUT *et al.*, 2002). A proteína produzida, sofre ainda modificações pós traducionais como fosforilações, glicosilações e lipidações, sendo tais modificações essenciais para a funcionalidade da molécula (FUNKESTEIN *et al.* 2000). Depois de sintetizada e modificada a vitelogenina é secretada para a corrente sanguínea e transportada até os ovócitos em maturação. É incorporada aos ovócitos por um processo de endocitose mediada por receptor e no interior deste é clivada em fosfovítina, lipovítelina e componente  $\beta$ . A fosfovítina e a lipovítelina farão parte da reserva energética do embrião, também conhecida como vitelo. Não se sabe ao certo qual a função do componente  $\beta$  (HENNIES *et al.*, 2003; MARIN, *et al.*, 2004).

A vitelogênese é o processo de produção, transporte, incorporação ao ovócito e clivagem da vitelogenina. Tal processo compreende ainda outras características envolvidas com a homeostase do fígado e sanguínea. Devido a proximidade da época reprodutiva, o fígado das fêmeas além de produzir a vitelogenina, também aloca uma reserva energética composta principalmente de lipídeos, que serão necessários à reprodução. O aumento na produção da

vitelogenina e a reserva energética levam a um aumento na massa deste órgão (MOURA-COSTA *et al.*, 2010). No sangue a vitelogenina é descrita como uma proteína ligante de cálcio, sendo a presença deste íon fundamental para o seu transporte. Desta forma o aumento na produção da vitelogenina leva a um aumento de cálcio no plasma (MARIN *et al.*, 2004).

A maturação das gônadas é um processo que ocorre concomitantemente com a vitelogênese e durante esta maturação as gônadas têm sua massa aumentada não só pela incorporação da vitelogenina, mas também devido a maturação dos ovócitos (HENNIES *et al.*, 2003).

### 1.3.3 Expressão de vitelogenina com o biomarcador

Os hormônios esteroides endógenos, ou os desreguladores endócrinos, tem duas categorias de influências sobre os sistemas biológicos: organizacional e ativacional. Efeitos organizacionais são usualmente mudanças permanentes na morfologia e que persistem mesmo depois de o estímulo hormonal ter desaparecido, alterando subsequentemente a função e o comportamento do órgão afetado. Efeitos ativacionais são usualmente mudanças transitórias na morfologia, fisiologia, função e comportamento que desaparecem quando o estímulo hormonal é removido. Os desreguladores endócrinos podem ter efeitos organizacionais na diferenciação sexual, na expressão de características sexuais secundárias e na morfologia das gônadas em peixes (LEINO *et al.*, 2005; XU *et al.*, 2008). Adicionalmente vários estudos têm documentado efeitos ativacionais causados por desreguladores endócrinos nos níveis de hormônios esteroidais bem como nos níveis de proteínas que tem sua síntese controlado por estes hormônios (FUNKESTEIN *et al.*, 2000; MOURA-COSTA *et al.*, 2010), sendo que tais alterações podem ser consideradas biomarcadores de exposição a poluentes desreguladores endócrinos. Dentre tais biomarcadores a expressão da vitelogenina por machos está entre os mais bem estudados.

Indivíduos machos adultos e juvenis possuem o receptor nuclear de estrógeno, no entanto não possuem concentrações circulantes deste hormônio suficientes para ativar o receptor. A presença de estrógenos no ambiente, ou de compostos que mimetizem o mesmo, promove a ativação do receptor culminando com o processo de vitelogênese em machos adultos e juvenis. O fato de a

vitelogenina ser uma proteína específica de fêmeas, podendo ser expressa por machos frente a desreguladores endócrinos estrogênicos torna esta molécula um bom biomarcador para disfunções do sistema endócrino (MARIN *et al.*, 2004).

Os desreguladores endócrinos de efeito estrogênico induzem todas as alterações metabólicas relacionadas a vitelogenese: aumento da massa do fígado, aumento da concentração de vitelogenina e cálcio plasmáticas, reserva energética no fígado alterações morfo e fisiológicas nas gônadas (FUNKESTEIN *et al.* 2000).

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar o processo de vitelogênese, bem como a molécula de vitelogenina em machos de *Rhamdia quelen*.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Induzir a vitelogênese em machos adultos de *Rhamdia quelen*;
- ✓ Comparar, sob diversos aspectos, machos induzidos com machos controle e fêmeas naturalmente vitelogênicas;
- ✓ Caracterizar alterações no fígado e nas gônadas, relacionadas a vitelogênese, utilizando parâmetros biométricos, alterações histológicas, metabólicas e fisiológicas;
- ✓ Identificar e caracterizar a molécula de vitelogenina expressa por machos e fêmeas vitelogênicas, pelas técnicas de SDS PAGE, *Western blot* e espectrometria de massa.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 INDUÇÃO ESTROGÊNICA

Para a indução estrogênica do processo de vitelogênese, realizou-se um experimento na PISCICULTURA PANAMÁ (Paulo Lopes – SC), entre os meses de outubro e novembro de 2010. Foram utilizados 30 animais experimentais, todos provenientes da piscicultura supracitada, sendo todos adultos (1 ano) da espécie *Rhamdia quelen*. Dos 30 exemplares de *R. quelen*, 10 eram machos não injetados com o estrógeno, sendo injetados apenas com o óleo de canola (CTM - grupo controle de machos), 10 eram fêmeas não injetadas e em período de vitelogênese (CTF - grupo controle de fêmeas), 10 eram machos injetados intraperitonealmente com 10 mg de 17 $\beta$ estradiol por quilograma de massa corpórea (10 mg.kg<sup>-1</sup>E<sub>2</sub>) (CARRERA *et al.*, 2007; PAIT e NELSON, 2003; ZAROOGIAN *et al.*, 2001). O hormônio 17 $\beta$ estradiol foi escolhido para a indução da vitelôgenese por ser o hormônio endógeno de fêmeas e que portanto, representa a mais realística condição fisiológica. Para a exposição o hormônio foi solubilizado em óleo de canola devido às suas propriedades lipofílicas.

Todo o procedimento experimental obedeceu às normas propostas pelo Comitê de Ética do Setor de Ciências Biológicas (Certificado número 314).

Durante o período experimental os animais foram alimentados diariamente, uma vez ao dia, *ad libitum*.

#### 3.2 COLETA E PROCESSAMENTO DO MATERIAL BIOLÓGICO

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

Parte do fígado e das gônadas foi coletada e mantida em solução fixadora de Alfac (formol, álcool e ácido acético glacial) por 16 horas, armazenados em álcool

70% e posteriormente sofreram processamento histológico. Outra parte do fígado e das gônadas foram coletados e fixados em Paraformaldeído 4% por 2 h; após a fixação o material foi estocado em tampão salino (PB) e processado para criomicrotomia. Uma terceira parte do fígado e das gônadas foi coletada e armazenada a -75°. C para posterior processamento por SDS-PAGE e *western blot*.

### 3.3 ÍNDICES BIOMÉTRICOS

Para cada um dos grupos experimentais foram mensurados a massa corpórea, das gônadas e do fígado. Estas mensurações foram realizadas a fim de se estabelecer os índices hepato e gonadossomáticos. O índice hepatossomático foi calculado como sendo a relação entre a massa do fígado e a massa corpórea. O índice gonadossomático como sendo a relação entre a massa das duas gônadas e a massa corpórea.

### 3.4 PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO

O fígado e as gônadas fixados em Alfac, foram mantidos em álcool 70% até que fosse possível dar continuidade ao processamento histológico.

Posteriormente o material foi desidratado em série crescente de etanol, diafanizado em xilol e incluído e emblocado em Paraplast (Sigma®). Cortes histológicos com 5 µm de espessura foram obtidos em micrótomo e distendidos em lâminas de vidro com o auxílio de uma placa aquecedora.

#### 3.4.1 Coloração Hematoxilina-Eosina

Os cortes a serem corados com hematoxilina-eosina foram aderidos às lâminas de vidro utilizando albumina diluída. Após os cortes estarem bem aderidos e a lâmina seca procedeu-se a coloração.

Primeiramente o Paraplast® foi removido das lâminas com o uso de xilol. Então as mesmas foram reidratadas em série decrescente de etanol e em água destilada. A hematoxilina, corante básico, foi mantida por cerca de 1 min em contato com as lâminas; já a eosina, corante ácido, foi mantida por cerca de 40 seg em contato com as lâminas. Prosseguindo o protocolo, as lâminas foram lavadas por 10

min em água corrente de torneira, depois em água destilada, desidratadas em série crescente de etanol, diafanizadas em xilol e montadas em resina histológica tipo Entelan.

Nesta técnica os núcleos que possuem grande quantidade de moléculas ácidas se coram com hematoxilina, adquirindo tons arroxeados. Já o citoplasma, rico em substâncias básicas, se cora com eosina, adquirindo tons rosados.

#### 3.4.2 Coloração de ácido periódico de Schiff

Os cortes a serem corados pela técnica de ácido periódico de Schiff foram aderidos às lâminas de vidro utilizando albumina diluída. Após os cortes estarem bem aderidos e a lâmina seca procedeu-se a coloração.

As lâminas foram inicialmente reidratadas em série decrescente de etanol e em água destilada. Em seguida imergiram-se as lâminas em solução de ácido periódico 0,5%. Na sequência, as mesmas foram lavadas em água destilada e imersas em reativo de Schiff por 20 min. Logo após as lâminas foram lavadas em água sulfurosa por 5 min e então contra-coradas com hematoxilina por 40 seg. O material foi então lavado em água corrente de torneira por 5 min, depois em água destilada, desidratadas em série crescente de etanol, diafanizadas em xilol e montadas em resina histológica tipo Entelan.

A reação do ácido periódico, seletivamente oxida os resíduos de glicose, produzindo aldeídos que reagem com o reagente de Schiff, que é o corante fucsina básica. A cor produzida varia entre o púrpura e o magenta, nos sítios onde se localizam carboidratos oxidáveis (mono-, oligo- e polissacarídeos, glico- e mucoproteínas). Nesta técnica os núcleos que possuem grande quantidade de moléculas ácidas se coram com hematoxilina devido a contra-coloração, adquirindo tons arroxeados. As regiões ricas em carboidratos, as glicoproteínas e os grânulos de glicogênio se coram de rosa intenso.

#### 3.4.3 Imuno-histoquímica

Os cortes de 5  $\mu$ m obtidos em micrótomo foram aderidos em lâminas gelatinizadas. Tais lâminas foram parcialmente desparafinizadas a 60 °C por 1h. A desparafinização completa deu-se através de dois banhos de xilol, 10 min cada um.

As lâminas foram reidratadas em série decrescente de etanol e então em tampão fosfato salino (PBS) pH 7,6. As peroxidases endógenas foram bloqueadas com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% em metanol por 3 min. Já os radicais aldeídicos foram bloqueados com glicina 0,1 M por 10 min e os sítios inespecíficos foram bloqueados com BSA 1% por 1 h. Os cortes foram então incubados com o anticorpo anti-vitelogenina de *Spaurus aurata* (Biosense, Norway), numa diluição de 1:75 (em PBS-BSA 0,1%), por 16 h. Após as 16 h os cortes foram lavados com PBS e subsequentemente incubados com anticorpo secundário anti-imunoglobulina de coelho (1:400) acoplado a HRP por 1 h a temperatura ambiente. A reação foi evidenciada utilizando DAKO ENVISION kit System Labeled Polymer HRP.

### 3.5 CRIOPROCESSAMENTO

O material fixado em PFA 4% e armazenado em PB foi mantido a 4 °C até que o processamento fosse possível. Fígado e gônadas passaram por uma etapa de crioproteção na qual foram imersos em sacarose 30% por 1 h, 50% por 1 h e sacarose 70% durante a noite. Na sequência o material foi emblocado em tissue-tek (resina específica para criostato) e cortes de 7 a 10 µm foram obtidos e aderidos a lâminas gelatinizadas.

Os cortes secaram a temperatura ambiente por 48 h e então na estufa a 37 °C por 1 h. Após a secagem o material foi armazenado a -20 °C.

#### 3.5.1 Coloração de Sudan Black B

As lâminas obtidas em criostato foram coradas com Sudan Black B para localização histoquímica de lipídeos.

Primeiramente as lâminas foram descongeladas a temperatura ambiente por cerca de 20 min. Em seguida as mesmas foram imersas em álcool 70% por 1 min e então coradas com SBB por 20 min. Após a remoção do corante as lâminas foram lavadas rapidamente em água destilada e contra-coradas com hematoxilina por 40 seg. As lâminas passaram então por um banho rápido de álcool acidulado e foram montadas com glicerina. As lamínulas foram seladas às lâminas com o uso de esmalte.

Nesta técnica as moléculas lipídicas, bem como lipoproteínas, se coram em tons que variam entre o negro e o roxo escuro. Já os núcleos apresentam-se em tons roxo claro devido a contra-coloração com hematoxilina.

### 3.5.2 Imunofluorescência

As lâminas obtidas em criostado também foram processadas a fim de se marcar a vitelogenina no fígado e nas gônadas com o auxílio de anticorpos específicos para esta molécula.

As lâminas foram primeiramente retiradas do freezer e secas em estufa a 37°C por 1 h e os cortes de interesse foram isolados com o auxílio de esmalte. Em seguida os cortes foram lavados em tampão PB e foi feito um bloqueio dos radicais aldeídicos com glicina 0,1 M por 10 min. Na sequência os sítios inespecíficos foram bloqueados com BSA 1%, por 1 h em câmara úmida a temperatura ambiente. Após o bloqueio as lâminas foram incubadas com o anticorpo primário anti-vitelogenina de *Spaurus aurata* (Biosense, Norway), diluído 1:75 por 12 h. Após as 12 h, as lâminas foram lavadas em tampão PB e incubadas com o anticorpo secundário anti-imunoglobulina de coelho acoplado ao fluoróforo FIT C, numa diluição de 1:200, por 2 h a temperatura ambiente e no escuro (para evitar a degradação do fluoróforo). As lâminas foram novamente lavadas em tampão PB e montadas com vectashield contendo DAPI (Vector®).

### 3.6 SDS PAGE

Para a amostragem da VTG no fígado e nas gônadas dos indivíduos, tais órgãos foram homogeneizados em PBS (contendo 1 mM de PMSF) e centrifugados a 12000 g, 20 min, 4°C. O pellet foi descartado e o sobrenadante prosseguiu para as análises.

Amostras de plasma, sobrenadante de fígado e gônada de indivíduos de todos os grupos tiveram sua quantificação proteica previamente determinada pelo método de BRADFORD (1976) e foram preparadas em tampão de amostra redutor. As amostras de plasma, fígado e gônadas dos indivíduos CTM, CTF e 10 mg.kg<sup>-1</sup>E<sub>2</sub> foram analisadas por eletroforese por SDS-PAGE a 4% (gel de empilhamento) e a 8% (separação), com aplicação de campo elétrico vertical (LAEMMLI, 1970),

seguida de coloração para proteínas totais (*Comassie brilliant blue*). Cada uma das amostras foi aplicada no gel numa concentração de 100 µg de proteínas totais por poço de gel.

Amostras de plasma que sofreram processamento acima descrito também seguiram para coloração de glicoproteínas (Ácido periódico de Schiff), fosfoproteínas (verde malaquita) e lipoproteínas (Sudan Black B).

### 3.6.1 Coloração de glicoproteínas

Após a separação eletroforética das proteínas totais do plasma, as glicoproteínas foram coradas como descrito por Zacharius *et al.*, 1969. Inicialmente as proteínas foram fixadas no gel com ácido tricloroacético 12,5% por 10 min, seguindo enxágue suave com água destilada. O gel foi então imerso em ácido periódico 1% (dissolvido em ácido acético 3%) por 50 min. Para a retirada do ácido periódico o gel foi lavado por 12 h com água destilada, sendo feitas trocas constantes da água. Após a lavagem o gel foi colocado em sulfato de fucsina protegido de luz por 50 min e em seguida lavado 3 vezes de 10 min cada, com metabisulfito de potássio 0,5% (recém preparado). Para a remoção do corante, o gel foi lavado em água destilada sob agitação constante. As glicoproteínas foram evidenciadas em tonalidade rosa.

### 3.6.2 Coloração de fosfoproteínas

Após a separação eletroforética das proteínas totais do plasma, as fosfoproteínas foram coradas como descrito por Cutting e Roth (1973). O gel foi fixado em SSA 10% (ácido sulfosalicílico) por 20 h, seguindo então para uma solução de SSA 10% contendo 0,5 M de CaCl<sub>2</sub> (recém preparada) por 1 h para que aumentasse a resolução das proteínas. O gel foi lavado em água destilada para remover o CaCl<sub>2</sub>, sendo então colocado em NaOH 0,5 M a 60°C por 30 min. Após a passagem pelo NaOH o gel foi lavado 2 vezes de 10 min cada com molibdato de amônia 1% (aquoso) e então colocado em solução de molibdato de amônia 1% (em HNO<sub>3</sub> 1 M) por 30 min. Para a coloração, o gel foi mantido por 30 min em solução de verde malaquita 1% preparado em ácido acético 7%. O corante foi removido através de lavagens em SSA 10%, com trocas constantes.

As fosfoproteínas foram evidenciadas em tons de verde.

### 3.6.3 Coloração de lipoproteínas

Previamente a separação eletroforética, as lipoproteínas do plasma foram processadas em polietilenoglicol e dioxane conforme descrito por Gros e Gros (1973) para evitar degradação dos lipídeos da amostra. As amostras assim preparadas foram separadas eletroforicamente e coradas em solução contendo Sudan Black B 0.2%, etanol 20%, glicerol 20% todos dissolvidos em solução de KOH 0.8 M por 40 min. A descoloração foi feita em solução de etanol 2% e ácido acético 2% (PRAT *et al.*, 1969).

As lipoproteínas foram evidenciadas em tons marrons e amarelos.

### 3.7 WESTERN BLOT

Amostras de plasma, sobrenadante de fígado e gônadas dos indivíduos de todos os grupos foram submetidas ao processo de imunodeteção da vitelogenina por *western blot*. Primeiramente 100 µg de proteínas totais foram resolvidas por SDS-PAGE conforme descrito no item 3.6. Após a corrida eletroforética, as proteínas foram eletrotransferidas para uma membrana de nitrocelulose poro 0.45 µm (Bio-Rad<sup>®</sup>). A membrana contendo as proteínas eletrotransferidas do gel foi corada com Ponceau's para análise da eletroforese e da transferência. Após a retirada total do corante, a membrana foi bloqueada por 1 h com 5% leite sem gordura (Molico) em solução de TBS-T (20 mM Tris pH 7.4, 120 mM NaCl e 0.05% Tween 20). Após o bloqueio a membrana foi incubada por 16 h à 4°C com o anticorpo anti-vitelogenina de *Spaurus aurata* (Biosense, Norway) numa diluição de 1:750. A membrana foi então lavada três vezes com TBS-T para a remoção dos anticorpos não ligados e foi incubada por 1 h com anti-imunoglobulina de coelho conjugada à peroxidase (KPL<sup>®</sup>), numa diluição de 1:4000. A reação foi evidenciada utilizando substrato quimioluminescente (Pierce ECL, Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) sobre a membrana, a qual foi exposta a um filme de raio-X sensível (Amersham biosence).

### 3.8 ESPECTROMETRIA DE MASSA

O processamento para espectrometria de massa seguiu o protocolo proposto por Shevchenko *et al.*, 1996 e modificado por Fiaschi *et al.*, 2006. Para a espectrometria de massa as proteínas totais do plasma foram separadas por SDS-PAGE em gel de poliacrilamida 8% e fixadas no gel com solução de ácido ortofosfórico (1.3%) e metanol (20%). Após a fixação, as proteínas foram coradas com *Azul de comassie* G-250 durante 16 h. Subsequentemente a coloração, o gel foi neutralizado em Tris-Base 0.1 M pH 6.5 e lavado com metanol 25%. Após a lavagem o gel foi transferido para tampão de estabilização (sulfato de amônia 20%) e então descorado em água milique. As bandas de interesse foram extraídas manualmente do gel, descoradas e lavadas em solução de bicarbonato de amônio (25 mM) e acetonitrila 50%, seguindo desidratação em acetonitrila. As proteínas das bandas foram então reduzidas em tampão contendo 10 mM DTT e 25 mM de bicarbonato de amônia e em seguida alquiladas em solução de 55 mM de iodoacetamida e 25 mM de bicarbonato de amônia. As bandas foram lavadas com acetonitrila e bicarbonato de amônia e secas em *speed vac*. Após a secagem as amostras sofreram digestão com a enzima tripsina (Tripsina Gold - Promega<sup>®</sup>) 12 ng/μl por 24 h a 37°C. As frações da digestão trípica foram dessalinizadas usando ZipTip C18 (Milipore<sup>®</sup>) e então misturadas em igual volume com a solução de matriz (uma solução saturada de α-cyano-4-hydroxycinnamic acid em 50% acetonitrila, contendo 0.1% TFA) para espectrometria de massa.

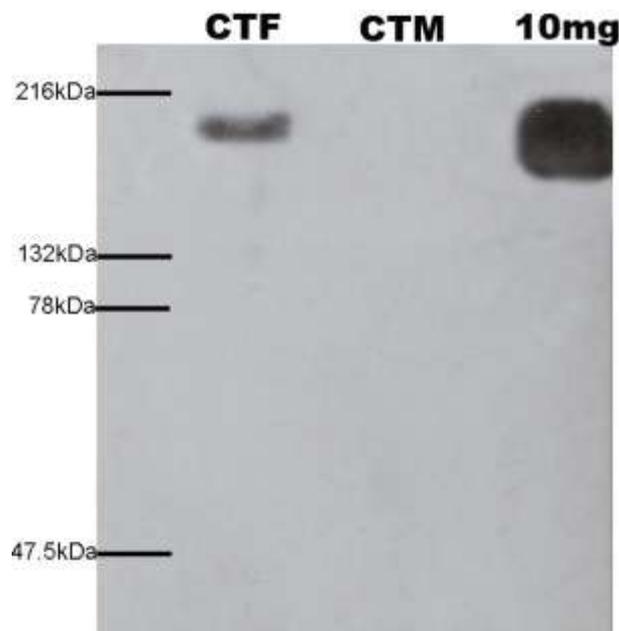
Os peptídeos provenientes da digestão trípica foram analisados no Depto de Bioquímica, UFPR, em espectrômetro de massa Ultraflex MALDI TOF/TOF (Burker Daltronic, GmbH), em modo refletor positivo. O equipamento foi externamente calibrado utilizando padrão de peptídeos de relação massa/carga conhecidas (angiotensina, substância P, ACTH e somatostatina). Foram obtidos espectros de massa 1 (MS1 ou MS) que são os espectros provenientes diretamente da digestão trípica da amostra, também conhecido como PMF (do inglês *peptide mass fingerprint*) e foram obtidos ainda espectros de massa 2 (MS2 ou MS/MS). O MS2 consiste na clivagem do chamado íon parental em seus aminoácidos constituintes, ou seja, um dos picos de massa do espectro MS1 (íon parental) é clivado em seus aminoácidos constituintes gerando o MS2, que é específico do pico de massa em questão.

As massas monoisotópicas obtidas dos peptídeos digeridos tripiticamente foram analisadas pelo software MASCOT (<http://www.matrixscience.com>), com tolerância de erro de 100 ppm, consultando os bancos de dados Swiss-prot e NCBI não redundante. Foram consideradas como modificação fixa carbamidometilação de cisteínas e como modificação variável oxidação de metioninas.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 CARACTERIZAÇÃO DA VITELOGENINA NO PLASMA

Para avaliar a presença de vitelogenina no plasma de *R. quelen*, foi realizado um ensaio de WB usando o anticorpo comercial anti-vitelogenina de *S. aurata* (Figura 3). O anticorpo reagiu especificamente com um antígeno de cerca de 200 kDa presente na amostra de plasma de fêmeas em vitelogênese (Figura 3 CTF). Esta mesma reação foi observada em amostras de plasma proveniente de machos expostos ao estrógeno (Figura 3 10mg). Entretanto, nenhuma reação foi evidenciada nas amostras provenientes de machos não expostos (Figura 3 CTM).

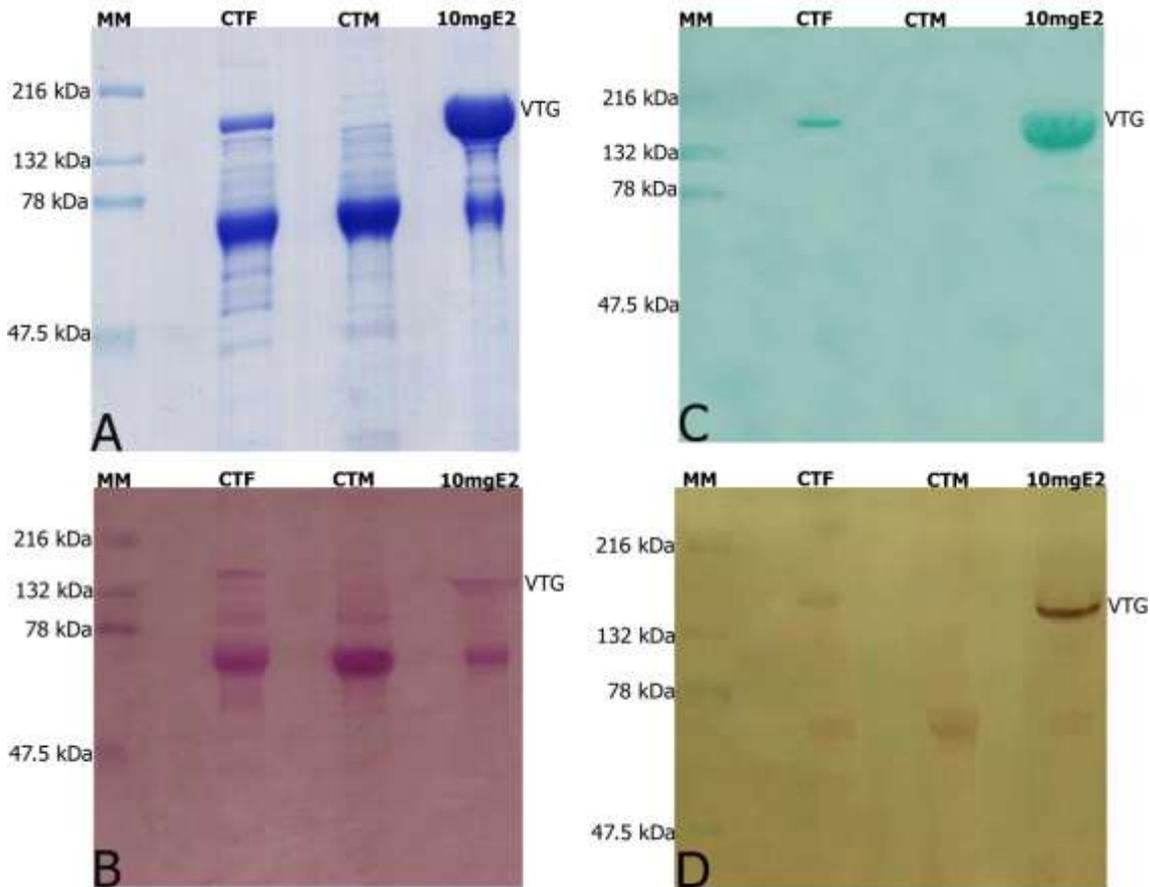


**Figura 3.** Reação de imunodeteção da vitelogenina no plasma.

NOTA: 100µg de proteínas totais do plasma resolvidas por SDS-PAGE 8% e submetidas a reação de *western blot* utilizando-se anticorpo comercial. CTF: grupo de fêmeas controle. CTM: grupo de machos controle. 10 mg: machos expostos a 10 mg E<sub>2</sub>.kg<sup>-1</sup>.

As amostras de plasma foram analisadas por SDS-PAGE seguida pela coloração com *Coomassie blue*. A partir desta análise, foi possível observar uma proteína de cerca de 200 kDa no plasma de fêmeas vitelogênicas e machos estrógeno induzido (Figura 4 A). Diferentes tipos de colorações foram usadas para caracterizar esta proteína como sendo uma glico, fosfo, e lipoproteína em fêmeas e machos estrógeno induzidos (Figura 4 B, C e D respectivamente). Nenhuma

proteína de massa semelhante foi corada para tais características em machos controle (Figura 4).



**Figura 4.** Padrão eletroforético das proteínas do plasma

NOTA: 100µg de proteínas totais do plasma resolvidas por SDS-PAGE. (A) Padrão eletroforético corado com Azul de Coomassie. (B) Padrão eletroforético de glicoproteínas coradas com ácido periódico de Schiff. (C) Padrão eletroforético de fosfoproteínas coradas com verde malaquita. (D) Padrão eletroforético de lipoproteínas coradas com Sudan Black B. MM: marcador de massa molecular. CTF: grupo de fêmeas controle. CTM: grupo de machos controle. 10 mg E<sub>2</sub>: machos expostos a 10 mg E<sub>2</sub>.kg<sup>-1</sup>.

Na tentativa de melhor caracterizar a proteína vitelogenina, foram realizados ensaios de espectrometria de massa.

As análises por MS1 e MS2 não foram capazes de identificar a vitelogenina no banco de dados do Swiss-prot e nem no banco de dados do NCBI. Tal identificação não foi possível uma vez que não há disponível nos bancos de dados o genoma de *R. quelen*. No entanto, mesmo não havendo tal identificação, verificou-se que tanto o PMF quanto o MS2 da proteína expressa por machos expostos ao estrógeno e fêmeas vitelogênicas são semelhantes, o que é um indicativo de que a

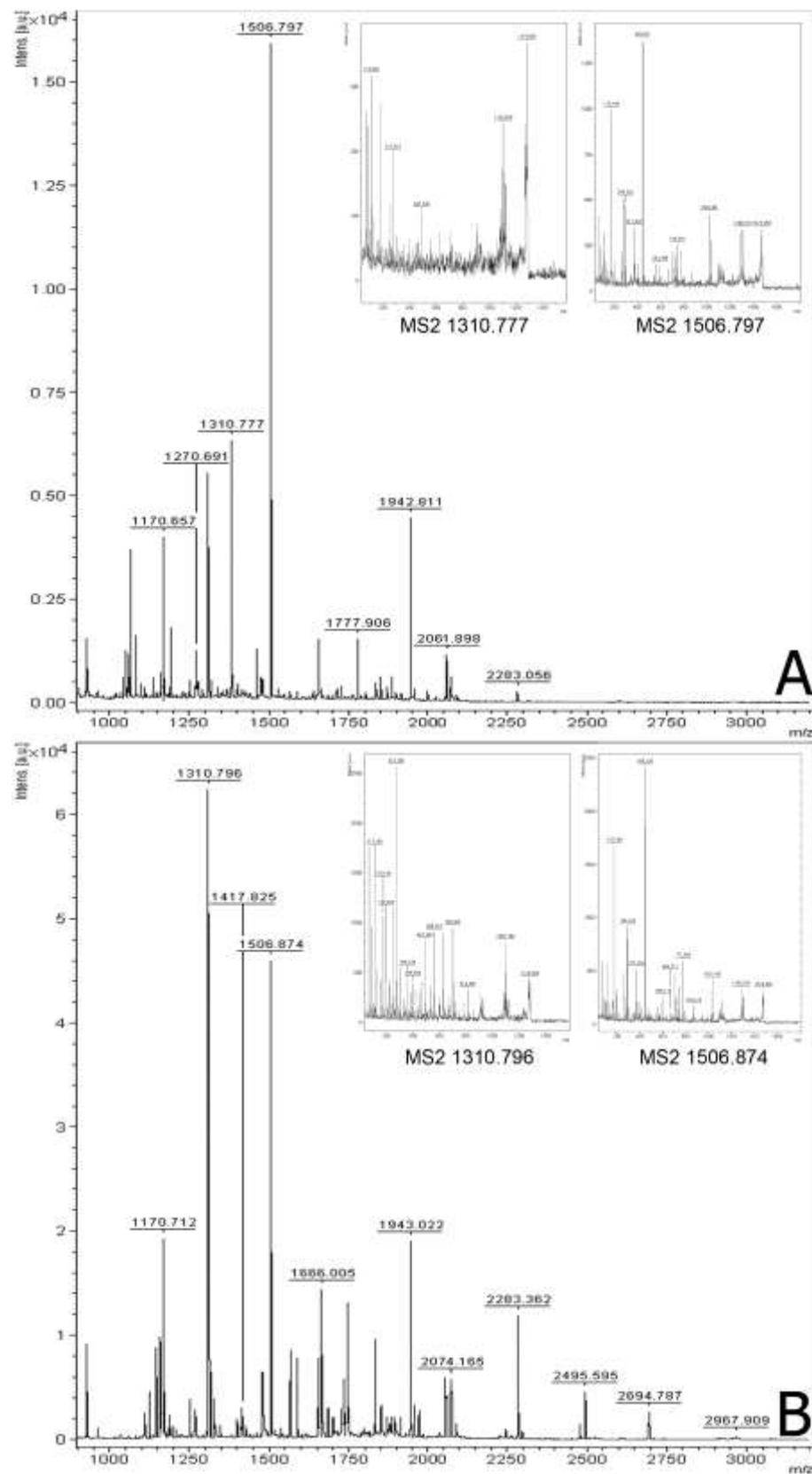
proteína estrógeno induzível nos machos é estruturalmente semelhante a proteína presente nas fêmeas maduras (Tabela 1 e Figura 5).

**Tabela 1.** Relações de massa/carga semelhantes entre a proteína considerada vitelogenina de fêmeas e machos expostos ao estrógeno.

