Universidade de São Paulo

Amanda de Moraes Narcizo

Efeitos *in vitro* do alumínio como desregulador endócrino sobre a hipófise e ovários de *Oreochromis niloticus* (Teleostei: Cichlidae).

In vitro effects of aluminum as an endocrine disrupter on the pituitary and ovary of *Oreochromis niloticus* (Teleostei: Cichlidae).

São Paulo

2014

Universidade de São Paulo

Amanda de Moraes Narcizo

Efeitos *in vitro* do alumínio como desregulador endócrino sobre a hipófise e ovários de *Oreochromis niloticus* (Teleostei: Cichlidae).

In vitro effects of aluminum as an endocrine disrupter on the pituitary and ovary of *Oreochromis niloticus* (Teleostei: Cichlidae).

Tese apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, para a obtenção de Título de Doutora em Ciências, na Área de Fisiologia Geral.

Orientadora: Profa. Dra. Renata Guimarães Moreira.

São Paulo

2014

Ficha Catalográfica

Narcizo, Amanda de Moraes

Efeitos *in vitro* do alumínio como desregulador endócrino sobre a hipófise e ovários de *Oreochromis niloticus* (Teleostei: Cichlidae). 68p.

Tese (Doutorado) - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Fisiologia Geral. São Paulo, 2014.

1. Alumínio 2. Peixe 3. Reprodução
I. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Fisiologia.

Comissão Julgadora:

Profa. Dra. Renata Guimarães Moreira
Orientadora

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus familiares e amigos que sempre torcem por mim e em especial a minha orientadora, Renata Guimarães Moreira, pela oportunidade, confiança e apoio para a conclusão desta etapa tão importante em minha vida. Descobri realmente uma realização! Muito obrigada!

Agradecimentos

Agradeço:

À vida, à minha vida, às oportunidades que tenho recebido e principalmente às pessoas que estiveram e que estão ao meu redor, é isto que faz melhor o meu ser. De coração agradeço a todas as pessoas que contribuíram para a realização deste trabalho e minha formação. Espero também contribuir para a formação de pessoas e continuar contribuindo com a ciência para o desenvolvimento social e sustentável global.

À Universidade de São Paulo (USP), ao Instituto de Biociências (IB) e ao Departamento de Fisiologia, por todo apoio à ciência e por isso tornar esta realização possível, sou muito feliz por fazer parte desta comunidade. Pelos mesmos motivos sou grata a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), e pela bolsa concedida (processo número: 2009/53077-5).

À minha orientadora Renata Guimarães Moreira, por todos estes anos de trabalho, por sua disponibilidade para discussões, respeito que tem a diferentes qualidades de cada pessoa com quem trabalha, apoio, amizade e pelo exemplo que é para mim. Sua dedicação e amor ao trabalho fazem de trabalhos desafiadores como a pesquisa se tornarem leves frente ao inesperado. Para evoluir devemos arriscar e ter a mente aberta ao que vier, com coragem sempre.

Ao Laboratório de Metabolismo e Reprodução de Organismos Aquáticos (LAMEROA – IB-USP) que cresce cada dia mais, em número de integrantes e alcance profissional. São pessoas muito queridas em minha vida: Aline Dal'Olio Gomes, Andreone Teles Medrado, Bianca da Silva Mayumi Kida, Bruno Cavalheiro Araújo, Carlos Eduardo Oliveira Garcia, Carlos Eduardo Tolussi, Cristiële da Silva Ribeiro, Gabriela Brambila de Souza, Jandyr de Almeida Rodrigues Filho, Jéssica Carolina Teske, Juliane Suzuki Amaral, Larissa Suzuki Amaral, Mariana Frias Campos, Paulo Henrique de Mello, Raísa Pereira Abdalla, Renato Massaaki Honji, Roberta Ferrari Mourão, Tiago Gabriel Correia e Vanessa Ap. Rocha de Oliveira Vieira, Walquíria Pedra Parreira, Vagner Alberto e mais recentemente Elena Galvanese. Obrigada pela amizade, conversas, e momentos compartilhados, todos!

Ao Laboratório de Endocrinologia de Peixes (LEP), do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da USP, começando pela Profa. Dra. Maria Inês Borella, Lázaro Wender Oliveira de Jesus, todos os seus integrantes e apoio técnico Cruz Alberto Mendonza Rigonati. Obrigada pelo espaço, apoio e conhecimento prático e teórico nestes últimos meses e momentos juntos! Foram doces e saborosos os momentos, adorei a experiência!

Ao laboratório de Fisiologia de Tripanossomatídeos, o laboratório morcego. Obrigada pelo apoio ao longo dos anos Profa. Dra. Lucile Maria Floeter-Winter, Ricardo Andrade Zampiere e toda sua equipe, gosto muito de como vocês trabalham.

