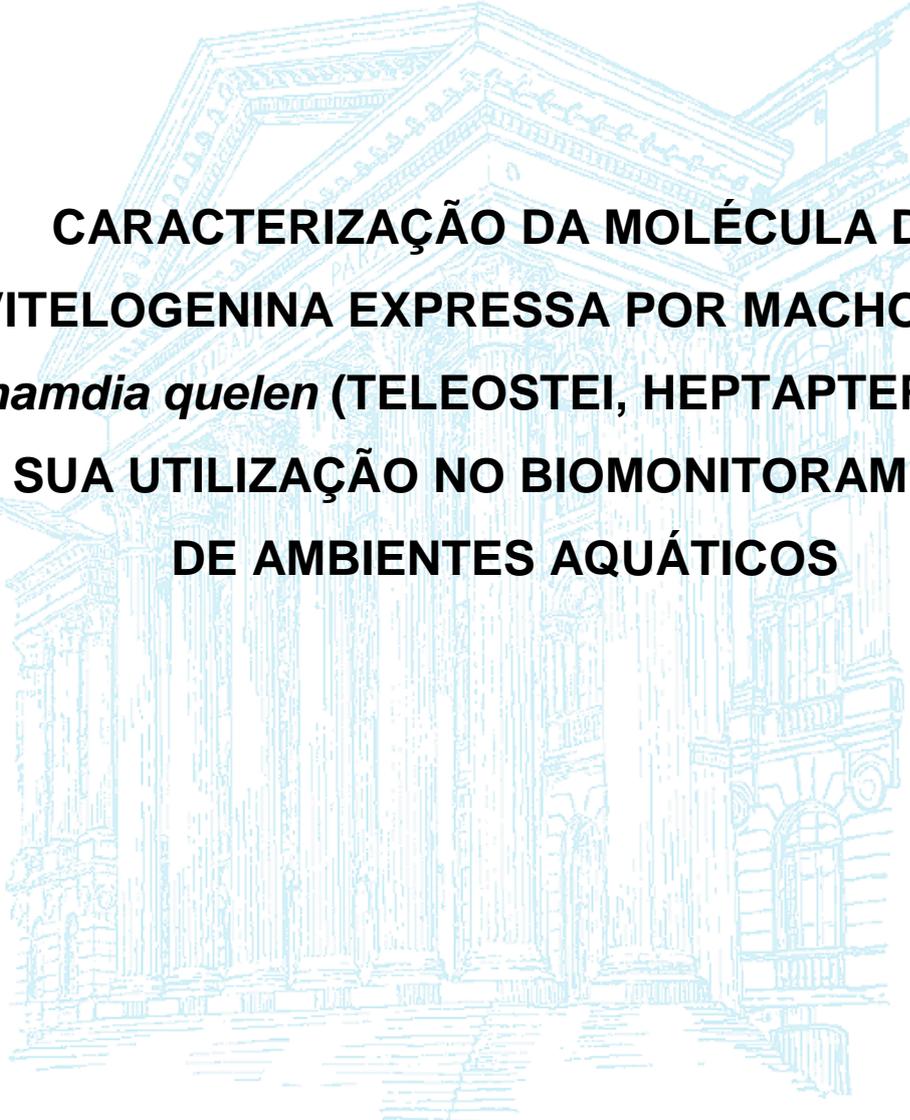


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

DANIELE DIETRICH MOURA COSTA



**CARACTERIZAÇÃO DA MOLÉCULA DE  
VITELOGENINA EXPRESSA POR MACHOS DE  
*Rhamdia quelen* (TELEOSTEI, HEPTAPTERIDAE)  
E SUA UTILIZAÇÃO NO BIOMONITORAMENTO  
DE AMBIENTES AQUÁTICOS**

CURITIBA

2009

DANIELE DIETRICH MOURA COSTA

**CARACTERIZAÇÃO DA MOLÉCULA DE  
VITELOGENINA EXPRESSA POR MACHOS DE  
*Rhamdia quelen* (TELEOSTEI, HEPTAPTERIDAE) E  
SUA UTILIZAÇÃO NO BIOMONITORAMENTO DE  
AMBIENTES AQUÁTICOS**

Trabalho de Monografia apresentado ao Departamento de Biologia Celular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito para a obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro.  
Co-orientador: Msc . Michele Dietrich Moura Costa.

CURITIBA

2009

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus por se fazer sempre presente em minha vida, guiando meus passos e me dando força e coragem para continuar!

Ao me pai, João e a minha mãe, Sueli pela educação de qualidade que me proporcionaram e por muitas vezes terem renunciado aos seus sonhos para que eu pudesse realizar os meus!

Ao meu orientador, Prof. Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro, pela orientação, apoio, incentivo, confiança e credibilidade.

A todo o pessoal do laboratório de Toxicologia Celular. À “velha guarda” do lab: Inês, Flávia, Daniel, Chico e Maritana por estarem sempre presentes. Aos alunos novos (alguns não tão novos) sempre dispostos a dar uma mãozinha, Andressa, Paola, Flávio, Chuli, Ana, Samuel, Loli, Stéfani! Em especial pro “pessoal da fofoca” sempre proporcionando momentos de descontração !!!

A Inês da Silva Rabitto por ser um exemplo de mãe, mulher e amiga, por toda a força e carinho ao longo destes anos de convivência no lab!

Ao Francisco Filipak Neto (Chico), por sempre gastar uns minutinhos de sua mente brilhante com minhas dúvidas!

Ao grande amigo Alberto Katsumiti por ter me ajudado a dar os primeiros passos na Ciência! A Jocieli Mascchio e ao Marco Aurélio, pois mesmo não estando mais no lab, foram essenciais para a minha vida científica!!

Ao professor Marco Randi, não só pela ajuda com as análises estatísticas, mas também pelo bom humor e carinho!

A professora Sonia Grotzner, pelas palavras de incentivo e pelo cantinho especial que me cedeu em seu laboratório!!

Ao pessoal do Laboratório de Neurobiologia que me agüentou os importunando durante todos estes anos. Ao professor Silvio Zanata pelo empréstimo do laboratório, dos reagentes e equipamentos. Ao Luiz Rizzo, pela paciência e por ter sempre algo novo a me ensinar! A Beatriz (nossa amiga) por me agüentar com as minhas perguntas toscas e também por todo o carinho! A minha co-orientadora (e irmã) Michele Dietrich por todos os puxões de orelha, por todas as idéias e por me ensinar que tudo tem que ter controle (sem falar na importância do Bradford!!).

Aos meus irmãozinhos Rafael e Michele, por todas as brigas e conversas que me fizeram a pessoa que sou. E também por todas as horas de amparo e de alegrias!! Sem vocês eu jamais seria quem sou!

Ao Geison que compartilhou meus ideais, incentivando-me a prosseguir na jornada, fossem quais fossem os obstáculos. Por ser sempre meu porto seguro, fonte de incentivo e inspiração!

A Dona Vera Lúcia por estar sempre presente, pelas conversas e conselhos e sempre ter uma comidinha gostosa me esperando!!! Ao “seu” José Benvindo (meu querido) por todo amor e carinho ao longo destes anos todos!! Por ambos serem a minha família, não pela genética, mas pelo amor!

A minha amiga Juliana Alves de Oliveira por esses mais de 12 anos de amizade sincera!!

Aos meus amigos Simone, Renata, Gabriel e Bruno por todas as risadas, almoços e horas de descontração ao longo de todos esses anos de faculdade! Em especial pra Si por todos os conselhos (mesmo que insanos)!!

A professora Rosana N. de Moraes, pelo auxílio com as análises de estradiol.

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,  
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 glicofosfoproteína expressa pelas fêmeas de ovíparos em resposta ao hormônio endógeno 17βestradiol (E<sub>2</sub>). Machos ovíparos não expressam essa proteína, exceto quando expostos a compostos que mimetizam o E<sub>2</sub>. Alguns poluentes provenientes do despejo industrial, urbano e resíduos da atividade agrícola possuem estrutura semelhante ao do E<sub>2</sub>, sendo capazes de afetar o sistema endócrino e portanto 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 indicadores de tal disfunção, sendo que tais processos representam uma consequência da exposição do organismo a um agente químico estressor. Frente a tal cenário, o objetivo do presente trabalho foi caracterizar o processo de vitelogênese de *Rhamdia quelen* (Teleostei, Heptapteridae) e, produzir anticorpos policlonais que reconheçam a vitelogenina desta espécie, visando sua posterior utilização no biomonitoramento de ambientes aquáticos. Para tanto três grupos de animais foram utilizados: um de fêmeas e um de machos ambos adultos e, um de machos adultos injetados com 10 mg E<sub>2</sub>.kg<sup>-1</sup>. Para a caracterização da VTG, sangue, fígado e gônadas foram coletados pós 17 dias de exposição. A caracterização do processo de vitelogênese foi realizada comparando-se parâmetros hepáticos, plasmáticos e gonadais de machos expostos ao estrógeno e de fêmeas em vitelogênese. O fígado foi analisado histologicamente e demonstrou aspecto vacuolizado tanto em fêmeas quanto em machos expostos ao E<sub>2</sub>. Indivíduos expostos ao estrógeno apresentaram ainda um aumento no índice hepatossomático e não apresentaram alteração no índice gonadossomático. As proteínas do plasma foram analisadas por SDS-PAGE, seguido de *western blotting* e por espectrometria de massa (MS). O resultado do SDS-PAGE demonstrou uma banda de 140kDa presente nos machos expostos ao estrógeno e nas fêmeas, porém ausente nos machos não expostos, indicando que a molécula foi induzida pelo estrógeno. Para comprovar a identidade da proteína em questão, realizaram-se ensaios de *western blotting* nos quais o anticorpo comercial anti-VTG reconheceu a vitelogenina expressa por fêmeas e machos expostos. A espectrometria de massa não identificou a proteína, porém verificou-se alta similaridade entre a estrutura da molécula das fêmeas e dos machos induzidos. Para a produção dos anticorpos a proteína foi isolada e coelhos machos foram imunizados. A especificidade dos anticorpos produzidos foi verificada por *western blotting* sendo que resultado foi o mesmo verificado para os anticorpos comerciais. Tais resultados confirmam a especificidade da molécula, porém análises complementares ainda são necessárias.

## LISTA DE ABREVIACOES E SÍMBOLOS

- BSA – albumina de soro bovino.  
CTF- grupo controle de fêmeas em vitelogênese.  
CTM - grupo controle de machos adultos.  
DTT - 4-Dithiothreitol.  
E<sub>2</sub> - 17βestradiol.  
EE<sub>2</sub> - 17α-etinil-estradiol.  
ELISA - *enzyme-linked immunosorbent assay*  
HRP – peroxidase de raiz forte (do inglês *horsedish peroxidase*).  
MS - espectrometria de massa.  
PBS - tampão fosfato salino (do inglês *phosphate buffer saline*).  
PMSF- cido fenil-metil-sulfonil fluorídrico.  
SDS – PAGE - gel de poliacrilamida para eletroforese com sódio dodecil sulfato (do inglês *sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis*).  
SSA - cido sulfosalicílico.  
TBS -T – tampão tris fosfato salino contendo *Tween 20*.  
USA-EPA - Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos da América.  
VTG – vitelogenina.  
10 mg.kg<sup>-1</sup>E<sub>2</sub> - grupo de machos injetados intraperitonealmente com 10 mg de 17βestradiol por quilograma de massa corpórea.  
λ - comprimento de onda.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – ESTRUTURA QUÍMICA DO ESTRADIOL E ALGUNS DESREGULADORES ENDÓCRINOS.