MS1		MS2 – íon parental 1310		MS2 – íon parental 1506	
Fêmea m/z	Macho E2 m/z	Fêmea m/z	Macho E2 m/z	Fêmea m/z	Macho E2 m/z
931.584	931.516	70.059	70.061	70.109	70.097
1163.688	1163.639	86.092	86.105	72.108	72.097
1170.712	1170.671	112.092	112.106	86.150	86.140
1310.796	1310.777	129.121	129.138	129.275	129.160
1318.815	1318.767	175.155	175.158	169.253	169.221
1481.832	1481.780	255.249	255.217	175.186	175.169
1506.874	1506.797	272.219	272.199	199.333	199.195
1656.998	1656.965	487.330	487.284	266.273	266.204
1726.966	1726.841	1097.210	1097.390	286.359	286.255
1849.027	1848.939	1103.639	1103.631	294.325	294.236
1869.074	1868.923	1119.974	1119.945	300.292	300.214
1885.057	1884.930	1276.438	1276.595	303.320	303.188
1957.063	1956.897	1279.698	1279.769	371.437	371.252
2060.044	2060.010			374.245	374.315
2074.165	2074.024			381.434	381.218
2283.362	2283.122			399.298	399.385
				560.304	560.251
				593.396	593.326
				705.317	705.122
				727.322	727.358
				744.381	744.375
				777.132	777.004
				1020.461	1020.484
				1037.560	1037.487
				1291.795	1291.262
				1308.703	1308.687

				1472.258	1472.370
				1474.536	1474.677

NOTA: MS1 – Lista relações m/z dos peptídeos provenientes da digestão triptica da vitelogenina, também conhecido como PMF. MS2 – íon parental 1310: espectro de massa dos peptídeos constituintes do íon parental 1310.796 nas fêmeas, e do íon parental 1310.777 nos machos expostos ao estrógeno. MS2 - íon parental 1506: espectro de massa dos peptídeos constituintes do íon parental 1506.874 nas fêmeas, e do íon parental 1506.797 nos machos exposto ao estrógeno. Fêmeas: grupo de fêmeas em vitelogênese. Machos E2: grupo de machos expostos a 10 mg E2.kg<sup>-1</sup>.



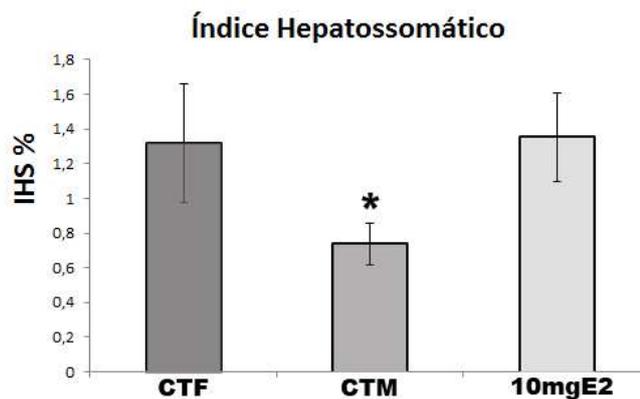
**Figura 5.** Espectros de massa da proteína considerada como vitelogenina.

NOTA: Perfil de massas moleculares gerados pela digestão trípica onde foi utilizado PMF e MS2 para identificação dos mesmos. A) Espectro de massa da proteína considerada como vitelogenina de machos expostos as estrógeno. Canto direito: Espectro de massa dos íons parentais 1310.777 e

1506.797. B) Espectro de massa da proteína considerada como vitelogenina de fêmeas em vitelogênese. Canto direito: Espectro MS2 dos íons parentais 1310.796 e 1506.874.

#### 4.2 CARACTERIZAÇÃO DO FÍGADO EM PROCESSO DE VITELOGÊNESE

A caracterização do fígado em processo de vitelogênese iniciou-se pela avaliação do índice hepatossomático que é a porcentagem de massa corpórea ocupada pelo fígado. Observa-se, em relação a este índice, a equivalência do grupo de fêmeas controle em ovogênese (CTF) e o grupo de machos injetados com estradiol (10 mg E2). Neste, o incremento na massa relativa do fígado deu-se pelo efeito indutivo do estradiol, na produção de vitelogenina. Já machos não expostos ao estrógeno (CTM) tiveram seu índice hepatossomático diminuído quando comparados a machos estrógeno induzidos e a fêmeas vitelogênicas (Figura 6).



**Figura 6.** Índice hepatossomático.

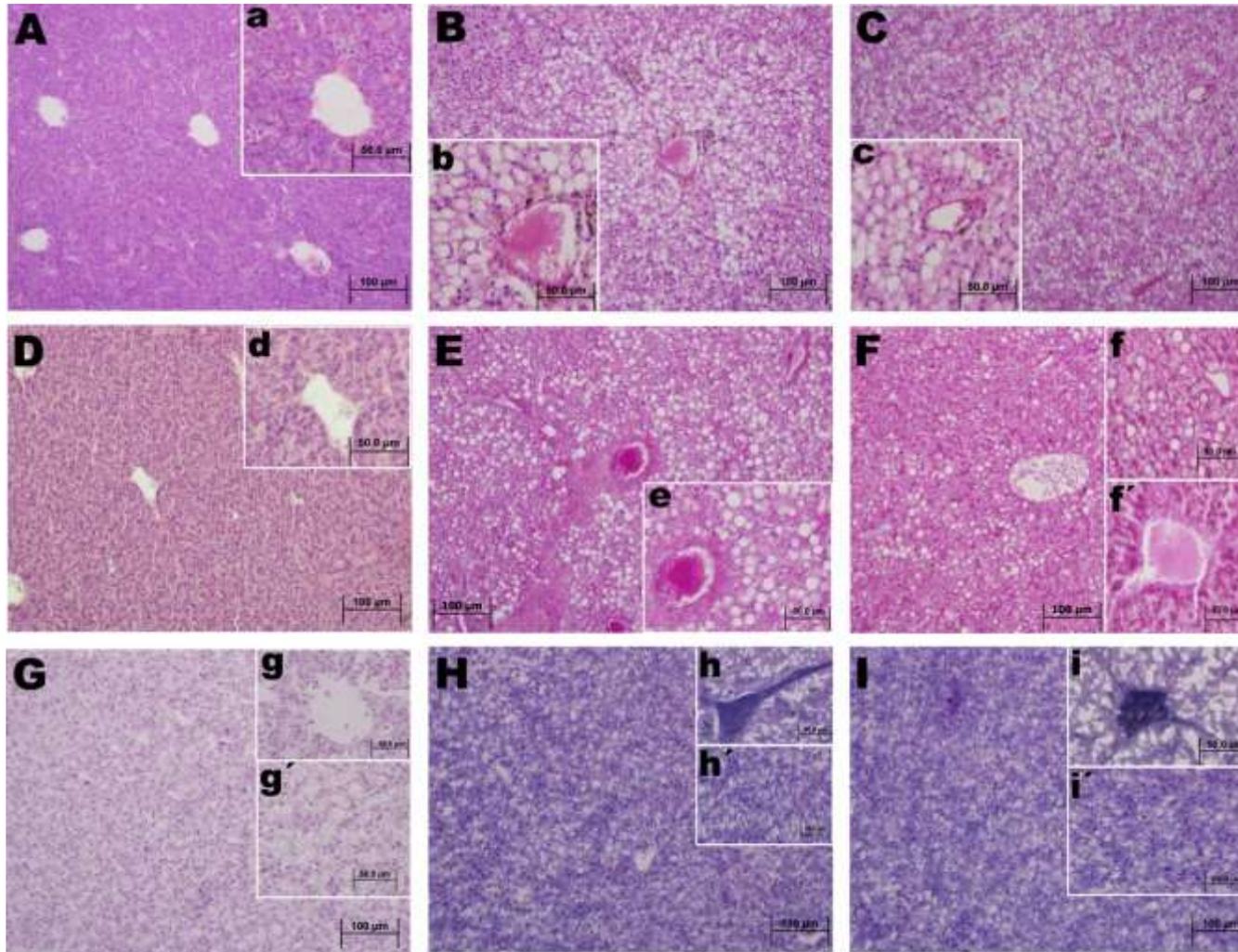
NOTA: CTF: grupo de fêmeas controle. CTM: grupo de machos controle. 10 mg E2: machos expostos a 10 mg E2.kg<sup>-1</sup>. \* p<0.05.

Cortes do fígado de fêmeas em vitelogênese e de machos expostos ao estrógeno apresentaram-se estruturalmente semelhantes, sendo que em ambos os casos foram observadas vacuolizações, que são possivelmente reservas lipídicas neste órgão (Figura 7 B e C respectivamente). Tal acúmulo caracteriza-se por uma ampla região do citoplasma que não se cora com hematoxilina/eosina e pelo núcleo apresentar-se deslocado periféricamente. Tal alteração não foi observada em machos não expostos ao estrógeno (Figura 7 A).

A técnica histoquímica de localização de carboidratos revelou uma intensa presença dos mesmos em fêmeas vitelogênicas e em machos expostos ao estrógeno (Figura 7 E e F respectivamente). Machos controle também apresentaram

conteúdo de carboidratos neste órgão, porém com menor intensidade (Figura 7 D). Observa-se também que o interior de vasos coraram-se positivamente para carboidratos em fêmeas e machos expostos ao estradiol (Figura 7 e e f respectivamente), indicando possivelmente a presença de glicoproteínas nestas regiões. Não houve coloração positiva para carboidratos em vasos de machos controle (figura 7 d).

A técnica de localização histoquímica de lipídeos mostrou a presença dos mesmos em fêmeas vitelogênicas e machos expostos ao estradiol (Figura 7 H e I respectivamente). Já os machos não expostos ao estrógeno não tiveram marcação para lipídeos no tecido hepático (Figura 7 G). As vacuolizações demonstradas na histologia padrão foram confirmadas como sendo reservas lipídicas por esta técnica. Assim, como para a técnica de detecção de carboidratos, esta técnica detectou a presença de lipídeos dentro dos vasos de fêmeas e machos expostos (figura 7 h e i respectivamente). Não foram detectadas moléculas lipídicas dentro dos vasos de machos controle (Figura 7 g).



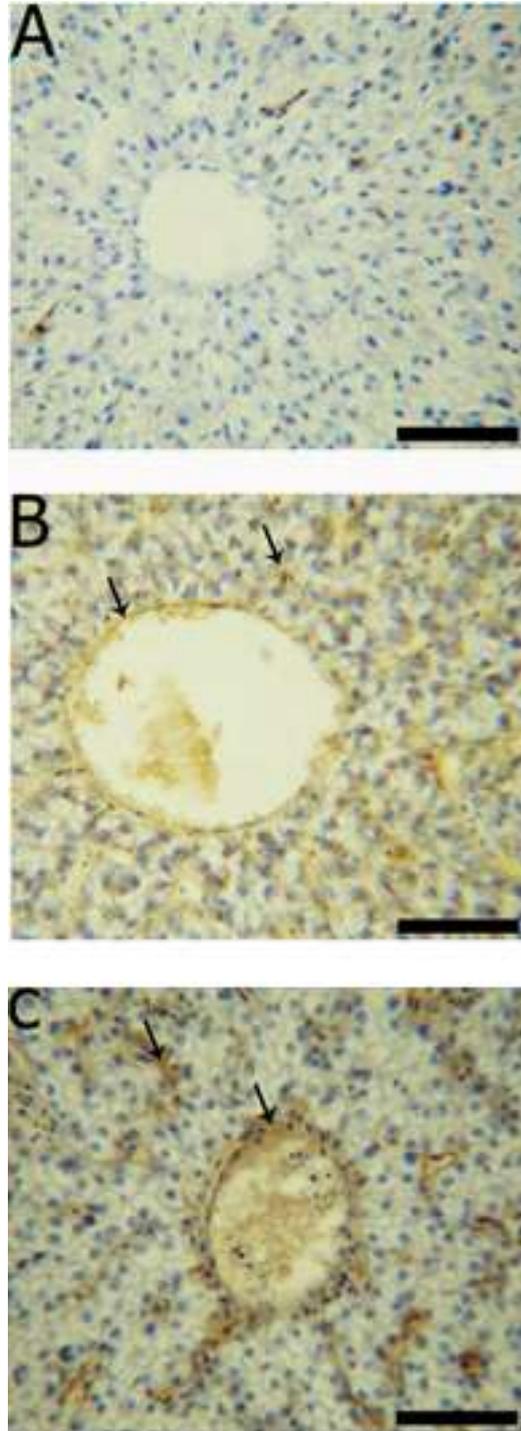
A) CTM – grupo controle de machos; a – detalhe do tecido hepático de CTM. Coloração hematoxilina-eosina. B) CTF – grupo de fêmeas em vitelogênese; b – detalhe do tecido hepático de CTF. Coloração hematoxilina-eosina. C) 10 mg E<sub>2</sub> – grupo de machos expostos a 10 mg E<sub>2</sub> . kg<sup>-1</sup>; c - detalhe do tecido hepático de 10 mg E<sub>2</sub>. Coloração hematoxilina-eosina.

D) CTM- grupo controle de machos; d – detalhe do tecido hepático de CTM. Coloração ácido periódico de Schiff. E) CTF – grupo de fêmeas em vitelogênese; e – detalhe do tecido hepático de CTF. Coloração ácido periódico de Schiff. F) 10 mg E<sub>2</sub> – grupo de machos expostos a 10 mg E<sub>2</sub> . kg<sup>-1</sup>; f - detalhe do tecido hepático de 10 mg E<sub>2</sub>. Coloração ácido periódico de Schiff.

G) CTM – grupo controle de machos; g – detalhe do tecido hepático de CTM. Coloração Sudan Black B. H) CTF – grupo de fêmeas em vitelogênese; h – detalhe do tecido hepático de CTF. Coloração Sudan Black B. I) 10 mg E<sub>2</sub> – grupo de machos expostos a 10 mg E<sub>2</sub> . kg<sup>-1</sup>; i - detalhe do tecido hepático de 10 mg E<sub>2</sub>. Coloração Sudan Black B.

**Figura 7.** Histologia e histoquímica do tecido hepático

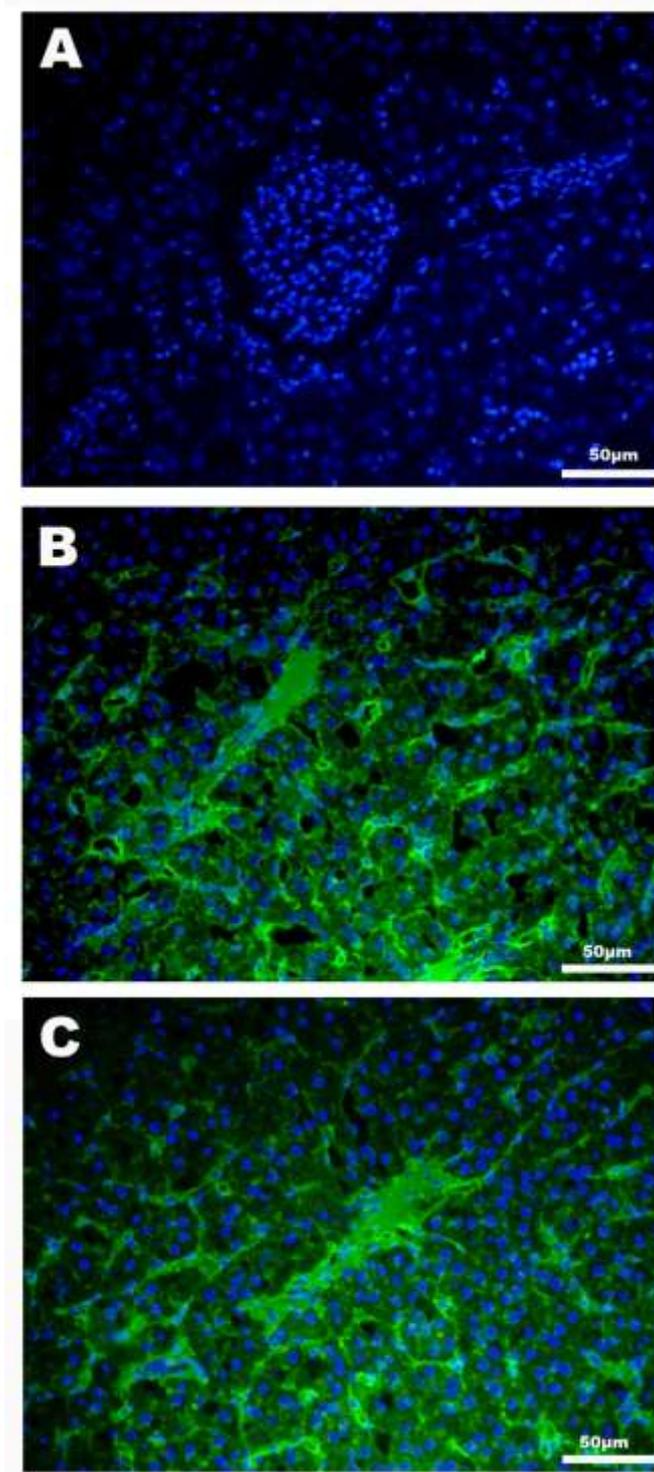
A imuno-histoquímica do fígado, utilizando a anticorpo de anti-vitelogenina de *S. aurata*, mostrou que a vitelogenina é encontrada próxima aos sinusóides e veias hepáticas, apenas nas fêmeas e nos machos expostos ao estrógeno (Figura 8 B e C respectivamente). Machos controle não apresentaram imuno-marcação para a vitelogenina no fígado (Figura 8 A). Esta marcação próxima a veias e sinusóides hepáticos demonstra que a vitelogenina é produzida pelos hepatócitos e secretada a partir destes para a circulação sanguínea, fato que é característico do processo de vitelogênese.



**Figura 8.** Reação de imuno-histoquímica para localização da vitelogenina em tecido hepático.

NOTA: A) CTM – grupo controle de machos; B) CTF – grupo de fêmeas em vitelogênese; C) 10 mg E<sub>2</sub> – grupo de machos expostos a 10 mg E<sub>2</sub> . kg<sup>-1</sup>. As regiões amareladas (→) referem-se à marcação para vitelogenina. Barra de escala 50 µm.

A imunofluorescência do fígado, utilizando o anticorpo anti-vitelogenina de *S. aurata*, assim como a imuno-histoquímica deste órgão, demonstrou a presença de vitelogenina próxima aos sinusóides e veias hepáticas, apenas nas fêmeas e nos machos expostos ao estrógeno (Figura 9 B e C respectivamente). Machos controle não apresentaram imuno-marcação para a vitelogenina no fígado (Figura 9 A).

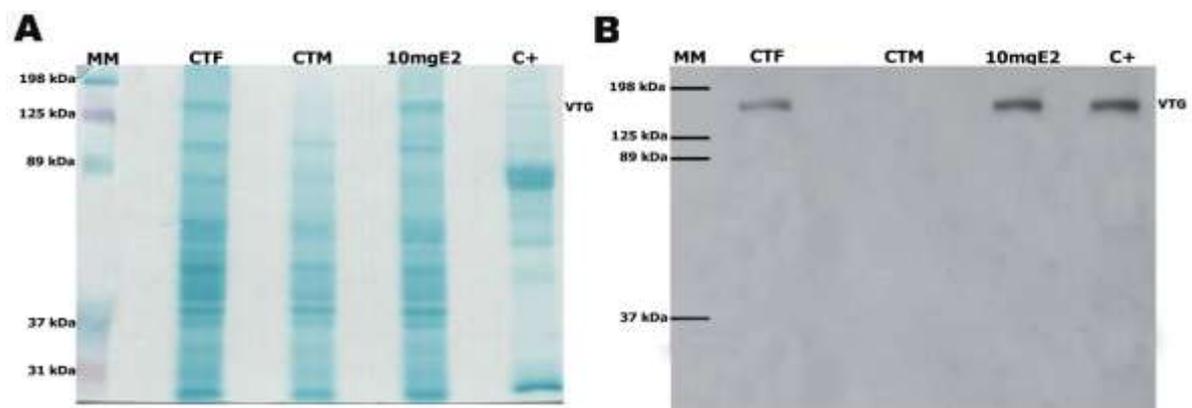


**Figura 9.** Reação de imunofluorescência para localização da vitelogenina em tecido hepático.

NOTA: A) CTM – grupo controle de machos; B) CTF – grupo de fêmeas em vitelogênese; C) 10 mg E<sub>2</sub> – grupo de machos expostos a 10 mg E<sub>2</sub> . kg<sup>-1</sup>. A marcação em azul indica os núcleos das células; a marcação em verde indica a presença de vitelogenina.

Amostras de tecido hepático foram analisadas quanto a presença de vitelogenina por *western blot* usando o anticorpo comercial anti-vitelogenina. Nas amostras de fígado de fêmeas vitelogênicas e machos expostos ao estradiol, o anticorpo reconheceu um antígeno de aproximadamente 200 kDa (Figura 10 B). A reação observada em amostras de fígado foi semelhante à reação observada em amostra de plasma de fêmeas vitelogênicas (C+). Não houve reação entre o anticorpo e a amostra de fígado de machos controle.

Já a análise por SDS-PAGE demonstrou a presença de uma banda de cerca de 200 kDa presente apenas nas fêmeas vitelogênicas e nos machos expostos ao estradiol, sendo que tal banda é a mesma reconhecida pelo anticorpo comercial. Machos não expostos ao estrógeno não apresentaram bandas semelhantes na mesma altura do SDS-PAGE (Figura 10 A).

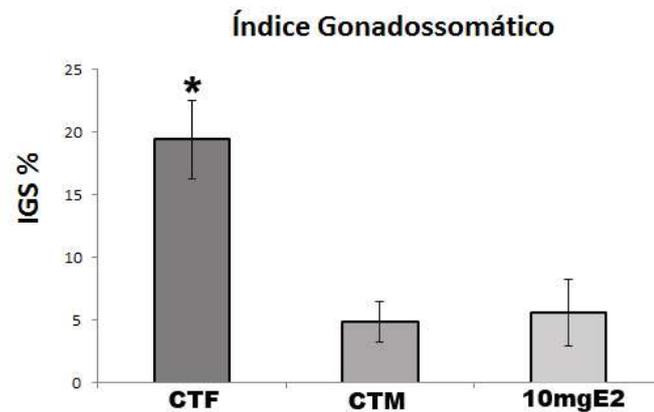


**Figura 10.** SDS-PAGE e reação de *western blot* com amostras de tecido hepático.

NOTA: A) 100 $\mu$ g de proteínas totais do fígado resolvidas por SDS-PAGE. B) 100 $\mu$ g de proteínas totais do fígado submetidas a reação de *western blot* para detecção da vitelogenina. MM: marcador de massa molecular. CTF: grupo de fêmeas controle. CTM: grupo de machos controle. 10 mg E<sub>2</sub>: machos expostos a 10 mg E<sub>2</sub>.kg<sup>-1</sup>. C+: plasma de fêmea vitelogênica.

#### 4.3 CARACTERIZAÇÃO DAS GÔNADAS EM PROCESSO DE VITELOGÊNESE

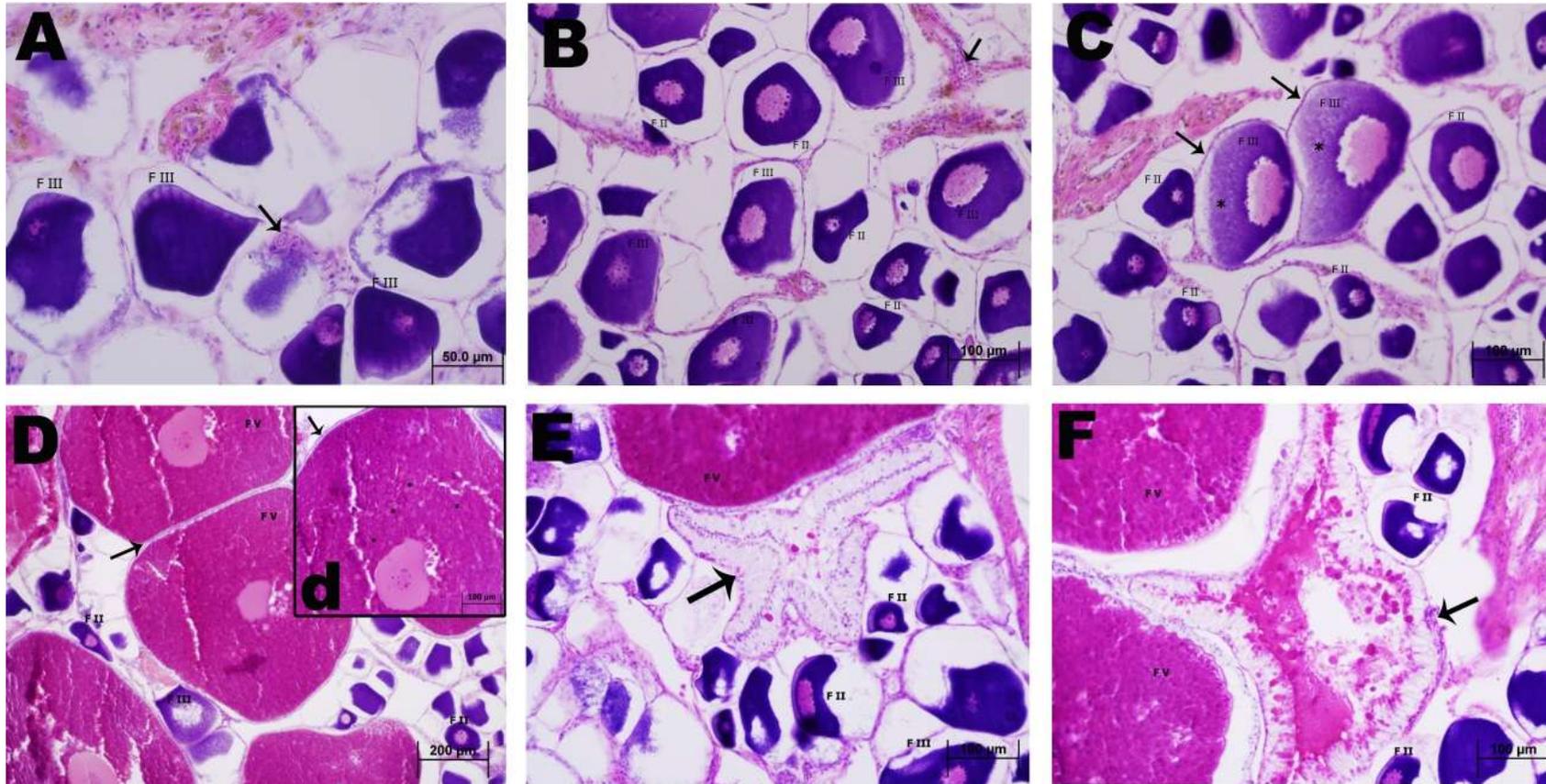
O índice gonadossomático apresentou-se aumentado em fêmeas vitelogênicas (CTF) em relação a machos controle (CTM) e machos expostos ao estrógeno (10 mg E<sub>2</sub>). Não houve diferença significativa neste índice para estes dois últimos grupos (Figura11).



**Figura 11.** Índice gonadossomático

NOTA: CTF: grupo de fêmeas controle. CTM: grupo de machos controle. 10 mg E<sub>2</sub>: machos expostos a 10 mg E<sub>2</sub>.kg<sup>-1</sup>. \* p<0.05.

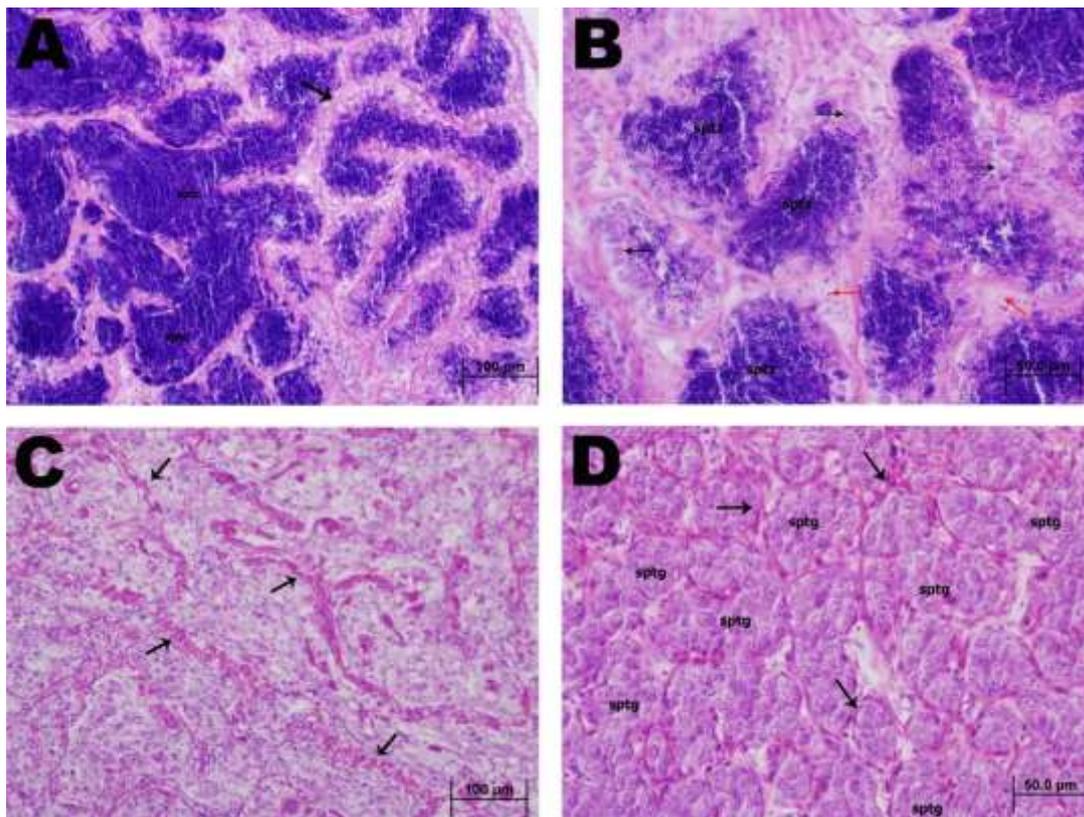
As fases de desenvolvimento dos ovócitos de fêmeas foram analisadas conforme proposto por VAZZOLER (1996). O ovário da espécie mostrou-se assincrônico no qual haviam ovócitos em todos os estágios de desenvolvimento. Foram observadas células germinativas primitivas, denominadas de oogônias ou fase I (Figura 12 A →); ovócitos de fase II (Figuras 12 B e C), ovócitos de Fase III (Figura 12 A, B e C) e ovócitos de Fase V (Figura 12 D). Foi também observado um pequeno número de folículos vazios (Figura 12 E) e de folículos atrésicos (Figura 12 F). Foi possível também identificar as células foliculares em ovócitos de Fase III e V (Figura 12 C e D indicados pela →).



**Figura 12.** Histologia dos ovários.

NOTA: (A) Ovócitos em maturação, oogônias(→). (B) Ovócitos em maturação, tecido conjuntivo(→). (C) Ovócitos em maturação, células foliculares (→), vacúolos citoplasmáticos (\*). (D) Ovócitos maduros, células foliculares (→), placas protéica acidófilas (\*). (d) detalhe do ovócito maduro. (E) Folículo vazio, células foliculares hipertrofiadas (→). (F) Folículo atrésico, células foliculares hipertrofiadas (→). FII: ovócitos em fase II do desenvolvimento ovocitário; FIII: ovócitos em fase III do desenvolvimento ovocitário; FV: ovócitos em fase V do desenvolvimento ovocitário;

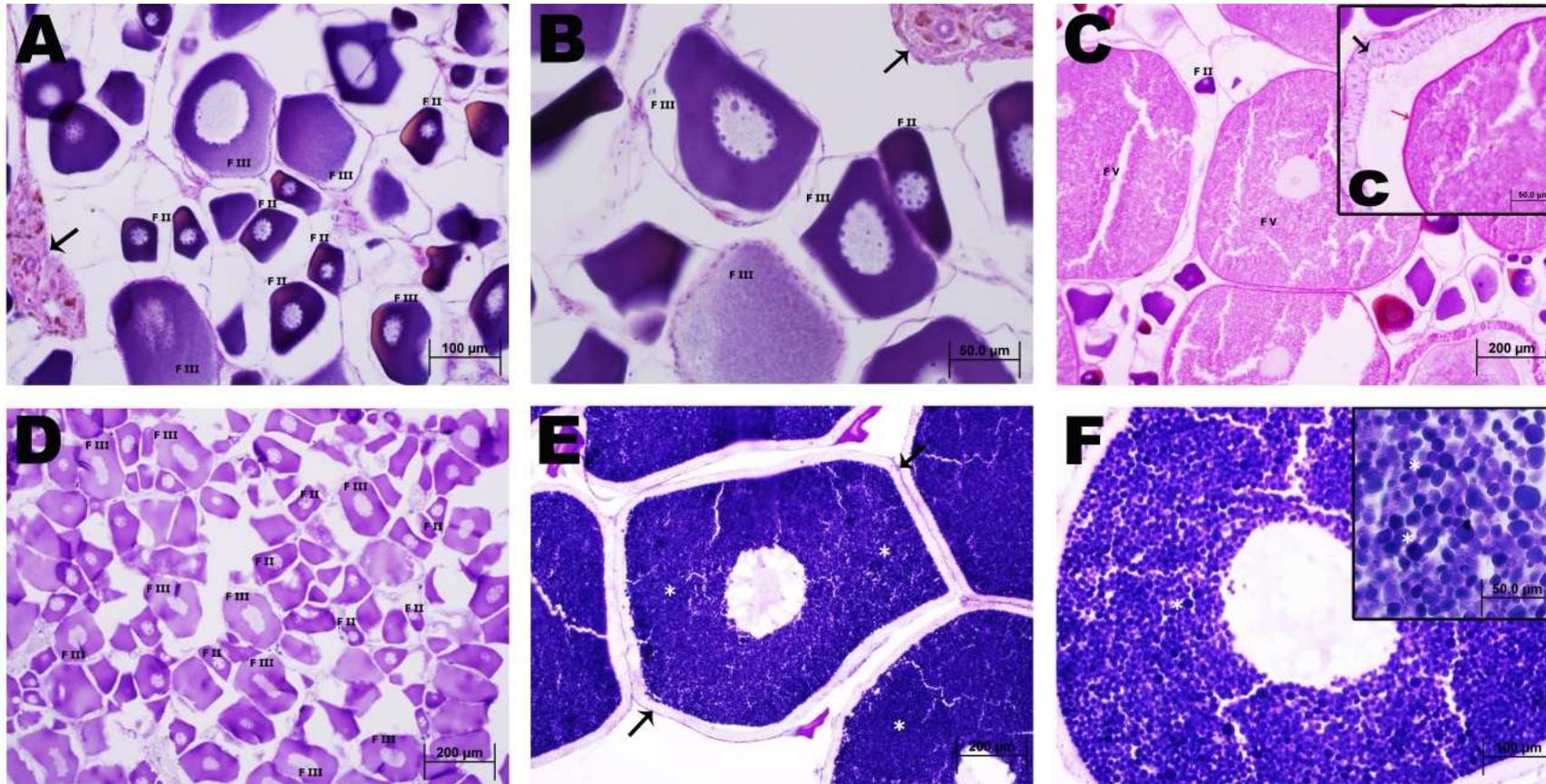
A histologia dos testículos de machos controle mostrou-se dentro do padrão predefinido por VAZZOLER (1996), sendo os testículos tubulares e os septos que delimitam os túbulos constituídos de tecido conjuntivo (Figura13 A, →). Dentro dos túbulos foi possível observar espermatozoides em grandes quantidades (Figura13 A e B). Foi possível também observar espermatogônias (Figura13 B, indicadas pela →) e algumas células de Leydig (Figura13 B, indicadas pela →). Devido ao aumento proporcionado pelo microscópio não foi possível diferenciar os estágios de desenvolvimento das células germinativas. Os machos expostos ao estrógeno apresentaram uma desorganização do tecido testicular (Figura13 C), bem como um afinamento da parede dos túbulos (Figura13 C, indicado pela →). Não foram observados espermatozoides na luz dos túbulos; foi observada predominantemente a presença de espermatogônias dentro dos túbulos (Figura13 D).