Ao Laboratório de Genômica Funcional de Plasmodium gerenciado pela Profa. Dra. Célia Regina da Silva Garcia, por disponibilizarem espaço e equipamento de pesquisa e por todo seu grupo de trabalho ser muito solícito, é ótimo trabalhar assim.

Ao pesquisador Dr. Enrique Eduardo Rozas Sanchez pelo apoio, suporte e análises de proteômica em espectrometria de massa do tipo MALDI-TOF (*matrix-assisted laser desorption ionization - time of flight*).

Ao Prof. Dr. Alexandre Hilsdorf, por me ajudar na obtenção dos animais; ao Prof. Dr. Matias Pandolfi, por ceder reagentes (hormônios: folículo estimulante - FSH e luteinizante - LH) para a realização deste trabalho.

À Gisele Ortoli, Marcilene Lasco e Roseli Silva Santos, pelo trabalho de vocês fazer o Departamento de Fisiologia (IB-USP) melhor. Agradeço o apoio técnico em microscopia eletrônica ao Edson Rocha de Oliveira e ao Gaspar Ferreira de Lima do Departamento de Biologia Celular e Desenvolvimento – ICB.

À Indústria Brasileira do Peixe e a Rio Doce Piscicultura pelos animais doados à pesquisa.

Aos meus familiares e amigos que sempre torcem por mim e que eu amo tanto!

Obrigada a todos!

Índice

Resumo	VII
Abstract	IX
Capítulo I – Introdução Geral e Objetivos	
Introdução Geral.....	12
Objetivo geral.....	16
Objetivo específico.....	16
Referências Bibliográficas.....	16
Capítulo II - Efeitos <i>in vitro</i> do alumínio como desregulador endócrino nos folículos ovarianos de <i>Oreochromis niloticus</i> (Teleostei: Cichlidae)	
Resumo.....	22
Introdução.....	23
Materiais e Métodos.....	24
Resultados.....	26
Discussão.....	29
Conclusão.....	33
Referências Bibliográficas.....	33
Capítulo III - Efeitos <i>in vitro</i> do alumínio como desregulador endócrino sobre a hipófise de <i>Oreochromis niloticus</i> (Teleostei: Cichlidae)	
Resumo.....	41
Introdução.....	42
Materiais e Métodos.....	43
Resultados.....	49
Discussão.....	55
Conclusão.....	59
Referências Bibliográficas.....	59
Capítulo IV – Discussão Geral	
Discussão Geral.....	68
Referências Bibliográficas.....	69

Resumo

O alumínio (Al) é o metal mais abundante na natureza e tornou-se importante poluente aquático trazendo prejuízos a reprodução de teleósteos, atuando como um desregulador endócrino. No entanto, em experimentos *in vivo* não é possível demonstrar que os efeitos do Al no eixo endócrino reprodutivo são devido a sua atuação direta sobre os órgãos que o compõem. Por isso, este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito direto do Al sobre células foliculares ovarianas, gonadotrópicas e somatolactínicas hipofisárias de fêmeas maduras de *Oreochromis niloticus*. Para isso dois experimentos *in vitro* de exposição ao Al foram realizados: um utilizando-se ovários maduros e outro hipófises de fêmeas sexualmente maduras. Para os experimentos ovarianos, frações de ovários maduros foram incubadas por 4 horas formando os seguintes grupos: **1)** Grupo controle (Ctr): tecido ovariano exposto somente à solução de Krebs-Ringer-glucose-HEPES; **2)** Grupo gonadotropina coriônica humana (hCG): tecido exposto à 6 µg/ml de hCG (Ovidrel); **3)** Grupo (hCG+Al): tecido exposto à 6 µg/ml de hCG (Ovidrel) + cloreto de alumínio (AlCl₃) - 10mM; **4)** Grupo (Al): exposto somente ao AlCl₃ - 10mM. A concentração dos hormônios 17β-estradiol (E₂) e 17α-hidroxiprogesterona (17αOHP) no meio de incubação foi determinada por ELISA. Para os experimentos hipofisários, hipófises de fêmeas sexualmente maduras foram incubadas por 24 horas formando os seguintes grupos: **1)** Ctr: hipófise exposta somente ao meio L15 (controle interno); **2)** GnRH: hipófise exposta somente ao GnRH (controle de liberação de gonadotropinas); **3)** GnRH+Al: hipófise exposta ao GnRH + AlCl₃ 10mM e **4)** Al: hipófise exposta somente AlCl₃ 10mM. Após o período experimental, foram realizadas análises de qPCR (PCR quantitativo), análises de imunohistoquímica, e de microscopia eletrônica. Os resultados do experimento ovariano mostraram que os fragmentos ovarianos do grupo exposto à hCG apresentaram um aumento significativo da liberação dos hormônios E₂ e 17αOHP em relação aos demais grupos, confirmando o efeito desta gonadotropina sintética na liberação destes esteroides gonadais. No entanto, a administração conjunta da hCG com Al (hCG+Al) não gerou este aumento da produção dos esteroides em relação ao grupo controle. Estes dados evidenciam que o Al inibiu a resposta celular das células esteroideogênicas ovarianas às gonadotropinas. Os resultados dos experimentos hipofisários mostraram que o Al (GnRH+Al e Al) afetou a expressão gênica dos genes estudados (βFSH, βLH, SL) inclusive dos normalizadores (EF1α e βAc), o que tem sido comum em