FIGURA 2 – CONCENTRAÇÃO DE ESTRADIOL EM  $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ .

FIGURA 3 – INDUÇÃO ESTROGÊNICA DA VITELOGENINA.

FIGURA 4 – ÍNDICES BIOMÉTRICOS.

FIGURA 5 – HISTOLOGIA DO FÍGADO DE *R. quelen*.

FIGURA 6 – PADRÃO ELETROFORÉTICO DAS PROTEÍNAS DO PLASMA.

FIGURA 7 – REAÇÃO DE *WESTERN BLOTTING* PARA DETECÇÃO DA VITELOGENINA.

FIGURA 8 – ESPECTROS DE MASSA DA PROTEÍNA CONSIDERADA COMO VITELOGENINA.

FIGURA 9 – REAÇÃO DE *WESTERN BLOTTING* DA VITELOGENINA UTILIZANDO SORO POLICLONAL PRODUZIDO.

## **LISTA DE TABELAS**

TABELA 1 – RELAÇÃO MASSA/CARGA DA VITELOGENINA DE FÊMEAS MADURAS.

TABELA 2 – RELAÇÃO DE MASSA/CARGA DA VITELOGENINA DE MACHOS EXPOSTOS AO ESTRÓGENO.

TABELA 3 – SEMELHANÇAS DE RELAÇÃO MASSA/CARGA DE FÊMEAS E MACHOS EXPOSTO AO ESTRÓGENO.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 ÁGUA COMO RECURSO .....	1
1.2 BIOMONITORAMENTO DA QUALIDADE DA ÁGUA.....	1
1.3 DESREGULADORES ENDÓCRINOS .....	3
1.4 VITELOGÊNESE.....	8
1.5 BIOMARCADORES.....	9
1.5.1 Vitelogenina como biomarcador.....	10
1.6 BIOINDICADORES.....	10
2. OBJETIVOS .....	12
2.1 OBJETIVO GERAL.....	12
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	12
3. MATERIAS E MÉTODOS .....	13
3.1 INDUÇÃO ESTROGÊNICA DA VITELOGENINA .....	13
3.2 COLETA E PROCESSAMENTO DO MATERIAL BIOLÓGICO .....	13
3.3 BIOMETRIA .....	13
3.4 MENSURAÇÃO DO ESTRADIOL NO PLASMA .....	14
3.5 HISTOLOGIA.....	14
3.6 QUANTIFICAÇÃO PROTEÍCA NO PLASMA.....	14
3.7 CARACTERIZAÇÃO DA PROTEÍNA ESTRÓGENO INDUZÍVEL.....	15
3.7.1 Separação eletroforética das proteínas do plasma.....	15
3.7.2 <i>Western blotting</i> .....	16
3.7.3 Espectrometria de massa.....	17
3.8 PRODUÇÃO DO SORO POLICLONAL .....	18
3.8.1 Isolamento da vitelogenina plasmática .....	18
3.8.2 Imunização dos coelhos .....	19
3.8.3 Coleta do soro imune .....	19
3.9 TESTE DO SORO POLICLONAL .....	19
3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	19
4. RESULTADOS.....	20
4.1 CONCENTRAÇÃO DE ESTRADIOL NO PLASMA.....	20
4.2 INDUÇÃO ESTROGÊNICA DE VITELOGENINA .....	20
4.3 BIOMETRIA .....	21
4.4 HISTOLOGIA DO FÍGADO .....	22
4.5 PADRÃO ELETROFORÉTICO DAS GLICOLIPOFOSFOPROTEÍNAS DO PLASMA.....	24
4.6 REÇÃO DE WESTERN BLOTTING PARA DETECÇÃO DA VITELOGENINA.....	25
4.7 ESPECTROMETRIA DE MASSA.....	26
4.8 SORO POLICLONAL PRODUZIDO .....	31
5. DISCUSSÃO .....	33
6. CONCLUSÕES.....	38
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	39

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 ÁGUA COMO RECURSO

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 (Hontela *et al.*, 1993; Kavlock *et al.*, 1996).

O aumento da demanda hídrica causado pelo crescimento populacional e pela significativa ampliação dos níveis de consumo *per capita*, encontra uma disponibilidade cada vez mais reduzida causada pela degradação da qualidade deste recurso, que inviabiliza determinados usos. A disponibilidade de água, tanto em quantidade como em qualidade, é um dos principais fatores limitantes ao desenvolvimento das cidades e um grande desafio para as autoridades e governantes. 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 (Andreoli *et al.*, 2000).

Os ecossistemas aquáticos são os que sofrem maior e mais impactante ação de poluentes. Poluentes chegam ao ambiente aquático não só por meio de despejos clandestinos, mas também pela deposição atmosférica e pela lixiviação de solos de regiões agrícolas (Kime, 1999).

### 1.2 BIOMONITORAMENTO DA QUALIDADE DA ÁGUA

A crescente expansão demográfica e o desenvolvimento industrial comprometeram a qualidade dos diferentes ecossistemas do planeta, em especial os aquáticos, onde ocorre o despejo de diferentes produtos químicos de origem industrial, agrícola e doméstica. 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 etc., 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 (Santos, 1998).

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 freqüentes 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).

Werner e colaboradores (2003) revisam que estações de tratamento de esgoto já foram relatadas contendo em seus efluentes, substâncias que desregulam o sistema endócrino de animais (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>). 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 de peixes, 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 biomonitorados 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 (Werner *et al.*, 2003) .

### 1.3 DESREGULADORES ENDÓCRINOS

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. Desregulador endócrino (do inglês *endocrine disruptor*) é o termo associado a toda substância ou mistura de substâncias exógenas, capazes de assumir idêntica função de um hormônio natural nos seres vivos ou inibir o funcionamento normal do mesmo, alterando as funções do sistema endócrino e conseqüentemente, prejudicando a saúde do organismo, da sua progênie ou de uma (sub)população. A Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos da América (USA EPA) define desreguladores endócrinos como “agentes exógenos que interferem na produção, transporte, metabolismos, 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. Os efeitos dos desreguladores endócrinos manifestam-se, genericamente, ao nível do sistema endócrino, causando efeitos adversos a 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, hipospádia (mal formação genital masculina) entre outros são os mais óbvios. 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).

Em geral os desreguladores endócrinos são compostos muito estáveis e, portanto persistentes; muitas vezes lipofílicos e semi-voláteis, o que facilita a rápida e vasta dispersão ambiental (Kavlock *et al.*, 1996).

Nos últimos anos, provavelmente nenhuma outra questão de toxicologia ambiental tem chamado mais atenção da comunidade científica e das autoridades regulatórias do que a desregulação endócrina. No que diz respeito às espécies animais que vivem em terra, incluindo os mamíferos aquáticos, 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).

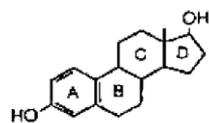
As substâncias causadoras de disfunções endócrinas são classificadas como hormônios naturais ou como substâncias artificiais. Os hormônios naturais incluem aqueles que ocorrem naturalmente no corpo humano e dos animais, como o estrogênio, a progesterona e a testosterona, e os fitoestrogênios, substâncias 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 se suspeita interferirem com o sistema endócrino dos seres humanos e dos animais (Safea, 2004).

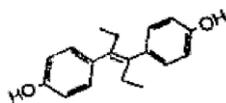
Uma das maiores fontes de desreguladores endócrinos são as excretas da medicina humana e veterinária. Ambas utilizam hormônios naturais e sintéticos em pílulas anticoncepcionais, remédios para infertilidade, endometriose, disfunções do ciclo menstrual e anabolizantes. São também fontes de desreguladores endócrinos a indústria de modo geral, em especial as indústrias de papel e plásticos e resíduos das atividades agrícolas (Moncaut, *et al.*, 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 ligando-se portanto 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 (Witorsch, 2002).

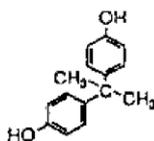
FIGURA 1 - ESTRUTURA QUÍMICA DO ESTRADIOL E DE ALGUNS DESREGULADORES ENDÓCRINOS



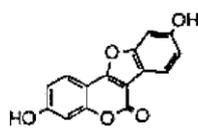
Estradiol



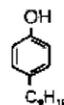
Diethylstilbestrol



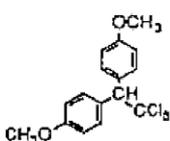
Bisphenol-A



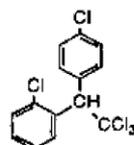
Coumestrol



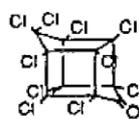
p-Nonylphenol



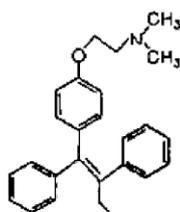
Methoxychlor



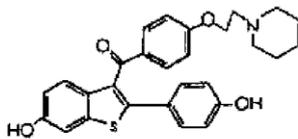
o,p'-DDT



Kepone



Tamoxifen



Raloxifene

FONTE: Witorsch, R. J., 2002.

Os hormônios esteróides são moléculas lipofílicas que atravessam as membranas biológicas por difusão, ligando-se a receptores citosólicos. 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 o citoplasma 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 nos organismos é estimulado com baixíssimas concentrações hormonais, da ordem das partes por bilhão (ppb) ou mesmo partes por trilhão (ppt), sendo essa a principal razão porque níveis ou teores vestigiais de químicos orgânicos exógenos poderem 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.*, 2009) ou até a morte (Hontela *et al.*, 1993).

Os efeitos destes desreguladores sobre humanos e também sobre diversas formas de vida animal vêm se tornando alvo da atenção da comunidade científica. Uma disfunção endócrina faz referência ao mecanismo de toxicidade de uma substância que interfere na habilidade de células, tecidos e órgão em exercer sua função de comunicação através de hormônios, resultando em uma ampla variedade de efeitos adversos que incluem redução de fertilidade e fecundidade, abortos espontâneos, reversão sexual, alteração do período reprodutivo, anomalia em glândulas endócrinas, desordens neuronais e comportamentais, alterações no sistema imune e até câncer (Safea, 2004).

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, o que é interpretado como um fenômeno evolutivo compensatório da maior mortalidade masculina ao longo da vida. A estes fatos se acrescentaram os relatos de modificações na qualidade dos espermatozoides (em termos de concentração, motilidade e anomalias celulares) e aumento na incidência de infertilidade, modificações na libido, doença nodular da tireóide, prematuridade, baixo peso ao nascer, malformações urogenitais masculinas (sobretudo criptorquidia e hipospádia) e alguns tipos de neoplasias como o câncer de testículo, e mais recentemente uma elevação na distribuição de câncer esporádico da mama em mulheres jovens (Eertmans *et al.*, 2004).

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, mimetizariam sua ação acoplando-se aos receptores hormonais nas células, estimulando assim a atividade hormonal num ritmo independente daquele definido pela homeostasia endócrina (Eertmans *et al.*, 2004).

Vale ressaltar ainda que, uma vez que os desreguladores endócrinos têm efeitos sobre a reprodução e o desenvolvimento dos organismos, as populações

como um todo estão sujeitas aos impactos destes poluentes, que podem levar ao seu declínio e até ao seu desaparecimento.