**Figura 13.** Histologia dos testículos.

NOTA:(A) e (B) – testículos e macho controle; (A) → septo que separa os túbulos; (B) → células de Leydig; → espermatogônia. (C) e (D) – morfologia alterada dos testículos de machos expostos ao estrógeno; → septo que separa os túbulos. sptz – espermatozoides; sptg – espermatogônias.

As análises histoquímicas dos ovários revelaram a presença de carboidratos e lipídeos apenas nos ovócitos de Fase V (Figura 14 C e E/F respectivamente); ovócitos de fase II e III não apresentaram marcação para tais moléculas e mantiveram sua basofilia quando comparados com a histologia padrão (Figura 14 A, B e D). Foi ainda possível identificar a zona radiata em ovócitos de fase V, uma vez que a mesma é rica em carboidratos (Figura 14 C, indicado pela →).



**Figura 14.** Histoquímica de ovários.

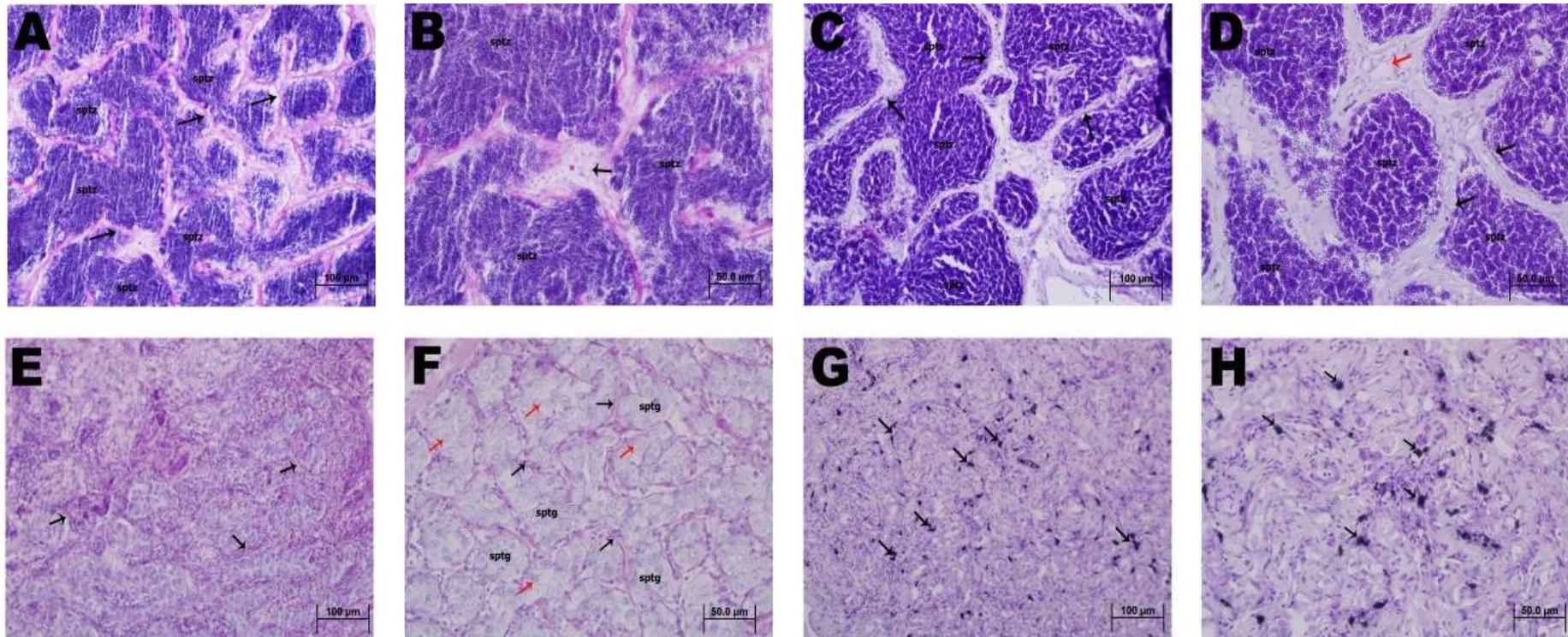
NOTA:(A) e (B) Ovócitos em maturação, tecido conjuntivo (→). (C) Ovócitos maduros, células foliculares (→), zona radiata (→). (D) Ovócitos em maturação. (E) e (F) Ovócitos maduros, células foliculares (→), placas lipídicas (\*).

(A), (B), (C): coloração de ácido periódico de Schiff

(D), (E), (F): coloração de Sudan Black B.

FII: ovócitos em fase II do desenvolvimento ovocitário; FIII: ovócitos em fase III do desenvolvimento ovocitário; FV: ovócitos em fase V do desenvolvimento ovocitário.

As análises histoquímicas revelaram pouca quantidade de moléculas de carboidratos nos testículos de machos controle e expostos ao estradiol (FIGURA 15 A e B e 15 E e F respectivamente). Foi observado que os septos constituídos de tecido conjuntivo apresentam uma maior quantidade de carboidratos em machos controle quando comparados ao machos expostos (Figura15 B e F respectivamente). Não foram detectadas a presença de moléculas lipídicas nos testículos de machos controle (Figura 15 C e D); já os testículos de machos expostos ao estrógeno apresentaram uma considerável quantidade de moléculas lipídicas em seu interior (Figura 15 G e H, indicados pela ➔).



**Figura 15.** Histoquímica de testículos.

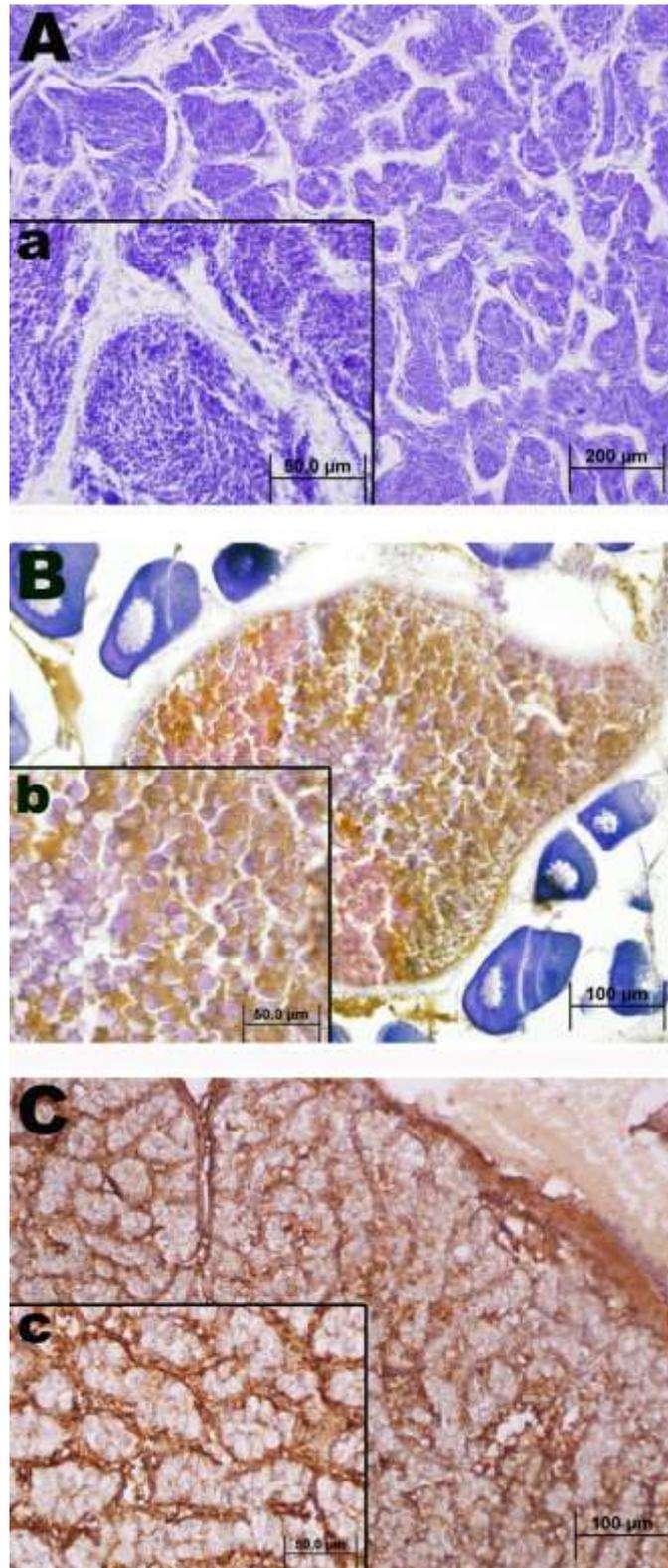
NOTA:

(A) Testículos de machos controle; → septo que separa os túbulos. (B) Testículos de machos controle; → tecido intersticial. (C) Testículos de macho controle; → septo que separa os túbulos. (D) Testículos de macho controle; → septo que separa os túbulos; → tecido intersticial. (E) Testículos de machos expostos a 10 mg. Kg  $E_2^{-1}$ ; → septo que separa os túbulos. (F) Testículos de machos expostos a 10 mg. Kg  $E_2^{-1}$ ; → septo que separa os túbulos; → espermatogônias. (G) Testículos de machos expostos a 10 mg. Kg  $E_2^{-1}$ ; → marcação de lipídeos. (H) Testículos de machos expostos a 10 mg. Kg  $E_2^{-1}$ ; → marcação de lipídeos.

(A), (B), (E) e (F) – Coloração de ácido periódico de Schiff.

(C), (D), (G) e (H) – Coloração de Sudan Black B.

Através da técnica de imunohistoquímica foi possível detectar a vitelogenina nos ovócitos de Fase V (Figura 16 B). Tal molécula não foi detectada no interior de ovócitos em fases anteriores de maturação (Figura 16 B, FIII). Testículos de machos expostos ao estrógeno apresentaram marcação difusa de vitelogenina pelo tecido (Figura 16 C). Esta marcação não foi observada para machos controle (Figura 16 A).

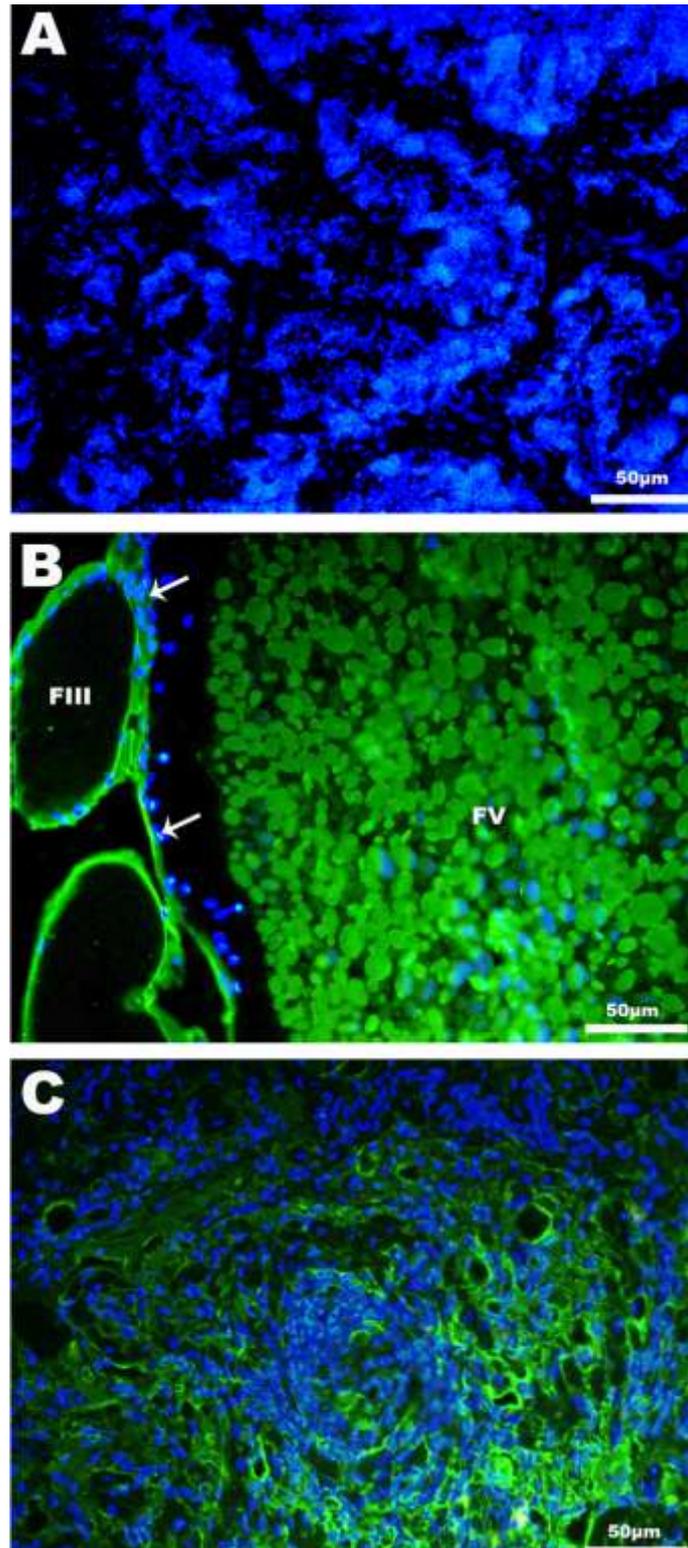


**Figura 16.** Reação de imuno-histoquímica para localização da vitelogenina nas gônadas.

NOTA: A) CTM – grupo controle de machos; a) detalhe de CTM B) CTF – grupo de fêmeas em vitelogênese; b) detalhe CTF; C) 10 mg E<sub>2</sub> – grupo de machos expostos a 10 mg E<sub>2</sub> · kg<sup>-1</sup>; c) detalhe 10 mg E<sub>2</sub>.

A técnica de imunofluorescência detectou a vitelogenina nos ovócitos de Fase V (Figura 17 B). Tal molécula não foi detectada no interior de ovócitos em fases anteriores de maturação (Figura 17 B FIII). Testículos de machos expostos ao estrógeno apresentaram marcação difusa (Figura 17 C). Nenhuma marcação foi observada para machos controle (Figura 17 A).

A vitelogenina foi marcada em verde; já os núcleos foram marcados em azul.

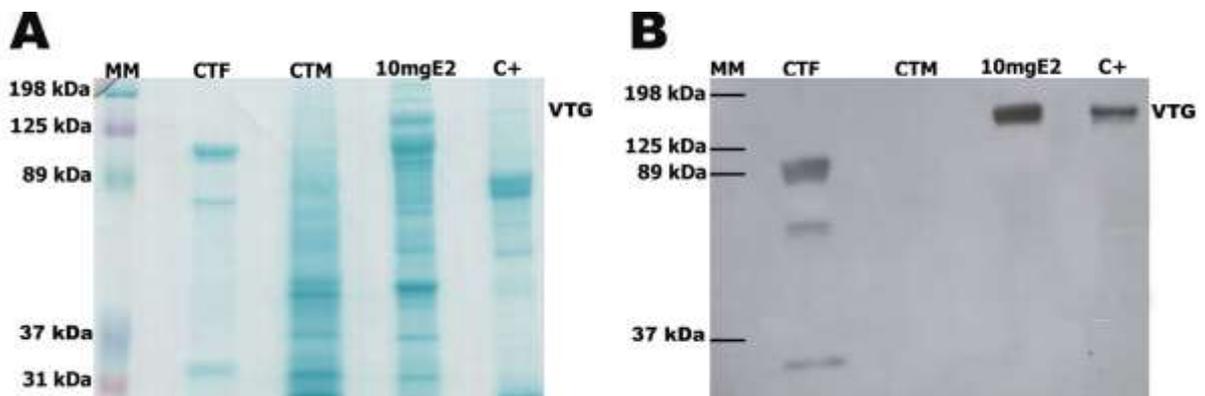


**Figura 17.** Reação de imunofluorescência para localização da vitelogenina nas gônadas.

NOTA: A) CTM – grupo controle de machos; B) CTF – grupo de fêmeas em vitelogênese, núcleo das células foliculares →; C) 10 mg E<sub>2</sub> – grupo de machos expostos a 10 mg E<sub>2</sub> . kg<sup>-1</sup>.

A reação de *western blot* com amostras de gônadas demonstrou a reação entre o anticorpo comercial e um antígeno de aproximadamente 200 kDa em machos expostos ao estradiol (Figura 18 B 10mgE2). Em fêmeas vitelogênicas, o anticorpo reconheceu três antígenos (Figura 18 B CTF). Neste caso, os antígenos tinham cerca de 100 kDa, 50-70 kDa e 20-30 kDa, sendo que tais antígenos são os produtos da degradação natural da vitelogenina em fosfovítina, lipovítina e componente  $\beta$  que são os constituintes do vitelo. No caso de machos estrógeno induzidos a reação antígeno anticorpo foi semelhante à reação utilizando uma amostra de plasma de fêmeas vitelogênica (C+). Nenhuma reação foi observada em amostras provenientes de gônadas de machos controle (Figura 18 B CTM).

Já o SDS-PAGE demonstrou a presença de uma banda de cerca de 200 kDa presente apenas nos machos expostos ao estradiol, sendo que tal banda é a mesma reconhecida pelo anticorpo comercial (Figura 18 A 10mgE2). Machos que não foram expostos ao estrógeno não apresentaram bandas semelhantes na altura esperada (Figura 18 A CTM). Fêmeas vitelogênicas apresentaram três bandas distintas no SDS-PAGE, sendo que as três foram reconhecidas pelo anticorpo comercial (Figura 18 A CTF).



**Figura 18.** SDS-PAGE e reação de *western blot* com amostras de tecido gonadal

NOTA: A) 100 $\mu$ g de proteínas totais das gônadas resolvidas por SDS-PAGE. B) 100 $\mu$ g de proteínas totais das gônadas submetidas a reação de *western blot* para detecção da vitelogenina MM: marcador de massa molecular. CTF: grupo de fêmeas controle. CTM: grupo de machos controle. 10 mg E<sub>2</sub>: machos expostos a 10 mg E<sub>2</sub>.kg<sup>-1</sup>. C+: plasma de fêmea vitelogênica

## 5. DISCUSSÃO

Nos últimos anos a expressão da vitelogenina tem sido usada por diversos autores como um biomarcador de disfunção endócrina (PALUMBO *et al.*, 2007; VEGA-LÓPEZ *et al.*, 2006) e, embora a mesma já tenha sido caracterizada em várias espécies de peixes, (LIU *et al.*, 2009; VEGA-LÓPEZ *et al.*, 2006; HENNIES *et al.*, 2003; MOSCONI *et al.*, 1998) pouca atenção tem sido dada para esta molécula em espécies de peixes brasileiros.

A caracterização de uma molécula, bem como de um processo fisiológico é um trabalho complexo e que envolve muitas metodologias. As metodologias utilizadas nesse estudo para a caracterização da vitelogenina e do processo de vitelogênese já foram utilizadas por outros autores (WUNSCHHEL *et al.*, 2005, ROUBAL *et al.*, 1997; PALUMBO *et al.*, 2007), entretanto de uma forma isolada. Neste trabalho pela primeira vez técnicas histológicas, imunológicas, SDS-PAGE, e espectrometria de massa foram combinadas para a caracterização da vitelogenina bem como do processo de vitelogênese.

A técnica de *western blot* é frequentemente utilizada para identificar moléculas e já foi usada por outros autores para identificar a vitelogenina em diferentes espécies de peixes (HENNIES *et al.*, 2003; HOLBECH *et al.*, 2001; MOSCONI *et al.*, 1998). Esta técnica se mostrou eficiente marcando adequadamente a vitelogenina de *R. quelen*. O fato de o anticorpo utilizado ser um policlonal e de existirem regiões conservadas entre diferentes espécies faz com que este anticorpo, que é específico para a vitelogenina de *S. aurata*, reconheça a proteína de *R. quelen*. Talvez se fosse um anticorpo monoclonal que reconhecesse um epítipo fora destas regiões conservadas, não ocorreria esta reação de vitelogenina de *R. quelen*.

A identificação da vitelogenina pelo anticorpo comercial é a principal evidência de que a molécula estudada é a vitelogenina, uma vez que tais anticorpos são específicos para a vitelogenina. Embora diversos autores discutam sobre a baixa conservação evolucionária desta molécula (WUNSCHHEL *et al.*, 2005; LIU *et al.*, 2009; PALUMBO *et al.*, 2007) verifica-se que alguns epítipos devem ser bem conservados entre as espécies, uma vez que o anticorpo utilizado era específico para a vitelogenina de *Spaurus aurata* e reagiu com a vitelogenina de *R. quelen*. Alguns autores já sequenciaram a molécula de vitelogenina e verificaram que as

regiões N- terminal e C-terminal são conservadas entre as espécies, mesmo que filogeneticamente distante (SIMON *et al.*, 2010; ROUBAL *et al.*, 1997; PANPROMMIN *et al.*, 2008).

Alguns autores relatam que a vitelogenina é uma glicolipofosfoproteína (MOSCONI *et al.*, 1998; MARIN e MATOZZO, 2004), entretanto poucos autores tem demonstrado estas características (UTARABHAND e BUNLIPATANON, 1996; ROUBAL *et al.*, 1997; LIU *et al.*, 2009). No presente trabalho, utilizando técnicas simples de coloração em gel de poliacrilamida foi demonstrado que a vitelogenina é uma glicolipofosfoproteína. Os resultados do SDS-PAGE também demonstraram que a vitelogenina possui uma alta massa molecular, sendo tal característica corroborada por outros autores para esta molécula (PALUMBO *et al.*, 2007; LIU *et al.*, 2009). Roubal e colaboradores (1997) comparam os resultados obtidos pelas técnicas de SDS-PAGE e NATIVE-PAGE em relação à massa molecular da vitelogenina de *Pleuromectes vetulus*. Para tal espécie a proteína nativa tem cerca de 300 kDa, enquanto que a proteína desnaturada possui cerca de 150 kDa, sugerindo que a vitelogenina é um homodímero na sua forma nativa, que ao ser processado é desnaturado em duas subunidades de mesma massa molecular. Embora tal resultado seja de extrema importância para a caracterização da proteína nativa, não foi possível reproduzi-lo com sucesso para a vitelogenina de *R. quelen*, uma vez que as técnicas de NATIVE-PAGE utilizadas não se mostraram satisfatórias.

A imuno-histoquímica e imunofluorescência são técnicas frequentemente utilizadas para localizar moléculas em um tecido (FARR E NAKANE, 1981). Autores como Roubal *et al.*, (1997) e Wahli *et al.*, (1998) utilizaram a técnica de imuno-histoquímica para a localização da vitelogenina no fígado de peixes. No presente trabalho a técnica de imuno-histoquímica se mostrou adequada para a marcação e consequente localização da vitelogenina no fígado de *R. quelen*. Tal técnica demonstrou que a vitelogenina é encontrada principalmente próxima a sinusóides e as veias centrais, demonstrando que esta proteína embora seja produzida pelo fígado logo é secretada do mesmo. Wahli e colaboradores (1998) também obtiveram o mesmo resultado para *Salmo trutta*. Roubal e colaboradores (1997) também utilizaram a técnica de imuno-histoquímica para localizar a vitelogenina nos ovários de fêmeas maduras de *P. vetulus*, observando que nem todos os ovócitos eram imunorreativos. O mesmo foi observado para *R. quelen*, onde apenas os ovócitos

em fase finais de maturação se mostraram imunorreativos para a molécula de vitelogenina. Tal fato já era de se esperar, pois conforme descrito por Vazzoler (1996) a vitelogenina só é incorporada aos ovócitos em fase IV e V de maturação, sendo que antes destas fases os ovócitos acumulam apenas lipídeos e carboidratos.

Já Bieberstein e colaboradores (1999) utilizaram a técnica de imunofluorescência para detectar a vitelogenina no fígado de *Oncorhynchus mikiss*. Tal técnica, assim como a imuno-histoquímica, também é utilizada para a detecção e consequente localização de moléculas em tecidos alvo, porém poucos foram os autores que utilizaram a mesma para a detecção da vitelogenina (BIEBERSTEIN *et al.*, 1999). Em *R. quelen* a vitelogenina foi localizada no fígado próximo aos sinusóides e veias centrais bem como nos ovócitos em fases finais de maturação e nas gônadas de machos expostos ao estradiol. A presença de vitelogenina nas gônadas de machos expostos ao estradiol sugere que os mesmos possuem o receptor, presente nas gônadas, necessário para a incorporação da vitelogenina às mesmas. O resultado de *western blot* detectou a vitelogenina nas gônadas de machos. Porém a mesma técnica detectou apenas os produtos da clivagem desta proteína nas gônadas de fêmeas, sendo que estes produtos são resultados de um processo natural e não devido a má preservação da amostra. Tais resultados demonstram que, embora machos possam incorporar a vitelogenina aos seus testículos, os mesmos não possuem a enzima catalepsina, responsável pela clivagem da vitelogenina dentro dos ovócitos.

A vitelogenina é uma glicolipofosfoproteína que aparece no sangue de fêmeas de vertebrados ovíparos sexualmente maduras. Ela é produzida pelo fígado em resposta aos estrogênios endógenos e então secretada para o sangue de onde segue para os ovócitos em crescimento onde é incorporada e clivada para formar os constituintes do vitelo (HIRAMATSU *et al.*, 2005). Estes dados da literatura são suportados pelos ensaios de imuno-histoquímica e imunofluorescência que marcaram a proteína no fígado e nas gônadas. A presença desta proteína em tais tecidos também foi confirmada pelos ensaios de *western blot*, nos quais a proteína foi identificada através do uso de anticorpos comerciais nestes tecidos. Pamprommin *et al.*, (2008), utilizaram técnicas de RT-PCR e RACE (*rapid amplification of cDNA ends*) e comprovaram que a expressão da vitelogenina é tecido específica, sendo que esta ocorre apenas no fígado. Tais autores dizem ainda que, embora a proteína vitelogenina possa ser encontrada nas gônadas, a mesma é sintetizada no fígado e

apenas incorporada às gônadas, uma vez que apenas o fígado possui mRNA para a vitelogenina.

A técnica de MALDI-TOF é uma técnica refinada e tem sido amplamente usada para identificar biomarcadores de câncer em humanos (KARPOVA *et al.*, 2010). Devido ao fato de ser uma técnica relativamente recente e de alto custo, poucos autores a tem utilizado para identificar biomarcadores de disfunção endócrina em peixes (WUNSCHHEL *et al.*, 2005), entretanto Palumbo *et al.*, (2007) e Liu *et al.*, (2009) já utilizaram esta técnica para identificar a vitelogenina em *Paralichthys californicus* e *Cyprinus carpio* respectivamente. Embora Palumbo e colaboradores (2007) não tenham conseguido identificar a vitelogenina com dados provenientes de MALDI-TOF MS/MS, tais autores realizaram um sequenciamento *de novo* desta molécula e compararam a sequência obtida com a sequência da vitelogenina de várias espécies. Utilizando este procedimento estes autores confirmaram a identidade da vitelogenina por comparação com a vitelogenina de outras espécies. O sucesso desta técnica depende da existência de um banco de dados de genoma e proteoma para a espécie ou ao menos para espécies próximas filogeneticamente. Autores como Wunschel *et al.*, (2005) e Banoub *et al.*, (2003) tentaram, sem sucesso, identificar a vitelogenina de *Oncorhynchus mykiss* e *Salmo solar*, utilizando a mesma técnica que foi empregada no presente trabalho, uma vez que não há banco de dados disponível para esta espécie assim como não há pra *R. quelen*. Tal resultado demonstra a necessidade de mais estudos com espécies nativas. Já Liu e colaboradores (2009) utilizaram a mesma técnica e obtiveram sucesso ao identificar a vitelogenina de *Cyprinus carpio*, uma vez que esta espécie já possui seu genoma e proteoma num banco de dados. No entanto, autores que utilizaram técnicas mais acuradas como *Electrospray ionization* e *matrix-assisted laser desorption/ionization quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry* tiveram sucesso na identificação desta proteína mesmo em espécies que não possuíam banco de dados (COHEN *et al.*, 2005). As disparidades entre a estrutura da vitelogenina, quanto a sua sequência aminoacídica, são um claro indicador da baixa conservação evolucionária da mesma entre as espécies, tornando ainda mais difícil a identificação desta molécula.

Embora a espectrometria de massa não tenha identificado a proteína estudada em nenhum dos bancos de dados consultados, a técnica demonstrou um alto grau de similaridade entre a proteína expressa por fêmeas vitelogênicas e

machos expostos ao estradiol, sugerindo que machos de *R. quelen* expressam a vitelogenina depois de serem expostos ao 17 $\beta$ -estradiol. O insucesso na identificação da vitelogenina também pode ser atribuído ao fato de que o banco de dados trabalha com a clivagem hipotética da proteína, sendo que a clivagem real pode variar uma vez que a tripsina utilizada pode não ter acesso a todos os sítios de clivagem da proteína em questão. Outra questão que pode dificultar a identificação de uma proteína no banco de dados é o alto grau de glicosilação e fosforilação da mesma conforme relatado por Wunschel *et al.*, (2005).

A proteína avaliada neste trabalho mostrou um alto peso molecular pelo SDS-PAGE, sendo estrógeno induzível em machos e naturalmente presente em fêmeas durante seu processo reprodutivo. Esta proteína também reagiu especificamente com o anticorpo policlonal anti-vitelogenina e foi corada como uma glicolipofosfoproteína. Estas características são fortes evidências de que a proteína avaliada neste trabalho é a vitelogenina, sendo que tais características já foram definidas por outros autores como indícios da identidade desta molécula em peixes (BRADLEY *et al.*, 1989; HIRAMATSU *et al.*, 2005).

O processo de vitelogênese interfere diretamente na homeostase do animal (MOURA-COSTA *et al.*, 2010), entretanto pouca atenção tem sido dada ao processo como um todo, sendo que a maioria dos autores foca-se apenas na molécula de vitelogenina (COHEN *et al.*, 2005; PAMPROMMIN *et al.*, 2008). Rempel e colaboradores (2006) e Moura-Costa e colaboradores (2010) foram uns dos poucos autores a trabalhar com a amplitude do processo de vitelogênese e como tal processo pode interferir na homeostase do animal. O índice hepatossomático mostrou-se aumentado em machos em processo de vitelogênese, sendo que tal aumento pode ser atribuído ao armazenamento lipídico neste órgão confirmado pela coloração de Sudan Black B, bem como pelo aumento de produção da vitelogenina pelo mesmo, confirmada pela imuno-histoquímica e pela imunofluorescência. O aumento de gordura neste órgão já foi discutido por outros autores (MOURA-COSTA *et al.*, 2010; CARRERA *et al.*, 2007; MILLS *et al.*, 2001) embora os mesmos não tenham utilizado técnicas histoquímicas para identificar a presença desta classe de moléculas neste órgão. O índice gônadossomático não se mostrou alterado em machos de *R. quelen* expostos ao estrógeno. Moura-Costa *et al.*, (2010) também não observaram alterações neste índice e discutem que o tempo de exposição curto não leva a alterações significativas neste índice. Já Brion e colaboradores (2004) em

seu trabalho com *Danio rerio* em diferentes estágios de desenvolvimento afirmam que a exposição a estrógenos é capaz de causar alterações no índice gonadossomático somente se a mesma ocorrer durante estágios larvais ou juvenis. Em machos adultos expostos ao hormônio, não há alterações neste índice, porém as alterações na morfologia e na fisiologia das gônadas são agravantes nesta fase da vida.

A histologia das gônadas de fêmeas mostrou que as mesmas se encontravam em estágio avançado de vitelogênese, com predominância de ovócitos de Fase V (classificação segundo VAZZOLER, 1996). Estágios iniciais também foram identificados, uma vez que mesmo um indivíduo maduro deve ter células germinativas em todos os estágios de desenvolvimento pois, seu ciclo reprodutivo se repete duas vezes a cada ano. Os estágios mais iniciais como oogônias foram de difícil visualização devido ao seu reduzido tamanho em relação aos demais estágios. Ovócitos de Fase II foram identificados em todas as fêmeas e se caracterizaram pela intensa basofilia citoplasmática e pela ausência de vacúolos. Já os ovócitos de Fase III se caracterizaram pela vacuolização citoplasmática e manutenção da intensa basofilia semelhante a da fase II, além do desenvolvimento, mesmo que sutil, das células foliculares. Ovócitos de fase IV foram de mais difícil visualização uma vez que como as fêmeas estavam maduras houve uma predominância de ovócitos de fase V. Os ovócitos de fase V são ovócitos prontos para serem liberados e que estão com o processo de incorporação da VTG completo. Tais ovócitos caracterizam-se pela intensa acidofilia citoplasmática e pela deposição de placas proteicas acidófilas, além do tamanho muito aumentado em relação às demais fases, conforme observado nas análises histológicas. Verifica-se ainda nesta fase um aumento acentuado de tamanho das células foliculares que passam a formar uma paliçada regular ao redor do ovócito. Foi verificada também a presença de folículos vazios, que se caracterizam por apresentarem células foliculares hipertrofiadas circundado um espaço vazio, que corresponde ao espaço que era ocupado pelo ovócito. Segundo Leino e colaboradores (2005), a presença de tal tipo de folículo é um indicativo de que os ovócitos estão completando corretamente o processo de vitelogênese e, portanto, estão sendo liberados para serem fecundados e darem continuidade ao processo reprodutivo da espécie. Foi observado também um pequeno número de folículos atrésicos que se caracterizam por uma hipertrofia das células foliculares circundando uma massa amorfa acidófila. A atresia ocorre

naturalmente para que ovócitos que não completaram o processo de vitelogênese corretamente sejam reabsorvidos, no entanto um aumento de 20% na quantidade de folículos atrésicos em relação à quantidade total de folículos é prejudicial para o sucesso reprodutivo da espécie (LEINO *et al.*, 2005; XU *et al.*, 2008). A coloração de ácido periódico de Schiff indicativo de glicogênio demonstrou ausência de carboidratos nas fases II e III, porém a intensa presença desta molécula nos ovócitos de fase V. Tal reserva de carboidratos nos ovócitos maduros já é bem relatada na literatura (revisado por Vazzoler, 1996) e é essencial para a sobrevivência do embrião. A coloração de Sudan Black B indicativo de lipídeos, demonstrou ausência destas moléculas nas fases II e III porém, demonstrou a presença destas moléculas na fase V. Novamente a reserva de lipídeos nos ovócitos maduros já é bem relatada na literatura (revisão realizada por Vazzoler (1996), e é essencial para a sobrevivência do embrião. Ao analisar as marcações de carboidratos e lipídeos nos ovócitos de fase V, verificamos que elas se co-localizam, ou seja, ambas as marcações estão no citoplasma destas células e dentro das placas que se formam neste citoplasma. Uma vez que a vitelogenina é um glicolipofosfoproteína e que ao ser incorporada ao ovócito é clivada proteoliticamente em fosfovítina, lipovítelina e componente  $\beta$ , podemos presumir que estas marcações também são um indicativo da presença dos subprodutos da VTG dentro dos ovócitos, sendo tal afirmação foi validada pela imuno-histoquímica e imunofluorescência que marcou a vitelogenina e/ou seus subprodutos dentro dos ovócitos de fase V. A padronização de um protocolo para marcação de grupos fosfatos também reforçaria a hipótese, uma vez que tal protocolo identificaria apenas a fosfovítina que é subproduto da clivagem da VTG.