experimentos de ecotoxicologia. Os dados de microscopia eletrônica mostraram desestruturação celular nas hipófises que foram expostas ao Al e as análises de imunohistoquímica apontaram que o Al (GnRH+Al e Al) não interferiu sobre a quantidade de grânulos de β LH e SL, enquanto o grupo Al indicou uma diminuição na quantidade de grânulos de β FSH, sugerindo que o Al afeta a dinâmica de síntese/liberação desta gonadotropina. Estes dados evidenciam a toxicidade do Al diretamente sobre ambos os órgãos estudados, tanto em nível de resposta celular quanto em nível estrutural confirmando o potencial do Al como um DE e amplia as perspectivas de estudo sobre o mecanismo de ação do Al como um DE.

Palavras chave: alumínio, desreguladores endócrinos; peixes, reprodução, 17β -estradiol, 17α -hidroxiprogesterona, gonadotropinas, somatolactina.

Abstract

Aluminum (Al) is the most abundant metal in nature and has become an important water pollutant impairing reproduction of teleosts, acting as an endocrine disrupter. However, *in vivo* experiments cannot demonstrate that the effects of Al on the reproductive endocrine axis are due to direct action on the organs that compose it. Therefore, this study aimed to assess the direct effect of Al on ovarian follicular cells, gonadotropic and somatolactin pituitary cells of mature females of *O. niloticus*. For this, two *in vitro* exposure experiments of Al were performed: one using mature ovaries and other using pituitaries of sexually mature females. For ovarian experiments, fractions of mature ovaries were incubated for 4 hours to obtain the following groups: **1)** control group (Ctr): ovarian tissue only exposed to Krebs- Ringer-HEPES-glucose; **2)** human chorionic gonadotropin (hCG) group: tissue exposed to 6 mg/ml hCG (Ovidrel); **3)** hCG + Al group: tissue exposed to 6 mg/ml hCG (Ovidrel) + aluminum chloride (AlCl_3) - 10mM; **4)** Al group: only exposed to 10 mM AlCl_3 . The concentration of the hormones 17β -estradiol (E_2) and 17α -hydroxyprogesterone ($17\alpha\text{OHP}$) in the incubation medium was determined by ELISA. For pituitary experiments, pituitaries of sexually mature females were incubated for 24 hours to form the following groups: **1)** Ctr: pituitary exposed only to L15 (internal control); **2)** GnRH: only exposed to the pituitary GnRH (gonadotropin releasing hormone); **3)** GnRH + Al: exposed to the pituitary GnRH AlCl_3 + 10 mM and **4)** Al: 10mM AlCl_3 only exposed pituitary. After the assay period, analysis of qPCR (quantitative PCR), analysis of immunohistochemistry and electron microscopy were performed. The results of the experiment showed that the ovarian exposed to hCG group showed a significant increase in the release of E_2 and $17\alpha\text{OHP}$ compared to the other groups, confirming the effect of synthetic gonadotropin in the release of these gonadal steroids. However, the administration combined of hCG with Al (Al + hCG) did not generate this increased production of steroids compared with the control group. These data show that Al inhibited the cellular response of the ovarian steroidogenic cells to gonadotropins. The results of the experiments with pituitaries showed that Al (GnRH + Al and Al) affected the gene expression of the genes studied (βFSH , βLH , SL) including the house keeping genes ($\text{EF}1\alpha$ and βAc), what has been common in ecotoxicology experiments. Data from electron microscopy showed cell disruption in the pituitary glands that were exposed to Al and immunohistochemical analyzes showed that Al (GnRH + Al and Al) did not affect the amount of granules of

β LH and SL, while the Al group indicated a decrease the amount of β FSH granules, suggesting that Al affects the dynamics of the synthesis/release of this gonadotropin. These data show the toxicity of Al directly on both organs studied, at both the cellular response as for structural level confirming the potential of Al as a DE and increases the perspectives of study on the mechanism of action of Al as a DE.

Keywords: aluminum, endocrine disruptors, fish, reproduction, 17β -estradiol, 17α -hydroxyprogesterone, gonadotropins, somatolactin.