#### 1.4 VITELOGÊNESE

A vitelogenina é uma glicolipofosfoproteína sintetizada pelo fígado de fêmeas ovíparas em resposta ao hormônio endógeno  $17\beta$ estradiol (Funkestein *et al.* 2000). Este hormônio é secretado pelas gônadas que são estimuladas a fazê-lo pelo eixo hipotálamo-hipofisário e a secreção depende de fatores ambientais, estando ligada diretamente a época reprodutiva da espécie (Silversand; Hyllner; Haux, 1993). O estrógeno atravessa a membrana biológica dos hepatócitos, liga-se a seu receptor citosólico e o complexo formado pelo hormônio e seu receptor é importado para o núcleo onde atua como ativador transcricional, agindo sobre o gene da vitelogenina (Moncaut *et al.*, 2002). A proteína posteriormente 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 a reprodução. O aumento na produção da vitelogenina e a reserva energética levam a um aumento na massa deste órgão (Moura-Costa *et al.*, 2009). 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 vitelogenese 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).

## 1.5 BIOMARCADORES

Biomarcador pode ser entendido uma resposta fisiológica, morfológica, molecular ou genética individual, alterada num organismo e, é a consequência (efeito) da exposição (causa) do organismo a um agente exógeno, substância química poluente ou contaminante. Portanto os biomarcadores integram sistemas biológicos operacionais indicando processos de contaminação ou intoxicação, em diferentes níveis de organização biológica. Ao representar um processo constitutivo do organismo, o biomarcador compreende uma resposta biológica que pode ser detectada por diversos métodos que empreendem o processo *per se* (como atividades catalíticas alteradas), ou que se utiliza de alguma estrutura do sistema biológico para se inferir alterações na organização do ser vivo, como por exemplo, uma alteração morfológica em nível tecidual ou celular, uma alteração bioquímica ou molecular. 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. Por esta razão biomarcadores devem ser considerados como indicadores precoces de contaminação (Walker *et al.*, 1996; Oliveira-Ribeiro *et al.*, 2002).

Embora baseado em análises individuais, um biomarcador de grande utilidade indica a exposição subletal de um grupo de organismos que, por propriedades inerentes ao mesmo, põem em risco uma comunidade natural. Como exemplo a capacidade reprodutiva e de procura de alimento podem sofrer alterações que tornam inviável a continuidade de uma população de uma determinada espécie (Oliveira-Ribeiro *et al.*, 2002, Akaish *et al.*, 2004).

### 1.5.1 Vitelogenina como biomarcador

Indivíduos machos e juvenis possuem o receptor citosólico 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 e juvenis. O fato de a vitelogenina ser uma proteína específica das fêmeas, porém expressa por machos frente a desreguladores endócrinos torna esta proteína um bom biomarcador para disfunções do sistema endócrino (Marin *et al.*, 2004).

Os desreguladores endócrinos induzem todas as alterações metabólicas relacionadas a vitelogênese: aumento da massa do fígado, aumento da concentração de vitelogenina e cálcio plasmáticas, reserva energética no fígado e desenvolvimento das gônadas, com seu conseqüente aumento de massa (Funkestein *et al.* 2000).

## 1.6 BIOINDICADORES

Uma maneira de se fazer o diagnóstico do potencial tóxico dos xenobióticos e de seus efeitos sobre o ambiente natural é através do uso de bioindicadores, constituindo métodos e técnicas que vem se tornando cada vez mais freqüentes nos estudos de biomonitoramento nos últimos anos (Oliveira Ribeiro *et al.*, 2002; Oliveira Ribeiro *et al.*, 2008). Bioindicadores são espécies biológicas que podem indicar os primeiros sinais de estresse ambiental causado por contaminantes em níveis mais elevados de organização biológica (Adams, 2002) apresentando características que favoreçam sua utilização na avaliação da saúde de um determinado ecossistema, tais como representatividade da área de estudo, facilidade de identificação e coleta e possibilidade de obtenção de quantidade suficiente de material biológico.

Atualmente ambientes aquáticos como rios, estuários, lagoas e oceanos próximos a grandes cidades recebem seus esgotos e efluentes industriais. A escolha de peixes como modelo biológico deve-se ao fato de os mesmo estarem sob constante influência de xenobióticos provenientes de efluentes industriais, agrícolas e até domésticos, com efeito estrogênico. O modelo biológico deste trabalho é a espécie *Rhamdia quelen*, cujo nome popular é jundiá. O jundiá tem distribuição

neotropical e é encontrado desde o centro da Argentina até o sul do México (Silfvergrip,1996), sendo que o cultivo desta espécie para fins comerciais está aumentando, especialmente no sul do Brasil. Esta espécie pode atingir até 50 cm de comprimento e 3 kg de massa, possui hábito noturno e habita locais calmos e profundos dos rios. Seu hábito alimentar é omnívoro, com tendência detritívora. A maturidade sexual é atingida no primeiro ano de vida, sendo que há dimorfismo sexual. Machos prontos para a espermiacão liberam com facilidade o líquido espermático quando o abdome é pressionado e o orifício genital é protraído. Fêmeas maduras apresentam o orifício genital avermelhado e com dilatação ventral (Mardini *et al.*, 1981). É uma espécie ovulípara e, na natureza, os cardumes desovam em locais com água limpa, calma e de fundo pedregoso. Não apresenta cuidado parental. A espécie possui dois picos reprodutivos por ano (um no verão e outro na primavera) e desova múltipla (Mardini *et al.*, 1981).

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste trabalho foi caracterizar o processo de vitelogenese em machos de *Rhamdia quelen*, bem como produzir anticorpos policlonais contra a molécula de vitelogenina desta espécie.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Induzir a vitelogenese em machos e compará-los a fêmeas em vitelogenese.
- ✓ Verificar alterações metabólicas no fígado associadas a vitelogenese.
- ✓ Caracterizar por SDS-PAGE o padrão de expressão das glicolipofosfoproteínas do plasma.
- ✓ Identificar a molécula de vitelogenina por meio de reações de imunodeteção e de espectrometria de massa.
- ✓ Produzir anticorpos policlonais contra a vitelogenina utilizando uma metodologia que permita sua empregabilidade no biomonitoramento.

### 3. MATERIAS E MÉTODOS

#### 3.1 INDUÇÃO ESTROGÊNICA DA VITELOGENINA

O experimento realizou-se na PISCICULTURA PANAMÁ (Paulo Lopes – SC), que forneceu todo o apoio técnico científico. Foram utilizados 30 animais experimentais, sendo todos da espécie *Rhamdia quelen*. Dos 30 exemplares de *R. quelen*, 10 eram machos não injetados com o estrógeno, sendo injetados penas com o óleo de canola (CTM - grupo controle de machos), 10 eram fêmeas não injetadas 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 and Nelson, 2003; Zarogian *et al.*, 2001). Para a exposição o hormônio 17 $\beta$ estradiol foi solubilizado em óleo de canola devido às suas propriedades lipofílicas.

#### 3.2 COLETA E PROCESSAMENTO DO MATERIAL BIOLÓGICO

A coleta do material biológico foi realizada 17 dias após a indução estrogênica experimental (Carrera *et al.*, 2007; Pait and Nelson, 2003;). O sangue foi coletado com o animal ainda vivo, conforme procedimento descrito por Silversand *et al.*, (1993), e ao sangue total foi acrescentado na razão 1:10 (v/v) o anti-proteolítico PMSF 10mM. A mistura foi centrifugada a 4°C, sob a força de 3000xg por 30 minutos para obtenção do plasma, que foi alíquotado, e mantido a temperatura de – 75°C para análises posteriores.

O fígado foi coletado e mantido em solução fixadora de Alfac (formol, álcool e ácido acético glacial) por 16 horas e posteriormente sofreu processamento histológico.

#### 3.3 BIOMETRIA

Para cada um dos grupos experimentais foram mensurados a massa corpórea, das gônadas e o 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 multiplicada por cem e a massa corpórea. O índice gonadossomático como sendo a relação entre a massa das duas gônadas multiplicada por cem e a massa corpórea.

### 3.4 MENSURAÇÃO DO ESTRADIOL NO PLASMA

Para a mensuração do hormônio  $17\beta$ estraiol, os hormônios esteróis foram extraídos do plasma de indivíduos (ou de *pools* de indivíduos quando o volume de plasma estava abaixo de  $400\mu\text{L}$ ) em éter dietílico (1:4 v/v). Os homogenatos de plasma em éter foram congelados em nitrogênio líquido permitindo a separação do plasma e da fase etérea contendo os esteróis. A fase etérea foi evaporada e os extratos de esteróis foram reconstituídos em  $200\mu\text{L}$  de tampão próprio para o ensaio ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ;  $\text{NaCl}$ ; BSA; pH 7.0) e posteriormente analisados por um ensaio de ELISA utilizando anticorpo policlonal anti  $17\beta$ estraiol marcado com peroxidase (diluição 1:12000/ Anti human-  $17\beta$ estraiol Sigma)

### 3.5 HISTOLOGIA

Após as 16 horas de fixação m Alfac, o material biológico foi desidratado em série crescente de etanol, diafanizado em xilol e incluído e emblocado em Paraplast (Sigma®). Cortes histológicos com  $5\mu\text{m}$  de espessura foram obtidos em micrótomo e corados com Hematoxilina e Eosina e analisados em microscópio de campo claro.

### 3.6 QUANTIFICAÇÃO PROTEÍCA NO PLASMA

A quantificação de proteínas totais das alíquotas de plasma foi determinada para que os dados obtidos nos ensaios pudessem ser normalizados. Utilizou-se, para a quantificação, o método de Bradford (1976).

Em microplaca, adicionou-se  $1\mu\text{l}$  das amostras de plasma descongeladas provenientes das alíquotas diluídas em PBS, seguidos de  $200\mu\text{l}$  do reativo de Bradford. Para a montagem de uma curva padrão de BSA (albumina de soro bovina), também foi adicionado em microplaca BSA nas concentrações de 0, 1, 2, 3,

4, 5 e 6 µg de BSA por mililitro de volume final de solução (diluição em H<sub>2</sub>O milique), seguidos também do reativo de *Bradford*. Procederam-se as leituras de absorbância ( $\lambda = 595 \text{ nm}$ ).

A concentração de proteínas foi determinada a partir da comparação dos valores de absorbância com aqueles provenientes de curva-padrão de BSA. A partir de uma equação de primeiro grau representativa da curva padrão, calcularam-se as concentrações de proteínas das alíquotas, através de suas absorbâncias.

### 3.7 CARACTERIZAÇÃO DA PROTEÍNA ESTRÓGENO INDUZÍVEL

#### 3.7.1 Separação eletroforética das proteínas do plasma

Para a amostragem de VTG no plasma dos indivíduos de todos os grupos, as amostras com sua quantificação protéica previamente determinada foram diluídas em PBS e então preparadas em tampão de amostra redutor.

As amostras de plasma 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, glicoproteínas, fosfoproteínas e lipoproteínas ou seguido de *western blotting*.

##### 3.7.1.1 Coloração de proteínas totais

Após a separação eletroforética das proteínas do plasma, as mesmas foram coradas com Comassie (R250) preparado em metanol (40%) e ácido acético glacial 5%. O gel foi corado seguindo descoloração em solução de metanol 50% e ácido acético glacial 15%.

##### 3.7.1.2 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 enxágüe suave com água destilada. O gel foi então imerso em ácido

periódico 1% (dissolvido em ácido acético 3%) por 50min. Para a retirada do ácido periódico o gel foi lavado por 12 horas 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 10min 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.

#### 3.7.1.3 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 horas, seguindo então para uma solução de SSA 10% contendo 0,5 M de  $\text{CaCl}_2$  (recém preparada) por 1 hora para que a resolução das proteínas ficasse mais bem definida. O gel foi lavado em água destilada para remover o  $\text{CaCl}_2$ , sendo então colocado em  $\text{NaOH}$  0,5 M a  $60^\circ\text{C}$  por 30 min. Após a passagem pelo  $\text{NaOH}$  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% e  $\text{HNO}_3$  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.