A histologia dos testículos de machos controle demonstrou um aspecto normal, porém a presença de células da linhagem reprodutiva em todos os estágios de desenvolvimento não foi possível de ser observada devido ao pequeno tamanho destas células, sendo apenas possível diferenciar espermatogônias de espermatozoides. A exposição de machos a desreguladores endócrinos leva não somente à síntese da vitelogenina, mas pode gerar sérios e deletérios efeitos para a espécie (ZAROOGIAN *et al.*, 2001; XU *et al.*, 2008). Os machos expostos ao estradiol apresentaram a morfologia estrutural dos testículos e dos túbulos seminíferos alteradas, além de terem sido observadas apenas espermatogônias, com ausência completa de espermatozoides. A marcação para lipídeos demonstrou

a presença destas moléculas especialmente nos espaços intersticiais. A imunohistoquímica e a imunofluorescência também indicaram a presença de vitelogenina nos testículos, o que de fato não é fisiologicamente normal, uma vez que os machos não devem sintetizar essa proteína e muito menos incorporá-la às suas gônadas, isto no entanto pode ser considerado um biomarcador de exposição a desreguladores endócrinos. Todo o processo reprodutivo é controlado pelo eixo hipotálamo-hipófise-gônadas e em peixes, um estímulo ambiental relacionado ao período reprodutivo leva o hipotálamo a secretar o hormônio liberador de gonadotropinas (GnRH). Este por sua vez estimula a hipófise a liberar as gonadotropinas GtH I e GtH II, que são análogos ao FSH e LH em mamíferos. As gonadotropinas agem sobre as gônadas levando as mesmas a se desenvolverem e a produzirem hormônios esteróis e, quando a concentração destes hormônios se elevam no plasma, há uma regulação por *feedback* negativo, no qual os hormônios esteróis inibem a secreção das GtHs pela hipófise (KIME 1999). Durante o processo normal de espermatogênese as GtHs estimulam as células de Leydig a produzirem hormônios esteróis androgênicos, sendo que estes estimulam as células de Sertoli a produzirem a activina B (LEINO *et al.*, 2005). A activina B é a molécula responsável por induzir as divisões mitóticas nas espermatogônias para que a espermatogênese se inicie. O excesso de estradiol nos machos inibe a secreção das GtHs, logo as células de Leydig não são estimuladas a produzirem androgênicos e na ausência destes as células de Sertoli não produzem a activina B, portanto não há estímulo para que as espermatogônias iniciem a mitose e gerem espermatozoides. Isto justifica a predominância de espermatogônias nos testículos dos indivíduos expostos ao estradiol conforme foi observado por Leino e colaboradores (2005) em seu trabalho com *Pimephales promelas*. Xu e colaboradores (2008) também observaram a predominância de espermatogônias em *Danio rerio* expostos ao 17 $\alpha$ etinil-estradiol, indicando que esta via é alterada não somente pelo hormônio natural, bem como pelo hormônio sintético, o que a torna plausível de ser desregulada por qualquer potencial desregulador endócrino. A ausência completa de espermatozoides pode ser explicada por duas vias. Na primeira delas o estradiol estaria levando a morte dos espermatozoides que seriam reabsorvidos pelo organismo (LEINO *et al.*, 2005). Na outra via, o estradiol estaria afetando as células de Sertoli que são responsáveis pela manutenção dos espermatozoides. Com as células de Sertoli prejudicadas, os espermatozoides estariam impossibilitados de se manterem vivos e, portanto,

morreriam e seriam reabsorvidos (KINNBERG *et al.*, 2003). Ambas as hipóteses, mesmo que por vias diferentes, são plausíveis para explicar a ausência de espermatozoides, sendo que ao final, ambas as vias resultariam na morte e degeneração destas células.

O presente trabalho suporta os dados encontrados por outros autores de que a vitelogenina é um biomarcador plasmático de disfunção endócrina em machos que pode ser útil quando há necessidade de se avaliar a presença de poluentes desreguladores endócrinos em ambientes aquáticos. Este trabalho também corrobora o fato de que a exposição a desreguladores endócrinos altera não somente a fisiologia endócrina, mas também a fisiologia reprodutiva e hepática.

## 6. CONCLUSÕES

✓ O hormônio  $17\beta$ estradiol induziu de forma satisfatória o processo de vitelogênese em machos de *R. quelen*.

✓ Há uma proteína com aproximadamente 200 kDa expressa pelos machos de *R. quelen* expostos ao estradiol e por fêmeas vitelogênicas, que apresenta glicosilações, lipidações e fosforilação, sendo que tal proteína reage especificamente com anticorpo comercial específico para a vitelogenina.

✓ Espectrometricamente a proteína em questão é estruturalmente semelhante em fêmeas maduras e machos expostos ao estrógeno, apesar de a técnica não ter identificado a proteína.

✓ A indução estrogênica altera o índice hepatossomático bem como a morfologia e fisiologia do fígado de machos de *R. quelen* expostos ao estradiol, sendo que para tais biomarcadores machos estrógeno induzidos são semelhantes às fêmeas em vitelogênese.

✓ A imuno marcação, seja pela técnica de imuno-histoquímica ou pela técnica de imunofluorescência, detecta a vitelogenina apenas no fígado das fêmeas em vitelogênese e de machos induzidos pelo estrógeno de *R. quelen*, sendo que a marcação situa-se próxima aos sinusóides e veias hepáticas.

✓ A imuno marcação também ocorre nas gônadas de fêmeas em vitelogênese e de machos expostos ao estradiol, demonstrando que a proteína circulante é incorporada a estes tecidos.

✓ As gônadas de machos expostos demonstraram ser sensíveis a exposição ao estradiol, sendo que o mesmo altera predominantemente a fisiologia das mesmas.

✓ Foi possível caracterizar a vitelogenina, bem como o processo de vitelogênese em machos de *R. quelen*, tornando ambos bons biomarcadores para exposição a desreguladores endócrinos estrogênicos em uma espécie nativa.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BAILEY, R. E. The effect of estradiol on serum calcium, phosphorus, and protein of goldfish. **J. Exp. Zool.** v.136, p. 455-469, 1957.
- BANOUB, J.; THIBAUT, P.; MANSOUR, A.; COHEN, A.; HEELEY, D. H.; JACKMAN, D. Characterization of the intact rainbow trout vitellogenin protein and analysis of its derived tryptic and cyanogen bromide peptides by matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight-mass spectrometry and electrospray ionisation quadrupole/time-of-flight mass spectrometry. **Eur. J. Mass Spectrom.** v.9, p.509–524, 2003.
- BIEBERSTEIN, U.; BERBNER, T.; ISLINGER, M.; BRAUNBECK, T. Immunohistochemical localization of vitellogenin in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes using immunofluorescence, **Sci. Total Environ.** v.233, p. 67-75, 1999.
- BILA, D.M; DEZOTTI, M. Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e conseqüências. **Quím. Nova.** v.30, n. 3, p. 651-666, 2007.
- BOND, C. E. **Biology of Fishes.** Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1979. 514pp
- BONE, Q.; MARSHALL, N. B.; BLAXTER, J. H. S. **Biology of Fishes.** New York: Chapman and Hall, 1995. 332pp.
- BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochem.** v.72, p.248-254, 1976.
- BRADLEY, J.T.; GRIZZLE, J. M. Vitellogenin induction by estradiol in channel catfish, *Ictalurus punctatus*. **Gen. Comp. Endocrinol.** v.73, p. 28-39, 1989.
- BRION, F.; TYLER, C. L.; LAILLET, B.; PORCHER, J. M. Impacts of 17 $\beta$ estradiol, including relevant concentration, on reproduction after exposure during embryo-larval, juvenile- and adult life estages in zebra fish. **Aquat. Toxicol.** v.68, p. 193-217. 2004.
- CARRERA, E. P.; GARCÍA-LÓPEZ, A.; RIO, M. P. M.; MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, G.; SOLÉ, M.; MANCERA, J. M. Effects of 17 $\beta$ -estradiol and 4-nonylphenol on osmoregulation and hepatic enzymes in gilthead sea bream (*Sparus auratus*). **Compar. Biochem. Physiol. C.** v.145, p.210-217, 2007.
- COHEN, A. M.; MANSOUR, A. A.; BANOUB, J. H. 'De novo' sequencing of *Atlantic cod* vitellogenin tryptic peptides by matrix-assisted laser desorption/ionization quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry:similarities with haddock vitellogenin. **Rapid Commun. Mass Spectrom.** v.19, p.2454–2460, 2005.
- CUTTING, J. A.; ROTH, T. F. Staining of phosphor-proteins on acrylamide gel electropherograms. **Anal. Biochem.** v.54, p.386-394, 1973.
- EERTMANS, F.; DHOOGHE, W.; STUYVAERT, F.; COMHAIRE, F. Endocrine disruptors: effects on male fertility and screening tools for their assessment. **Toxicology in vitro.** v.17, p.515–524, 2003.
- EMMERSEN, B. K.; PETERSEN, I. M. Natural occurrence and experimental induction by estradiol-17/3, of a lipophosphoprotein (vitellogenin) in flounder (*Platichthys flesus*). **Comp. Biochem. Physiol. B.** v.54, p.443-446, 1976.
- FARR, A. G.; NAKANE, P. K. Immunohistochemistry with enzyme labeled antibodies: a brief review. **J. Immunol. Methods.** v.47, p.129-144, 1981.
- FIASCHI, T.; COZZI, G.; RAUGEI, G.; FORMIGLI, L.; RAMPONI, G.; CHIARUGI, P. Redox regulation of  $\beta$ -actin during integrin-mediated cell adhesion. **J. Biol. Chem.** v.281; p.22983-22991, 2006.

- FUNKENSTEIN , B.; BOWMAN , C. J.; , DENSLow, N. D.; CARDINALI, M.; CARNEVALI, O. Contrasting effects of estrogen on transthyretin and vitellogenin expression in males of the marine fish, *Sparus aurata*. **Mol. Cell. Endocrinol.** v.167, p.33–41, 2000.
- GROS, M.; GROS, T. J. Electrophoretical separation of pré-stained serum lipoproteins on cellulose acetate, agarose gel and polyacrylamide. **Clin. Chim. Acta.** v.45, p.165-167, 1973.
- HARA, A.; HIRAI. H. Iron-binding activity of female-specific serum proteins of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) and chum salmon (*Oncorhynchus keta*). **Biochim. Biophys. Acta.** v. 437, p. 549-557, 1976.
- HARA, A.; HIRAI, H. Comparative studies on immunochemical properties of female-specific serum protein and egg yolk proteins in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). **Comp. Biochem. Physiol B.** v.59, p. 339-343, 1978.
- HENNIES, M.; WIESMANN, M.; ALLNER, B.; SAUERWEIN, H. Vitellogenin in carp (*Cyprinus carpio*) and perch (*Perca fluviatilis*): purification, characterization and development of an ELISA for the detection of estrogenic effects. **Sci. Total Environm.** v.309. p. 93-103, 2003.
- HIRAMATSU, N.; CHEEK, A. O.; SULLIVAN, C. V.; MATSUBARA, T.; HARA, A. Vitellogenesis and endocrine disruption. In: Environmental Toxicology. **Biochemistry and Molecular Biology of Fishes.** v.6, 2005. p. 431-471.
- HOLBECH, H.; ANDERSEN, L.; PETERSEN, G. I.; KORSGAARD, B.; PEDERSEN, K. L.; BJERREGAARD, P. Development of an ELISA for vitellogenin in whole body homogenate of zebrafish (*Danio rerio*). **Comp. Biochem. Physiol. C.** v. 130, p. 119-131. 2001
- HONTELA, A.; RASMUSSEN, J. B.; CHEVLIER, G. Endocrine responses as indicators of sublethal toxic stress in fish from polluted environments. **Water Poll. Res.** v. 28, p 767-780, 1993.
- INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY (IUPAC). Technical report. **Pure Appl. Chem.** v.75, n.5, p. 631–681, 2003.
- KARPOVA, M. A.; MOSHKOVSKII, S. A.; TOROPYGIN, I. Y.; ARCHAKOV, A. I. Cancer-specific MALDI-TOF profiles of blood serum and plasma: Biological meaning and perspectives. **J. Proteomics.** v. 73, p. 537- 551, 2010.
- 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. Environm. Health Perspec.** v.104, p.715–740, 1996.
- KIME, D. E. A strategy for assessing the effects of xenobiotics on fish reproduction. **Sci. Total Environm.** v.2225, p.3-11, 1999.
- KINNBERG, K.; KORSGAARD, B.; BJERREGAARD, P. Effects of octylphenol on the gonads of guppies (*Poecilia reticulata*) exposed as adults via the water or as embryos via the mother. **Comp. Biochem. Physiol. C.** v.134, p.45-55, 2003.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature.** v.22, p.680–685, 1970.
- LEINO, R. L.; JENSEN, K. M.; ANKLEY, G. T. Gonadal histology and characteristics histopathology associated with endocrine disruption in the adult female minnow (*Pimephales promelas*). **Environ. Toxicol. Pharmacol.** v.19, p.85-98, 2005.
- LIU, Q.; CUIZHANG, S.; JIELI, Z.; RENGAO, C. Characterization of a pattern recognition molecule vitellogenin from carp (*Cyprinus carpio*). **Immunobiology.** v.214, p.257–267, 2009.

MARDINI, C. V., SILVEIRA, M. A., BARENHO D. H. L. **Técnica de indução da desova em jundiá (*Rhamdia quelen*) empregada na estação experimental de piscicultura da Lagoa dos Quadros.** Porto Alegre: Secretaria da Agricultura. Documento ocasional n.4. 1981. 14p.

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

MILLS, L. J.; GUTJAHR-GOBELL, R.; HAEBLER, R.; HOROWITZ, D.; JAYARAMAN, S.; PRUELL, R. Effects of estrogenic (o,p'-DDT; octylphenol) and anti-androgenic (p,p'- DDE) chemicals on indicators of endocrine status in juvenile male summer flounder (*Paralichthys dentatus*). **Aquat. Toxicol.** v.52, p.157–176, 2001.

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-17b. Effects on liver and gonads. **Aquat. Toxicol.** v.00, p.1-11, 2002.

MOSCONI, G.; CARNEVALI, R.; NABISSI, M.; POLZONETTI-MAGNI, A. M. Gilthead seabream (*Spaurus aurata*) vitellogenin: purification, partial characteriation, and validation of an enzyme-linked immunodorbent assay (ELISA). **Gen. Comp. Endocr.** v.110, p.252-261, 1998.

MOURA-COSTA, D. D.; FILIPAK NETO, F.; COSTA, M. D. M.; MORAIS, R. N.; GARCIA, J. R. E.; ESQUIVEL, B. M.; OLIVEIRA RIBEIRO, C. A. Vitellogenesis and other physiological responses induced by 17- $\beta$ -estradiol in males of freshwater fish *Rhamdia quelen*. **Comp. Biochem. Physiol. C.** v.151, p. 248–257, 2010.

OLIVEIRA RIBEIRO, C. A.; SCHATZMANN, M.; SILVA DE ASSIS, H. C.; SILVA, P. H.; PELLETIER, E.; AKAISHI, F. M. Evaluation of tributyltin subchronic effects in tropical freshwater fish (*Astyanax bimaculatus*, Linnaeus, 1758). **Ecotoxicol. Environ. Safety.** v.51, p.161–167. 2002.

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

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

PALUMBO, A. J.; LINARES-CASENAVE, J.; JEWELL, W.; DOROSHOV, S. I.; TJEERDEMA, R. S. Induction and partial characterization of california halibut (*Paralichthys californicus*) vitellogenin. **Comp. Biochem. Physiol. A.** v.46, p.200–207, 2007.

PAMPROMMIN, D.; POOMPUANG, S.; SRISAPOOME, P. Molecular characterization and seasonal expression of the vitellogenin gene from Gunther's walking catfish *Clarias macrocephalus*. **Aquaculture.** v.276, p.60-68, 2008.

PAN, M. J.; BELL, W. J.; TELLER, W. H. Vitellogenic blood protein synthesis by insect fat body. **Science.** v.165, p.393-394, 1969.

PRAT, J. P.; LAMY, J. N.; WEIL, J. D. Coloration des lipoproteines après électrophorèse en gel de polyacrylamide. **Bull. Chim. Biol.** v.51, p.1367-1369, 1969.

REMPEL, M. A.; REYES, J.; STEINERT, S.; HWANG, W.; ARMSTRONG, J.; SAKAMOTO, K.; KELLEY, K.; SCHLRNK, D. Evaluation of relationship between reproductive metrics, gender and vitellogenin expression in demersal flatfish collected near the municipal wastewater outfall of Orange County, California, USA. **Aquat. Toxicol.** v.77, p.241-249, 2006.

ROEPKE, R. R.; HUGHES, J. S. Phosphorus partition in the blood of laying hens. **J. Biol. Chem.** v.108, p. 79-83, 1935.

ROUBAL, W. T.; LOMAX, D. L.; WILLIS, M. L.; JOHNSON, L. L. Purification and Partial Characterization of English Sole (*Pleuronectes vetulus*) Vitellogenin. **Comp. Biochem. Physiol. B.** v.118, p. 613–622, 1997.

- SAFEA, S. Endocrine disruptors and human health: is there a problem? **Toxicology**. v.205, p.3–10, 2004.
- SHEVCHENKO, A.; WILM, M.; MANN, M. Mass spectrometric sequencing of proteins from silver stained polyacrylamide gels. **Anal Chem**. v.68, p.850–858, 1996.
- SILFVERGRIP, A. M. C. A **Sistematic revision of the neotropical catfish genus *Rhamdia* (Teleostei, Pimelodidae)**. 156p. PhD. Thesis. Department of Zoology, Stockholm University and Department of Vertebrate Zoology, Swedish Museum of Natural History, 1996.
- SILVERSAND, C.; HYLLNER, S. J.; HAUX, C. Isolation, immunochemical detection, and observations of the instability of vitellogenin from four teleosts. **J. Exper. Zool**. v.267, p.587-597. 1993.
- SIMON, R.; JUBEAUX, G.; CHAUMOT, A.; LEMOIE, J. Mass spectrometry assay as an alternative to the enzyme-linked immunosorbent assay test for biomarker quantitation in ecotoxicology: Application to vitellogenin in Crustacea (*Gammarus fossarum*). **J. Chromatography. A**. v.1217, p.5109-5115, 2010.
- SULLIVAN, C. V.; BERLINSKY, D. L.; HODSON, R. G. Striped Bass and Other Morone Culture. R.M. In: Harre, U. (Editor): **Developments in Aquaculture and Fisheries Science**, v.30, 1997. p.11-73.
- UHLENHUTH, P.; T. KODAMA. Studien fiber die Geschlechtsdifferenzierung. **Kokka Igakkai Zassi**. v.324, p.385-405, 1914.
- UTARABHAND, P.; BUNLIPATANON, P. Plasma vitellogenin of grouper (*Epinephelus malabaricus*): Isolation and properties. **Comp. Biochem. Physiol. C**. v.115, p. 101-110, 1996.
- VAZZOLER, A. E. A. M. **Biologia da reprodução de peixes teleósteos: teoria e prática**. Maringá: Eduem/SBI/CNPq/Nupelia, 1996. 169p.
- VEGA-LÓPEZ, A.; MARTINEZ-TABEHE, L.; DOMINGUEZ-LÓPEZ, M. L.; GARCIA-LATORRE, E.; RAMÓN-GALLEGOS, E.; GARCÍA-GASCA, A. Vitellogenin induction in the endangered goodeid fish *Girardinichthys viviparus*: Vitellogenin characterization and estrogenic effects of polychlorinated biphenyls. **Comp. Biochem. Physiol. C**. v.142, p.356-364, 2006.
- XU, H.; YANG, J.; WANG, Y.; JIANG, Q.; CHEN, H.; SONG, H. Exposure to 17 $\alpha$ -ethynylestradiol impairs reproductive functions of both male and female zebrafish (*Danio rerio*). **Aquat. Toxicol**. v.88, p.1-8, 2008.
- YAMAMOTO, K. Studies on the formation of fish eggs, I. Annual cycle in the development of ovarian eggs in the flounder, *Liopsetta obscura*. **Fac. Sci. Hokkaido Univ**. v.12, p.362-373, 1956.
- WAHLI, T.; MEIER, W.; SEGNER, H.; BURKHARDT-HOLM, P. Immunohistochemical detection of vitellogenin in male brown trout from Swiss rivers. **Histochemical Journal**. v.30, p.753-758, 1998.
- WITORSCH, R. J. Endocrine Disruptors: Can Biological Effects and Environmental Risks Be Predicted? **Regul. Toxicol. Pharmacol**. v.36, p.118–130, 2002.
- WORLDWATCH INSTITUTE. Estado do Mundo: Transformando culturas do consumismo à sustentabilidade. Relatório técnico-científico. Washington. 2010.
- WUNSCHHEL, D.; SCHULTZ, I.; SKILLMAN, A.; WAHL, K. Method for detection and quantification of fathead minnow vitellogenin (Vtg) by liquid chromatography and matrix-assisted-laser-desorption/ionization mass spectrometry. **Aquat. Toxicol**. v.73, p.256-267, 2005.
- ZACHAREWSKI, T. In vitro bioassays for assessing estrogenic substances. **Environ. Sci. Technol**. v.31, n.3, p.613-623, 1997.

ZACHARIUS, R. M.; ZELL, T. E.; MORRISON, J. H.; WOODLOCK, J. J. Glycoprotein staining electrophoresis on acrylamide gels. **Anal. Biochem.** v. 31, p.148–152, 1969.

ZAROOGIAN, G.; GARDNER, G.; BORSAY HOROWITZ, D.; GUTJAHR-GOBELL, R.; HAEBLER, R.; MILLS, L. Effect of 17 $\beta$ -estradiol, *o,p*-DDT, octylphenol and *p,p*-DDE on gonadal development and liver and kidney pathology in juvenile male summer flounder (*Paralichthys dentatus*). **Aquat. Toxicol.** v.54, p. 101-112, 2001.

## CAPÍTULO II

**Produção de anticorpos policlonais  
anti-vitelogenina de *Rhamdia quelen* e avaliação da eficácia dos mesmos**

## RESUMO

Atualmente a vitelogenina é um biomarcador de disfunção endócrina amplamente aceito pela comunidade científica. Isto faz com que haja ferramentas comerciais, tais como anticorpos específicos para a mesma disponíveis. No entanto, tais ferramentas apresentam um custo elevado em relação a quantidade disponibilizada, o que inviabiliza seu uso em estudos de biomonitoramento, onde se requer uma grande quantidade de anticorpos. Frente a tal cenário, o objetivo deste capítulo foi produzir anticorpos policlonais que reconheçam especificamente a molécula de vitelogenina expressa por *R. quelen*, para disponibilizar esta ferramenta para futuros usos no biomonitoramento da presença de desreguladores endócrinos na espécie em questão. Para tanto, a proteína presente no plasma de machos expostos ao estradiol foi extraída diretamente do gel de poliacrilamida, de acordo com sua massa molecular, e utilizada nas imunizações de um coelho macho da raça *New zeland*. Para testar a eficácia dos anticorpos produzidos foram realizados ensaios de *western blot*, bloqueio, imuno-histoquímica e imunofluorescência. O resultado obtido foi semelhante ao resultado obtido pelo anticorpo comercial, demonstrando que o anticorpo produzido é tão específico quanto o comercial. Desta forma, produziu-se uma ferramenta mais acessível em termos econômicos quando comparada a comercial, e que é plausível de ser utilizada em estudos de biomonitoramento da presença de desreguladores endócrinos.

Palavras-chave: vitelogenina, anticorpos policlonais, *R. quelen*.

## 1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Durante as últimas décadas métodos imunológicos têm sido utilizados em laboratórios como ferramentas poderosas e indispensáveis para estudos em biologia celular, molecular e bioquímica. O aumento da importância do uso de anticorpos em estudos de biologia celular e molecular é evidenciado pela porcentagem de artigos publicados utilizando tais ferramentas: na década de 70 cerca de 1% dos estudos nestas áreas utilizavam métodos imunológicos; na década de 80 cerca de 30% dos estudos em biologia celular e molecular já faziam o uso de tais ferramentas; nos anos 90 cerca de 70% dos estudos na área utilizavam estes métodos e atualmente esta porcentagem ultrapassa 90% (Considerando a porcentagem de artigos publicados na revista *Journal of Cell Biology* nestas décadas) (CONROY *et al.*, 2009).

As técnicas imunológicas possuem uma ampla gama de aplicações em estudos de macromoléculas e proteínas especialmente devido a sua alta especificidade e sensibilidade, que permitem a detecção, isolamento e quantificação de moléculas em níveis de até picogramas. A principal vantagem do uso de anticorpos é que estes podem ser induzidos contra vários tipos de macromoléculas ou substâncias estranhas, de massa molecular acima de 1000 Da, que forem apresentadas ao sistema imune (VAN REGENMORTEL, 1982).

Os usos mais frequentes de técnicas imunológicas dependentes de anticorpos são: a visualização de macromoléculas em células e tecidos por técnicas de imunocitoquímica, imuno-histoquímica e imunofluorescência; identificação de proteínas em eletroferogramas utilizando técnicas de *imunoblot* (*western blot*); isolamento de proteínas por imunoprecipitação e a determinação quantitativa de proteínas por imunoenaios (ELISA, RIA). O sucesso das técnicas imunológicas se deve a especificidade, capacidade de reconhecer a proteína de interesse em diferentes espécies e afinidade dos anticorpos por moléculas específicas (ABBAS *et al.*, 2008).

### 1.1 ANTÍGENOS E ANTICORPOS

Um antígeno é qualquer substância capaz de induzir uma resposta imunológica quando um animal vertebrado é exposto ao mesmo. Estas substâncias

são normalmente moléculas bastante grandes, cuja massa molecular é superior a 5 kDa ou partículas que são formadas de proteínas ou polissacarídeos estranhos às espécies exposta. Via de regra, um organismo não induz uma resposta imunológica contra as suas próprias proteínas e polissacarídeos (VAN REGENMORTEL, 1982; MATTHEWS, 1991).

Um antígeno pode estimular um animal a produzir anticorpos que irão reagir especificamente com o mesmo. Este aspecto é conhecido por imunogenicidade. Por outro lado o antígeno deve ser capaz de se combinar com o anticorpo específico produzido contra ele, ao que se chama antigenicidade (MATTHEWS, 1991).

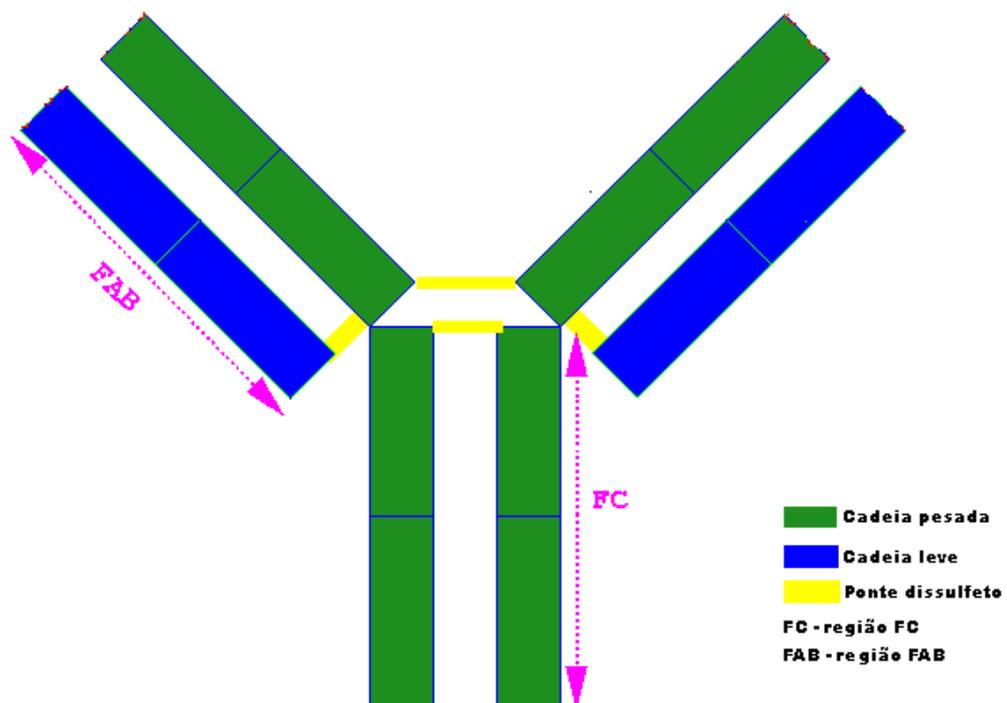
Segundo Van Regenmortel (1982), a capacidade de um dado animal em produzir anticorpos contra um antígeno depende do mesmo possuir células linfóides (linfócitos B). Tais células são dotadas de receptores que reconhecem especificamente uma dada região do antígeno, chamada de epítipo. Um antígeno pode exibir um ou vários epítipos, dependendo da sua massa molecular. A resposta imunológica das células B de um animal vertebrado frente à presença de antígenos estranhos é a produção de anticorpos contra o mesmo (ABBAS *et al.*, 2008).

Os anticorpos são glicoproteínas pertencentes ao grupo das imunoglobulinas capazes de se ligarem aos antígenos por reconhecimento do epítipo do antígeno que lhes deu origem. Existem 5 classes de imunoglobulinas: IgG, IgM, IgA, IgD, IgE, e todas têm uma estrutura básica semelhante, que consiste em duas cadeias leves idênticas e duas cadeias pesadas também idênticas, ligadas entre si por forças não covalentes e pontes dissulfeto. Há uma região variável tanto na cadeia leve quanto na pesada e a porção formada por estas duas regiões variáveis é a responsável pelo reconhecimento do epítipo. O restante das cadeias leves e pesadas não varia dentro de uma mesma classe de imunoglobulinas. As diferentes classes distinguem-se pelas diferentes cadeias pesadas, sendo as cadeias leves iguais em todas as classes (VAN REGENMORTEL, 1982; WISTREICH e LECHTMAN, 1988; MERNAUGH *et al.*, 1990).

As imunoglobulinas IgG e IgM são as que aparecem nos soros em maior quantidade e são as únicas que, até agora, foram implicadas em reações serológicas contra proteínas estranhas (MATTHEWS, 1991).

Segundo Van Regenmortel (1982), a classe das IgGs, por si só, constitui aproximadamente 75% do total de imunoglobulinas. A estrutura básica das moléculas de IgG consiste em duas cadeias leves (de massa molecular 25 kDa) e

duas cadeias pesadas (de massa molecular 50 KDa), ligadas por uma ponte simples de dissulfeto. O anticorpo IgG é bivalente, ou seja, tem duas regiões variáveis que se combinam com dois antígenos. Estes dois locais de ligação encontram-se na extremidade de ambos os braços da molécula em forma de Y e consistem numa "armação" constituída por uma sequência relativamente estável de aminoácidos interrompida por várias regiões com sequências altamente variáveis (MATTHEWS, 1991).



**Figura 1.** Estrutura geral das imunoglobulinas do tipo G (IgG).

FONTE: Adaptado de MATTHEWS, 1991.

O uso de enzimas e outros tratamentos químicos na digestão e separação das moléculas de imunoglobulinas em partes menores revelaram a existência de várias subregiões funcionais. A hidrólise de IgG com papaína dá origem a três fragmentos, dois dos quais são denominados Fab (ambos com uma cadeia leve e outra pesada) e possuem igual dimensão e capacidade de ligação com os antígenos. O terceiro fragmento denominado Fc é constituído apenas por cadeias pesadas, não tem capacidade de se ligar aos antígenos, mas apresenta elevada afinidade por uma molécula isolada a partir da parede celular de *Staphylococcus aureus* (Proteína A), que é muito usada para a purificação de moléculas de IgG. A região entre os fragmentos Fab e Fc confere ao anticorpo a flexibilidade necessária

para que os fragmentos Fab operem independentemente (MERNAUGH *et al.*, 1990; MATTHEWS, 1991).

As IgMs são as maiores das imunoglobulinas e contêm maior quantidade de resíduos de carboidratos que as IgGs. Tais imunoglobulinas constituem cerca de 10% das imunoglobulinas totais do soro. Encontram-se na forma de pentâmero com 5 unidades ligadas entre si por pontes dissulfeto, cada uma composta igualmente por duas cadeias leves e duas cadeias pesadas. Estas imunoglobulinas têm 10 potenciais locais de ligação, mas estes podem não se encontrar todos reativos simultaneamente. É a sequência de aminoácidos da parte N-terminal das cadeias leve e pesada que determina a estrutura terciária e, portanto, a especificidade do local de ligação do anticorpo (VAN REGENMORTEL, 1982)

Quando um animal é exposto a um antígeno este é reconhecido por receptores presentes na superfície das células B. Após o reconhecimento, os linfócitos B sofrem uma série reações e passam a secretar anticorpos específicos contra o epítipo que foi anteriormente reconhecido pelo receptor presente em sua superfície. Cada célula B reconhece apenas um tipo de epítipo e é capaz de secretar anticorpos apenas contra este epítipo. Os anticorpos aparecem no sangue normalmente uma semana após exposição ao antígeno e são principalmente do tipo IgM. A concentração destas IgMs no soro aumenta durante alguns dias, diminuindo em seguida, até atingir o ponto em que poucos anticorpos conseguem ser detectados. Se o animal for exposto novamente ao mesmo antígeno, o período latente é mais curto, a concentração aumenta mais rapidamente e atinge níveis mais elevados, e os anticorpos, que são principalmente do tipo IgG, permanecem no sangue durante mais tempo do que os do tipo IgM (GIBBS e HARRISON, 1976; WISTREICH e LECHTMAN, 1988; MERNAUGH *et al.*, 1990).