Capítulo I

Introdução Geral e Objetivos

Introdução Geral

Segundo o VI Fórum Mundial de Ciências realizado no Brasil, Rio de Janeiro em 2013, o século XXI traz grandes desafios para a Ciência devido ao atual estágio de desenvolvimento da humanidade. Estes desafios estão atrelados ao crescimento populacional e urbanização; às mudanças ambientais regionais e globais; à segurança alimentar, hídrica, energética e cibernética; à conservação da biodiversidade e dos ecossistemas; ao surgimento de novas doenças e o reaparecimento de outras antigas; ao enfrentamento de desastres naturais; e à necessidade de redução das desigualdades sociais e eliminação da pobreza e da fome, com melhoria das condições de vida da população mundial e o cumprimento das Metas do Milênio da ONU (Organização das Nações Unidas). Encarar esses desafios, num contexto de mudanças ambientais aceleradas, exige o rompimento de fronteiras disciplinares e requer políticas de ciência e tecnologia que estimulem a colaboração internacional e promovam a desfragmentação e o compartilhamento do conhecimento (Ciência..., 2013).

Com a consciência do papel da Ciência como ferramenta decisiva para o desenvolvimento sustentável, a presente pesquisa, em conexão com o cenário atual apresentado, ressalta que a fisiologia comparativa tem sido aplicada à conservação de espécies estudando as respostas fisiológicas dos organismos frente às ações antrópicas no meio ambiente que podem causar ou contribuir para o declínio de uma ou mais populações ao longo do tempo.

Os ecossistemas aquáticos são considerados receptores finais de contaminantes químicos que levam a mudanças nas características bióticas e abióticas. Portanto, conhecer as condições ecológicas desses ambientes e as mudanças fisiológicas toleradas pelas espécies que vivem nessas condições é fundamental para estudos de conservação. Os ambientes aquáticos, principalmente as águas continentais e marinhas costeiras, encontram-se contaminados por uma grande variedade de poluentes cujas fontes principais são os efluentes líquidos de origem doméstica e industrial, que muitas vezes não recebem o tratamento adequado. Além destes efluentes, inúmeras atividades antrópicas são capazes de gerar algum tipo de impacto, que direta ou indiretamente, alteram as condições físico-químicas, biológicas, e ecológicas de um ecossistema (Fleeger *et al.*, 2003). Neste contexto, podem ser citadas as atividades de mineração, petrolíferas, pesqueiras, a agricultura, desflorestamento, represamento de rios, ou ainda

alterações climáticas, tais como modificações na precipitação pluviométrica de uma região, e até mesmo a presença de chuva ácida.

Algumas bacias do Estado de São Paulo, como por exemplo, a Bacia do Rio Paraíba do Sul e a Bacia do Rio Tietê apresentam elevadas concentrações de metais como o mercúrio (Hg), o chumbo (Pb), o zinco (Zn), o cobre (Cu), o alumínio (Al), o manganês (Mn), o ferro (Fe) e outros (CETESB, 2008), que muitas vezes excedem os valores permitidos pelo Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA, 2008). As altas concentrações de Al, objeto de estudo desta pesquisa, Mn e Fe encontradas nestas bacias, não estão necessariamente relacionadas a fontes antrópicas de emissão de efluentes, pois também foram registradas em excesso em áreas protegidas de rios onde ainda existe vida, sendo estes dados coincidentes com épocas de chuvas e/ou a redução do pH. A este respeito, é reportado que as altas concentrações registradas poderiam estar associadas aos processos de erosão e conseqüentemente de lixiviação destes metais presentes no solo e sedimento para a coluna d'água (CETESB, 2008). Portanto, os fatores de impacto e atividades antrópicas citados acima poderiam estar associados a estes processos e por consequência tornar estes metais mais biodisponíveis para os organismos, aumentando o risco de efeitos tóxicos.

Populações ícticas podem sofrer o efeito de metais, pois os mesmos podem atuar como desreguladores endócrinos (do inglês: *Endocrine Disrupting Chemicals*, disruptores ou desreguladores endócrinos). De forma geral, desreguladores endócrinos (DE), assim como outros xenobióticos não metálicos, interferem sobre o sistema endócrino alterando os processos de síntese e/ou degradação de hormônios e de receptores ou influenciando vias de sinalização celular. Podem atuar como antagonistas biológicos bloqueando os receptores hormonais acarretando na inibição de uma resposta natural, ou como agonistas, mimetizando, total ou parcialmente, os hormônios endógenos, e ligando-se a um receptor, torna-se capaz de desencadear a resposta fisiológica associada ao receptor (Matthiessen; Johnson, 2007). Estas interferências às respostas de homeostase do organismo podem trazer efeitos adversos sobre sua saúde, alterando seu desenvolvimento, manutenção, reprodução e comportamento, muitas vezes afetando também a prole e a população, sendo que estas interferências podem acarretar uma acentuada diminuição do tamanho da população e eventualmente levar a espécie à extinção (Lawrence; Hemingway, 2003).