#### 3.7.1.4 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  $\text{KOH}$  0.8 M por 40 minutos. A descoloração foi feita em solução de etanol 2% e ácido acético 2% (Prat *et al.*, 1969).

#### 3.7.2 *Western blotting*

Amostras de plasma dos indivíduos de todos os grupos foram submetidas à SDS-PAGE, seguida da transferência das proteínas para uma membrana de nitrocelulose (BioRad®: poro de 0,45 µm). Marcadores de massa molecular pré-corados (BioRad®) foram empregados para o monitoramento da transferência e do perfil eletroforético da vitelogenina. As membranas de nitrocelulose contendo as proteínas eletrotransferidas do gel foram primeiramente coradas com Ponceauu's para análise da eletroforese e da transferência. Após a retirada do corante da membrana, a mesma foi bloqueada por 1 hora com 5% leite sem gordura (Molico) em solução de TBS-T (20mM Tris pH 7.4, 120mM NaCl e 0.05% Tween 20). Após o bloqueio a membrana foi incubada por 16 horas à 4°C com o anticorpo anti-vitelogenina de *Sapaurus aurata* (Biosense, Norway) os anti-soro supracitado, numa diluição de 1:750. A membrana foi então lavada três vezes com TBS-T para a remoção dos anti-corpos e foi incubada por 1 hora com anti-imunoglobulina de coelho conjugada à com peroxidase (Sigma), 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).

Para a análise da resposta imune do animal imunizado, as mesma amostras foram usadas, mas como anticorpo primário foi empregado o soro imune do coelho (em diferentes diluições) e como controle negativos destas reações foi empregado o soro pré imune.

### 3.7.3 Espectrometria de massa

Após SDS-PAGE em gel de poliacrilamida 8%, as proteínas totais do plasma foram 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 horas. Subseqüentemente 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 amônia (25 mM) e acetonitrila 50%, seguindo desidratação em acetonitrila. As proteínas das bandas foram então reduzidas etampão contendo 10 mM DTT (,4-Dithiothreitol) 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 acetona e bicarbonato de amônia e secas em *speed vac*.

Após a secagem as amostras sofreram digestão com a enzima tripsina (Promega®) 12ng/ul por 24 horas a 37°C. Tal enzima é específica para ensaios proteômicos uma vez que a mesma cliva especificamente sítios de ligação de lisinas e argininas não precedidos de prolina na região carboxi terminal e também devido as modificações inseridas na enzima que impedem a autoclivagem da mesma. As frações da digestão triptica foram dessalinizadas usando ZipTip C18 (Milipore) e a então misturadas em igual volume com a solução de matriz para espectrometria de massa.

Os peptídeos provenientes da digestão triptica foram analisados no Depto de Bioquímica, UFPR, em espectrômetro de massa Ultraflex MALDI TOF/TOF (Burker Daltronic, GmbH). Foram obtidos espectros de massa 1 (MS1 ou MS) que são os espectros provenientes diretamente da digestão triptica da amostra 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 relações monoisotópicas massa/carga obtidas dos peptídeos digeridos tripiticamente foram analisadas pelo software MASCOT utilizando-se os bancos de dados Swiss-prot e NCBI não redundante.

### 3.8 PRODUÇÃO DO SORO POLICLONAL

#### 3.8.1 Isolamento da vitelogenina plasmática

As proteínas do plasma total de machos induzidos tiveram seu teor protéico previamente quantificado pelo método de Bradford (1976) e foram separadas por SDS-PAGE, conforme descrito no item 3.7.1. O gel foi lavado 3 vezes de 1 hora com água destilada e a banda correspondente a vitelogenina foi recortada do gel e macerada com auxílio de grau e pistilo em PBS.

### 3.8.2 Imunização dos coelhos

Um coelho da raça *New Zeland* foi mantido no biotério do Setor de Ciências Biológicas. Amostras 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, sendo realizado um total de 3 imunizações (Holbech *et al.*, 2001; Alves-Costa, 2006), foram realizadas coletas de sangue a partir da veia marginal auricular, ou a administração de 0,25 mg de VTG isolada.

### 3.8.3 Coleta do soro imune

O sangue foi deixado a 37°C por 1 hora e então centrifugado a 4°C, por 7 minutos a 3000xg para obtenção do do soro contendo os anticorpos policlonais que anti VTG de *R. quelen*, este alíquotado e mantido a -20°C.

## 3.9 TESTE DO SORO POLICLONAL

Um ensaio de *western blotting*, utilizando a vitelogenina de *R. quelen*, foi realizado para a confirmação da especificidade dos anticorpos produzidos. Em tal ensaio reagiu-se a vitelogenina da espécie em questão com o soro pré imune do coelho (soro antes das imunizações) e com o soro imune do coelho (soro obtido após todas as imunizações).

## 3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

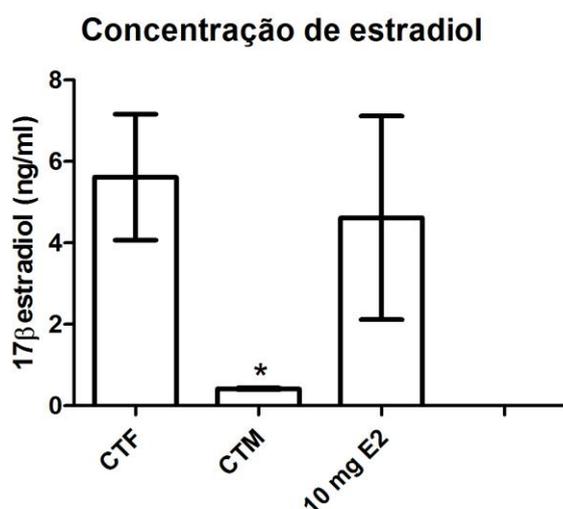
Para os índices hepato e gonadossomáticos e para a concentração de estradiol no plasma foram realizadas análises estatística utilizando-se ANOVA uma via seguido de Tukey para comparação entre todos os grupos experimentais. Foram consideradas diferenças estatisticamente significantes aquelas cujo  $p$  foi menor ou igual a 0.05 ( $p \leq 0.05$ ).

## 4. RESULTADOS

### 4.1 CONCENTRAÇÃO DE ESTRADIOL NO PLASMA

A concentração do hormônio  $17\beta$ estradiol mostrou-se similar no plasma de fêmeas e machos expostos a  $10 \text{ mg E}_2$ . As fêmeas possuíam na média  $3,08 \text{ ng}$  de estradiol por mililitro de plasma, enquanto que machos expostos a  $10 \text{ mg E}_2 \cdot \text{kg}^{-1}$  apresentaram  $3,54 \text{ ng}$  de estradiol por mililitro de plasma. Machos controle apresentaram  $0,05 \text{ ng}$  de estradiol por mililitro de plasma. A figura 2 mostra as concentrações de estradiol no plasma de indivíduos de todos os grupos considerando-se também o desvio padrão.

FIGURA 2 – CONCENTRAÇÃO DE ESTRADIOL EM  $\text{ng} \cdot \text{ml}^{-1}$ .



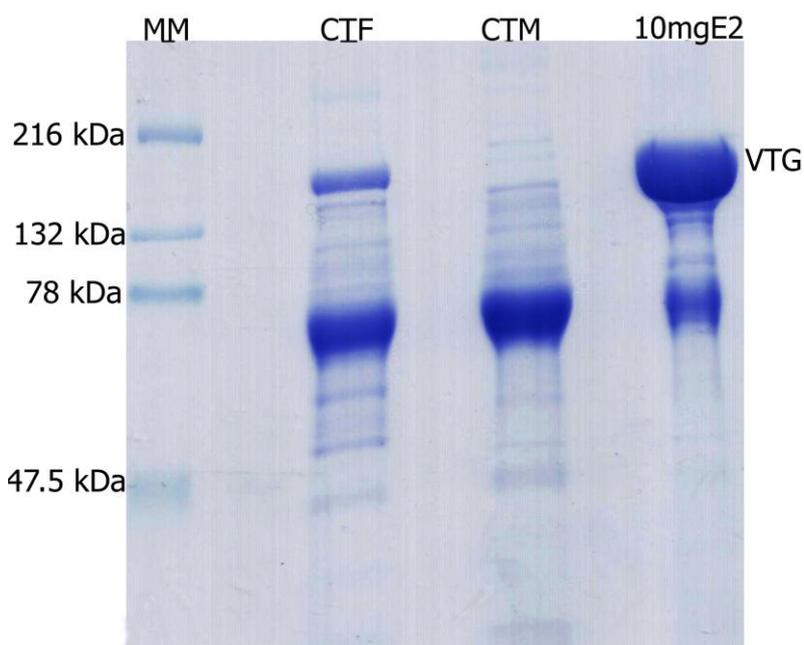
FONTE: O autor (2009).

NOTA: Concentração de  $17\beta$ estradiol em nanogramas de estradiol por mililitro de plasma. CTF: grupo de fêmeas controle. CTM: grupo de machos controle.  $10 \text{ mg E}_2$ : machos expostos a  $10 \text{ mg E}_2 \cdot \text{kg}^{-1}$ . \*  $p < 0.05$ .

### 4.2 INDUÇÃO ESTROGÊNICA DE VITELOGENINA

Verificou-se, através do uso de um SDS-PAGE e também de *wester blotting*, que a vitelogenina estava presente nas fêmeas maduras e que essa proteína foi induzida pelo estrógeno nos machos expostos ao mesmo. Machos não expostos ao estrógeno não apresentaram indução estrogênica da VTG.

FIGURA 3 – INDUÇÃO ESTROGÊNICA DA VITELOGENINA



FONTE: O autor (2009).

NOTA: 100µg de proteínas totais do plasma resolvidas por SDS-PAGE seguindo coloração com azul de Coomassie. 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>. VTG: banda correspondente a vitelogenina.

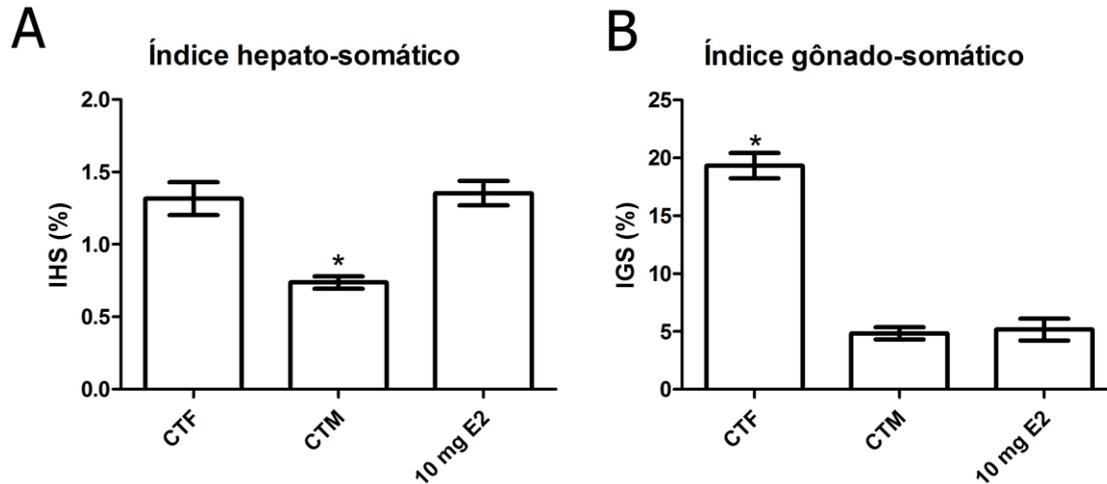
#### 4.3 BIOMETRIA

A massa do fígado foi semelhante entre machos controle e fêmeas controle e entre machos controle e machos injetados. Observa-se, em relação ao índice hepatossomático, a equivalência do grupo de fêmeas controle em ovogênese (CTF) e o grupo de machos injetados com a maior dose (Figura 4 A). Neste, o incremento na massa relativa do fígado deu-se pelo efeito indutivo do estradiol, na produção de vitelogenina.