## 1.2 ANTICORPOS POLICLONAIS vs ANTICORPOS MONOCLONAIS

Há basicamente dois tipos de anticorpos: os policlonais e os monoclonais, que se diferenciam pela forma como são produzidos e pela quantidade de epítipos que reconhecem, sendo que cada tipo tem suas vantagens e desvantagens.

Uma molécula de proteína antigênica pode ter vários epítipos diferentes sendo que dentro de uma população de células B cada célula pode ter um receptor específico para um epítipo do antígeno. Deste modo, para qualquer antígeno com

estas características, pode haver muitos linfócitos B com receptores que reconheceram diversos epítomos de um mesmo antígeno. Esta população de linfócitos B que é capaz de reconhecer vários epítomos de um antígeno, leva a formação de uma população de anticorpos capazes de reconhecer os vários epítomos do antígeno. Os anticorpos formados desta maneira são denominados anticorpos policlonais. Uma vez que cada linfócito B só secreta um tipo de anticorpo específico para um epítomo, anticorpos policlonais nada mais são que um conjunto de anticorpos monoclonais que reconhecem vários epítomo de um mesmo antígeno (DRENCKHAHN *et al.*, 1993).

A maioria dos estudos em biologia celular e molecular faz uso de anticorpos policlonais uma vez que a sua produção é mais simples, rápida e barata quando comparada a produção de anticorpos monoclonais. Os policlonais também são vantajosos quando se faz o uso de técnicas que alteram a estrutura da proteína, pois mesmo que a estrutura da mesma seja alterada ainda haverão epítomos que serão reconhecidos. A utilização dos policlonais é limitada a alguns procedimentos, como a composição de kits para diagnósticos e uso como ferramenta de pesquisa acadêmica (WISTREICH e LECHTMAN, 1988; DRENCKHAHN *et al.*, 1993).

No entanto, e como seria desejável, os linfócitos B não podem ser multiplicados *in vitro*. Para tentar ultrapassar este problema, Kohler e Milstein (1975) promoveram a fusão entre estas células (retiradas do baço de um camundongo imunizado com um dado antígeno) e uma linhagem de células de mieloma cancerígeno que possui crescimento contínuo; da fusão de tais células resultou uma célula híbrida que recebeu o nome de hibridoma. Com este procedimento, conseguiram selecionar células individuais híbridas com capacidade biossintética de produzir um único tipo de anticorpos - anticorpos monoclonais- a partir de um único linfócito B (CLAUSEN, 1988; MATTHEWS, 1991). Desta forma os anticorpos monoclonais surgem a partir de um único linfócito B, que é clonado e imortalizado, produzindo sempre os mesmos anticorpos, que reconhecem sempre o mesmo epítomo de um antígeno. Estes anticorpos apresentam-se iguais entre si em estrutura, especificidade e afinidade, ligando-se ao mesmo epítomo no antígeno. De fato, Matthews (1991) e Fox (1993) referem-se às inúmeras vantagens deste tipo de anticorpos sobre os anticorpos policlonais. A produção de anticorpos monoclonais exige pequenas quantidades de antígeno para a imunização dos animais. Uma vez selecionada uma linhagem de células de hibridoma, uma quantidade infundável

desse mesmo anticorpo pode ser obtida, pois o hibridoma pode ser armazenado em baixas temperaturas e infinitamente reproduzido. Este fato permite uma uniformização do tipo de anticorpos usados pelos diferentes laboratórios, eliminando-se o problema da variabilidade de resultados que normalmente ocorre devido ao uso de diferentes tipos de anticorpos. Por outro lado, e por reconhecerem um só epítopo, os monoclonais muitas vezes não reconhecem proteínas semelhantes provenientes de dois organismos diferentes, mesmo que estes sejam filogeneticamente próximos.

### 1.3 PRODUÇÃO DE ANTICORPOS POLICLONAIS

Para várias proteínas, antissoros contendo anticorpos policlonais, podem ser adquiridos comercialmente. No entanto, são caros e por vezes apresentam baixa concentração de anticorpos. Desta forma, é aconselhável aos laboratórios que trabalham no campo da imunquímica preparar os seus próprios antissoros e, para que esse empreendimento se torne viável, devem ocupar-se também da preparação dos antígenos adequados à sua produção (CLAUSEN, 1988).

Os antissoros são produzidos através da imunização de animais com antígenos total ou parcialmente purificados, sendo que tais antígenos em geral são proteínas estranhas ao animal (BERCKS *et al.*, 1972; CLAUSEN, 1988; FOX, 1993). Hoje em dia, normalmente se purificam e concentram as proteínas, quando se pretende imunizar animais para obtenção de antissoro. No entanto, se a proteína em questão for sensível a degradação durante sua purificação outros métodos para seu isolamento podem ser alternativas. Proteínas que são difíceis de serem purificadas em suas formas nativas podem ser separadas por SDS-PAGE e a banda correspondente a proteína de interesse pode ser recortada diretamente do gel e homogeneizada em solução tamponante para proceder-se a imunização (DRENCKHAHN *et al.*, 1993).

Todos os animais vertebrados são capazes de produzir anticorpos, no entanto, coelhos, galinhas, ovelhas, ratos e camundongos são as espécies mais mencionadas na bibliografia (BALL *et al.*, 1990; GIBBS e HARRISON, 1976). Os coelhos são os animais comumente mais utilizados na produção de anticorpos policlonais para proteínas exógenas de organismos filogeneticamente distantes do

mesmo, uma vez que respondem bem as proteínas estranhas e produzem volumes de soro convenientes às necessidades (BALL *et al.*, 1990).

Em relação ao protocolo de imunização a ser utilizado, deve-se levar em conta que são produzidos mais anticorpos para determinada quantidade de antígeno quando este é dividido e injetado em pequenas quantidades durante determinado período de tempo do que quando é todo administrado numa só injeção. Por outro lado, a quantidade injetada deve ser tão pequena quanto possível, de forma a minimizar tanto reações indesejadas com contaminantes bem como a indução à tolerância (BALL *et al.*, 1990; TORRANCE, 1992).

A concentração de anticorpos policlonais presentes em um antissoro não é diretamente proporcional à quantidade de antígeno introduzida. Embora quantidades de pelo menos 0,5 mg de antígeno sejam normalmente injetadas de cada vez, há registros de que quantidades de 50-100 µg podem ser suficientes para induzir uma resposta imunológica satisfatória. De fato, a maioria dos cientistas usam, desnecessariamente, doses de antígeno demasiado elevadas na imunização para garantir a resposta imune desejada, porém, no caso de antígenos de difícil obtenção, um estudo da dose mínima necessária revela-se de grande importância (VAN REGENMORTEL, 1982).

A determinação do nível de anticorpos no soro é feita periodicamente, através da coleta de amostras de sangue do animal imunizado. Uma vez atingida a concentração de anticorpos desejada, sangra-se o animal para a coleta do antissoro contendo os anticorpos policlonais, também chamado de soro hiper-imune (WISTREICH e LECHTMAN, 1988). Segundo Van Regenmortel (1982), podem ser tirados de um coelho até 50 ml de sangue a intervalos de duas semanas ao longo de um período de um ano sem que isso interfira com a saúde de um animal com cerca de um ano de idade e um peso de 4 Kg. Em coelhos, o sangue pode ser obtido via cardíaca, arterial e venal, sendo que a forma de obtenção tem maior importância para a sobrevivência do animal do que para a qualidade do soro coletado (BALL *et al.*, 1990).

As amostras de sangue oriundas de animais imunizados devem ser coaguladas e o coágulo deve ser separado do restante das células sanguíneas e fibras por centrifugação. O soro obtido deve ser translúcido e de cor amarelo-palha. Quando armazenados corretamente, os antissoros permanecem ativos durante vários anos. Clausen (1988) considera que a forma mais simples e eficaz de

armazenamento dos antissoros é a sua congelação a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  em pequenas ampolas ou liofilização (i.e, secagem em vácuo enquanto congelados e armazenamento também em vácuo).

## 1.4 IMUNOENSAIOS NA IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS

Diferindo apenas na sua conveniência e sensibilidade a escolha do teste sorológico mais adequado depende da experiência e do objetivo do operador, uma vez que cada técnica contribui, à sua maneira, para um melhor conhecimento do antígeno em estudo.

### 1.4.1 RIA e ELISA

Os métodos imunológicos de quantificação da concentração de um antígeno possuem sensibilidade e especificidade altas, fazendo destas técnicas padrões tanto na análise clínica quanto na pesquisa. Em geral os métodos atuais de quantificação precisa de antígenos requerem um antígeno ou um anticorpo puro, cuja quantidade possa ser medida por uma molécula indicadora. Tanto o RIA (*radioimmunoassay*) quanto o ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) são ensaios de ligação ao antígeno ou ao anticorpo. E ambos trabalham segundo o mesmo princípio, diferenciando-se apenas pela forma de detecção.

Quando a molécula indicadora é marcada com um radioisótopo esta pode ser quantificada por instrumentos que detectam a perda radioativa do mesmo. Este tipo de ensaio recebe o nome de radioimunoensaio uma vez que é dependente de um anticorpo radiomarcado. Já quando a molécula indicadora é marcada com uma enzima e a reação desta enzima com seu substrato específico produz uma cor que pode ser mensurada, então o ensaio passa a se chamar ELISA. Em geral o anticorpo específico é que é marcado, e o antígeno não marcado é adsorvido a um suporte sólido, que em geral é um poço de microplaca. O anticorpo marcado pode ligar-se ao antígeno não marcado em condições específicas nas quais a adsorção inespecífica é bloqueada e quaisquer anticorpos não ligados são removidos por meio de lavagens. A ligação do anticorpo ao seu antígeno é medida diretamente pela quantidade de quantidade de radioatividade retida no poço, no caso do RIA, ou

pela quantidade de subproduto formado pela reação entre enzima e substrato no caso do ELISA (CALICH e VAZ, 2009; JANEWAY *et al.*, 2002).

Quando devidamente usados, e com uma amostragem adequada do antígeno, estes testes denotam uma elevada sensibilidade e rapidez de detecção e são especialmente eficazes quando um grande número de amostras tem que ser testado (MATTHEWS, 1991). São testes simples que podem ser desenvolvidos corretamente pela maioria das pessoas após um breve treino e alguma prática.

Atualmente há uma preferência pelos ensaios de ELISA em detrimento dos RIA, pois os primeiros não oferecem os perigos da marcação radioativa. Outra desvantagem dos RIA é que os radioisótopos tem uma meia-vida curta, portanto os reagentes para tal tipo de ensaio não podem ser armazenados por longos períodos como é possível se fazer para os reagentes utilizados nos ensaios de ELISA (DRENCKHAHN *et al.*, 1993).

#### 1.4.2 *Western blot*

Esta técnica, que surgiu em 1975 e que foi aprimorada nos anos seguintes (ABBAS *et al.*, 2008), envolve primeiramente a separação das proteínas de acordo com seu peso molecular em um gel de poliacrilamida; estas são então transferidas de géis de poliacrilamida para uma membrana de nitrocelulose ou de PVDF, sendo depois feita uma reação antígeno-anticorpo que visa o reconhecimento de uma proteína específica. A reação é evidenciada por um sistema de detecção que envolve o uso de imunoglobulinas específicas para o anticorpo anteriormente utilizado, conjugadas a uma enzima e também o uso de substrato específico para a enzima em questão (ABBAS *et al.*, 2008; JANEWAY *et al.*, 2002).

A principal vantagem do *western blot* em relação ao ELISA é que a reatividade dos anticorpos pode ser correlacionada com proteínas de determinada massa molecular, mesmo quando presentes em misturas complexas, uma vez que aquelas migram para locais diferentes do gel, dependendo do seu tamanho e forma. No entanto a sensibilidade dos ensaios de ELISA é mais elevada quando comparada a sensibilidade dos ensaios de *western blot*.

### 1.4.3 Imunofluorescência

Como os anticorpos se ligam de forma estável e específica a seus antígenos, constituem-se em inestimáveis sondas para identificar uma determinada molécula em células, tecidos ou fluidos biológicos. Os anticorpos podem ser usados para marcar e conseqüentemente localizar seus antígenos-alvo de uma forma precisa em células isoladas ou cortes de tecidos por uma variedade de técnicas de marcação. Quando o próprio anticorpo primário, ou o anticorpo secundário antiimunoglobulina, são marcados por um corante fluorescente, a técnica é conhecida como microscopia de imunofluorescência. Como em todas as técnicas sorológicas, o anticorpo se liga de forma estável ao seu antígeno, permitindo que os anticorpos não ligados sejam removidos por sucessivas etapas de lavagens. Como os anticorpos contra proteínas reconhecem as características de superfície da proteína nativa dobrada, a estrutura original da proteína em questão deve ser mantida. Isso pode ser obtido pelo uso de técnicas de fixação pouco agressivas como o congelamento (crioprocessamento). Entretanto alguns anticorpos se ligam às proteínas mesmo quando desnaturadas, e tais anticorpos se ligarão especificamente mesmo às proteínas em secções de tecidos fixados de forma química mais agressiva (JANEWAY *et al.*, 2002).

Um corante fluorescente pode ser covalentemente ligado de forma direta no anticorpo, mas tal processo é complicado e dispendioso. Normalmente utilizam-se anticorpos antiimunoglobulina, que reconhecem o anticorpo primário, acoplado a um corante fluorescente. Os corantes usados para imunofluorescência são excitados por luz em um comprimento de onda e emitem luz em um outro comprimento de onda do espectro de luz visível. A análise da imunomarcação é feita em geral em microscópio epifluorescente (ABBAS *et al.*, 2008; JANEWAY *et al.*, 2002).

### 1.4.4 Imuno-histoquímica

Uma alternativa à imunofluorescência para detectar uma proteína em um corte de tecido é a imuno-histoquímica, na qual o anticorpo específico é quimicamente ligado a uma enzima que converte um substrato incolor em um produto colorido, cuja deposição pode ser observada diretamente ao microscópio

ótico. Esta técnica de detecção é análoga ao ELISA, sendo que a principal diferença na detecção é que os produtos corados na imuno-histoquímica, são insolúveis e precipitam no local onde há reação antígeno anticorpo. A peroxidase de raiz forte (*horseradish peroxidase*) e a fosfatase alcalina são as duas enzimas mais comumente usadas para estas finalidades. A peroxidase de raiz forte oxida o substrato diaminobenzidina (DAB) para produzir um precipitado marrom, enquanto que a fosfatase alcalina produz um precipitado azul ou vermelho, de acordo com o substrato utilizado (CALICH e VAZ, 2009).

#### 1.4.5 Imunoprecipitação

A imunoprecipitação é uma técnica que utiliza um anticorpo específico para um antígeno proteico, a fim de se isolar este antígeno presente em uma mistura proteica complexa. Na maior parte dos procedimentos, o anticorpo é preso a uma partícula de fase sólida. Neste caso em geral a região Fc das imunoglobulinas é presa a proteína A associada a resina de sefarose. Primeiramente incuba-se o anticorpo com a fase sólida, fazendo com que o mesmo fique preso a esta. Incuba-se então o complexo anticorpo-fase sólida (anticorpo-proteína A sefarose) com a mistura que contém o antígeno de interesse. O antígeno irá se ligar ao complexo anteriormente formado e irá precipitar devido ao peso da sefarose associada ao mesmo, enquanto que as moléculas que não se ligaram ao complexo serão eliminadas por meio de lavagens. Os antígenos precipitados serão eluídos da ligação com o anticorpo por meio de alterações no pH da solução ou alterações em outras variáveis que alterem a afinidade do antígeno pelo anticorpo (ABBAS *et al.*, 2008; CALICH e VAZ 2009).

Uma vez que a proteína de interesse tenha sido isolada com o auxílio do anticorpo, elas podem ser caracterizadas de diversas maneiras. A maneira mais comum é por SDS-PAGE seguido de *western blot*.

#### 1.5 ANTICORPOS NO BIOMONITORAMENTO

Um anticorpo pode ser considerado um biosensor. Um biosensor é uma molécula que reconhece especificamente outra molécula de imensa importância biológica (CONROY *et al.*, 2009). Desta forma os biosensores, ou anticorpos, são

ferramentas poderosas para a análise de biomoléculas, tais como proteínas, em análises clínicas, bioquímicas e ambientais (HOCK *et al.*, 2002).

Embora haja anticorpos de aplicação ambiental viáveis para várias espécies, devido a baixa conservação evolucionária de várias moléculas envolvidas em processo biológicos, é necessário produzir e padronizar anticorpos para cada espécie estudada, ou ao menos, produzir anticorpos para espécies correlacionadas filogeneticamente (PRAKASH *et al.*, 2007).

Diversos autores têm produzido anticorpos contra moléculas de importância ambiental e padronizado imunoensaios para os mesmos (PRAKASH *et al.*, 2007; MOSCONI *et al.*, 1998; HOLBECH *et al.*, 2001; OHKUBO *et al.*, 2003; HERBST *et al.*, 2003). No entanto poucos são os autores que fazem o uso destes anticorpos no biomonitoramento (DESFORGES *et al.*, 2010).

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Produzir anticorpos policlonais específicos que reconheçam a molécula de vitelogenina da espécie *R. quelen*.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Induzir a super-expressão da vitelogenina em machos de *R. quelen*;
- ✓ Isolar a molécula de vitelogenina do plasma dos indivíduos expostos ao estrógeno;
- ✓ Induzir coelhos a produzirem anticorpos policlonais específicos contra a molécula de vitelogenina;
- ✓ Testar a eficácia dos anticorpos produzidos por ensaios de *western blot*, bloqueio, imuno-histoquímica e imunofluorescência;
- ✓ Comparar a eficácia dos anticorpos produzidos com a eficácia do anticorpo comercial testado anteriormente.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 INDUÇÃO DA EXPRESSÃO DA VITELOGENINA

A super-expressão da vitelogenina, foi realizada injetando-se 10 mg de 17 $\alpha$ -etinil-estradiol por quilograma de massa corpórea, em 10 animais machos da espécie *R. quelen*. Tal hormônio foi escolhido para a super-expressão da proteína uma vez que este é o hormônio sintético e que por ser etinilado sofre metabolização e degradação mais lenta, permanecendo mais tempo circulante no organismo. Para controle positivo e negativo da expressão da vitelogenina, 10 fêmeas e 10 machos da espécie, respectivamente, foram mantidos em tanques redes, nas mesmas condições que os animais expostos ao hormônio.

Tal desenho experimental foi realizado de acordo com as normas propostas pelo Comitê de Ética do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (Certificado 314).

#### 3.2 COLETA E PROCESSAMENTO DO MATERIAL BIOLÓGICO

A coleta do material biológico foi realizada 15 dias após a indução estrogênica experimental (CARRERA *et al.*, 2007; MOURA-COSTA *et al.*, 2010). Os animais foram primeiramente anestesiados com benzocaína 0,8%. O sangue foi coletado com o animal ainda vivo, conforme procedimento descrito por Silversand *et al.*, (1993), e ao sangue total foi acrescentado o anti-proteolítico PMSF a 1 mM. A mistura foi centrifugada a 4 °C, sob a força de 3000 g por 30 min para obtenção do plasma, que foi alíquotado, e mantido a temperatura de -75 °C para a produção do soro policlonal e análises posteriores por *western blot*.

Os animais foram então sacrificados por rompimento da coluna vertebral e parte do fígado e das gônadas foram coletados e mantidos em solução fixadora de Alfac (formol, álcool e ácido acético glacial) por 16 h, armazenados em álcool 70% e posteriormente sofreram processamento histológico seguido de processamento para imuno-histoquímica. Outra parte do fígado e das gônadas foram coletados e fixados em Paraformaldeído 4% por 2h; após a fixação o material foi estocado em tampão salino (PB), processado para criomicrotomia seguida de imunofluorescência.

### 3.3 PRODUÇÃO DO SORO POLICLONAL

#### 3.3.1 Isolamento da vitelogenina plasmática

As proteínas do plasma total de machos induzidos tiveram seu teor proteico previamente quantificado pelo método de Bradford (1976) e foram separadas por SDS-PAGE a 4% (gel de empilhamento) e a 8% (separação), com aplicação de campo elétrico vertical (LAEMMLI, 1970). Após a separação eletroforética o gel foi corado com Azul de Comassie e descorado em solução de Destain (metanol 40%, ácido acético 10% em água). O gel foi então lavado 3 vezes de 1 h cada com água destilada e a banda correspondente a vitelogenina foi recortada do gel e macerada com auxílio de grau e pistilo em PBS.

#### 3.3.2 Imunização dos coelhos

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

A obtenção, manuseio e manutenção do animal no biotério obedeceram às normas propostas pelo Comitê de Ética do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (Certificado 314).

### 3.3.3 Processamento do soro imune

O sangue coletado do coelho foi deixado a 37 °C por 1 h e então centrifugado a 4 °C, por 7 min a 3000 g para obtenção do soro contendo os anticorpos policlonais anti-vitelogenina de *R. quelen*, este aliquoteado e mantido a -20 °C.

## 3.4 TESTE DO SORO POLICLONAL

### 3.4.1 Diluição do anticorpo

Para testar se a anticorpo produzido reconhecia a vitelogenina de *R. quelen* foram realizados ensaios de *western blot*, nos quais o anticorpo em questão foi testado em várias diluições. Para tanto 50 µg de proteínas do plasma de machos expostos ao estrógeno forma separadas por SDS-PAGE (gel de empilhamento 4% e gel de separação 8%) e eletrotransferidas para membranas de nitrocelulose. A membrana de nitrocelulose contendo as proteínas eletrotransferidas do gel foram primeiramente coradas com Ponceau's para análise da eletroforese e da transferência e então a mesma foi bloqueada por 1 h com 5% leite sem gordura (Molico) em solução de TBS-T. Após o bloqueio a membrana foi incubada por 16 h à 4°C com o soro pré-imune ou policlonal contendo os anticorpos anti-vitelogenina de *R. quelen* nas seguintes diluições: 1:100, 1:500, 1:1000, 1:1500, 1:2000, 1:2500, 1:5000, 1:7500, 1:10000, 1:15000, 1:20000, 1:25000, 1:30000, 1:40000, 1:60000, 1:80000. A membrana foi então lavada três vezes com TBS-T para a remoção dos anticorpos não ligados e foi incubada por 1 h com anti-imunoglobulina de coelho conjugada à com peroxidase, numa diluição de 1:4000. A reação foi evidenciada utilizando substrato quimioluminescente (Pierce ECL, Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) sobre a membrana, a qual foi exposta a um filme de raio-X não sensível (Kodak) e quando necessário a um filme sensível.

### 3.4.2 Ensaio de *Western blot*

Amostras de plasma de fêmeas controle (controle positivo da expressão da vitelogenina; C+), machos controle (controle negativo da expressão da vitelogenina; C-) e machos expostos ao estrógeno tiveram sua quantificação proteica previamente determinada pelo método de Bradford (1976) e foram preparadas em tampão de

amostra para SDS-PAGE redutor. Cerca de 50µg de proteínas totais foram submetidas a eletroforese por SDS-PAGE e eletrotransferência para membrana de nitrocelulose conforme descrito acima. Após o bloqueio a membrana foi incubada por 16 h à 4°C com o soro policlonal contendo os anticorpos anti-vitelogenina de *R. quelen* numa diluição de 1:35000, ou com o soro pré-imune na mesma diluição. A membrana foi então lavada três vezes com TBS-T para a remoção dos anticorpos não ligados e foi incubada por 1 h com anti-imunoglobulina de coelho conjugada à com peroxidase, numa diluição de 1:4000. A reação foi evidenciada utilizando substrato quimioluminescente (Pierce ECL, Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) sobre a membrana, a qual foi exposta a um filme de raio-X não sensível (Kodak).

### 3.4.3 Ensaio de bloqueio

Para este ensaio primeiramente o soro policlonal contendo os anticorpos anti-vitelogenina de *R. quelen* foi diluído 1:35000 em solução de TBTS contendo 5% de leite sem gordura. Uma parte da solução contendo os anticorpos diluídos foi aliqüotada pra um novo tubo e a ela foi misturada 200µg de proteínas totais do plasma de machos expostos ao estrógeno; a outra parte da solução permaneceu no tubo e não foi misturada a nada. Ambas as alíquotas foram incubadas por 2 h a 4°C, sob agitação constante. Durante o período de incubação, 2 géis idênticos contendo as amostras de C+, C- e EE<sub>2</sub>, numa concentração de 50 µg de proteínas totais por poço de gel, foram submetidos a eletroforese e transferência conforme descrito anteriormente. Após o bloqueio uma das membranas foi incubada por 16 h à 4°C com o anticorpo anti-vitelogenina de *R. quelen* diluído que ficou incubando por 2 h anteriormente; a outra membrana foi incubada com a solução de anticorpo diluído contendo 200 µg de proteínas totais do plasma de machos expostos ao estrógeno. Ambas as membranas foram então lavada três vezes com TBS-T para a remoção dos anticorpos não ligados e incubadas por 1 h com anti-imunoglobulina de coelho conjugada com peroxidase, numa diluição de 1:4000. A reação foi evidenciada utilizando substrato quimioluminescente (Pierce ECL, Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) sobre a membrana, a qual foi exposta a um filme de raio-X não sensível (Kodak).

#### 3.4.4 Processamento histológico e ensaio de imuno-histoquímica

O fígado e as gônadas fixados em Alfac, foram mantidos em álcool 70% até que fosse possível dar continuidade ao processamento histológico.

Posteriormente o material foi desidratado em série crescente de etanol, diafanizado em xilol e incluído e emblocado em Paraplast (Sigma®). Cortes histológicos com 5 µm de espessura foram obtidos em micrótomo e distendidos em lâminas gelatinizadas com o auxílio de uma placa aquecedora.

Tais lâminas foram parcialmente desparafinizadas a 60 °C por 1 h. A desparafinização completa deu-se através de dois banhos de xilol, 10 min cada um. As lâminas foram reidratadas em série decrescente de etanol e então em tampão fosfato salino (PBS) pH 7,6. As peroxidases endógenas foram bloqueadas com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% em metanol por 3 min. Já os radicais aldeídicos foram bloqueados com glicina 0,1 M por 10 min e os sítios inespecíficos foram bloqueados com BSA 1% por 1 h. Os cortes foram então incubados com o anticorpo anti-vitelogenina de *R. quelen*, numa diluição de 1:3000 (em PBS-BSA 0,1%), por 16 h. Após as 16 h os cortes foram lavados com PBS e subsequentemente incubados com anticorpo secundário anti-imunoglobulina de coelho (1:400) acoplado a HRP por 1 h a temperatura ambiente. A reação foi evidenciada utilizando DAKO ENVISION kit System Labeled Polymer HRP.

#### 3.4.5 Crioprocessamento e ensaio de imunofluorescência

O material fixado em PFA 4% e armazenado em PB foi mantido a 4 °C até que o processamento fosse possível. Fígado e gônadas passaram por uma etapa de crioproteção na qual foram imersos em sacarose 30% por 1 h, 50% por 1 h e sacarose 70% durante a noite. Na sequência o material foi emblocado em tissue-tek (resina específica para criostato) e cortes de 7 a 10 µm foram obtidos.

Os cortes secaram a temperatura ambiente por 48 h e então na estufa a 37°C por 1 h. Após a secagem o material foi armazenado a -20 °C.

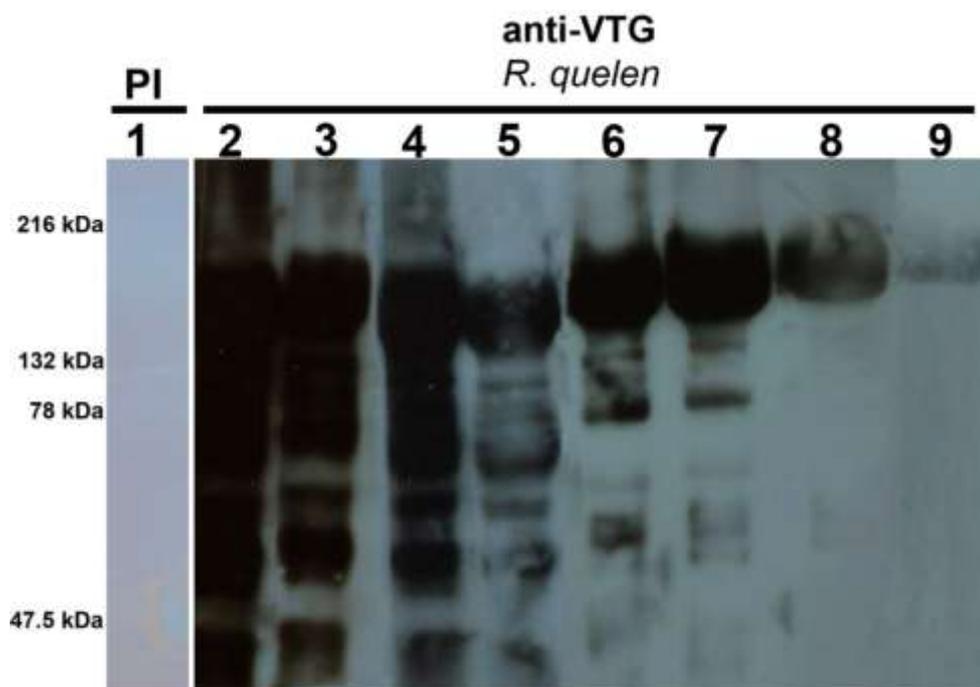
Primeiramente as lâminas foram retiradas do freezer e secas em estufa a 37°C por 1 h e os cortes de interesse foram isolados com o auxílio de esmalte. Em seguida os cortes foram lavados em tampão PB e foi feito um bloqueio dos radicais aldeídicos com glicina 0,1 M por 10 min. Na sequência os sítios inespecíficos foram

bloqueados com BSA 1%, por 1 h em câmara úmida a temperatura ambiente. Após o bloqueio as lâminas foram incubadas com o anticorpo primário anti-vitelogenina de *R. quelen*, diluído 1:300 por 12 h. Após as 12 h, as lâminas foram lavadas em tampão PB e incubadas com o anticorpo secundário anti-imunoglobulina de coelho (acoplada ao fluoróforo FIT C), numa diluição de 1:200, por 2 h a temperatura ambiente e no escuro (para evitar a degradação do fluoróforo). As lâminas foram novamente lavadas em tampão PB e montadas com vectashield contendo DAPI (Vector<sup>®</sup>).

## 4. RESULTADOS

### 4.1 TESTE DO ANTICORPO PRODUZIDO

O anticorpo anti-vitelogenina de *R. quelen* reagiu especificamente com a vitelogenina da espécie numa diluição de até 1:80000, embora nesta diluição o anticorpo tenha reconhecido sutilmente a vitelogenina. A diluição de 1:40000 mostrou-se satisfatória, no entanto a reação não foi muito intensa. Desta forma optou-se por utilizar este anticorpo, em ensaios de *western blot*, numa diluição de 1:35000. Diluições iguais ou inferiores a 1:20000 mostraram inespecificidade e reações cruzadas com outras moléculas que não a vitelogenina.



**Figura 2.** Diluição dos anticorpos policlonais anti-vitelogenina de *R. quelen*.

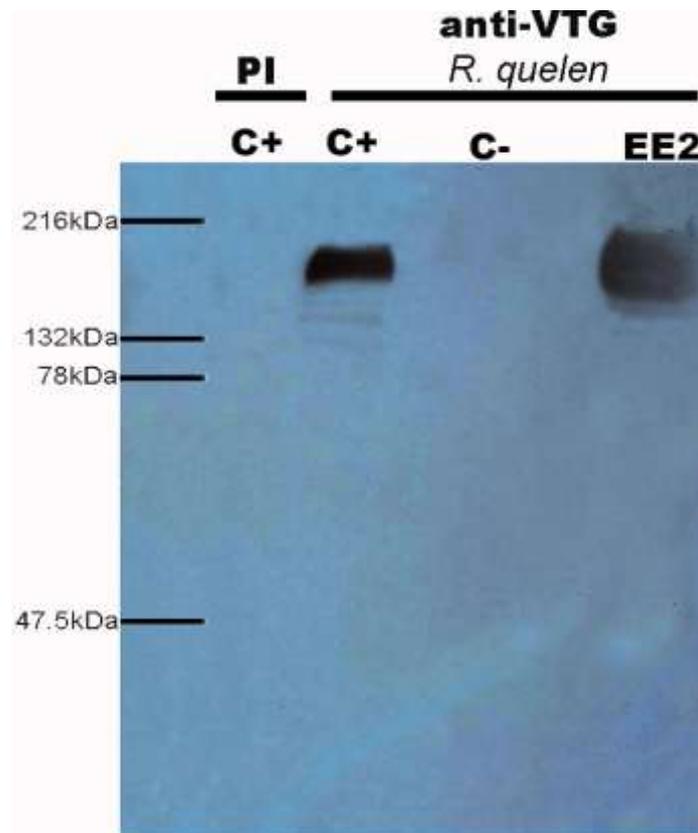
NOTA: 50  $\mu$ g de proteínas totais do plasma de machos expostos a 10 mg de  $EE_2 \cdot kg^{-1}$ . MM – marcador molecular. 1 – soro pré-imune (PI). 2 – soro imune diluído 1:1000. 3 – soro imune diluído 1:2500. 4 – soro imune diluído 1:5000. 5 – soro imune diluído 1:10000. 6 – soro imune diluído 1:20000. 7 – soro imune diluído 1:30000. 8 – soro imune diluído 1:40000. 9- soro imune diluído 1:80000.

### 4.2 ENSAIO DE WESTERN BLOT

Os anticorpos policlonais presentes no soro do coelho submetido às imunizações, reagiram com um antígeno de aproximadamente 200 kDa em machos expostos ao estrógeno e em fêmeas maduras (Figura 3 EE2 e C+, respectivamente).