Neste contexto, em ambientes naturais de países escandinavos, populações de peixes foram reduzidas e até mesmo eliminadas devido ao baixo pH e principalmente à disponibilidade do Al no ambiente aquático (Exley *et al.*, 1997; Poléo *et al.*, 1997). Os efeitos tóxicos atribuídos ao Al para peixes são mais estudados para os salmonídeos, sendo descritos efeitos como disfunções branquiais, trazendo prejuízos à respiração e regulação iônica (Exley *et al.*, 1991; Peuranen *et al.*, 1993, Poléo *et al.*, 1997), prejuízos metabólicos e reprodutivos, como a inibição ou atraso em meses na ovulação e desova (Vuorinen *et al.*, 1990; Vuorinen; Vuorinen, 1991).

Sobre a atuação do Al como um DE, Correia *et al.* (2010) estudaram os efeitos do Al em fêmeas maduras de *Oreochromis niloticus*, espécie de peixe conhecida como tilápia e estabelecida na Bacia do Rio Tietê, assim como na maioria das bacias hidrográficas brasileiras, e verificaram alterações no metabolismo energético, sugerindo uma aceleração da transferência de lipídios para os ovários de animais expostos ao Al e também alterações na concentração de progestágenos no plasma, esteroides importantes para a maturação final e ovulação. Além disso, neste mesmo experimento, fêmeas adultas de *Oreochromis niloticus* expostas ao Al mostraram uma diminuição nos níveis de expressão de gonadotropinas, hormônios hipofisários que, juntamente com os esteroides sexuais, estão relacionados ao controle da reprodução (Narcizo, 2009), evidenciando pela primeira vez em peixes neotropicais, a toxicidade do Al sobre um dos processos mais importantes para a manutenção de uma espécie, a reprodução.

Além dos efeitos citados do Al, sobre a fisiologia de teleósteos, é também conhecida a capacidade do Al em causar sintomas de toxicidade, com acentuado efeito neurotóxico, inclusive em humanos (Nayak, 2002). Por isso, é possível que espécies de peixes que se encontrem expostas a concentrações subletais de Al e venham a apresentar perturbações em seus processos reprodutivos, tenham tido também seu sistema nervoso afetado, pois o controle hormonal da reprodução ocorre através de um eixo neuroendócrino composto pelo hipotálamo, hipófise e gônadas (H-H-G) (Zohar *et al.*, 2010).

Este eixo de controle reprodutivo é modulado por fatores ambientais e endógenos. O sistema sensorial capta mudanças sazonais de fatores ambientais, e estes estímulos são transduzidos em uma resposta neuronal até o hipotálamo. A glândula pineal tem importante papel como transdutor foto-neuroendócrino por seus

fotorreceptores extraoculares que atuam como detectores de luminosidade (fotoperíodo) regulando a síntese de um mensageiro neuroendócrino, a melatonina (Korf, 2006). O hipotálamo, modulado por variáveis ambientais e também pela melatonina e *kisspeptina*, sintetiza o neuro-hormônio conhecido como GnRH (hormônio liberador de gonadotropinas) que estimula a adeno-hipófise a sintetizar as gonadotropinas, FSH (hormônio folículo estimulante) e LH (hormônio luteinizante) (Zohar *et al.*, 2010).

Em fêmeas adultas de peixes teleósteos, o FSH é transportado pelo sistema circulatório até os ovários, atuando sobre as células foliculares promovendo assim a síntese do hormônio esteroide 17β -estradiol (E_2) (Lubzens *et al.*, 2010), que é transportado até o fígado pela corrente sanguínea, e no núcleo dos hepatócitos, que possui receptores específicos (ER - *estradiol receptor*) para este hormônio, ativa a transcrição de genes da vitelogenina (VTG), uma glicolipofosfoproteína (Mommensen; Walsh, 1988). A VTG é transportada pelo plasma sanguíneo até os ovócitos juntamente com íons metálicos, como Ca^{2+} , Zn^{2+} e Mg^{2+} (Montorzi *et al.*, 1994, 1995) e é incorporada por endocitose mediada por receptores de membrana, também sob a ação do FSH (Shibata *et al.*, 1993). Com a elevação plasmática do E_2 , a hipófise estimulada pelo GnRH, passa a secretar LH que atua sobre as células foliculares ovarianas, estimulando a síntese do $17\alpha 20\beta$ dihidroxi-4-pregnen-3-one ($17\alpha 20\beta$ -DHP), o hormônio da maturação final e ovulação (MIS, do inglês *maturation-inducing steroid*) para a maioria dos teleósteos. Em todos estes processos há a modulação da expressão gênica hormonal e de receptores hormonais, bem como a interação entre hormônio-receptor, para que ocorra o sucesso do desenvolvimento ovocitário e desova (Lubzens *et al.*, 2010; Zohar *et al.*, 2010).