A massa das gônadas das fêmeas apresentou-se aumentada em comparação com a massa das gônadas de machos controles e expostos ao estrógeno. Machos controles e expostos ao estradiol apresentaram valores semelhantes para as massas das gônadas. O índice gonadossomático das fêmeas apresentou valor superior tanto quando comparado ao de machos controle quanto quando comparado

ao de machos expostos ao estrógeno, sendo que não há diferenças entre os dois últimos para tal critério (Figura 4 B).

FIGURA 4 – ÍNDICES BIOMÉTRICOS

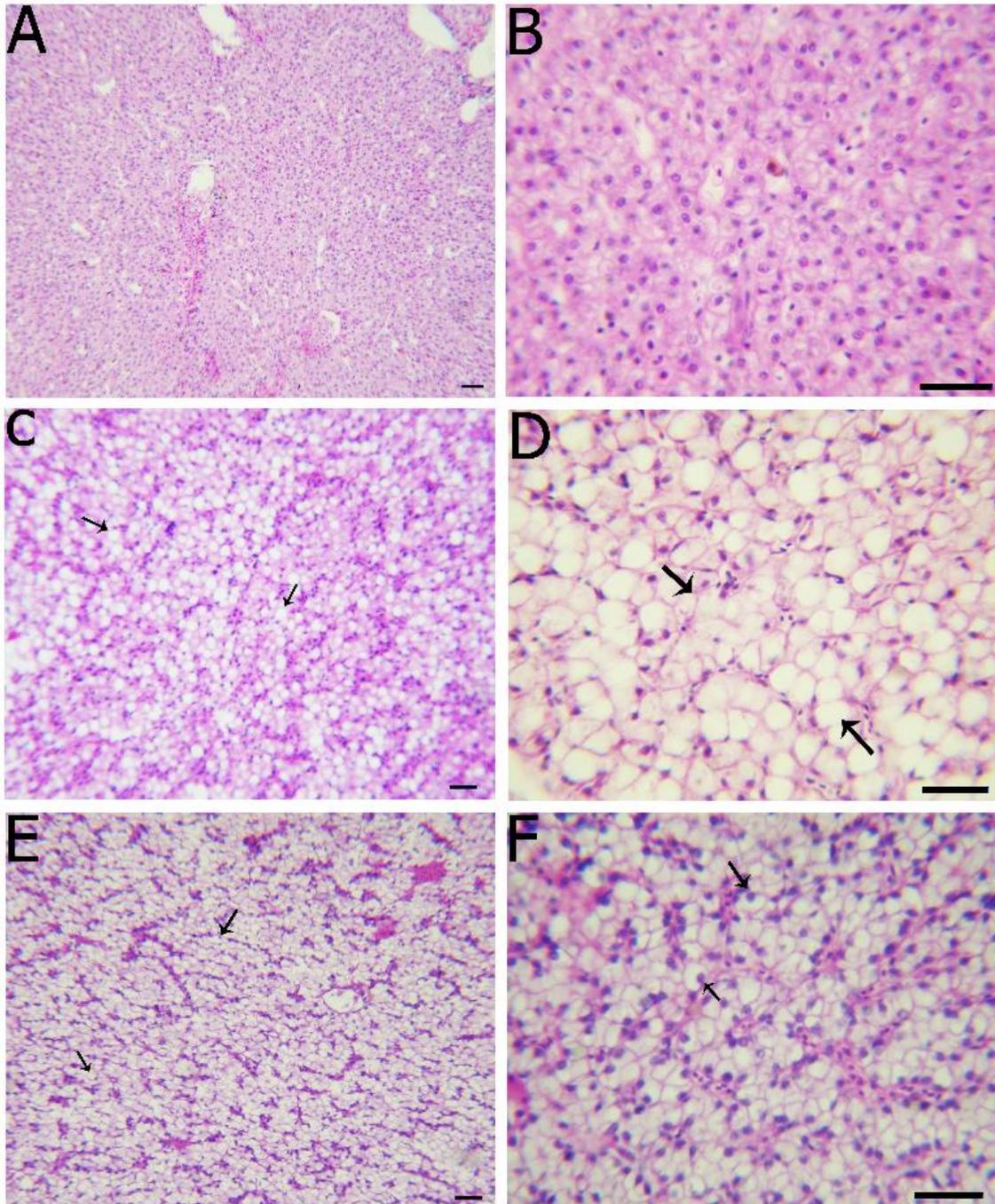


FONTE: O autor (2009).

NOTA: (A) Índice hepatossomático em porcentagem, indicando a relação da massa do fígado e da massa corpórea. (B) Índice gonadossomático em porcentagem, indicando a relação da massa das gônadas e da massa corpórea. CTF: grupo de fêmeas controle. CTM: grupo de machos controle. 10 mg E2: machos expostos a 10 mg E<sub>2</sub>.kg<sup>-1</sup>. \* p<0.05.

#### 4.4 HISTOLOGIA DO FÍGADO

Cortes do fígado de fêmeas em vitelogênese e do fígado 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. 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 5).

FIGURA 5 – HISTOLOGIA DO FÍGADO DE *R. quelen*.

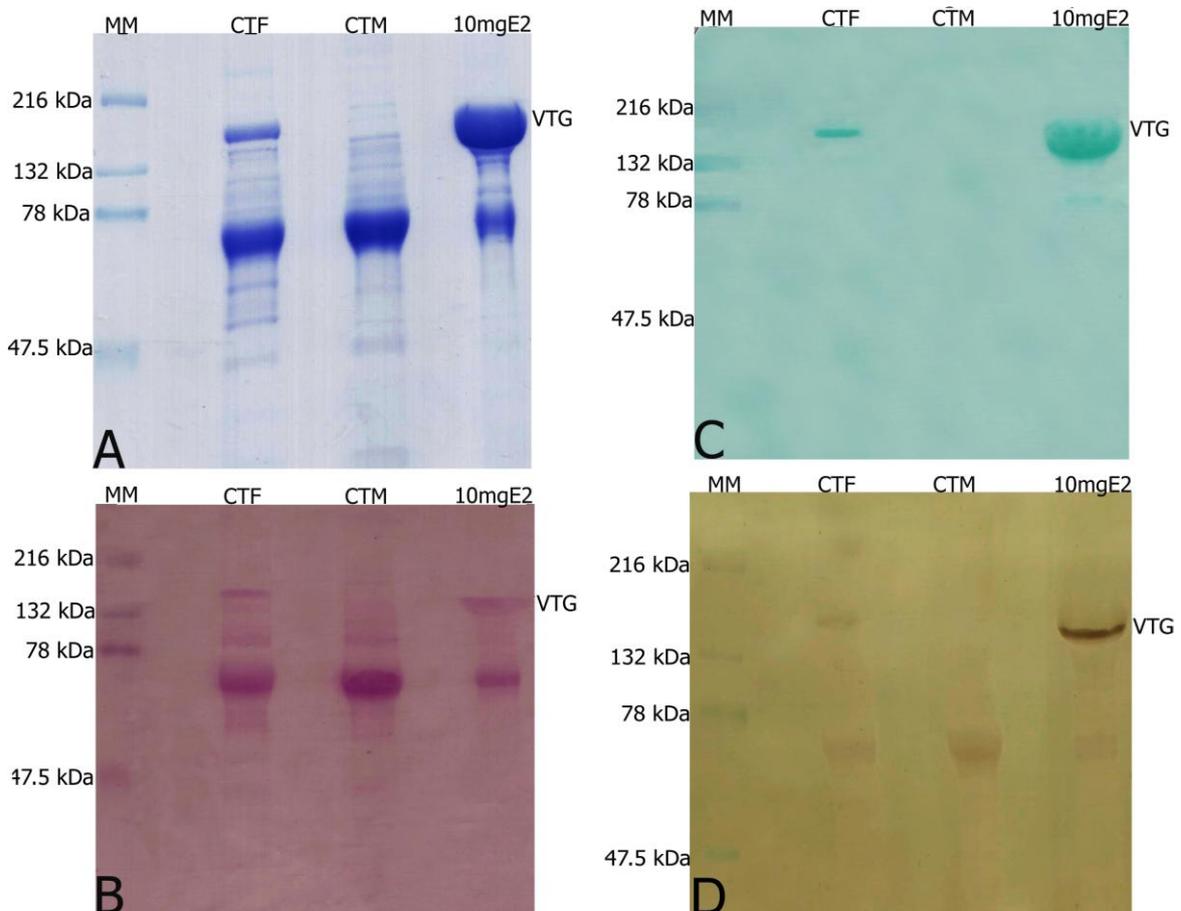
FONTE: O autor (2009).

NOTA: (A) e (B) estrutura do fígado de machos não expostos ao estrogênio. (C) e (D) estrutura do fígado de fêmeas em vitelogênese. (E) e (F) estrutura do fígado de machos expostos a  $10 \text{ mg E}_2 \cdot \text{kg}^{-1}$ . As setas indicam células vacuolizadas. Barras de escala =  $50 \text{ }\mu\text{m}$ .

#### 4.5 PADRÃO ELETROFORÉTICO DAS GLICOLIPOFOSFOPROTEÍNAS DO PLASMA

O SDS-PAGE indicou uma banda de aproximadamente 200 kDa presente nos machos estrógenos induzidos, presente também nas fêmeas em vitelogênese e ausente nos machos controles (Figura 6 A). Verificou-se também que tal banda foi super expressa nos machos expostos ao E<sub>2</sub> quando comparada com a banda expressa pelas fêmeas maduras. A banda em questão corou-se com reativo de Schiff indicando que a proteína é glicosilada (Figura 6 B), corou-se com verde malaquita (Figura 6 C), sendo este um indicativo de que a proteína é fosforilada e corou-se com Sudan Black (figura 6 D), sendo este último indicativo de lipidação na proteína.

FIGURA 6 – PADRÃO ELETROFORÉTICO DAS PROTEÍNAS DO PLASMA.



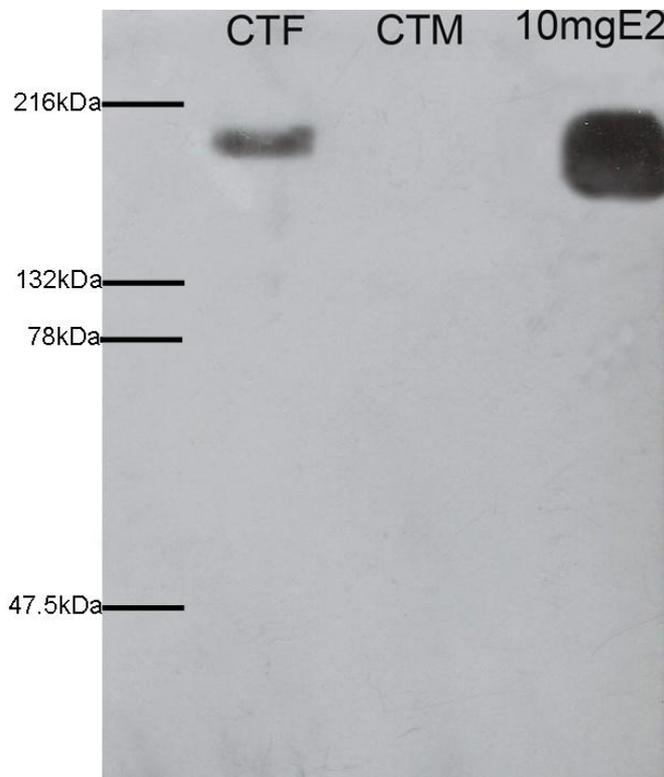
FONTE: O autor (2009).