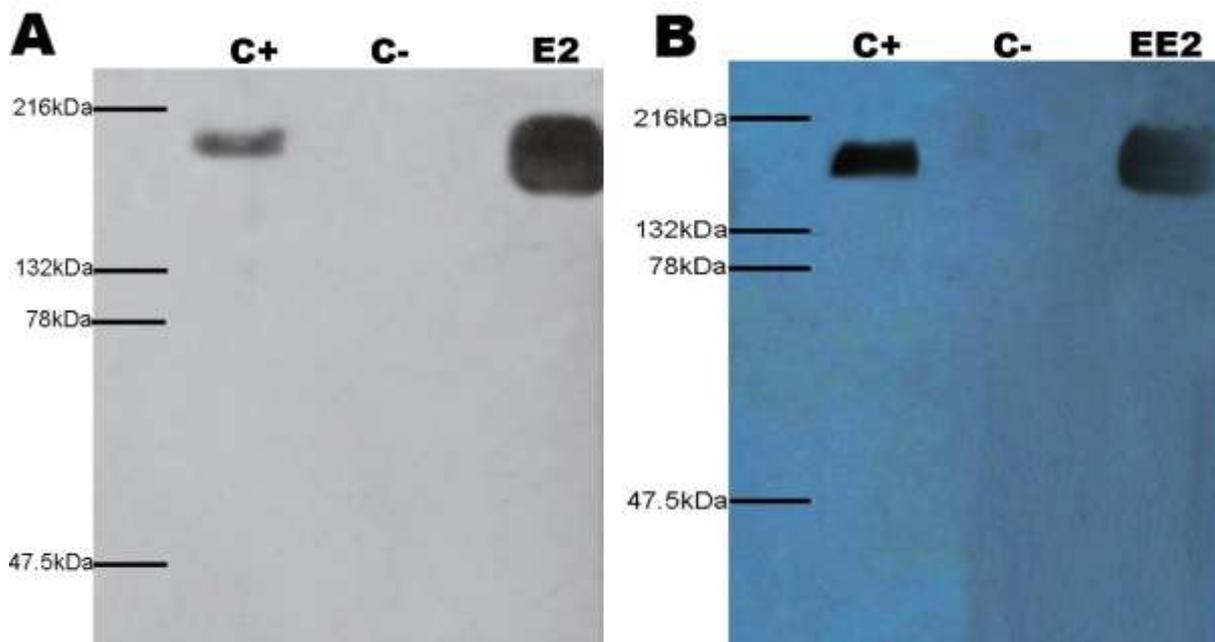
Nenhuma reação foi evidenciada na amostra de plasma de macho controle negativo (Figura 3 C-). O soro pré-imune, que foi incubado com uma amostra de C+, não demonstrou reação com nenhum antígeno do plasma (Figura 3 C+ PI), demonstrando que antes de ser imunizado o coelho não possuía anticorpos anti-vitelogenina.

A reação entre os anticorpos policlonais produzidos e as respectivas fontes de vitelogenina foi semelhante a reação produzida pelo anticorpo comercial anti-vitelogenina de *S. aurata* (Figura 4).



**Figura 3.** Reação de *western blot* utilizando o anticorpo anti-vitelogenina de *R. quelen*.

NOTA: C+: plasma de fêmeas; C-: plasma de macho; EE2: plasma de macho exposto a 10 mg EE<sub>2</sub>.kg<sup>-1</sup>; PI: reação com soro pré-imune; anti-VTG *R. quelen*: reação com o anticorpo anti-vitelogenina de *R. quelen*



**Figura 4.** Comparação entre as reações de *western blot* utilizando os anticorpos anti-vitelogenina de *Spaurus aurata* e *Rhamdia quelen*.

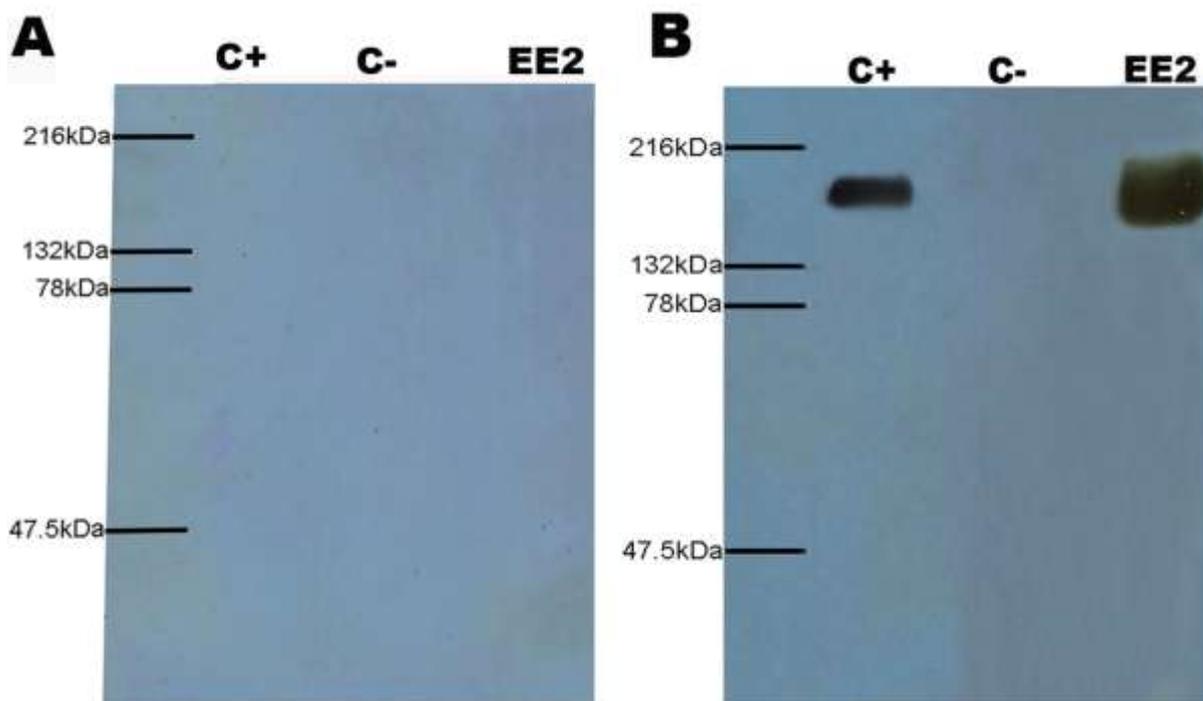
NOTA: A) Reação de *western blot* utilizando o anticorpo comercial anti-vitelogenina de *S. aurata* (Reação descrita e demonstrada no capítulo I). B) Reação de *western blot* utilizando os anticorpos policlonais anti-vitelogenina de *R. quelen*. C+: plasma de fêmea vitelogênica. C-: plasma de macho controle. E2: plasma de macho injetado com 10 mg  $E_2.Kg^{-1}$ . EE2: plasma de macho injetado com 10 mg  $EE_2.Kg^{-1}$ .

#### 4.3 ENSAIO DE BLOQUEIO

Para verificar a especificidade dos anticorpos policlonais foi realizado um ensaio de bloqueio. Este ensaio consistiu em fazer uma pré-incubação do soro contendo os anticorpos policlonais com o plasma de machos expostos ao estrógeno contendo grandes quantidades de vitelogenina. Após esta pré-incubação, este mesmo soro foi utilizado para reagir com amostras de plasma em um ensaio convencional de *western blot*.

Este ensaio demonstrou que os anticorpos policlonais produzidos são capazes de reconhecer especificamente a proteína presente no plasma de machos expostos ao estrógeno. Devido a este reconhecimento, os anticorpos foram bloqueados pela proteína e nenhuma reação foi observada ao reagir-se esta mistura com a vitelogenina de fêmeas e machos expostos ao estradiol (Figura 5 A C+ e EE2). Já os anticorpos que foram incubados de forma semelhante, porém não foram bloqueados com a proteína do plasma, reconheceram um antígeno específico de cerca de 200 kDa em machos estrógeno induzidos e fêmeas maduras (Figura 5 B

C+ e EE2). Nenhuma reação foi observada entre os anticorpos incubados e a amostra de plasma de macho controle. Tal ensaio demonstra que os anticorpos policlonais não são degradados durante o período de incubação e que a proteína é reconhecida pelos anticorpos presentes no soro do coelho imunizado.



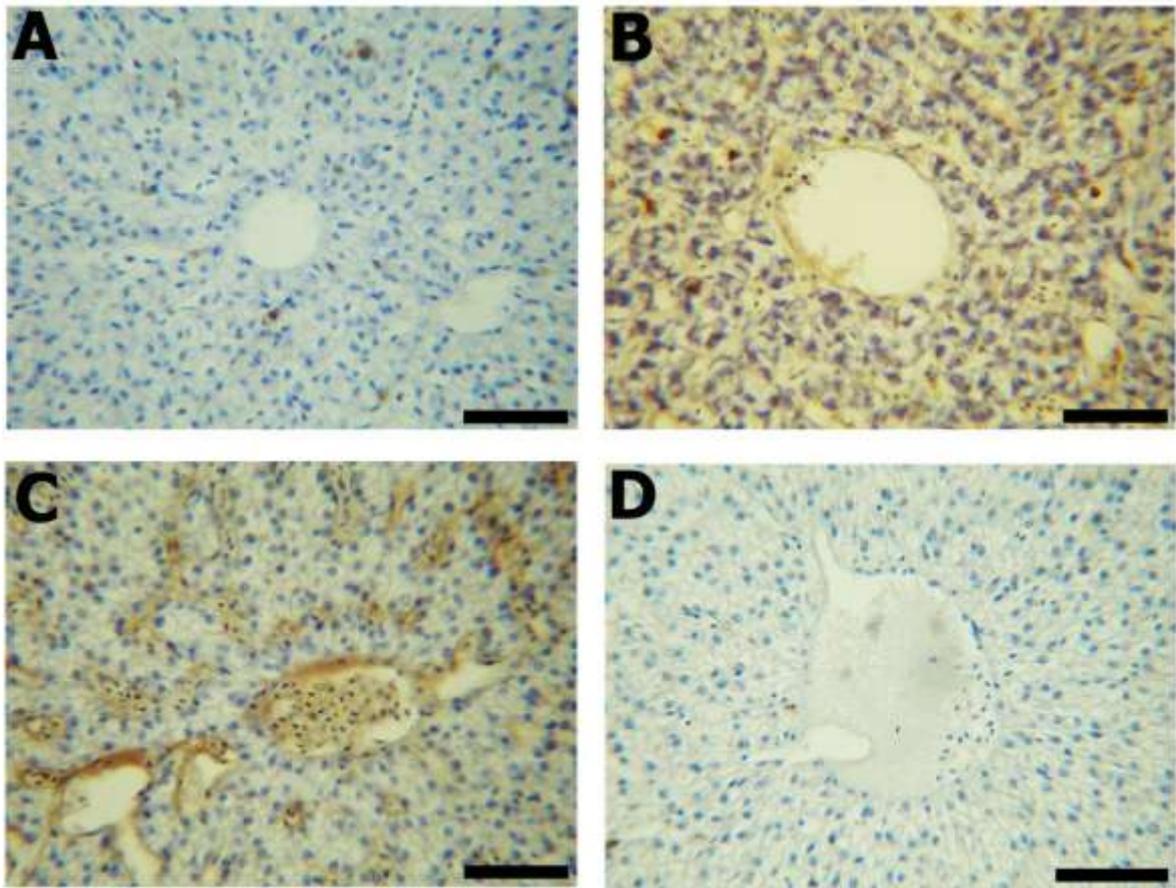
**Figura 5.** Ensaio de bloqueio.

NOTA: A) Reação entre o anticorpo anti-vitelogenina de *R. quelen* que foi bloqueado com 200 µg de proteínas totais do plasma. B) Reação entre o anticorpo anti-vitelogenina de *R. quelen* que não foi bloqueado pelas proteínas plasmáticas, mas que foi incubado nas mesmas condições do anticorpo que foi bloqueado, demonstrando que a incubação não afeta a eficiência do anticorpo. C+: amostra de plasma de fêmea vitelogênica; C-: amostra de plasma de macho; EE2: amostra de plasma de machos expostos a 10 mg EE<sub>2</sub>.kg<sup>-1</sup>.

#### 4.4 ENSAIO DE IMUNO-HISTOQUÍMICA

##### 4.4.1 Imuno-histoquímica de fígado

O soro policlonal produzido reconheceu um antígeno no fígado de fêmeas vitelogênicas e de machos expostos ao estradiol (Figura 6 B e C respectivamente). Tal reação ocorreu predominantemente na região dos vasos e sinusóides, o que já era de se esperar uma vez que a vitelogenina é produzida pelos hepatócitos e secretada para a corrente sanguínea. Não houve marcação em machos controle (Figura 6 A). Também não foi observada reação entre o soro pré-imune e amostras de fígado de fêmeas vitelogênicas (Figura 6 D).

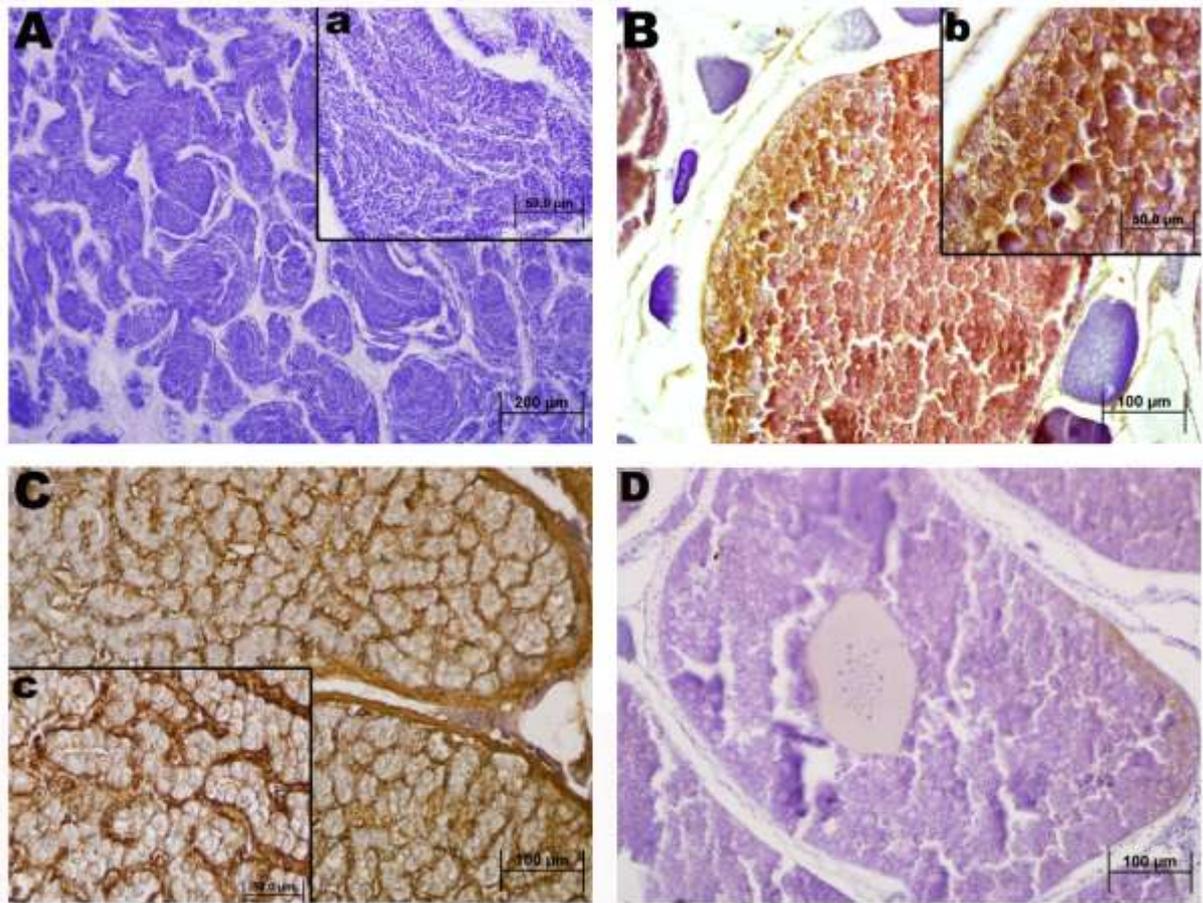


**Figura 6.** Imuno-histoquímica do fígado utilizando anticorpos policlonais anti-vitelogenina de *R. quelen*.

NOTA: A) Fígado de macho controle. B) Fígado de fêmea vitelogênica. C) Fígado de macho exposto ao EE<sub>2</sub>. D) Fígado fêmea vitelogênica reagindo com o soro pré-imune. As regiões marrons e/ou amareladas indicam a imuno-marcação para vitelogenina.

#### 4.4.2 Imuno-histoquímica de gônada

Na imuno-histoquímica das gônadas, os anticorpos policlonais produzidos reconheceram um antígeno dentro dos ovócitos de fase V em fêmeas vitelogênicas (Figura 7 B); as gônadas de macho expostos ao etinil-estradiol também apresentaram marcação, especialmente nas regiões dos septos que separam os túbulos (Figura 7 C). As gônadas de machos controle não se apresentaram imuno-reativas (Figura 7 A). Também não houve imuno-marcação para a vitelogenina presente nos ovócitos de fêmeas quando se utilizou o soro pré-imune (Figura 7 D).



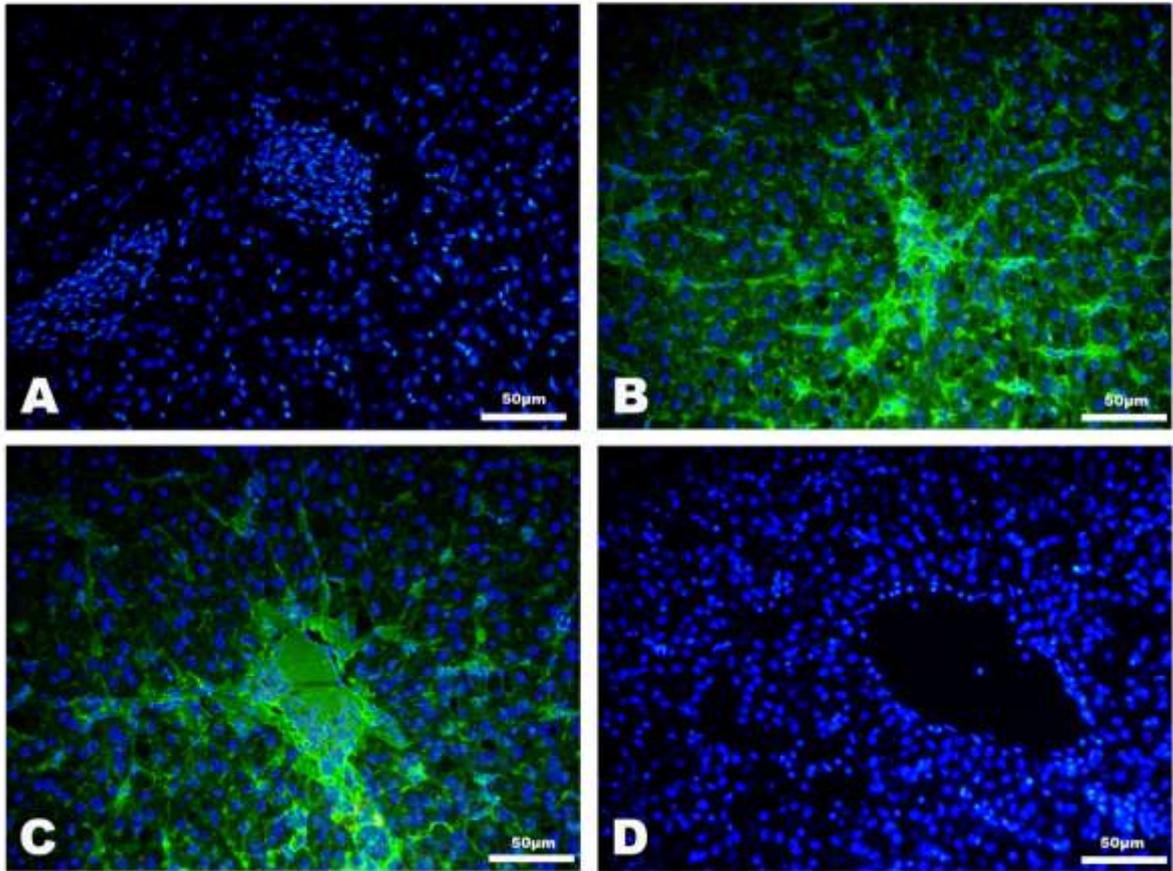
**Figura 7.** Imuno-histoquímica das gônadas utilizando anticorpos policlonais anti-vitelogenina de *R. quelen*.

NOTA: A) Testículo de macho controle. a) detalhe do testículo de macho controle. B) Ovário de fêmea vitelogênica. b) detalhe dos ovócitos. C) Testículo de macho exposto ao EE<sub>2</sub>. c) detalhe do testículo de macho expostos ao EE<sub>2</sub>. D) Ovário de fêmea vitelogênica reagindo com o soro pré-imune. As regiões marrons e/ou amareladas correspondem à imuno-marcação para vitelogenina.

## 4.5 ENSAIO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA

### 4.5.1 Imunofluorescência de fígado

O soro policlonal produzido reconheceu um antígeno no fígado de fêmeas vitelogênicas e de machos expostos ao estradiol (Figura 8 B e C respectivamente). Tal reação ocorreu predominantemente na região dos vasos e sinusóides. Não houve marcação em machos controle (Figura 8 A). Também não foi observada reação entre o soro pré-imune e amostras de fígado de fêmeas vitelogênicas (Figura 8 D).

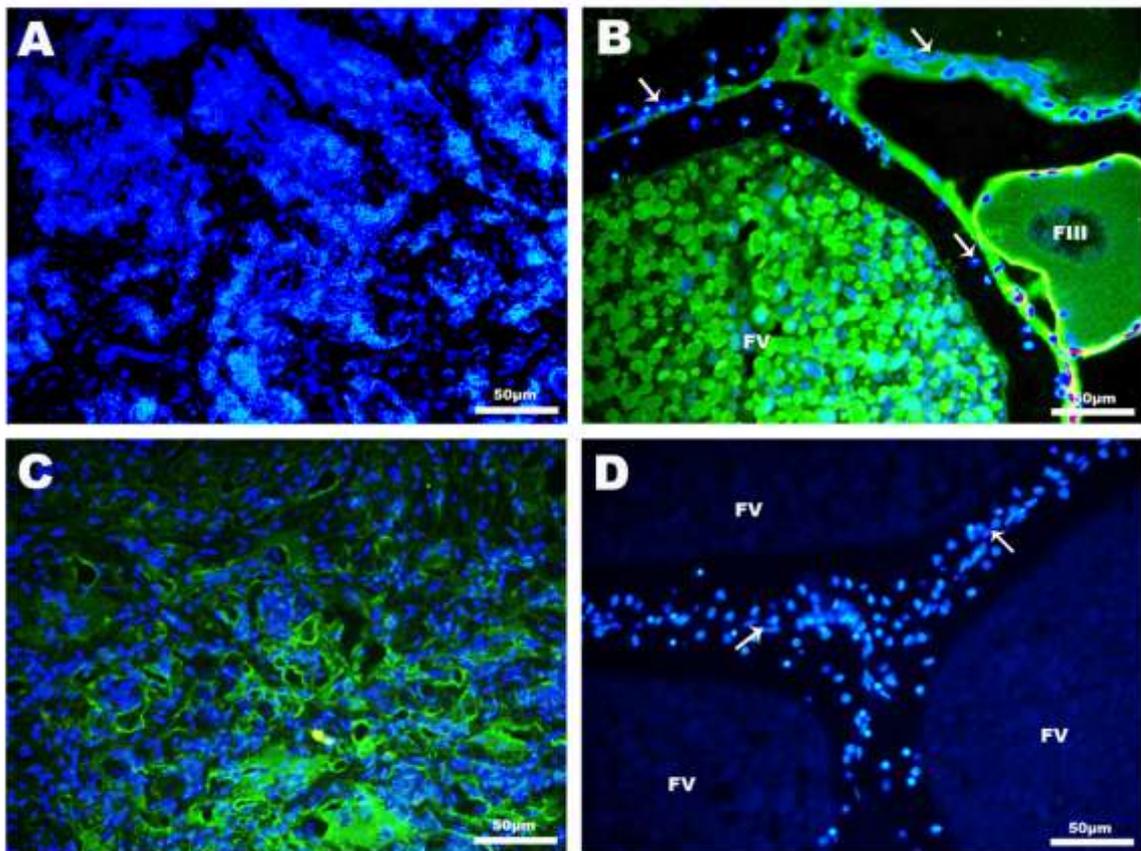


**Figura 8.** Imunofluorescência do fígado utilizando anticorpos policlonais anti-vitelogenina de *R. quelen*.

NOTA: A) Fígado de macho controle. B) Fígado de fêmea vitelogênica. C) Fígado de macho exposto ao EE<sub>2</sub>. D) Fígado de fêmea vitelogênica reagindo com o soro pré-imune. Os núcleos são marcados em azul pelo DAPI; já a vitelogenina é marcada em verde pelo fluoróforo FIT C presente no anticorpo secundário utilizado no ensaio.

#### 4.5.2 Imunofluorescência de gônada

Os anticorpos policlonais marcaram um antígeno nos ovócitos de fase V em fêmeas vitelogênicas (Figura 9 B). Também houve marcação difusa para vitelogenina nos testículos de machos expostos ao etinil-estradiol (Figura 9 C). Nenhum antígeno foi reconhecido nos testículos de machos controle (Figura 9 A). O soro pré-imune não evidenciou nenhum tipo de marcação em ovócitos de fêmeas (Figura 9 D).



**Figura 9.** Imunofluorescência das gônadas utilizando os anticorpos policlonais anti-vitelogenina de *R. quelen*.

NOTA: A) Gônada de macho controle. B) Gônada de fêmea vitelogênica; núcleo das células foliculares (→). C) Gônada de macho exposto ao EE<sub>2</sub>. D) Gônada de fêmea vitelogênica reagindo com o soro pré-imune; núcleo das células foliculares (→). Os núcleos são marcados em azul pelo DAPI; já a vitelogenina é marcada em verde pelo fluoróforo FIT C presente no anticorpo secundário utilizado no ensaio.

## 5. DISCUSSÃO

Embora hajam anticorpos anti-vitelogenina viáveis para várias espécies, o seu elevado custo inviabiliza sua aplicação em estudos de biomonitoramento. Por isto, é importante que laboratórios que fazem o uso de tais ferramentas em estudos de biomonitoramento produzam seus próprios anticorpos, uma vez que os mesmos serão mais viáveis economicamente e mais específicos para a espécie estudada (PRAKASH *et al.*, 2007).

Diversos autores têm produzido e testado tanto anticorpos mono quanto policlonais contra a molécula de vitelogenina (PRAKASH *et al.*, 2007; MOSCONI *et al.*, 1998; HOLBECH *et al.*, 2001; OHKUBO *et al.*, 2003; HERBST *et al.*, 2003). No entanto, a maioria deles utiliza estas ferramentas em estudos de efeitos estrogênicos apenas em laboratório ou *in vitro* (HENNIES *et al.*, 2003; BRAATHEN *et al.*, 2009; OHKUBO *et al.*, 2003). Embora neste capítulo os anticorpos não tenham sido utilizados no biomonitoramento, estes foram produzidos com tal intuito.

O primeiro passo descrito por Dreckhahn e colaboradores (1993), para a produção de anticorpos é a purificação do antígeno contra o qual se deseja produzir um anticorpo. Diversos autores têm utilizados diferentes métodos de purificação da molécula de vitelogenina presente no plasma a fim de prepará-la para a inoculação como antígeno. Mosconi e colaboradores (1998) purificaram a vitelogenina por cromatografia de tamanho seguida de cromatografia de troca iônica, no entanto o resultado obtido não foi satisfatório devido a degradação da proteína. Já Holbech e colaboradores (2001), utilizaram gel filtração associada a cromatografia de afinidade para a purificação da vitelogenina. Tais autores não conseguiram satisfatoriamente purificar a proteína e discutem que possivelmente isto tenha ocorrido devido a sua grande massa molecular. Ohkubo *et al.*, (2003), tentaram purificar a vitelogenina dos ovócitos de fêmeas vitelogênicas, alegando que esta fonte da proteína seria mais estável e portanto resistente a degradação. Tais autores não conseguiram purificar a vitelogenina a partir do tecido ovariano, uma vez que a mesma é clivada nos componentes do vitelo dentro dos ovócitos. Autores que utilizaram técnicas mais acuradas de isolamento de macromoléculas, tais como cromatografia líquida de alta performance, tiveram maior sucesso na purificação desta molécula (MAGALHÃES *et al.*, 2004; WUNSCHERL *et al.*, 2005). O presente trabalho utilizou uma metodologia pouco usada atualmente para a produção de anticorpos. A maioria dos autores isola

e purifica a proteína para então imunizar os animais. Neste trabalho a proteína não foi purificada, foi apenas separada das demais proteínas do plasma por SDS-PAGE, recortada do gel e então utilizada como imunógeno. Drenckhahn e colaboradores (1993) descrevem que tal técnica é eficaz, especialmente se a proteína em questão possuir um alto peso molecular, como é o caso da vitelogenina, e também caso a proteína seja sensível a degradação. Roubal e colaboradores (1997) relatam que a vitelogenina sofre degradação proteolítica ao ser purificada, mesmo que tal purificação seja acompanhada do uso de antiproteolíticos e se realize em baixas temperaturas. Os mesmos autores discutem que a degradação da vitelogenina ao ser purificada é devido ao seu alto peso molecular. Apesar de a molécula não ter sido purificada para a produção do soro policlonal, o mesmo mostrou-se altamente específico indicando que a purificação é desnecessária, ao menos para a vitelogenina de *R. quelen*.

Vários estudos analisados por Ball e colaboradores (1990) demonstraram que a variação da resposta em animais injetados com antígenos depende do sistema imunológico do próprio animal, via e calendário de imunização, formas de coleta de sangue e quantidade de antígeno imunizante injetado, sendo portanto essencial considerar estes fatores quando se pretende produzir um antissoro específico e com alta concentração de anticorpos.

O protocolo de imunizações seguido, utilizando 4 imunizações, 2 com cerca de 500µg de VTG e 2 de 250 µg de VTG, em intervalos de 15 dias, mostrou-se eficiente uma vez que os anticorpos gerados se mostraram específicos e em alta concentração no soro. Segundo Gibbs e Harrison (1976) são produzidos mais anticorpos para determinada quantidade de imunógeno quando este é dividido e injetado em pequenas quantidades durante determinado período de tempo do que quando é todo administrado numa só injeção. Por outro lado, a quantidade injetada deve ser tão pequena quanto possível, de forma a minimizar tanto reações indesejadas com contaminantes ou componentes menores como a indução à tolerância (BALL *et al.*, 1990; TORRANCE, 1992).

A concentração de um antissoro não é diretamente proporcional à quantidade de imunógeno introduzida; a resposta é do tipo acréscimo decrescente, ou seja, a medida que o tempo passa menor quantidade de antígeno é necessária para levar a uma maior produção de anticorpos. Embora quantidades de pelo menos 1 mg de antígeno sejam normalmente injetadas de cada vez, existem provas de que

quantidades de 50-100 µg podem ser suficientes para induzir uma resposta imunológica satisfatória (TORRANCE, 1992), sendo que no presente trabalho a quantidade utilizada mostrou resposta imunológica do coelho satisfatória.

Segundo Bercks *et al.*, (1972), duas injeções intramusculares dadas com uma semana de intervalo podem iniciar um processo de imunização a longo prazo comparável ao induzido por um maior número de injeções intravenosas. O soro obtido após injeções intramusculares permanece inalterado no animal por longos períodos. Já Segundo Ball (1974), injeções intravenosas na veia marginal da orelha do coelho dão normalmente origem a um soro mais diluído do que quando a mesma quantidade de antígeno é injetada no músculo da coxa.

Do que foi dito anteriormente, a forma mais eficiente de produzir um antissoro policlonal de alta concentração usando coelhos é injetando-se quantidades moderadas de imunógeno (até 1 mg) a intervalos de tempo relativamente longos, via intramuscular, conforme foi o procedimento realizado no presente trabalho.

A forma como é coletado o soro imune afeta não só a qualidade do mesmo, mas pode interferir severamente na saúde do animal envolvido. Em coelhos, o sangue pode ser obtido pelas vias cardíaca, arterial e venal (BALL *et al.*, 1990). Por punção cardíaca, é possível recolher 10 a 20 ml de sangue em apenas 15 a 30 segundos, a intervalos semanais. Este procedimento não provoca, normalmente, nenhum dano à saúde do animal, mas envolve a necessidade de recorrer a anestesia (GIBBS e HARRISON, 1976; BALL *et al.*, 1990). Menores riscos para a saúde do animal estão envolvidos quando se procede uma coleta de sangue venal ou arterial. No primeiro caso, é usada a veia marginal da orelha, enquanto no segundo se procede à sangria a partir da artéria central (BALL *et al.*, 1990). O princípio seguido é semelhante em ambos os casos. No presente trabalho optou-se pela coleta a partir da veia auricular marginal, o que forneceu uma quantidade significativa de sangue (cerca de 10 ml). Tal forma de coleta, além de fornecer um soro isento de interferentes provenientes de hemácias hemolisadas, não causa dano a saúde do animal. Contudo o mesmo animal não deverá ser utilizado para inocular um novo antígeno, uma vez que o mesmo foi manipulado de forma a responder especificamente para o antígeno com o qual foi inoculado.

A obtenção do soro segue protocolos variáveis (BERCKS *et al.*, 1972; GIBBS e HARRISON, 1976; VAN REGENMORTEL, 1982; CLAUSEN, 1988; BALL *et al.*, 1990), mas todos com a mesma finalidade: formar um coágulo e separá-lo do

restante das células sanguíneas. Neste trabalho o protocolo de obtenção do soro utilizado mostrou-se satisfatório, uma vez que permitiu a obtenção de um antissoro limpo, com ausência de interferentes celulares e com uma alta concentração de imunoglobulinas.