Além das gonadotropinas, a somatolactina (SL) é outro hormônio hipofisário, descrito exclusivamente em peixes até o momento, e também tem sido relacionado aos processos reprodutivos. Descoberta há cerca de 20 anos (Ono *et al.*, 1990; Rand-Weaver *et al.*, 1991) a SL pertence à família do hormônio de crescimento (GH) e prolactina (PR) e sua função ainda é pouco conhecida, mas muitos trabalhos já vêm relacionando o papel da SL à camuflagem, regulação do cálcio (Kaneko; Hirano, 1993), metabolismo de lipídios (Mingarro *et al.*, 2002), alterações no comportamento reprodutivo (Pandolfi *et al.*, 2009; Fiszbein *et al.*, 2010) e influência no controle de processo reprodutivos, como maturação e desova (Mousa; Mousa, 1999; Honji *et al.*, 2013). Kakizawa *et al.* (1997) evidenciaram que o GnRH, a serotonina e o hormônio liberador de

corticotropina (CRH) estimulam a liberação de SL em cultivos de hipófises de *Oncorhynchus mykiss* (truta arco-íris) e em *Oncorhynchus masou* (salmão) foi observado o aumento da expressão gênica de SL em cultivo de células primárias quando estimuladas com GnRH. Planas *et al.* (1992) comprovaram em experimento *in vitro* com gônadas de *Oncorhynchus kisutch* que a SL aumenta a produção de 11-cetotestosterona e testosterona em testículos e de estradiol em ovários de maneira dose-dependente, mas afirmam que o efeito esteroideogênico da SL comparado às gonadotropinas é mínimo.

O eixo endócrino-reprodutivo, brevemente apresentado, deixa explícito que as possibilidades de atuação do AI como um DE são extensas e também a literatura apresentada sobre os efeitos do AI em *Oreochromis niloticus in vivo* evidencia que o eixo hipófise-gônadas sofre sua influência (Narcizo, 2009; Correia *et al.*, 2010). Por isso, investigar aspectos ainda desconhecidos na literatura atual, do efeito direto do AI nas células gonadotrópicas, somatolactínicas e foliculares, em experimentos *in vitro*, uma vez que disfunções no eixo hipófise-gônadas são conhecidas faz-se necessário.

Objetivos

Objetivo geral

O objetivo deste trabalho foi testar a hipótese de que o AI teria uma ação direta na alteração da produção de esteroides gonadais, somatolactina e gonadotropinas hipofisárias em fêmeas adultas de *Oreochromis niloticus*.

Objetivos específicos

- Avaliar o efeito do AI no nível hipofisário do eixo H-H-G, analisando a produção de gonadotropinas (FSH e LH) e somatolactina (SL).
- Avaliar o efeito do AI no nível gonadal do eixo H-H-G, analisando a liberação de esteroides gonadais como o E₂ e a 17 α -hidroxiprogesterona (17 α OHP), precursor do MIS, nos folículos ovarianos.

Referências bibliográficas

- CETESB. Relatório de qualidade das águas interiores do estado de São Paulo, 2008 e anexos (Série Relatórios / CETESB, ISSN 0103-4103) Disponível em: <http://www.cetesb.sp.gov.br/agua/aguas-superficiais/35-publicacoes/-relatorios>.
- CIÊNCIA para o desenvolvimento sustentável global: contribuição do Brasil. *Síntese dos Encontros Preparatórios para o Fórum Mundial da Ciência 2013*. Brasília, DF: Centro de Gestão e Estudos Estratégicos, 2013. 114 p. Disponível em <http://www.sbpnet.org.br/site/arquivos/arquivo_374.pdf>.
- CONAMA, 2008. Resolução número 357, de 17 de março de 2005. Ministério do Meio Ambiente. 1-23.
- Correia, T. G.; Narcizo, A. M.; Bianchini, A.; Moreira, R. G. 2010. Aluminum as an endocrine disruptor in female Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 151: 461-466.
- Exley, C.; Chappell, C.; Birchall, J. D. 1991. A mechanism for acute aluminium toxicity in fish. *Journal of Theoretical Biology*, 151: 417-428.
- Exley, C.; Pinnegar, J. K.; Taylor, H. 1997. Hydroxyaluminosilicates and acute aluminium toxicity in fish. *Journal of Theoretical Biology*, 189: 133-139.
- Fiszbein, A.; Cánepa, M.; Vázquez, G.R.; Maggese, C.; Pandolfi, M. 2010. Photoperiodic modulation of reproductive physiology and behaviour in the cichlid fish *Cichlasoma dimerus*. *Physiology & Behavior*, 99: 425-432.
- Fleeger, J. W.; Carman, K. R.; Nisbet, R. M. 2003. Indirect effects of contaminants in aquatic ecosystems. *The Science of the Total Environment*, 317: 207-233.
- Honji, R. M.; Nóbrega, R. H.; Pandolfi, M.; Shimizu, A.; Borella, M. I.; Moreira, R. G. 2013. Immunohistochemical study of pituitary cells in wild and captive *Salminus hilarii* (Characiformes:Characidae) females during the annual reproductive cycle. *SpringerPlus*, 2: 460-473.
- Kakizawa, S.; Kaneko, T.; Hirano, T. 1997. Effects of hypothalamic factors on somatolactin secretion from the organ-cultured pituitary of rainbow trout. *General and Comparative Endocrinology*, 105: 71-78.