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 E2: machos expostos a 10 mg E<sub>2</sub>.kg<sup>-1</sup>.

#### 4.6 REAÇÃO DE *WESTERN BLOTTING* PARA DETECÇÃO DA VITELOGENINA

O anticorpo comercial anti VTG de *Sparus aurata* reconheceu o antígeno expresso nos machos expostos ao estrógeno, assim como, reconheceu o antígeno expresso por fêmeas. No entanto, a VTG não foi detectada nos machos controle, o que de fato era esperado já que em condições normais esta proteína não expressa em machos (Figura 7).

FIGURA 7 – REAÇÃO DE *WESTERN BLOTTING* VITELOGENINA



FONTE: O autor (2009).

NOTA: 100µg de proteínas totais do plasma resolvidas por SDS-PAGE e submetidas a reação de *western blotting* utilizando-se anticorpo comercial. CTF: grupo de fêmeas controle. CTM: grupo de machos controle. 10 mg E2: machos expostos a 10 mg E<sub>2</sub>.kg<sup>-1</sup>.

#### 4.7 ESPECTROMETRIA DE MASSA

A análise 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 MS1 quanto o MS2 de machos e fêmeas 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, 2 e 3 e Figura 8).

TABELA 1 – RELAÇÕES MASSA/CARGA DA VITELOGENINA DE FÊMEAS MADURAS.

MS1	MS2- íon parental 1310.796	MS2 -íon parental 1506.874	MS1	MS2 -íon parental 1310.796	MS2-íon parental 1506.874
931.584	70.059	70.109	1567.985		1478.735
963.577	86.092	72.108	1588.931		
1110.608	112.092	86.150	1653.993		
1125.698	129.121	110.116	1656.998		
1147.701	175.155	112.140	1666.005		
1156.713	255.249	129.275	1686.013		
1163.688	272.219	169.253	1700.038		
1170.712	487.330	175.186	1726.966		
1178.692	1097.210	197.334	1733.059		
1185.660	1103.639	199.333	1741.002		
1190.579	1119.974	266.273	1747.080		
1192.695	1269.047	268.296	1796.389		

1194.679	1272.746	286.359	1833.018		
1201.629	1276.438	294.325	1849.027		
1208.683	1279.698	300.292	1853.029		
1252.676	1282.927	303.320	1869.074		
1266.795	1285.995	371.437	1879.056		
1269.702	1289.193	374.245	1885.057		
1304.795		381.434	1895.088		
1310.796		399.298	1911.137		
1318.815		445.421	1943.022		
1326.806		560.304	1957.063		
1332.807		593.396	1974.219		
1348.784		705.317	2055.314		
1397.788		727.322	2060.044		
1403.783		744.381	2062.220		
1411.786		777.132	2074.165		
1417.825		1020.461	2077.249		
1426.793		1037.560	2090.247		
1481.832		1291.795	2246.397		
1487.908		1308.703	2283.362		
1506.874		1315.099	2297.430		
1517.923		1458.792	2.478.577		
1537.965		1472.258	2495.595		
1565.945		1474.536	2694.787		
			2967.909		

FONTE: O autor (2009)

NOTA: MS1 – espectro de massa dos peptídeos provenientes da digestão trípica da vitelogenina. MS2 – íon parental 1310.796 – espectro de massa dos peptídeos constituintes do íon parental 1310.796. MS2- íon parental 1506.874 – espectro de massa dos peptídeos constituintes do íon parental 1506.874.

TABELA 2 - RELAÇÕES MASSA CARGA DA VITELÓGENINA DE MACHOS EXPOSTOS AO ESTRÓGENO.

MS1	MS2-íon parental 1310.768	MS2-íon parental 1506.856	MS1	MS2-íon parental 1310.768	MS2-íon parental 1506.856
927.482	70.061	70.097	2002.018	527.380	606.170
931.516	86.105	72.097	2060.010	530.312	664.211
1.63.639	101.069	86.140	2061.968	558.343	705.122
1170.671	112.106	101.088	2074.024	601.372	727.358
1193.614	129.138	112.147	2075.994	629.377	744.375
1251.675	155.151	129.160	2283.122	676.321	777.004
1270.708	172.204	169.221		700.405	791.226
1310.768	175.158	175.169		715.192	874.176
1318.767	199.209	195.192		784.462	1020.484
1338.690	214.159	199.195		813.490	1037.487
1383.815	227.244	266.204		908.507	1119.453
1460.836	230.190	272.198		914.669	1285.620
1461.836	243.106	286.255		930.641	1291.262
1473.726	255.217	294.236		1081.171	1305.324
1481.780	272.199	300.214		1084.713	1308.687
1506.856	302.216	303.188		1097.390	1468.833
1656.965	328.266	371.252		1103.631	1472.370
1726.841	342.213	374.315		1119.945	1474.677
1777.993	359.228	381.218		1273.248	1479.485
1832.947	385.277	399.385		1276.595	
1848.939	399.280	414.163		1279.769	
1868.923	416.284	445.298		1281.859	
1884.930	456.281	470.429		1284.001	
1942.893	459.276	560.251		1286.075	
1956.897	487.284	593.326			

FONTE: O autor (2009)

NOTA: MS1 – espectro de massa dos peptídeos provenientes da digestão trípica da vitelogenina. MS2 – íon parental 1310.768 – espectro de massa dos peptídeos constituintes do íon parental 1310.768. MS2- íon parental 1506.856 – espectro de massa dos peptídeos constituintes do íon parental 1506.856.

TABELA 3 – SEMELHANÇAS DE RELAÇÃO MASSA CARGA DA VITELOGENINA DE FÊMEAS E MACHOS EXPOSTOS AO ESTRÓGENO.

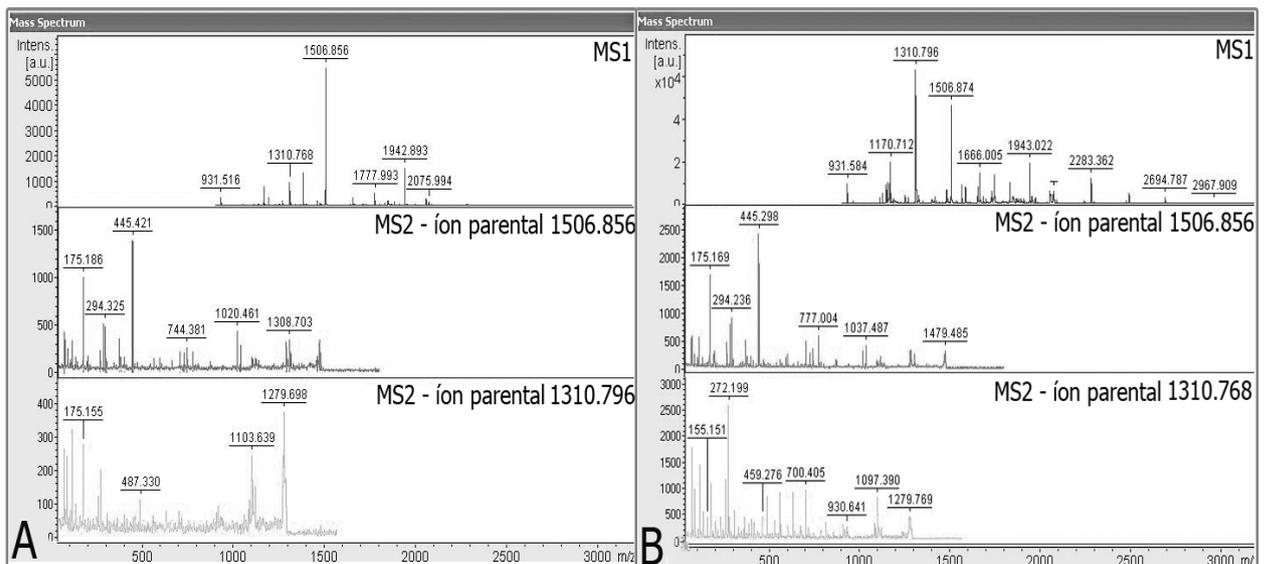
MS1		MS2 – íon parental 1310		MS2 – íon parental 1506	
Fêmea	Macho E2	Fêmea	Macho E2	Fêmea	Macho E2
931.584	931.516	70.059	70.061	70.109	70.097
1163.688	1163.639	86.092	86.105	72.108	72.097
1170.712	1170.671	112.092	112.106	86.150	86.140
1310.796	1310.768	129.121	129.138	129.275	129.160
1318.815	1318.767	175.155	175.158	169.253	169.221
1481.832	1481.780	255.249	255.217	175.186	175.169
1506.874	1506.856	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

FONTE: O autor (2009)

NOTA: MS1 – espectro de massa dos peptídeos provenientes da digestão trípica da vitelogenina. MS2 – íon parental 1310 – espectro de massa dos peptídeos constituintes do íon parental 1310.796. MS2 - íon parental 1506.874 – espectro de massa dos peptídeos constituintes do íon parental 1506. Fêmeas: grupo de fêmeas em vitelogênese. Machos E2: grupo de machos expostos a 10 mg E<sub>2</sub>.kg<sup>-1</sup>

FIGURA 8 – ESPECTROS DE MASSA DA PROTEÍNA CONSIDERADA COMO VITELOGENINA.



FONTE: O autor (2009).

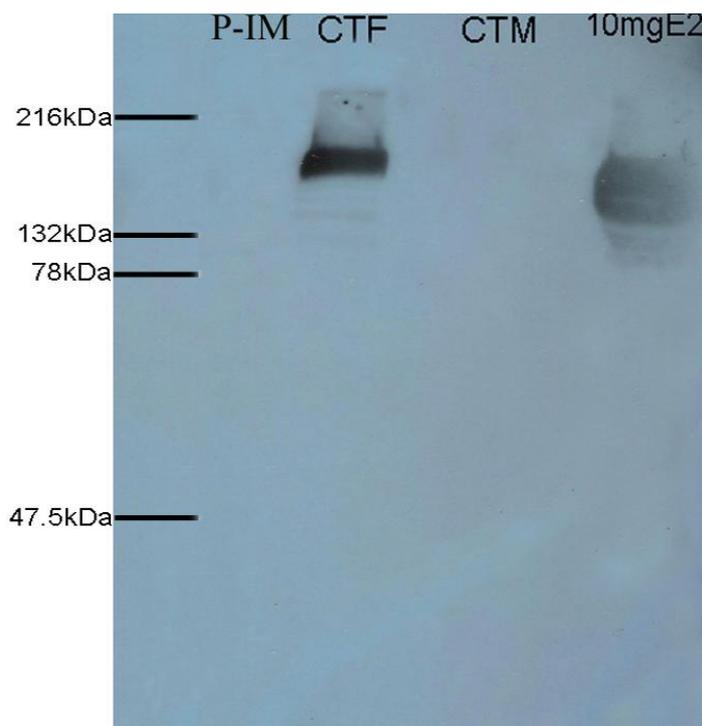
NOTA: (A) Espectrometria de massa da vitelogenina de fêmea em vitelogênese. MS1 - espectros de massa da digestão trípica da VTG de fêmea (MS1); MS2 - íon parental 1506.856 - espectros de massa dos aminoácidos do pico de massa 1506,856 proveniente da digestão trípica da VTG da fêmea (MS2 do pico 1506,856); MS2 – íon parental 1310.796 - espectros de massa dos aminoácidos do pico 1310,796 proveniente da digestão trípica da VTG da fêmea (MS2 do pico 1310,796).