Quando armazenados corretamente, os antissoros permanecem ativos durante vários anos (GIBBS e HARRISON, 1976). A forma mais simples de armazenamento e que foi realizada no presente trabalho, é o congelamento a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Tal forma de armazenamento mostrou-se eficaz, uma vez que quando foram descongeladas, as imunoglobulinas permaneceram ativas. Outros autores utilizam protocolos de armazenamento a  $4^{\circ}\text{C}$  com aditivos antissépticos (CLAUSEN, 1988). Para este efeito a azida de sódio e metiolato são os antissépticos mais mencionados na bibliografia (BERCKS *et al.*, 1972; GIBBS e HARRISON, 1976; VAN REGENMORTEL, 1982; CLAUSEN, 1988; BALL *et al.*, 1990). Contudo, Clausen (1988) chama a atenção para a possibilidade de efeitos adversos como inibição da atividade das imunoglobulinas quando se usa antissépticos em reagentes imunoquímicos. Gibbs e Harrison (1976), bem como Drenckhahn e colaboradores (1993), consideram que a forma mais simples e eficaz de armazenamento dos antissoros é a sua congelação a  $-20^{\circ}\text{C}$  em pequenas ampôlas ou liofilização (i.e, secagem em vácuo enquanto congelados e armazenamento também em vácuo).

Estudos efetuados por Drenckhahn *et al.* (1993) consideram também que congelamentos e descongelamentos repetidos não têm, aparentemente, qualquer efeito negativo, embora durante o desenvolvimento do presente estudo, uma vez descongelada uma alíquota esta era mantida a  $4^{\circ}\text{C}$  para o uso. Ball *et al.* (1990) têm, em relação a este aspecto, opinião oposta, considerando que a repetição destas operações deve ser evitada, caso ao antissoro não tenha sido adicionado glicerol que previne a quebra de crioproteínas.

A maioria dos autores produz anticorpos a fim de testá-los apenas por *western blot* e/ou ELISA (HERBEST *et al.*, 2003; OHKUBO *et al.*, 2003; PRAKASH *et al.*, 2007). A técnica de *western blot* é conhecidamente a mais utilizada para testar um anticorpo produzido. Caso esta técnica dê um bom resultado então se procede a padronização do ensaio de ELISA. A maioria dos autores testa os anticorpos por eles produzidos por ELISA, por esta ser uma técnica quantitativa (BRAATHEN *et al.*, 2009; HENNIES *et al.*, 2003). No presente trabalho não foi possível proceder-se a padronização de um ensaio de ELISA uma vez que não possuíamos nem o antígeno

e nem o anticorpo puros. Embora o ensaio de ELISA possa ser realizado com o soro total, a maioria dos autores purifica as IgGs, e quando estas não são purificadas, ao menos o antígeno de interesse é purificado, permitindo que se mensure a concentração do mesmo em uma amostra desconhecida a partir da comparação com uma curva de concentrações conhecidas. Apesar de repetidas tentativas para a obtenção do antígeno puro, não houve sucesso, devido às dificuldades de purificação da vitelogenina em função da sua massa molecular. Realizou-se também a purificação das imunoglobulinas do soro obtido, a fim de se obter apenas IgGs e desta forma poder-se padronizar um ensaio de ELISA. Neste caso também não se obteve sucesso, uma vez que as imunoglobulinas perderam a capacidade de reconhecer a molécula de vitelogenina após a purificação. Alternativamente os anticorpos produzidos anti-vitelogenina de *R. quelen* foram testados por *western blot*, imuno-histoquímica e imunofluorescência. Todos os testes realizados mostraram resultados satisfatórios, no qual o anticorpo produzido reagiu de forma muito semelhante ao anticorpo comercial.

O teste de *western blot* utilizou o anticorpo produzido numa diluição de até 1:35000-1:40000, sem perder sua especificidade. Quando se compara esta diluição a diluição do anticorpo comercial (1:750), verifica-se que a questão intra-específica é significativa para espécies distantes filogeneticamente. Embora esta comparação esteja desconsiderando diversos fatores sobre o anticorpo comercial, tais como a concentração de IgGs no mesmo, verifica-se que anticorpo anti-vitelogenina de *R. quelen* apresentou-se muito mais específico para a vitelogenina desta espécie do que o anticorpo anti-vitelogenina de *S. aurata*, uma vez que o segundo é específico para a vitelogenina de *S. aurata*.

O ensaio de bloqueio pode ser usado quando se deseja validar eficácia e especificidade de um anticorpo produzido. Isto por que ao reagir-se o anticorpo com uma amostra de contenha a proteína que ele reconhece, o mesmo irá se ligar a ela e não ocorrerá reação quanto este anticorpo bloqueado for incubado com uma membrana contendo a proteína em questão. Embora neste trabalho o anticorpo tenha sido produzido a partir da proteína desnaturada, a reação entre o anticorpo e a vitelogenina presente no plasma de machos injetados com EE<sub>2</sub> mostrou que o anticorpo é capaz de reconhecer a proteína nativa presente no plasma dos mesmos. Provavelmente o anticorpo tem maior afinidade pela proteína desnaturada, mas como a proteína nativa encontra-se em altas concentrações no plasma, esta foi

capaz de reagir completamente com o mesmo, imedindo que posteriormente o anticorpo reconhecesse a mesma proteína desnaturada no ensaio de *western blot*.

Quando se comparam as técnicas de imuno-histoquímica e imunofluorescência, observa-se que na primeira o anticorpo produzido foi utilizado numa diluição de 1:3000; já na segunda o anticorpo produzido foi utilizado 1:300, ou seja dez vezes mais concentrado. A diferença na concentração dos anticorpos utilizados nestas duas técnicas se deve ao fato de que o anticorpo foi produzido contra a proteína desnaturada e na técnica de imuno-histoquímica as proteínas são desnaturadas durante o processo de fixação; já a imunofluorescência preserva parcialmente a estrutura nativa das proteínas, logo o anticorpo teve mais dificuldade de reconhecer esta estrutura e precisou ser utilizado mais concentrado. Embora houvesse a necessidade de concentrar o anticorpo num dos ensaios, o mesmo mostrou-se específico e reconheceu a vitelogenina tanto em fígado quanto nas gônadas, com resultado semelhante ao observado para o anticorpo comercial.

O teste sorológico de imunoprecipitação também foi realizado, porém não se obteve um resultado satisfatório, uma vez que a vitelogenina precipitou após ser armazenada a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Não foram encontrados na literatura outros estudos que tentassem realizar tal teste. Possivelmente a vitelogenina é uma proteína e que precipita após congelamento e descongelamento, inviabilizando este tipo de ensaio. Para solucionar este problema sugere-se realizar o ensaio logo após a coleta do plasma do animal, pois desta forma o material não precisa ser congelado para o armazenamento evitando a precipitação da vitelogenina.

A obtenção de um anticorpo funcional e específico para a detecção da VTG, que emprega uma metodologia de baixo custo em sua produção, torna tal ferramenta amplamente útil no monitoramento de regiões contaminadas por desreguladores endócrinos. O uso de um anticorpo que detecte um biomarcador presente no plasma também torna desnecessário o sacrifício do animal, uma vez que o sangue pode ser coletado sem maiores danos ao organismo e sem grandes impactos ao ecossistema.

Desta forma o presente trabalho disponibilizou uma ferramenta de extrema utilidade em estudos de biomonitoramento da presença de desreguladores endócrinos e que pode ser utilizada para mensurar a vitelogenina em inúmeras amostras, dada a quantidade de anticorpo produzida e a alta concentração dos mesmos.

## 6. CONCLUSÕES

✓ O hormônio sintético  $17\alpha$ -etinil-estradiol foi capaz de induzir a super-expressão da vitelogenina em machos de *R. quelen*.

✓ Os anticorpos policlonais produzidos para *R. quelen*, mesmo sem a purificação da VTG, mostraram-se tão específicos quanto o anticorpo comercial, evidenciando que a purificação não é necessária para a produção dos mesmos.

✓ O resultado obtido para os ensaios de *western blot*, imunohistoquímica e imunofluorescência foram satisfatórios e semelhantes aos mesmos resultados obtidos por tais ensaios utilizando o anticorpo comercial.

✓ O ensaio de bloqueio demonstrou que o anticorpo reconhece de maneira específica a vitelogenina.

✓ A metodologia aplicada na produção dos anticorpos policlonais, produz uma grande quantidade de anticorpos e tem um baixo custo, o que permite seu uso futuro no biomonitoramento.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, K. A.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. 6.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.
- BALL, E.; HAMPTON, R.; DE BOER, S.; SHAAD, N. **Polyclonal antibodies**. St Paul, Minnessota: APS Press, 1990. p.33-54.
- BERCKS, R.; KOENIG, R.; QUERFURTH, G. Plant Virus Serology, In: AGRAWAL, K.; REINHOLD, V. **Principles and Techniques in Plant Virology**. 1972. p.467-490.
- BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. **Anal. Biochem.**v.72, p.248–254, 1976.
- BRAATHEN, M.; MDEGELA, R. H.; CORREIA, D.; RUNDBERGET, T.; MYBURGH, J.; BOTHA, C.; SKAARE, J. U.; SANDVIK, M. Vitellogenin in African sharp-toothed catfish (*Clarias gariepinus*): purification, characterization, and ELISA development. **J. Toxicol. Environ. Health A**. v.72, p.173-183, 2009.
- CALICH, V.; VAZ, C. **Imunologia**. 2.ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2009.
- CARRERA, E. P.; GARCÍA-LÓPEZ, A.; RIO, M. P. M.; MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, G.; SOLÉ, M.; MANCERA, J. M. Effects of 17 $\beta$ -estradiol and 4-nonylphenol on osmoregulation and hepatic enzymes in gilthead sea bream (*Sparus auratus*). **Compar. Biochem. Physiol. C**. v.145, n.3, p.210-217, 2007.
- CLAUSEN, J. **Immunochemical techniques for the identification and estimation of macromolecules**. 1.ed. Netherlands: Elsevier Science Publishers (Biochemical Division), 1988. 464 pp.
- CONROY, P. J.; HEARTY, S.; LEONARD, P.; O'KENNEDY, J. R. Antibody production, design and use for biosensor-based applications. **Sem. Cell Develop. Biol.**v.20, p.10-26, 2009.
- DESFORGES, J. P. W.; PEACHEY, B. D. L.; SANDERSON, P. M.; WHITE, P. A.; BLAIS, J. M. Plasma vitellogenin in male teleost fish from 43 rivers worldwide is correlated with upstream human population size. **Environ. Pollut.** v.158, n.10, p.3279-3284, 2010.
- DRENCKHAHN, D.; JONS, T.; SCHMITZ, F. **Production of polyclonal antibodies against proteins and peptides**. London: Academic Press, 1993.
- FOX, R. **Principles of Diagnostic Techniques in Plant Pathology**. 1.ed. United Kingdom: CAB INTERNATIONAL, 1993. 213 pp
- GIBBS, A.; HARRISON, B. **Plant Virology**. 1.ed. London: Edward Arnold Ltd, 1976. 292 pp.
- HENNIES, M.; WIESMANN, M.; ALLNER, B.; SAUERWEIN, H. Vitellogenin in carp (*Cyprinus carpio*) and perch (*Perca fluviatilis*): purification, characterization and development of an ELISA for the detection of estrogenic effects. **Sci. Total Environm.** v.309, p.93-103, 2003.
- HERBST, L. H.; SICONOLFI-BAEZ, L.; TORELLI, J. H.; KLEIN, P.A.; KERBEN, M. J.; SCHUMACHER, I. M. Induction of vitellogenesis by estradiol-17 $\beta$  and development of enzyme-linked immunosorbent assays to quantify plasma vitellogenin levels in green turtles (*Chelonia mydas*). **Comp. Biochem. Physiol. B**. v.135, n.3, p.551-563, 2003.
- HOCK, B.; SEIFERT, M.; KRAMER, K. Engineering receptors and antibodies for biosensors. **Biosens Bioelectron.** v.17, n.3, p.239-249, 2002.

HOLBECH, H.; ANDERSEN, L.; PETERSEN, G. I.; KORSGAARD, B.; PEDERSEN, K. L.; BJERREGAARD, P. Development of an ELISA for vitellogenin in whole body homogenate of zebrafish (*Danio rerio*). **Comp. Biochem. Physiol. C.** v. 130, n.1, p.119-131, 2001.

JANEWAY, C. A.; TRAVERS, P.; WALPORT, M.; SHLOMCHIK, M. **Imunobiologia**. 5.ed. Porto Alegre: Artmed, 2002.

KÖHLER, G.; MILSTEIN, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. **Nature**. v.256,p.495-497. 1975.

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

MAGALHÃES, I.; LEDRICH, M. L.; PIHAN, J. C.; FALLA, J. One-step, non-denaturing purification method of carp (*Cyprinus carpio*) vitellogenin. **J. Chromatography B**. v.799, n.1, p.87-93, 2004.

MATTHEWS, R. **Plant Virology**. 3. ed. New York: Academic Press, 1991.835 pp.

MERNAUGH, R.,; MERNAUGH, G.; KOVACS, G. The immune response: antigens, antibodies, antigen-antibodies interactions. In HAMPTON, E., BALL, S. **Serological methods for detection and identification of viral and bacterial pathogens - a laboratory manual**. St. Paul, Minnessota: APS Press, 1990. p.4-35.

MOSCONI, G.; CARNEVALI, O.; CARLETTA, R.; NABISSI, M.; POLZONETTI-MAGNI, A. M. Gilthead Seabream (*Sparus aurata*) Vitellogenin: Purification, Partial Characterization, and Validation of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). **Gen. Comp. Endocrinol.** v.110, n.3, p.252-261, 1998.

MOURA-COSTA, D.D.; FILIPAK NETO, F.; COSTA, M. D. M.; MORAIS, R. N.; GARCIA, J. R. E.; ESQUIVEL B. M.; OLIVEIRA RIBEIRO, C. A. Vitellogenesis and other physiological responses induced by 17- $\beta$ -estradiol in males of freshwater fish *Rhamdia quelen*. **Comp Biochem Physiol. C.** v.151, p.248-257, 2010.

OHKUBO, N.; MOCHIDA, K.; ADACHI,S.; HARA, A.; HOTTA, K.; NAKAMURA, Y.; MATSUBARA, T. Development of enzyme-linked immunosorbent assays for two forms of vitellogenin in Japanese common goby (*Acanthogobius flavimanus*). **Gen. Comp. Endocrinol.** v.131, n.3, p.353-364, 2003.

PARAKASH, O.; GOSWAMI, S. V.; SEHGAL, N. Establishment of ELISA for murrel vitellogenin and choriogenin, as biomarkers of potential endocrine disruption. **Comp. Biochem. Physiol. C.** v.146, n.4, p.540-551, 2007.

ROUBAL, W. T.; LOMAX, D. L.; WILLIS, M. L.; JOHNSON, L. L. Purification and Partial Characterization of English Sole (*Pleuronectes vetulus*) Vitellogenin. **Comp. Biochem. Physiol. B.** v.118, p.613-622, 1997.

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

TORRANCE, L. Serological methods to detect plant viruses: production and use of monoclonal antibodies. In: DUNCA, J. M.; TORRANCE, L. **Techniques for the rapid detection of plant pathogens**, Blackwell Scientific Publications, 1992, p.7-33.

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

WISTREICH, G.; LECHTMAN, M. **Microbiology**. 5. ed. New York: Macmillan Publishing Company, 1988. 916 pp.

WUNSCHER, D.; SCHULTZ, I.; SKILLMAN, A.; WAHL, K. Method for detection and quantification of fathead minnow vitellogenin (Vtg) by liquid chromatography and matrix-assisted-laser-desorption/ionization mass spectrometry. **Aquat. Toxicol.** v.73, p.256-267, 2005.

### CAPÍTULO III

**Aplicação de anticorpos policlonais anti-vitelogenina de *Rhamdia quelen* no biomonitoramento da qualidade da água de reservatórios de abastecimento urbanos.**

## RESUMO

O crescente aumento populacional leva a um aumento pela demanda hídrica. De forma paradoxal intensificam-se os despejos urbanos, industriais e agrícolas em corpos hídricos, aumentando a concentração de diversas classes de poluentes nestes ambientes. A presença de poluentes desreguladores endócrinos em reservatórios de água utilizados para abastecimento urbanos é alarmante uma vez que são conhecidos os efeitos deletérios de tais poluentes sobre a fauna e sobre o próprio homem. Frente a tal cenário o objetivo deste capítulo foi biomonitorar a presença de desreguladores endócrinos nos reservatórios de abastecimento urbano do Iraí e do Passaúna, que abastecem Curitiba e Região Metropolitana. Para tanto indivíduos juvenis da espécie *R. quelen* foram expostos por um período de 3 e 6 meses em ambos os reservatórios. Para detectar a presença de desreguladores endócrinos nestes ambientes foi utilizada a expressão da vitelogenina em machos como biomarcador. A detecção desta molécula foi feita através de ensaios de *western blot* nos quais foram empregados os anticorpos policlonais previamente produzidos. Os ensaios demonstraram a presença da vitelogenina em fêmeas de ambos os reservatórios e em ambas as coletas, mas não em machos. Tais resultados nos levam a concluir que, para esta espécie, a quantidade de desreguladores endócrinos biodisponível não é capaz de induzir a expressão da vitelogenina em machos, numa concentração detectável pelo método utilizado.

## 1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

De acordo com o Relatório Estado do Mundo produzido pelo Worldwatch Institute (WWI) (2010) “*Os últimos cinco anos testemunharam uma mobilização sem precedentes em termos de esforços no combate ao avanço da crise ecológica mundial. Desde 2005, milhares de novas políticas governamentais foram implementadas, centenas de bilhões de dólares foram investidos em negócios e infraestrutura ecológicos, cientistas e engenheiros aceleraram enormemente o desenvolvimento de uma nova geração de tecnologias “verdes” e os meios de comunicação de massa converteram problemas ambientais em uma preocupação preponderante*”. Tais esforços, no entanto não conseguiram ainda garantir o avanço desenfreado e irresponsável do homem em deteriorar talvez o bem mais precioso e necessário de todos: a água.

O acentuado crescimento populacional provoca um aumento na demanda de água para abastecimento, ao mesmo tempo em que de forma paradoxal intensificam-se também os despejos de esgotos urbanos, industriais e agrícolas em rios, lagos, bacias e mananciais pela atividade antrópica desordenada e inconsequente. Tais formas de poluição, pontuais e difusas, acarretam muitas vezes na degradação completa de ecossistemas aquáticos, com prejuízos muitas vezes irreversíveis à qualidade da água tornando-a imprópria para o abastecimento público. Sendo assim, tornam-se necessários ainda investimentos não apenas para a manutenção da qualidade deste recurso, mas também para a avaliação da qualidade do mesmo em diferentes regiões do planeta e regionalmente no Brasil, com vistas a garantir a utilização segura deste bem (ANDREOLI *et al.*, 2005).

O Brasil, assim como a maioria dos países, é deficiente em recursos que previnam e tratem os problemas causados pelo despejo de resíduos tóxicos no ambiente. Contudo a preocupação crescente em encontrar meios que contenham a poluição ainda em níveis iniciais e evitar seu contato com a população fez crescer, a partir de 1950, as pesquisas em tecnologias para a prevenção da contaminação ambiental (GOLDFARB *et al.*, 1998).

Os efeitos das atividades humanas sobre o ambiente representam uma grande preocupação para as autoridades. A contaminação ambiental por compostos químicos é a consequência direta do rápido processo de industrialização, do crescimento agrícola, da mineração, da emissão de poluentes orgânicos entre

outros, representando um grande risco para o ambiente e para a saúde humana. Estes compostos orgânicos estranhos que são liberados pelas comunidades urbanas e industriais recebem o nome de xenobióticos e geralmente são nocivos a saúde dos organismos (SANTOS, 1998).

### 1.1 RESERVATÓRIOS DE ABASTECIMENTO URBANOS

Com a crescente demanda por água potável, torna-se cada vez mais necessário avaliar a qualidade da mesma. Os reservatórios de abastecimento urbano encontram-se sob forte ação antrópica, sendo que esta ação afeta direta ou indiretamente a qualidade da água. Despejos urbanos, industriais e até agrícolas são frequentes em regiões de mananciais, podendo desestabilizar todo o ecossistema da área impactada (GOLDFARB *et al.*, 1998).

Para reverter esta situação, é preciso adotar um modelo de gestão de recursos hídricos que promova um desenvolvimento sustentável, aliando o crescimento econômico à preservação ambiental. No Brasil, um passo importante foi dado neste sentido com a aprovação da Lei Federal nº 9433 em 1997, que instituiu a Política Nacional de Recursos Hídricos e criou o Sistema Nacional de Gerenciamento de Recursos Hídricos (ANDREOLI *et al.*, 2000). Para a manutenção sustentável do recurso água é necessário o desenvolvimento de instrumentos gerenciais de proteção, planejamento e utilização, adequando o planejamento urbano de acordo com a vocação natural do sistema hídrico (SANTOS, 1998).

Os corpos de água do Território Nacional, em função dos seus usos, possuem critérios de utilização estabelecidos pela Legislação Ambiental vigente. Desta forma, a água destinada ao consumo humano tem sua qualidade estabelecida pela Portaria 1469/2000 do Ministério da Saúde. Lagos e reservatórios são partes integrantes das Bacias Hidrográficas e por suas características hidrodinâmicas podem reter diversas substâncias em seu ciclo produtivo, tendo como consequência não só um aumento na taxa de produção primária de fitoplâncton, originando o processo denominado eutrofização, mas também um acúmulo de poluentes, especialmente os hidrofóbicos (VOLLENWEIDER, 1989).

Os reservatórios têm função de armazenamento de água, de regularização das vazões, além de proporcionar maior altura de queda de água para geração de energia. No entanto, estes têm sido utilizados para outras finalidades, destacando-se

lazer, captação de água e navegação. Embora o Brasil tenha imensa área de reservatórios, em todas as suas regiões, as informações sobre a qualidade da água dos mesmos estão escassas (VELINI *et al.*, 2003; BRITO, 2010).

A preservação, conservação e a utilização dos recursos naturais, especificamente os recursos hídricos é um desafio latente no atual contexto urbano brasileiro e mundial. Um dos problemas ambientais que ocorre nas bacias hidrográficas próximas às regiões metropolitanas, é o uso desordenado e ocupações ilegais da terra, possibilitando alterações no ambiente fluvial, assoreamento, erosão, poluição das águas dentre outros, que resultam no comprometimento da qualidade de vida da população local (MARICATO, 1995). O caso da região metropolitana de Curitiba-PR, não foge à regra, pois se trata de uma das aglomerações urbanas brasileiras que mais cresceu na década de 1990, trazendo para a realidade a questão do planejamento e utilização dos recursos hídricos, não como um fato municipal isolado, mas como um desafio regional integrado que sobrepõem as malhas administrativas dos municípios (MOURA e ULTRAMARI, 1994).

#### 1.1.1 Reservatórios de abastecimento de Curitiba e Região metropolitana

Diversos estudos estão sendo desenvolvidos para definir a capacidade de abastecimento de água da Região Metropolitana de Curitiba (RMC), principalmente em função do elevado crescimento populacional registrado na mesma nas últimas décadas e, a conseqüente preocupação em garantir o abastecimento de água para a população. Andreoli *et al.* (2000) traçaram alguns cenários de disponibilidade hídrica dos mananciais da RMC para os próximos 50 anos. No cenário de manutenção da disponibilidade hídrica atual, os mananciais disponíveis serão suficientes até o ano 2050 para o crescimento mínimo populacional e até o ano de 2040 para o máximo. Em condições de ausência de programas efetivos de conservação, os mananciais acima referidos estariam esgotados entre os anos de 2030 e 2035 para o máximo crescimento populacional, e entre 2035 e 2040 para as projeções de mínimo crescimento populacional.

Em levantamento realizado sobre a visão das Companhias de Saneamento em relação à conservação de mananciais, LARA *et al.* (1999) identificaram que embora a maioria dos entrevistados (23 de um universo de 27 empresas) considerem a questão importante e necessária, apenas 12 companhias possuem

algum tipo de programa para a conservação de mananciais que incluem desde projetos de despoluição até planos de ação integradas entre órgãos. As demais empresas relataram não possuírem programas específicos, sendo que destas, apenas uma empresa estava iniciando um diagnóstico ambiental e plano de conservação de mananciais. Esta informação demonstra a forma como os recursos hídricos estão sendo tratados apesar da existência de uma Política Nacional de Recursos Hídricos. Neste sentido vale ainda ressaltar que são poucos os estados que instituíram sua política Estadual sobre o tema e implantaram as medidas nela previstas.

No Estado do Paraná, segundo SANTOS (1998) algumas iniciativas já existiram no sentido de se tratar das questões de recuperação e/ou conservação de mananciais, mas por dificuldades de articulação entre instituições ou de recursos financeiros, não foram levadas a termo. Atualmente, a SANEPAR possui um Programa de Conservação de Mananciais que tem por objetivo a implementação de ações estruturais e não estruturais visando a melhoria da qualidade das águas dos mananciais de abastecimento público e sua manutenção.

Apesar da importância desses reservatórios do ponto de vista de abastecimento de água para a população de Curitiba e RMC, não existem estudos físicos, químicos e biológicos associados e completos que indiquem a qualidade de água desses sistemas, tornando-os desconhecidos para a comunidade científica (IAP, 2009). Dentro deste contexto ressalta-se a importância dos estudos de qualidade de água e a necessidade de um manejo adequado das bacias hidrográficas, para se garantir água de boa qualidade tanto para o presente, como para as gerações futuras (ANDREOLI *et al.*, 2005).

Com uma área de 123 km<sup>2</sup> a sub-bacia do Iraí faz parte da bacia do Altíssimo Iguaçu, que possui 565 km<sup>2</sup> e abriga, além da captação de água do Iraí, a captação de água do Iguaçu. É protegida por meio de uma Área de Proteção Ambiental – APA, através do Decreto Estadual n<sup>o</sup>. 1753 de 06/05/93. A proximidade das cidades da Região Metropolitana define um grande potencial de urbanização deste reservatório. A construção do Contorno Leste é um dos principais fatores de pressão nesta área, por cortar transversalmente a bacia à montante da barragem. Para evitar riscos ambientais maiores, o Estudo de Impacto Ambiental da obra, definiu que esta estrada seria classe zero, o que impede a construção de alças de ligação no trecho do reservatório. Além da ampliação dos riscos de acidentes, a

construção dessa estrada levou a uma ocupação desordenada da região. Pelas características ambientais da barragem do Iraí, que tem uma profundidade média de apenas 6 metros e que foi inaugurada há apenas 12 anos, há riscos de eutrofização. Por esta razão apesar da rigorosa limpeza da área, prévia ao enchimento do reservatório, é necessária a criteriosa observação de cuidados para evitar o lançamento de nutrientes através de qualquer tipo de esgoto (ANDREOLI *et. al.* 2005). O IAP (Instituto Ambiental do Paraná) faz análises periódicas da qualidade da água dos reservatórios de todo o estado. O método utiliza análises físico-químicas para determinar a transparência da água, pH, sólidos suspensos totais, compostos nitrogenados, fósforo total, demanda química e bioquímica de oxigênio, clorofila a, fitoplâncton, zooplâncton e etc. De acordo com os resultados obtidos, são atribuídos pesos distintos. A classe de qualidade de água a que cada reservatório pertence é calculado através do Índice de Qualidade de Água de Reservatórios (IQAR), que pode variar de classe I (não impactado á muito pouco degradado) à classe VI (extremamente poluído). No relatório elaborado pelo IAP, entre 2001 e 2002, o reservatório do Iraí foi classificado na classe III (moderadamente degradado) e entre 2003 e 2004 foi classificado na classe IV (criticamente degradado a poluído) (IAP 2004). Esse resultado fez com que o IAP notificasse a SANEPAR, para que a mesma tomasse medidas para conter a poluição (PARANÁ ONLINE 2003). Entre 2005 e 2007, o reservatório encontrava-se ainda em classe IV. Em 2008, subiu, chegando à classe V (muito poluído). Fazendo uma média entre 2001 e 2008, o Iraí encontra-se em classe IV (criticamente degradado a poluído) (IAP 2009). Em dezembro de 2010, a Rede Paranaense de Comunicação denunciou em um dos seus noticiários, a emissão de esgoto em um córrego que deságua no rio Iraí (RPC 2010). A SANEPAR alega que os moradores não fazem a ligação correta da rede de esgoto, o que acarreta na emissão direta dos dejetos no rio (FERNANDES *et al.*, 2011).

A Área de Proteção Ambiental (APA) Estadual do Rio Passaúna foi criada 1991 pelo Decreto n°. 458/91, constituindo-se a primeira APA sobre um manancial de abastecimento d'água no Paraná (PARANÁ, 2001) e que faz parte do Sistema Integrado de Proteção dos Mananciais da RMC (Lei Estadual n° 12.248/98). O Rio Passaúna faz parte da Bacia Hidrográfica do Alto-Iguaçu, e sua nascente situa-se no município de Almirante Tamandaré. No município de Araucária situa-se a barragem, construída em 1989 pela SANEPAR. O Reservatório do Passaúna, cujo enchimento

completou-se em 1990, apresenta área de drenagem de 214 Km<sup>2</sup>, profundidade média de 7 metros e volume estimado em 48 milhões de metros cúbicos. Praticamente toda a área é transposta pela BR 277 o que determina riscos de acidentes e pressão de ocupação urbana dos municípios de Curitiba e Campo Largo. Existe ainda intensa atividade industrial e agrícola na região deste reservatório; além disto, o reservatório sofre influência direta do antigo aterro sanitário da região metropolitana de Curitiba. De acordo com o relatório do IAP sobre a qualidade da água dos reservatórios que abastecem o Paraná, o reservatório do Passaúna foi classificado quanto ao IQAR, entre 1999 e 2001 como classe IV (criticamente degradado a poluído). Já entre os anos de 2001 e 2002 o reservatório passou a ter o IQAR classificado em III e, a partir de 2002, até a última avaliação em 2009, manteve esta classificação.

## 1.2 DESREGULADORES ENDÓCRINOS EM ECOSISTEMAS AQUÁTICOS

Werner e colaboradores (2003) revisam que estações de tratamento de esgotos contêm substâncias de ação estrogênica, em concentrações de até 0,021 mg.l<sup>-1</sup> de estradiol (E<sub>2</sub>) e 7 ng.l<sup>-1</sup> de 17 $\alpha$ -etinil-estradiol (EE<sub>2</sub>). Em efluentes provenientes da cidade de Berlin (Alemanha) também foram encontradas substâncias que desregulam o sistema endócrino de peixes (MARX *et al.*, 2001). Animais provenientes do rio Mississipi, próximo a região de St Paul (Minessota, EUA) também apresentaram disfunções endócrinas quando comparados a animais provenientes do rio Snake, próximo a cidade de Pine, uma pequena cidade que é conhecida por coletar e tratar de forma eficiente o esgoto gerado por sua população (FOLMAR *et al.*, 2001). Já no rio Llobregat, situado no nordeste da Espanha, foram detectados concentrações de 15 mg/L de nonylphenol e 35 mg/L de nonylphenoxy, dois poluentes com efeitos estrogênicos conhecidos; ainda na mesma região foram detectados estrogênios e progesteronas na concentração de ng\L (PETROVIC *et al.*, 2002). Substâncias que induzem a expressão da vitelogenina por machos também foram encontradas no rio Danúbio (CEAPA *et al.*, 2002). Estes dados revelam que o problema da contaminação dos recursos hídricos por poluentes desreguladores endócrinos é de amplitude mundial.

No caso particular do Brasil, onde muito do esgoto doméstico ainda vai para corpos de água e sistemas de drenagem de bacias *in natura*, populações naturais de peixes podem estar sujeitas a concentrações muito superiores às supracitadas, de compostos que desregulam o sistema neuro-endócrino-reprodutor, este facilmente susceptível a variáveis abióticas como intervenientes físico-químicos (KIME, 1999). Isto associado ao fato de que o tratamento da água não prevê com eficiência a detecção e muito menos a eliminação destes compostos, o risco em potencial de exposição das populações humanas aumenta consideravelmente.

No Brasil, os casos de contaminação ambiental ainda não são monitorados adequadamente, pois não existem dados pretéritos que estabeleçam um histórico de diagnóstico na maioria dos ecossistemas brasileiros. Precede, portanto a obtenção de tais dados objetivando um diagnóstico evolutivo das alterações nestes ambientes (ANDREOLI *et al.*, 2005).

### 1.3 ESTUDOS DE BIOMONITORAMENTO

O monitoramento ambiental é uma importante ferramenta para a administração dos recursos naturais. Este fornece conhecimento e informações básicas para avaliar a presença de contaminantes, para compreender os sistemas ambientais e para dar suporte às políticas ambientais. O monitoramento consiste em observações repetidas da presença de uma substância química ou mudança biológica, com um propósito definido de acordo com um planejamento prévio ao longo do tempo e espaço, utilizando métodos comparáveis e padronizados (NEVES, 2006).

Para monitorar a qualidade da água vários parâmetros podem ser utilizados, entre eles análises físico-químicas, onde se mede a concentração de oxigênio dissolvido (OD), demanda bioquímica de oxigênio (DBO) e pH. A qualidade da água também pode ser avaliada pela presença de nutrientes como o fósforo e o nitrogênio. Já as análises biológicas mais comuns relacionadas a qualidade da água, são realizadas através de análises bacteriológicas, como coliformes totais e fecais (SILVEIRA, 2004). Porém, esses parâmetros podem atender as necessidades estéticas e de recreação, mas não as de qualidade da água para o consumo ou para garantir a sobrevivência das espécies que vivem nestes ecossistemas (ANDREOLI *et al.*, 2005).

Quando organismos vivos são usados no monitoramento ambiental para avaliar mudanças no meio ambiente ou na qualidade da água o monitoramento é chamado de monitoramento biológico ou biomonitoramento. Neste tipo de monitoramento são, muitas vezes, utilizados biomarcadores para indicar a presença e o efeito de um poluente.

Como biomarcador de disfunção endócrina, foi adotada a expressão da molécula de vitelogenina em machos, sendo que este biomarcador já vem sendo utilizado para biomonitorar a presença de desreguladores endócrinos em outras regiões do mundo (MARX *et al.* , 2001; FOLMAR *et al.*, 2001; CEAPA *et al.* , 2002; DESFORGES *et al.*, 2010).