- Kaneko, T.; Hirano, T. 1993. Role of prolactin and somatolactin in calcium regulation in fish. *Journal of Experimental Biology*, 184: 31- 45.
- Korf, H. W. 2006. The pineal organ. In: Reinecke, M.; Zaccone, G.; Kapoor, B. G. Fish Endocrinology, *Science Publishers*, vol 2: 541-567.
- Lawrence, A.; Hemingway, K. 2003. Effects of pollution on fish: Molecular effects and population responses. *Blackwell Science Ltd*. Oxford, United Kingdom, 342.
- Lubzens, E.; Young, G.; Bobe, J.; Cerdà, J. 2010. Oogenesis in teleost: How fish eggs are formed. *General and Comparative Endocrinology*, 165: 367-389.
- Matthiessen, P.; Johnson, I. 2007. Implications of research on endocrine disruption for the environmental risk assessment, regulation and monitoring of chemicals in the European Union. *Environmental Pollution*, 146 (1): 9-18.
- Mingarro, M.; Celis S. V.; Astola, A.; Pendón, C.; Valdivia, M. M.; Pérez-Sánchez, J. 2002. Endocrine mediators of seasonal growth in gilthead sea bream (*Sparus aurata*): the growth hormone and somatolactin paradigm. *General and Comparative Endocrinology*, 128: 102-111.
- Mommsen, P. T.; Walsh, P. J. 1988. Vitellogenesis and oocyte assembly. In: *Fish Physiology*, vol. XI: 347-405.
- Montorzi, M; Falchuk, K. H; Vallee, B. L. 1994. *Xenopus laevis* vitellogenin is a zinc protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 200: 1407-1413.
- Montorzi, M; Falchuk, K. H; Vallee, B. L. 1995. Vitellogenin and lipovitellin: zinc proteins of *Xenopus laevis* oocytes. *Biochemistry*, 34: 10851-10858.
- Mousa, M. A.; Mousa, S. A. 1999. Immunocytochemical study on the localization and distribution of the somatolactin cells in the pituitary gland and the brain of *Oreochromis niloticus* (Teleostei, Cichlidae). *General and Comparative Endocrinology*, 113: 197-211.
- Narcizo, A. M. 2009. *Avaliação da exposição aguda ao alumínio e variações do pH na expressão de gonadotropinas em Oreochromis niloticus (Teleostei: Cichlidae)*. Dissertação de Mestrado. Departamento de Fisiologia, IB - USP.

- Nayak, P. 2002. Aluminum: Impacts and disease. *Environmental Research*, A 89: 101-115.
- Ono, M.; Takayama, Y.; Rand-Weaver, M.; Sakata, S.; Yasunaga, T.; Noso, T.; Kawauchi, H. 1990. cDNA cloning of somatolactin, a pituitary protein related to growth hormone and prolactin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87: 4330-4334.
- Pandolfi, M.; Pozzi, A. G.; Cánepa, M. M.; Vissio, P. G.; Shimizu, A.; Maggese, M. C.; Lobo, G. 2009. Presence of b-FSH and b-LH transcripts in the brain of *Cichlasoma dimerus* (Perciformes: Cichlidae): effect of brain-derived gonadotropins on pituitary hormone release. *Neuroendocrinology*, 89: 27-37.
- Peuranen, S.; Vuorinen, P. J.; Vuorinen, M.; Tuurala, H. 1993. Effects of acidity and aluminium on fish gills in laboratory experiments and in the field. *The Science of the Total Environment*, 134 (2): 953-967.
- Planas, J. V.; Swanson, P.; Rand-Weaver, M.; Dickhoff, W. W. 1992. Somatolactin stimulates *in vitro* gonadal steroidogenesis in coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*. *General and Comparative Endocrinology*, 87: 1-5.
- Poléo, A. B. S.; Ostbye, K.; Oxnevad, S. A.; Andersen, R. A.; Heibo, E.; Vollestad, L. A. 1997. Toxicity of acid aluminium – rich water to seven freshwater fish species: A comparative laboratory study. *Environmental Pollution*, 96: 129-139.
- Rand-Weaver, M.; Noso, T.; Muramoto, K.; Kawauchi, H. 1991. Isolation and characterization of somatolactin, a new protein related to growth hormone and prolactin from Atlantic cod (*Gadus morhua*) pituitary glands. *Biochemistry*, 30: 1509-1515.
- Shibata, N.; Yoshikuni, M.; Nagahama, Y. 1993. Vitellogenin incorporation into oocytes or rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, *In Vitro*: Effects of hormones on denuded oocytes. *Development, Growth & Differentiation*, 35: 115-121.
- Vuorinen, P. J.; Vuorinen, M.; Peuranen, S. 1990. Long-term exposure of adult whitefish (*Coregonus wartrnanni*) to low pH/aluminium: effects on reproduction, growth, blood composition and gills, In Kauppi, P.; Anttila, P.; Kenttimies, K. (Eds.), *Acidification in Finland*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 941-961.