(B) Espectrometria de massa da vitelogenina de macho induzido com E<sub>2</sub>. MS1: espectros de massa da digestão trípica da VTG de macho induzido com E<sub>2</sub> (MS1); MS2 – íon parental 1506.856: espectros de massa dos aminoácidos do pico 1506,856 proveniente da digestão trípica da VTG de macho induzido com E<sub>2</sub> (MS2 do pico 1506,856); MS2 – íon parental 1310.768: espectros de massa dos aminoácidos do pico 1310,768 proveniente da digestão trípica da VTG de macho induzido com E<sub>2</sub> (MS2 do pico 1310,768).

#### 4.8 SORO POLICLONAL PRODUZIDO

O soro pré-imune, coletado do coelho antes deste ser imunizado com vitelogenina de *R. quelen*, não reagiu com nenhuma proteína do plasma de nenhum grupo experimental (figura 9 – P-IM). O soro policlonal produzido reagiu especificamente (diluição 1: 40000) com a banda correspondente a vitelogenina apenas em fêmeas em vitelogênese e em machos expostos ao estrógeno. Não há reação entre o soro policlonal produzido e qualquer proteína presente no plasma de machos controle.

FIGURA 9 – REÇÃO DE *WESTERN BLOTTING* DA VITLOGENINA UTILIZANDO SORO POLICLONAL PRODUZIDO



FONTE: O autor (2009).

NOTA: 50 $\mu$ g de proteínas totais do plasma resolvidas por SDS-PAGE e imuno detectadas por *western blotting* utilizando-se os anticorpos policlonais produzidos. P-IM: soro pré imune reagindo com VTG de macho exposto a 10 mg E<sub>2</sub>.kg<sup>-1</sup>. CTF: plasma do grupo de fêmeas controle. CTM: plasma do grupo de machos controle. 10 mg E<sub>2</sub>: plasma de machos expostos a 10 mg E<sub>2</sub>.kg<sup>-1</sup>.

## 5. DISCUSSÃO

A ocorrência de hormônios estrógenos em ambientes aquáticos naturais tem aumentado enormemente nas duas últimas décadas devido às suas aplicações na medicina humana e veterinária, sendo tal aumento preocupante para os profissionais da área de Ecotoxicologia. Uma injeção intraperitoenal de um dado composto não é a forma ambientalmente mais relevante de exposição, no entanto esta forma de exposição demonstra como uma dada espécie responde ao composto de interesse e quais tipos de respostas são relevantes para a saúde e sobrevivência da espécie.

As diferentes espécies de peixes tem diferentes sensibilidades aos hormônios estrógenos (Maria *et al.*, 2007, Moura-Costa *et al.*, 2009; Zarrogian *et al.*, 2000), sendo que os efeitos da exposição são em geral doses dependente. A dose escolhida para a exposição foi aquela relatada pela literatura como sendo capaz de induzir a vitelogenese sem ser letal para o animal (Flynn *et al.*, 2007; Maria *et al.*, 2007, Zarrogian *et al.*, 2000). Durante um experimento prévio, cujos dados não foram expostos neste trabalho, verificou-se que a dose de 20 mg E<sub>2</sub>.kg<sup>-1</sup> and 50 mg E<sub>2</sub>.kg<sup>-1</sup> foram letais para *R. quelen*, no entanto Mills e colaboradores., 2001, relata que 20 mg E<sub>2</sub>.kg<sup>-1</sup> não é letal para a espécie *Paralichthys dentatus*.

Apesar dos efeitos desregulaodres endócrinos serem observados em baixíssimas concentrações de estrógenos na ordem de ppb, as descargas domésticas contém estrógenos no ordem de microgramas por litro. Deve-se levar em conta também o fato de os tratamentos de efluentes não eliminarem por completo os estrógenos nem seus metabolitos. É também agravante o fato de estrógenos não serem considerados, até o presente momento pela resolução vigente que regulariza as concentrações de poluentes aceitáveis na água de consumo, como poluentes capazes de causar efeitos deletérios as populações de organismos aquáticos e também as populações humanas.

A concentração de estradiol no plasma de fêmeas de *R. quelen* em vitelôgenese foi similar a concentração encontrada também por outros autores (Barcellos *et al.*, 2001; Soso *et al.*, 2007), sendo que esta concentração foi superior a concentração presente em mamíferos, possivelmente devidos as diferentes estratégias reprodutivas adotadas por peixes e mamíferos. Fêmeas no período reprodutivo e machos expostos a 10 mg E<sub>2</sub>.kg<sup>-1</sup> apresentaram concentrações similares de estradiol no plasma, demonstrando que a dose administrada

intraperitonealmente tem significado fisiológico para a espécie. Machos não expostos ao estrógeno tiveram concentrações similares do hormônio no plasma quando comparados a machos da mesma espécie expostos a 0,1 e 1,0 mg de E<sub>2</sub> por Moura-Costa *et al.*, 2009. A presença de concentrações baixas do estrógeno no plasma de machos controle demonstra que estes animais possuem concentrações fisiológicas do hormônio e que doses baixas do mesmo são rapidamente metabolizadas e excretadas do organismo. A literatura relata que o 17βestradiol é convertido pelas enzimas de detoxificação do fígado em estrona e subseqüentemente metabolizado em 2-4-hidroxiestrona (2-4-OHE) e 16-α-hidroxiesterona (16-α-OHE). A 2-4-OHE é rapidamente excretada pelo organismo, enquanto que a 16-α-OHE não é excretada, sendo então considerada um potente estrógeno, exibindo características tóxicas (Greenspan *et al.*, 1997). Devido a sua biotransformação e posterior excreção os estrógenos podem ter seus efeitos reversíveis quando os organismo passam por um período de depuração (Hughes e Gallagher, 2004; Teles *et al.*, 2004, Teles *et al.*, 2005; Moncaut *et al.*, 2002; Pait *et al.*, 2003).

Zarogian e colaboradores (2001) relatam inúmeras injúrias causadas nas gônadas de machos tratados com E<sub>2</sub>, como diminuição na motilidade e na produção de espermatozoides. No presente trabalho não foi avaliada a estrutura das gônadas, devido ao fato de os efeitos de estrógenos sobre as gônadas serem amplamente relatados (Funkensteins *et al.*, 2000; Moncaut *et al.*, 2002; Pait *et al.*, 2003). A espécie *R. quelen* não apresenta alteração no índice gonadossomático de machos expostos ao estrógeno quando comparados com machos não expostos. Fêmeas em vitelogênese apresentam massa das gônadas, bem como índice gonadossomático superiores ao de machos expostos e não expostos, uma vez que estas produzem inúmeros ovócitos preenchidos por vitelo que são necessários ao desenvolvimento do embrião. Brion e colaboradores. (2004) em seu trabalho com *Danio rerio* em diferentes estágios de desenvolvimento afirma que o E<sub>2</sub> é capaz de causar alterações no índice gonadossomático somente se a exposição for em 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. O trabalho de Carrera e colaboradores (2007) assim como o presente trabalho relatam um aumento no índice hepatossomático de *S. auratus* e *R. quelen* respectivamente expostos ao E<sub>2</sub>. Mills e colaboradores (2001)

também relatam aumento no IHS de *P. dentatus* quando expostos a 2 e 20 mg E<sub>2</sub>.kg<sup>-1</sup> no entanto Moura-Costa *et al.*, 2009, relata que o aumento do IHS ocorre apenas em machos expostos a 10 mg E<sub>2</sub>.kg<sup>-1</sup> sendo que tal aumento não é observado em machos expostos a 0,1 e 1 mg E<sub>2</sub>.kg<sup>-1</sup>. Este aumento no IHS se deve a um incremento na produção de VTG e a alocação lipídica feita pelo fígado.

Danos histológicos não têm sido freqüentemente usados para avaliar o efeito de desreguladores endócrinos no fígado. No entanto alguns poucos trabalhos relatam injúrias histológicas no fígado de animais expostos ao estradiol (Moncaut *et al.*, 2002; Moura-Costa *et al.*, 2009; Zaroogian *et al.*, 2000). Além de danos histológicos como necroses, desaranjo celular e alteração de basofilia no citoplasma os autores supracitados relatam também a vacuolização. Tal vacuolização não pode ser atribuída a uma reserva lipídica uma vez que o processamento histológico degrada tais moléculas. No entanto diversos autores associam este aspecto vacuolizado do fígado com a reserva lipídica, especialmente em fêmeas no período reprodutivo.

A proteína avaliada neste trabalho foi estrógeno induzível em machos, presente em fêmeas em vitelogênese, reagiu especificamente com o anticorpo comercial contra vitelogenina e corou-se como um glicolipofosfoproteína. Tais evidências, além da alteração do índice hepatossomático e vacuolização do fígado, são fortes indicativos de que a molécula em questão trata-se da vitelogenina. Trabalhos como o de Moncaut (2002), Funkensteins (2000) e Pait e Judd (2003) indicam que a produção de VTG por machos de diferentes espécies é dose e tempo dependente. Pait e Judd (2003) comparam a expressão de vitelogenina por espécies diferentes e concluem que em ambos os casos a produção da mesma é dose dependente, porém a concentração produzida varia interespecificamente. Folmar e colaboradores (2000) mostram que a vitelogenina também pode ser induzida por exposição hídrica ao E<sub>2</sub>, sendo que a expressão da mesma, neste caso, também é dose dependente, mas ainda assim é menor quando comparada a expressão por exposição intraperitoneal. Xuefei e colaboradores (2007) mostra que doses baixas de E<sub>2</sub>, como 0,1 e 0,5ug/l de E<sub>2</sub> só são capazes de induzir a expressão da VTG em tempo de exposição superiores a 28 dias, enquanto que doses elevadas de E<sub>2</sub> como 1 e 5 ug/l induzem a expressão da vitelogenina em apenas 7 dias. No presente trabalho não verificou-se se a expressão da vitelogenina é dose e tempo dependente para *R. quelen*, no entanto Moura-Costa e colaboradores (2009) afirmam que a

expressão desta proteína é dose dependente para esta espécie e que doses iguais ou inferiores a  $0.1 \text{ mg E}_2\cdot\text{kg}^{-1}$  não são capazes de induzir a vitelogênese em machos.

Verificou-se ainda que a vitelogenina apresenta uma alta massa molecular com indicado por outros autores e os padrões de coloração da molécula indicam que a mesma trata-se de uma glicolipofosproteína também foram encontrados por outros autores (Carrera *et al.*, 2007; Folmar *et al.*, 2000). A fosforilação e a lipidação da proteína são essenciais uma vez que a mesma será clivada e os componentes da clivagem servirão de alimento para o embrião em desenvolvimento. As glicosilações são referidas apenas como uma marcação para que a proteína seja corretamente incorporada aos ovócitos.

A espectrometria de massa não identificou no banco de dados a vitelogenina. Entretanto o padrão espectrométrico indicou que a proteína presente em fêmeas maduras e machos estrógeno induzidos é estruturalmente semelhante. Um dos fatores agravantes para que não houvesse a identificação da vitelogenina foi a ausência de bancos de dados de genoma para espécies. Outro aspecto que pode dificultar a identificação da molécula é que os bancos de dados utilizam a clivagem teórica da molécula, no entanto a clivagem real da molécula pode não ser tão exata quanto a clivagem teórica sugerida pelo banco de dados. Apesar das tentativas de redução e alquilação da proteína, para evitar que a enzima tripsina não tenha acesso aos sítios de clivagem, não há a garantia exata de que todos os sítios de clivagem foram realmente expostos. A ausência de banco de dados demonstra a necessidade de mais estudos com espécies nativas. Alguns autores como Palumbo e colaboradores (2007) e Banoub e colaboradores (2003) não obtiveram sucesso na identificação da VTG de *Paralichthys californicus* e *Salmo salar* respectivamente. Alguns autores que utilizam técnicas mais acuradas de identificação da vitelogenina, como Electrsopray ionization, obtiveram maior sucesso em suas identificações (Cohen *et al.*, 2005).