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste capítulo é o biomonitoramento da presença de poluentes desreguladores endócrinos em dois reservatórios que abastecem Curitiba e Região Metropolitana.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Expor indivíduos juvenis de *R. quelen*, durante três e seis meses, em tanques redes, nos reservatórios do Iraí e do Passaúna;
- ✓ Utilizar os anticorpos policlonais anti-vitelogenina de *R. quelen*, produzidos anteriormente, para verificar a expressão da vitelogenina em machos da espécie;
- ✓ Verificar se a disfunção endócrina pode ser tempo dependente;
- ✓ Inferir, a partir da expressão da vitelogenina, se estes ecossistemas estão ou não impactados por poluentes desreguladores endócrinos.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 EXPOSIÇÃO DE EXEMPLARES DE *R. QUELEN* NOS RESERVATÓRIOS

Primeiramente 60 animais juvenis da espécie foram obtidos na Piscicultura Panamá – SC. Devido a outros ensaios realizados com animais provenientes da mesma região, pode-se afirmar que a mesma está isenta de impacto por desreguladores endócrinos. Destes 60 animais, 30 foram alocados em tanques redes (2mx2mx2m) no reservatório do Iraí (Região nordeste da RMC) e os 30 restantes foram alocados em tanques redes idênticos no reservatório do Passaúna (Região oeste da RMC), por um período de três meses (de outubro-2010 a janeiro-2012).

Mais 60 animais juvenis da espécie foram obtidos na piscicultura e alocados nos mesmos tanques redes utilizados anteriormente, sendo 30 no reservatório do Iraí e 30 no reservatório do Passaúna, por um período de seis meses (de abril-2011 a outubro-2011).

Ao final dos três ou seis meses de exposição foi realizada a coleta do material biológico.

#### 3.2 COLETA E PROCESSAMENTO DO MATERIAL BIOLÓGICO

Os animais foram retirados dos tanques redes com o auxílio de puçás e anestesiados com benzocaína 0,8%. O sangue foi coletado com o animal vivo, conforme procedimento descrito por Silversand *et al.*, (1993), e ao sangue total foi acrescentado o anti-proteolítico PMSF a 1mM. A mistura foi centrifugada a 4°C, sob a força de 3000 g por 30 min para obtenção do plasma, que foi alíquotado, e mantido a temperatura de -75°C para análises posteriores por *western blot*.

#### 3.3 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DA VITELOGENINA

Amostras de plasma de todos os indivíduos coletados, fossem eles fêmeas (F) ou machos (M), tiveram sua quantificação proteica previamente determinada pelo método de Bradford (1976) e foram preparadas em tampão de amostra redutor para SDS-PAGE. Foram preparadas também amostras fêmeas vitelogênicas,

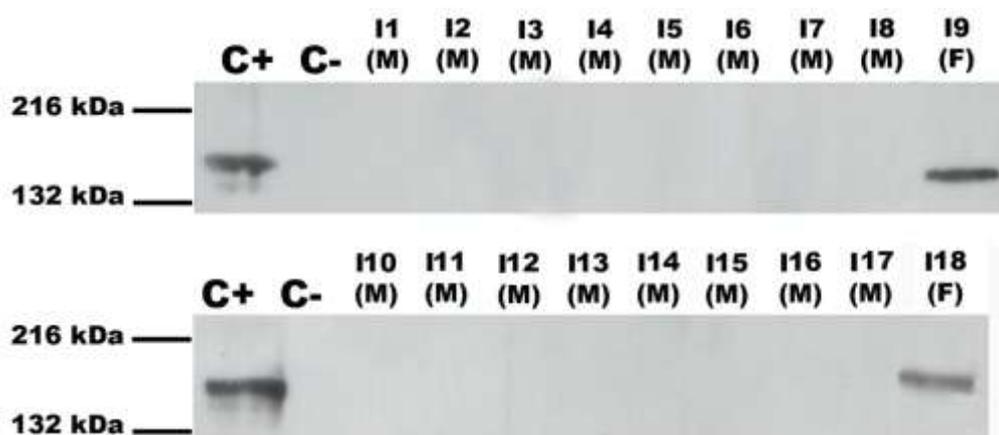
consideradas como controle positivo da reação (C+) e amostras de machos, considerados controle negativo da reação (C-). Cerca de 50 µg de proteínas totais foram submetidas a eletroforese por SDS-PAGE (gel de empilhamento a 4% e Gel de separação a 8%), com aplicação de campo elétrico vertical (LAEMMLI, 1970), seguida de eletrotransferência para membranas de nitrocelulose. As membranas de nitrocelulose contendo as proteínas eletrotransferidas foram coradas com Ponceau's para análise da eletroforese e da transferência. Após a retirada total do corante, as membranas foram bloqueadas por 1 h com leite sem gordura (Molico) 5% em solução de TBS-T. Após o bloqueio, as membranas foram incubadas por 16 h a 4°C com o soro policlonal contendo os anticorpos anti-vitelogenina de *R. quelen* numa diluição de 1:35000. As membranas foram então lavadas três vezes com TBS-T para a remoção dos anticorpos não ligados e então incubadas por 1 h com anti-imunoglobulina de coelho conjugada à com peroxidase (KPL), numa diluição de 1:4000. A reação foi evidenciada utilizando substrato quimioluminescente (Pierce ECL, Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) sobre as membranas, as quais foram expostas a um filme de raio-X não sensível (Kodak) e quando necessário a um filme sensível (GE).

## 4. RESULTADOS

### 4.1 EXPOSIÇÃO DE TRÊS MESES NO RESERVATÓRIO DO IRAÍ

Na exposição de três meses, dos 30 animais expostos, apenas 18 sobreviveram, sendo destes 16 machos e 2 fêmeas.

Os anticorpos policlonais reconheceram especificamente um antígeno presente no plasma de fêmeas vitelogênicas (C+) e não reconheceram nenhum antígeno no plasma de machos controle (C-), indicando que a reação de *western blot* foi conduzida corretamente. Os anticorpos policlonais reconheceram especificamente um antígeno presente no plasma das 2 fêmeas coletadas; não houve reação no 16 machos coletados, indicando a ausência de expressão da vitelogenina pelos mesmos (Figura 1).



**Figura 1.** Reação de *western blot* para detecção da vitelogenina em exemplares de *R. quelen* expostos por três meses no reservatório do Iraí.

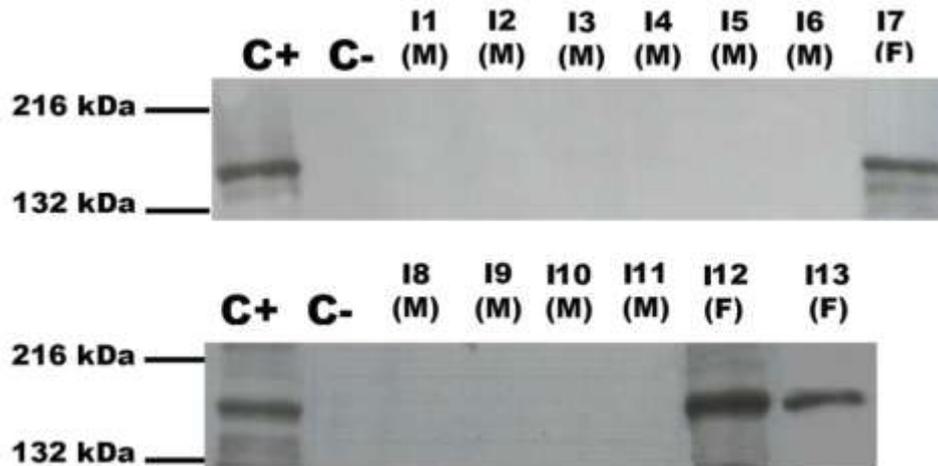
NOTA: C+: amostra do plasma de fêmea vitelogênica. C-: amostra do plasma de macho adulto. I1 a I18: animais coletados no reservatório do Iraí. F: fêmeas coletadas. M: machos coletados.

### 4.2 EXPOSIÇÃO DE SEIS MESES NO RESERVATÓRIO DO IRAÍ

Na exposição de seis meses, dos 30 animais expostos, apenas 13 sobreviveram, sendo destes 10 machos e 3 fêmeas.

Os anticorpos policlonais reconheceram especificamente um antígeno presente no plasma de fêmeas vitelogênicas (C+) e não reconheceram nenhum antígeno em machos controle (C-). Os anticorpos policlonais reconheceram a vitelogenina presente no plasma das 3 fêmeas coletadas; não houve reação nas

amostras de plasma dos 10 machos coletados, indicando a ausência de expressão da vitelogenina pelos mesmos.



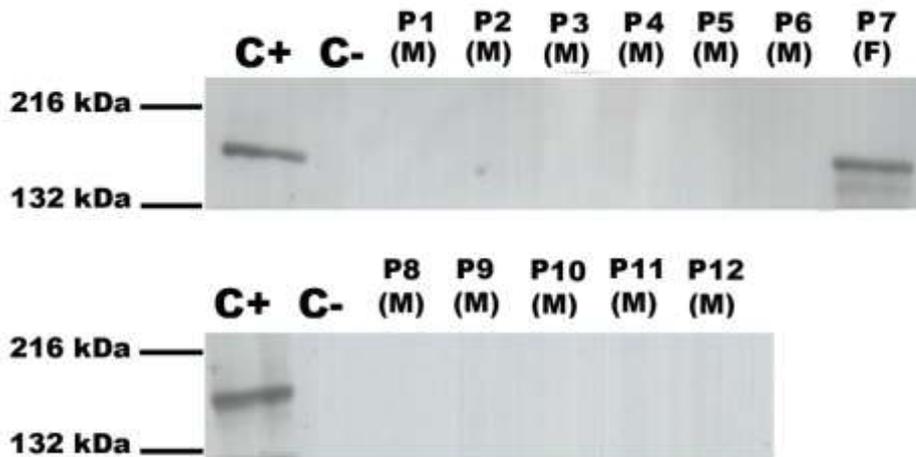
**Figura 2.** Reação de *western blot* para detecção da vitelogenina em exemplares de *R. quelen* expostos por seis meses no reservatório do Iraí.

NOTA: C+: amostra do plasma de fêmea vitelogênica. C-: amostra do plasma de macho adulto. I1 a I13: animais coletados no reservatório do Iraí. F: fêmeas coletadas. M: machos coletados.

#### 4.3 EXPOSIÇÃO DE TRÊS MESES NO RESERVATÓRIO DO PASSAÚNA

Na exposição de três meses, dos 30 animais expostos, apenas 12 sobreviveram, sendo destes 11 machos e 1 fêmea.

Os anticorpos policlonais reconheceram especificamente a vitelogenina presente no plasma de fêmeas vitelogênicas (C+). Não houve detecção da vitelogenina em machos controle (C-). Os anticorpos reconheceram especificamente a vitelogenina presente no plasma da fêmea coletada, mas não houve reação nas amostras dos 12 machos coletados, indicando a ausência de expressão da vitelogenina pelos mesmos.



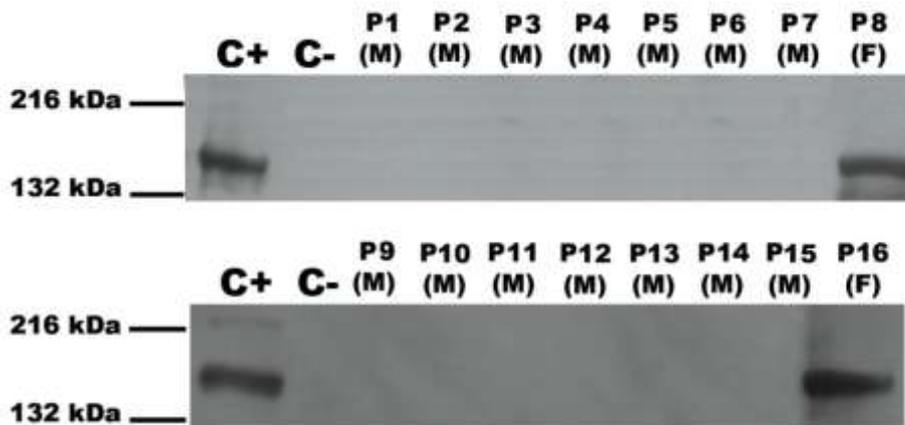
**Figura 3.** Reação de *western blot* para detecção da vitelogenina em exemplares de *R. quelen* expostos por seis meses no reservatório do Iraí.

NOTA: C+: amostra do plasma de fêmea vitelogênica. C-: amostra do plasma de macho adulto. P1 a P12: animais coletados no reservatório do Passaúna. F: fêmeas coletadas. M: machos coletados.

#### 4.4 EXPOSIÇÃO DE SEIS MESES NO RESERVATÓRIO DO PASSAÚNA

Na exposição de seis meses, dos 30 animais expostos, apenas 16 sobreviveram, sendo destes 14 machos e 2 fêmeas.

Os anticorpos policlonais reconheceram especificamente a vitelogenina presente no plasma de fêmeas vitelogênicas (C+). Não houve detecção da vitelogenina em machos controle (C-). Os anticorpos policlonais reconheceram especificamente a vitelogenina presente no plasma das 2 fêmeas coletadas; não houve reação nas amostras de plasma dos 14 machos coletados, indicando a ausência de expressão da vitelogenina pelos mesmos.



NOTA: C+: amostra do plasma de fêmea vitelogênica. C-: amostra do plasma de macho adulto. P1 a P16: animais coletados no reservatório do Passaúna. F: fêmeas coletadas. M: machos coletados.

**Figura 4.** Reação de *western blot* para detecção da vitelogenina em exemplares de *R. quelen* expostos por seis meses no reservatório do Passaúna.

## 5. DISCUSSÃO

O biomonitoramento de um ecossistema aquático é um trabalho de alta complexidade, pois deve levar em consideração fatores bióticos e abióticos que exercem efeitos sobre os organismos, bem como a presença de misturas complexas de agentes causadores de estresse. O laboratório de Toxicologia celular vem, há vários anos, realizando estudos de biomonitoramento em rios e reservatórios brasileiros (BRITO, 2011; OSÓRIO, 2009; RABITTO, 2010). Entretanto, tais estudos avaliam a presença de poluentes causadores de estresse oxidativo, alterações neuro-musculares, alterações histológicas em órgãos alvo, bem como a mensuração da concentração de algumas classes de poluentes orgânicos persistentes acumulados pelos organismos (RABITTO, 2010). Com o presente trabalho, pela primeira vez, o laboratório está fazendo o emprego de um biomarcador de disfunção endócrina para avaliar esta classe de poluentes emergentes e até então muito pouco estudada nas espécies brasileiras.

Embora haja anticorpos anti-vitelogenina viáveis para várias espécies, devido a baixa conservação evolucionária de várias moléculas envolvidas em processo biológicos, é necessário produzir e padronizar anticorpos para cada espécie estudada, ou ao menos, produzir anticorpos para espécies correlacionadas filogeneticamente (PRAKASH *et al.*, 2007). Também devido ao alto custo dos mesmos (cerca de U\$ 1000\100µl) se torna inviável o emprego destes em estudos de biomonitoramento, onde uma quantidade elevada de amostras é coletada para análise, o que requer também uma quantidade elevada de anticorpos. Por isso optou-se por produzir um anticorpo de forma mais viável economicamente e que reconhecesse de forma específica a vitelogenina de *R. quelen*, para poder realizar o biomonitoramento da presença de desreguladores endócrinos no ambiente.

Diversos autores têm produzido anticorpos contra a molécula de vitelogenina e padronizado imunoensaios para os mesmos (PRAKASH *et al.*, 2007; MOSCONI *et al.*, 1998; HOLBECH *et al.*, 2001; OHKUBO *et al.*, 2003; HERBST *et al.*, 2003). No entanto poucos são os autores que fazem o uso destes anticorpos no biomonitoramento (AN *et al.*, 2007). A maioria dos pesquisadores prefere mensurar a concentração de poluentes conhecidamente tóxicos do que fazer o uso de anticorpos, uma vez que a produção dos mesmos é demorada e onerosa (XUE *et al.*, 2005; BOITI *et al.*, 2007; KASPRZYK-HORDERN *et al.*, 2008). No entanto, a

simples mensuração da concentração de um poluente em um ambiente não reflete os efeitos do mesmo sobre os organismos que ali habitam. Uma vez que os ecossistemas aquáticos são dinâmicos devido aos fluxos e correntes de água, é preciso mensurar os efeitos dos poluentes na saúde dos organismos e não apenas a concentração dos mesmos que podem variar enormemente entre períodos de secas e chuvas ou mesmo com correntes de água momentâneas.

Neste quesito o uso de anticorpos que reconheçam moléculas tóxicas dentro dos organismos, ou que reconheçam proteínas expressas frente a tais moléculas tóxicas, se torna indispensável, uma vez que mensura a saúde do organismo que habita o ecossistema e que reflete de forma mais realística as condições a que o organismo está sujeito.

An e colaboradores (2007) produziram um anticorpo monoclonal anti-vitelogenina de *Carassius carassitus* e aplicaram-no no biomonitoramento do rio Gaobeidian em Pequim, na China, que recebe efluentes da região. Este estudo de biomonitoramento fez coletas de animais a montante a jusante da região onde ocorre a descarga de poluentes neste rio. O estudo detectou a vitelogenina em machos coletados a jusante da região onde ocorre a descarga de efluentes; machos coletados em regiões a montante da descarga apresentaram concentrações de vitelogenina menores que os coletados a jusante, indicando que o esgoto doméstico descarregado no rio contém desreguladores endócrinos.

Embora muitos autores não produzam seus próprios anticorpos anti-vitelogenina, este biomarcador vem sendo amplamente utilizado para detectar a presença de desreguladores endócrinos no ambiente. Folmar *et al.* (2001) monitoraram a presença de vitelogenina em machos de *Stizostedion vitreum* provenientes do rio Mississipi, próximos a cidade de St Paul. Neste estudo os autores detectaram não apenas um elevado nível de vitelogenina no plasma de machos, como também uma elevação da concentração de estradiol e uma diminuição da concentração de testosterona no plasma dos mesmos, indicando não somente a presença de desreguladores endócrinos que estimulam a produção da vitelogenina, mas também a presença de desreguladores que elevam a produção de estradiol e diminuem a produção de testosterona. Poluentes que agem diretamente sobre o receptor de estrogênio levam a produção de vitelogenina; já poluentes que agem aumentando a atividade da enzima aromatase aumentam consequentemente a concentração de estradiol circulante, o que também leva a produção da

vitelogenina. Já poluentes que inibem as enzimas responsáveis pela conversão do colesterol em testosterona podem levar a uma diminuição da concentração da mesma. Logo em misturas complexas dificilmente saber-se-á qual é o poluente que está causando um dado efeito

Burki *et al.* (2006) utilizaram anticorpos comerciais para detectar a vitelogenina, através de um ELISA, em *Salmo trutta* nativos e enjaulados em um pequeno rio chamado Luetzelmurg, na Suíça. Embora os autores tenham detectado a presença da vitelogenina em machos expostos de ambas as formas, os animais nativos apresentaram concentrações até 20 vezes superiores de vitelogenina quando comparados aos animais que ficaram enjaulados no rio por um período de 30 dias, demonstrando que um aumento no período de exposição aumenta a expressão da vitelogenina. No estudo realizado com *R. quelen* o mesmo não foi verificado, uma vez que a vitelogenina não foi detectada nem em animais expostos por 3 meses e nem em animais expostos pelo dobro deste período de tempo.

A metodologia empregada também pode ser responsável pela ausência da detecção desta molécula em *R. quelen*, uma vez que ensaios de *western blot* são menos sensíveis que ensaios de ELISA. Burki *et al.* (2006) também discutem o efeito da metodologia sobre a detecção da molécula de vitelogenina em animais coletados em campo; ensaios de PCR (*Polymerase chain reaction*) em tempo real, detectaram concentrações de mRNA específico para vitelogenina até 40 vezes superior que a concentração de vitelogenina detectada por ELISA neste mesmo estudo. É conhecido que concentração de um dado mRNA não corresponde diretamente a concentração da proteína que será traduzida a partir do mesmo, mas de qualquer forma vale ressaltar-se que metodologias diferentes, tem limites de detecção diferentes, podendo gerar resultados diferentes. Já Versonnen e colaboradores (2004), avaliaram a presença de vitelogenina em machos de *Anguilla anguilla* coletados na região de Flanders na Bélgica utilizando *western blot*. Tais autores conseguiram detectar uma baixa concentração da proteína, mesmo sabendo que a região possui alta contaminação por desreguladores endócrinos, demonstrando que a técnica de *western blot*, que é muito mais qualitativa do que quantitativa, não é a mais indicada para mensurar a quantidade de vitelogenina em animais selvagens.

A maioria dos poluentes com capacidade de disfunção endócrina são lipofílicos e, portanto, encontram-se acumulados na biota ou em partículas em

suspensão, o que não os torna biodisponíveis para todos os organismos. Tais poluentes estariam mais biodisponíveis para animais que se alimentam da própria biota local como por exemplo, aqueles que consomem microcrustáceos que vivem associados ao sedimento e que são filtradores e por isso acumulariam uma maior quantidade destes poluentes. O material particulado também se torna mais biodisponível para animais filtradores do que para animais com hábitos alimentares diferentes destes, uma vez que os filtradores filtram o material particulado dissolvido na água. A ausência de expressão da vitelogenina por machos de *R. quelen* pode ser explicada pelo fato de os animais terem sido expostos em tanques redes que estavam situados na coluna d'água e que não tinham contato algum com o sedimento. Esta espécie em geral vive associada ao fundo e se alimenta de material associado ao mesmo, incluindo microscrostáceos. No presente trabalho, o tanque rede encontrava-se na coluna d'água e os animais eram alimentados com ração comercial, logo uma exposição que permitisse o acesso dos mesmos ao sedimento poderia resultar em uma concentração de vitelogenina diferente. De fato Petrovic e colaboradores (2002) verificaram que a exposição a água contendo estradiol e compostos alquilfenólicos leva a uma expressão da vitelogenina em machos de *Cyprinus carpio* mais baixa do que quando estes animais são expostos a água e ao sedimento contendo tais poluentes. Isto é explicado pelo fato de esta espécie alimentar-se do sedimento e portanto, assimilar melhor os poluentes que se encontram no mesmo do que aqueles particulados na água.

Considerando a técnica empregada e o desenho experimental não se pode afirmar que os reservatórios em questão estão isentos de impacto por desreguladores endócrinos. Podemos apenas afirmar que estudos complementares são necessários para avaliar a qualidade da água consumida pela população de Curitiba e Região Metropolitana. Para um resultado mais realístico seria importante considerar a exposição de uma espécie filtradora, uma vez que para esta os poluentes particulados encontrariam-se mais biodisponíveis do que para uma espécie não filtradora.

## 6. CONCLUSÕES

✓ A espécie *R. quelen* adaptou-se bem às condições de confinamento durante o experimento realizado nos reservatórios;

✓ A ausência de detecção da vitelogenina em machos de ambos os reservatórios nos dois períodos de exposição mostra que para o modelo utilizado e para os métodos de detecção, os reservatórios estão isentos de desreguladores endócrinos de efeito estrogênico em concentrações capazes de alterar o sistema endócrino;

✓ O aumento no tempo de exposição não leva a expressão da vitelogenina por machos, em níveis detectáveis pelos ensaios utilizados.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AN, L.; HU, J.; ZHU, X.; DENG, B.; ZHANG, Z.; YANG, M. Crucian carp (*Carassius carassius*) VTG monoclonal antibody: Development and application. **Ecotoxicol. Environ. Safe.** v.66, n.2, p. 148–153, 2007.
- ANDREOLI, C. V.; DALARMI, O.; LARA, A.I.; ANDREOLI, F.N. Limites ao desenvolvimento da Região Metropolitana de Curitiba, impostos pela escassez de água. **Simpósio Luso-Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental**, Porto Seguro, p. 185-195, 2000.
- ANDREOLI, C.V.; CARNEIRO, C. **Gestão Integrada de Mananciais de Abastecimento Eutrofizados**. Curitiba: SANEPAR, 2005.
- BOTI V. I.; SAKKAS, V. A.; ALBANIS, T. A. Measurement uncertainty arising from trueness of the analysis of two endocrine disruptors and their metabolites in environmental samples. Part I: ultrasonic extraction from diverse sediment matrices. **J. Chromatogr. A.** v.1146, n.2, p.139-147, 2007.
- BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochem**, v.72, p.248-254, 1976.
- BRITO, I. A. **Avaliação da qualidade da água de três reservatórios do rio Paraíba do Sul através de biomarcadores em *Pimelodus maculatus* (Siluriformes, Pimelodidae) e *Oligosarcus hepsetus* (Characiformes, Characidae)**. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Conservação) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.
- BURKI, R.; VERMEIRSSSEN, E. L.; KÖRNER, O.; JORIS, C.; BURKHARDT-HOLM, P.; SEGNER, H. Assessment of estrogenic exposure in brown trout (*Salmo trutta*) in a Swiss midland river: integrated analysis of passive samplers, wild and caged fish, and vitellogenin mRNA and protein. **Environ. Toxicol. Chem.** v.25, n.8, p.2077-2086, 2006.
- CEAPA, C.; WILLIOT, P.; LE MENN, F.; DAVAIL-CUISSET, B. Plasma sex steroids and vitellogenin levels in stellate sturgeon (*Acipenser stellatus Pallas*) during spawning migration in the Danube River. **J. Appl. Ichthyol.** v.18, p.391–396, 2002.
- DESFORGES, J. P. W.; PEACHEY, B. D. L.; SANDERSON, P. M.; WHITE, P A.; BLAIS, J. M. Plasma vitellogenin in male teleost fish from 43 rivers worldwide is correlated with upstream human population size. **Environ. Pollut.** v.158, p.3279-3284, 2010.
- FERNANDEZ, L. F.; LAGOS, P. E.; VENTURA, C. Florações de Cianobactérias e Eutrofização no Reservatório do Iraí, Curitiba, PR. **Distribuição Horizontal de Algumas Espécies de Águas de Abastecimento Público na Bacia do Altíssimo Iguaçu**, Curitiba, PR, 2011.
- FOLMAR, L. C.; DENSLOW, N. D.; KROLL, K.; ORLANDO, E. F.; ENBLUM, J.; MARCINO, J.; METCALFE, C.; GUILLETTE, L. J. Altered serum sex steroids and vitellogenin induction in walleye (*Stizostedion vitreum*) collected near a metropolitan sewage treatment plant. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.** v.40, p.392–398, 2001.
- GOLDFARB, P.; LIVINGSTONE, D.; BURMELIN, C. Biomonitoring in the aquatic environment: use of molecular biomarkers. **Biochem. Soc. Transac.** v.26, p.690-694, 1998.
- HERBST, L. H.; SICONOLFI-BAEZ, L.; TORELLI, J. H.; KLEIN, P.A.; KERBEN, M .J.; SCHUMACHER, I. M. Induction of vitellogenesis by estradiol-17 $\beta$  and development of enzyme-linked immunosorbant assays to quantify plasma vitellogenin levels in green turtles (*Chelonia mydas*). **Comp. Biochem. Physiol. B.** v.135, n.3, p.551-563, 2003.
- HOLBECH, H.; ANDERSEN, L.; PETERSEN, G. I.; KORSGAARD, B.; PEDERSEN, K. L.; BJERREGAARD, P. Development of an ELISA for vitellogenin in whole body homogenate of zebrafish (*Danio rerio*). **Comp. Biochem. Physiol. C.** v. 130, n.1, p.119-131, 2001.

INSTITUTO AMBIENTAL DO PARANÁ (IAP). Monitoramento da qualidade das águas dos reservatórios do estado do Paraná, no período de 1999 a 2004. Curitiba, 2004. Disponível em: [http://www.iap.pr.gov.br/arquivos/File/Monitoramento/rel\\_monit\\_qual\\_aguas\\_reserv\\_9904\(1\).pdf](http://www.iap.pr.gov.br/arquivos/File/Monitoramento/rel_monit_qual_aguas_reserv_9904(1).pdf). Acesso em 11/01/2012.

INSTITUTO AMBIENTAL DO PARANÁ (IAP). Monitoramento da qualidade das águas dos reservatórios do estado do Paraná, no período de 2005 a 2009. Editora Fundamento, Curitiba, 2009. 120p.

KASPRZYK-HORDERN, B., DINSDALE, R. M., GUWY, A. J. The occurrence of pharmaceuticals, personal care products, endocrine disruptors and illicit drugs in surface water in South Wales, UK. **Water research**. v.42, p. 3498 – 3518, 2008.

KIME, D. E. A strategy for assessing the effects of xenobiotics on fish reproduction. **Sci. Total Environm.** v.222,, p. 3-11, 1999.

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

LARA, A. I.; ANDREOLI,C.V.; ANDREOLI,F.N.. Conservação e mananciais: A visão das companhias de saneamento. **CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL**. Rio de Janeiro, 1999. Anais p. 3760-3764. 1999.

MARICATO, M. E. **Metrópole na periferia do capitalismo**. Hucitec. São Paulo, 1995.

MARX, A.; SHERRY, J.; HANSEN, P. D.; HOCK, B. A new monoclonal antibody against vitellogenin from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Chemosphere**. v.44, n.3, p.393-399, 2001.

MOSCONI, G.; CARNEVALI, O.; CARLETTA, R.; NABISSI, M.; POLZONETTI-MAGNI, A. M. Gilthead Seabream (*Sparus aurata*) Vitellogenin: Purification, Partial Characterization, and Validation of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). **Gen. Comp. Endocrinol.** v.110, n.3, p.252-261, 1998.

MOURA, R; ULTRAMARI, C. **Metrópole – Grande Curitiba: Teoria e prática**. Curitiba: Editora Ipades, 1994

NEVES, R.L.S. **Avaliação da contaminação de óleo no ambiente estuarino da Baía de Guanabara (RJ) pela determinação fluorimétrica de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs) na bÍlis de peixes Mugil liza**. Dissertação de Mestrado (Programa de Pós-graduação em Química).. PUC/RJ, 120p. 2006.

OHKUBO, N.; MOCHIDA, K.; ADACHI,S.; HARA, A.; HOTTA, K.; NAKAMURA, Y.; MATSUBARA, T. Development of enzyme-linked immunosorbent assays for two forms of vitellogenin in Japanese common goby (*Acanthogobius flavimanus*). **Gen. Comp. Endocrinol.** v.131, n.3, p.353-364, 2003.

OSÓRIO, F. H. T. **Avaliação da qualidade da água do rio tubarão através de biomarcadores em *geophagus brasiliensis* (quoy e gaimard, 1824)**. Dissertação de Mestrado (Programa de Pós-graduação em Ecologia). Universidade Federal Do Paraná.. 2011.

PARAKASH, O.; GOSWAMI, S. V.; SEHGAL, N. Establishment of ELISA for murrel vitellogenin and choriogenin, as biomarkers of potential endocrine disruption. **Comp. Biochem. Physiol. Part C**. v.146, n.4, p.540-551, 2007.

PARANÁ. Coordenação da Região Metropolitana de Curitiba. Atualização do Zoneamento Ecológico – Econômico da APA do Passaúna. Curitiba, 2001.

PARANÁ ONLINE 2003. Disponível em: <http://www.paranaonline.com.br/editoria/cidades/news/37835/?noticia=IAP+VAI+NOTIFICAR+SANEP+AR+SOBRE+A+BARRAGEM+DO+IRAI>. Acesso em 11/01/2012.

PETROVIC, M.; SOLÉ, M.; LÓPEZ, M. J.; BARCELÓ, D. Endocrine disruptors in sewage treatment plants, receiving river waters, and sediments: integration of chemical analysis and biological effects on feral carp. **Environ Toxicol Chem.** v.10, p.2146-2156, 2002.

RABITTO, I. S. **Avaliação da exposição crônica do Hg e DDTs em Cichla monoculus (Cichlidae) e riscos para exposição humana na Amazônia.** Tese Doutorado (Programa de Pós-graduação em Biologia Celulare Molecular). Universidade Federal do Paraná. 2010.

RPC 2010. Disponível em: <http://www.rpctv.com.br/parana-tv/2010/12/esgoto-a-ceu-aberto-contamina-rio-que-abastece-curitiba/>. Acesso em 11/01/2012

SANTOS, R. J. R. **Programa de Conservação de Mananciais.** Sanare, Curitiba: Sanare. v.9 n.9, p.33-40. 1998.

SILVEIRA, M. P. Aplicação do Biomonitoramento para Avaliação da Qualidade da Água em Rios. 1ª.ed. Embrapa meio ambiente: Jaguariúna, 2004. 68p.

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.

VELINI, E.D; CAVENAGHI, A.L.; NEGRISOLI, E.; MARTINS, D.; ARRUDA, D.P.; TRINDADE, M.L.B; SANTOS, S.C.; SIMIONATO, J.L.A. Avaliação da qualidade da água e sedimento relacionados com a ocorrência de plantas aquáticas em cinco reservatórios do rio Tietê. **Planta Daninha, Viçosa-MG.** v.21, p.43-52, Edição especial, 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, n.3, p.363-371,2004.

VOLLENWEIDER, R.A.; JORGENSEN, S.E. Guidelines of Lake Management. International Lake Environment Committee and the United Nations Environment Programme. 1989.199p.

XUE, N.; XU, X.; JIN, Z. Screening 31 endocrine-disrupting pesticides in water and surface sediment samples from Beijing Guanting reservoir. **Chemosphere.** v.61, n.11, p.1594-1606, 2005.

WERNER, J.; WAUTIER, K.; EVANS, R. E.; BARON, C. L.; KIDD, K.; PALACE, V. Waterborne ethynylestradiol induces vitellogenin and alters metallothionein expression in lake trout (*Salvelinus namaycush*). **Aquatic Toxicology**, v. 62, p. 321-328, 2003.

WORLDWATCH INSTITUTE. Estado do Mundo: Transformando culturas do consumismo à sustentabilidade. Relatório técnico-científico. Washington. 2010.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

A molécula de vitelogenina foi caracterizada como uma glicolipofosfoproteína estrógeno induzível na espécie *Rhamdia quelen*.

Tal molécula mostrou-se um bom biomarcador experimental para disfunção endócrina na espécie.

A dificuldade na identificação da vitelogenina por espectrometria de massa demonstra a necessidade de estudos complementares que disponibilizem um banco de dados de genômica e proteômica para a espécie.

A metodologia empregada para produção de anticorpos policlonais anti-vitelogenina de *Rhamdia quelen* mostrou-se eficaz e de baixo custo, o que torna a ferramenta viável para aplicação em estudos de biomonitoramento.

A técnica utilizada para detecção da vitelogenina em machos da espécie provenientes de reservatórios de abastecimento urbanos, não se mostrou eficaz, sendo necessário padronizar outras técnicas quantitativas, como o ELISA, que requer a purificação da vitelogenina, bem como do seu anticorpo.

Ficam, portanto, as diretrizes a serem seguidas em estudos futuros que devem incluir: a purificação da vitelogenina e a padronização de um ensaio de ELISA para a detecção da mesma; a exposição associada entre água e sedimento e; a exposição de espécies filtradoras a fim de se verificar a real presença de desreguladores endócrinos nos reservatórios estudados.