O presente trabalho utilizou uma metodologia pouco usada atualmente para a produção de anticorpos a partir da vitelogenina. 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. Shao e colaboradores (2004) e 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 da 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*.

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.

## 6. CONCLUSÕES

Há uma proteína com aproximadamente 200 kDa expressa pelos machos expostos ao estradiol e que foi caracterizada como sendo estrógeno indizível e que apresenta glicosilações, lipidações e fosforilação, sendo que tal proteína reage especificamente com anticorpo específico para a vitelogenina.

Espectrometricamente a proteína em questão é estruturalmente semelhante em fêmeas maduras e machos expostos ao estrógeno.

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

O anticorpo produzido, mesmo sem a purificação da VTG, mostrou-se tão específico quanto o anticorpo comercial, evidenciando que a purificação não é necessária para a produção dos mesmos.

A metodologia aplicada na produção do anticorpo permite seu uso futuro no biomonitoramento.

Estudo complementares são necessários para que mais características da molécula sejam corroboradas.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, M. Biological Indicators of aquatic Ecosystem Stress. **American Fisheries Society**, 2002.

AKAISHI, F.M.; SILVA DE ASSIS, H.C.; JAKOBI, S.C.G.; STJEAN, S.; COUTERNAY, S.C.; LIMA, E.; WAGNER, A.L.R.; SCOFIELD, A.; OLIVEIRA RIBEIRO, C.A.. Morphological and neurotoxicological findings in tropical freshwater fish (*Astyanax sp.*) after waterborne and acute exposure to water soluble fraction (WSF) of crude oil. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.** V.46. p.44–253. 2004.

ALVES-COSTA, J. R. M. **Padronização de metodologias para o uso de biomarcadores e contaminação ambiental em traíra (*Hoplias malabaricus*, Erythrinidae):** δALA-d, metalotioneína e vitelogenina. Curitiba, 2006. 122f. Tese (Doutorado em Biologia Celular). Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

ANDREOLI, C. V.; DALARMI, O.; LARA, A.I.; ANDREOLI, F.N. Limites ao desenvolvimento da Região Metropolitana de Curitiba, impostos pela escassez de água. In: Simpósio Luso-Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental, 9., 2000. **ANAIS...** PORTO SEGURO, S. ED., ABR. 2000. P.185-195.

BANOUB, J.; THIBAUT, P.; MANSOUR, A.; COHEN, A.; HEELEY, D.H.; JACKMAN, D.. Characterisation 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.

BARCELLOS, L. J. G.; GUILLERMO, F. W.; SCOTT, A. P.; WOEHL, V. M.; QUEVEDO, R. M.; ITTZE'S, I.; KRIEGER, M. H.; LULHIER, F. Steroid Profiles in Cultured Female Jundiá, the Siluridae *Rhamdia quelen* (Quoy and Gaimard, Pisces Teleostei), during the First Reproductive Cycle. **Gen. Comp. Endocrinol.** V.121, 325–332, 2001.

BEARDMORE, J.A; MAIR, G.C.; LEWIS, R.I. Monosex. male production in finfish as exemplified by tilapia: applications, problems, and prospects. **Aquaculture** v.197, p.283–301, 2001

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.

BRION, F.; TYLER, C. L.; LAILLET, B.; PORCHER, J. M.; Impacts of 17β-estradiol, including relevant concentration, on reproduction after exposure during embryo-larval, juvenile- and adult life stages in zebra fish. **Aquatic Toxicology.** 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 17β-estradiol and 4-nonylphenol on osmoregulation and hepatic enzymes in gilthead sea bream (*Sparus auratus*). **Compar. Biochem. and Physiol., Part 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.

- DENSLOW, N.D.; CHOW, M.C.; KROLL, K.J.; GREEN, L. Vitellogenin as a biomarker of exposure for estrogen or estrogen mimics. **Ecotoxicology**. v.8, p.385–398, 1999.
- DRENCKHAHN, D.; JÖNS, T.; SCHMITZ, F. Production of Polyclonal Antibodies against Proteins and Peptides. **Methods in cell biology**. v.37 p. 7-56, 1993.
- 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.
- FLYNN, R. S.; BENFEY, T. Effects of dietary estradiol-17 $\beta$  in juvenile shortnose sturgeon, *Acipenser brevirostrum*, Lesueur. **Aquaculture**. v.170, p.405-412, 2007.
- FOLMAR, L. C.; HEMMER M.; BOWMAN, R. C.; KROLL, K. N.; DENSLOW, D. Comparative estrogenicity of estradiol, ethynyl estradiol and diethylstilbestrol in an in vivo, male sheepshead minnow (*Cyprinodon ariegatus*), vitellogenin bioassay. **Aquat. Toxicol.** v.48, p.77-88, 2000.
- 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.
- GREENSPAN, F. S.; GORDON, J. S. Introduction to endocrinology. In: Reinhardt, S., Langan, S. Basic & Clinical Endocrinology. Appleton & Lange, Stamford, p.1–38, 1997.
- 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.
- 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.
- HOLBECH, H. et al. Development of an ELISA for vitellogenin in whole body homogenate of zebrafish (*Danio rerio*). **Comparative Biochemistry and Physiology, Part 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.
- HUGHES, E. M.; GALLAGHER, E. P. Effects of 17- $\beta$  estradiol and 4-nonylphenol on phase II electrophilic detoxification pathways in largemouth bass (*Micropterus salmoides*) liver. **Comp. Biochem. Physiol. Part C**. v.137,p. 237–247, 2004.
- JÜRGENS, M.D.; HOLTHAUS, K.I.E.; JOHNSON, A.C.; SMITH, J.J.L; HETHERIDGE, M; WILLIAMS, R.J. The potential for estradiol and ethinylestradiol degradation in English rivers. **Environ Toxicol Chem**. v.21, p.480–488, 2002.
- KAVLOCK, R.J.; DASTON, G.P.; DEROSA, C.; FENNER-CRISP, P.; GRAY, L.E.; KAATTARI, S.; LUCIER, G.; LUSTER, M.; MAC, M.J.; MACZKA, C.; MILLER, R.; MOORE, J.; ROLLAND, R.; SCOTT, G.; SHEEHAN, D.M.; SINKS, T.; TILSON, H.A. Research needs for the risk assessment of health and environmental effects of endocrine disruptors: a report of the U.S. **EPA-sponsored workshop. Environmental Health Perspectives** v.104, 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.

KUSTER, M.; LOPEZ DE ALDA, M.J; BARCELÓ D. Analysis and distribution of estrogens and progestogens in sewage sludge, soils and sediments. **Trends Anal Chem** v.23, p.790–8, 2004.

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

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, 14 p.Documento ocasional n.4. 1981

MARIA V.L.; AHMAD I.; SANTOS, M.A. JUVENILE SEA BASS (*DICENTRARCHUS LABRAX* L.) DNA STRAND BREAKS AND LIPID PEROXIDATION RESPONSE FOLLOWING 17 $\beta$ -ESTRADIOL TWO MODE OF EXPOSURES, **ENVIRON. INTERNATIONAL**, XX(2007).

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.

MATOZZO, V.; GANGÉ, F.; MARIN, M. G.; RICCIARDI, F.;BLAISE, C. Vitellogenin as a biomarker of exposure to estrogenic compounds in aquatic invertebrates : a review. **Environ. Internat.** v.34, p. 531–545. 2008.

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

MONTORZI, M.; FALCHUK, K.H.; VALLEE, B.L. *Xenopus laevis* vitellogenin is a zinc protein. **Biochem Biophys Res Commun.** v.200, p.1407–1413, 1994.

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. Part C.** Article in press. 2009.

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.

OLIVEIRA RIBEIRO, C.A.; MESMER-DUDONS, P.; GONZALEZ, P.; YANNICK, D.; BOURDINEAUD, J.; BOUDOU, A.; MASSABUAU, J.C. Chronic and Trophic Effects of Methylmercury on Zebrafish Muscle Fibers. **Environmental Toxicology and Pharmacology.** v. 25, p. 304-305, 2008.

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.; J. LINARES-CASENAVE, J.; JEWELL, W.; DOROSHOV, S.I.; TJEERDEMA, R.S. Induction and partial characterization of California halibut (*Paralichthys californicus*) vitellogenin. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part A.** v.46, p.200–207, 2007

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

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. Part 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.

SANTOS, R.J.R. PROGRAMA DE CONSERVAÇÃO DE MANANCIASIS. **SANARE**, CURITIBA, V.9 N.9, P.33-40. 1998.

SHAO; L.; SHI, G.; LIU. J.; JIANG. G .A rapid two-step chromatographic method for the quantitative determination of vitellogenin in fish plasma. **Anal Bioanal Chem.** v. 378, p.615–620, 2004.

SILFVERGRIP, A.M.C. A sistematic revision of the neotropical catfish genus *Rhamdia* (Teleostei, Pimelodidae). **Tese de De doutorado**. Stockholm, Sweden, 156p. (PhD Thesis) - Department of Zoology, Stockholm University and Department of Vertebrate Zoology, Swedish Museum of Natural History, 1996.

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.

SOSO, A. B.; BARCELLO, L. J. G.; RANZANI-PAIVA, M. J.; KREUTZ, L. C.; QUEVEDO, R. M.; ANZILIERO, D.; LIMA, M.; SILCA, L. B.; RITER, F., BEDIN, A. C.; FINCO, J. A. Chronic exposure to sub-lethal concentration of a glyphosate-based herbicide alters hormone profiles and affects reproduction of female Jundiá (*Rhamdia quelen*). *Environm. Toxicol. and Pharmacol.* v.23, p.308–313, 2007

TELES M., GRAVATO C., PACHECO M., SANTOS M. A. Juvenile sea bass biotransformation, genotoxic and endocrine responses to  $\beta$ -naphthoflavone, 4-nonylphenol and 17  $\beta$ -estradiol individual and combined exposures. **Chemosphere.** v.57, p.147–158, 2004.

TELES, M., PACHECO, M., SANTOS, M. A. *Sparus aurata* L. liver EROD and GST activities, plasma cortisol, lactate, glucose and erythrocytic nuclear anomalies following short-term exposure either to 17 $\beta$ -estradiol (E2) or E2 combined with 4-nonylphenol. **Sci Total Environ.** v.336, p.357–369, 2005.

XUEFEI, L.; QUNFANG, Z.; MAOYONG, S.; GUIBIN, J.; JING, S. Vitellogenic responses of male Chinese loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) exposed to the individual or binary mixtures of 17 $\beta$ -estradiol and nonylphenol. **Chinese Science Bulletin.** v.59, p. 3333-3338, 2007

YING, G.G.; KOOKANA, R.S.; RU, Y.J. Occurrence and fate of hormone steroids in the environment. **Environ Int.** v.28, p.545–551, 2002.

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

WERNER, J. Waterborne ethynylestradiol induces vitellogenin and alters metallothionein expression in lake trout (*Salvelinus namaycush*). **Aquatic Toxicology**, v. 62, p. 321-328, 2003.

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

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 17βestradiol, 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.