- Vuorinen, P. J.; Vuorinen, M. 1991. Effects of long-term prespawning acid/aluminium exposure on whitefish (*Coregonus wartmanni*) reproduction and blood and plasma parameters. *Finish Fisheries Research*, 12: 125-133.
- Zohar, Y.; Muñoz-Cueto, J.; Elizur, A.; Kah, O. 2010. Neuroendocrinology of reproduction in teleost fish. *General and Comparative Endocrinology*, 165: 438-455.

Capítulo II

***Efeitos in vitro do alumínio como desregulador
endócrino nos folículos ovarianos de Oreochromis
niloticus (Teleostei: Cichlidae)***

Efeitos *in vitro* do alumínio como desregulador endócrino nos folículos ovarianos de *Oreochromis niloticus* (Teleostei: Cichlidae)

Resumo

O alumínio (Al) é um dos elementos químicos mais abundantes na natureza e tornou-se importante poluente aquático trazendo prejuízos à reprodução de teleósteos, atuando como um desregulador endócrino. No entanto, em experimentos *in vivo* não é possível afirmar que os efeitos do Al no eixo endócrino reprodutivo são devido a sua atuação direta sobre os órgãos que o compõem. Por isso, este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito local do Al sobre a liberação de esteroides gonadais envolvidos na reprodução de fêmeas de *Oreochromis niloticus* utilizando-se experimentos *in vitro*. Fragmentos de ovários maduros foram incubados utilizando-se as seguintes condições experimentais por 4 horas: **1)** Grupo controle (Ctr): tecido ovariano exposto somente à solução de Krebs-Ringer-glucose-HEPES; **2)** Grupo gonadotropina coriônica humana (hCG): tecido exposto à 6 µg/ml de hCG (Ovidrel); **3)** Grupo (hCG+Al): tecido exposto à 6 µg/ml de hCG (Ovidrel) + cloreto de alumínio (AlCl₃), 10mM **4)** Grupo (Al): exposto somente ao AlCl₃ 10mM. A concentração dos hormônios 17β-estradiol (E₂) e 17α-hidroxiprogesterona (17αOHP) no meio de incubação foi determinada por ELISA. Os resultados obtidos mostraram que no grupo exposto à hCG, os fragmentos ovarianos aumentaram a liberação dos hormônios E₂ e 17αOHP em relação aos demais grupos, confirmando o efeito desta gonadotropina sintética na liberação destes esteroides gonadais. No entanto, a administração conjunta da hCG com Al (hCG+Al) não gerou este aumento da produção dos esteroides em relação ao grupo controle. Estes dados evidenciam que o Al inibiu a resposta celular das células esteroideogênicas ovarianas às gonadotropinas, ampliando as perspectivas de estudo sobre o mecanismo de ação do Al como um desregulador endócrino e o consequente bloqueio desta ação fisiológica.

Palavras chave: alumínio, desreguladores endócrinos, peixes, reprodução, 17β-estradiol, 17α-hidroxiprogesterona.

Introdução

O alumínio (Al) é um metal que compõe cerca de 8% da crosta terrestre sendo encontrado naturalmente no solo, ar e água (Pérez *et al.*, 1999). É considerado um importante poluente em ambientes aquáticos sendo responsável por eventos de toxicidade trazendo graves consequências ecológicas. A toxicidade do Al é bem estabelecida para populações ícticas, sobretudo em águas ácidas (McCartney *et al.*, 2003; Monette; McCormick, 2008), pois neste contexto, populações naturais de peixes foram reduzidas e até mesmo eliminadas em países escandinavos (Exley *et al.*, 1997; Poléo *et al.*, 1997).

Entre os efeitos tóxicos do Al em peixes são conhecidos distúrbios fisiológicos relacionados à osmorregulação, ionorregulação, respiração e neurotoxicidade (Exley *et al.*, 1991; Peuranen *et al.*, 1993; Poléo, 1995; Alstad *et al.*, 2005; Camargo *et al.*, 2009), distúrbios cardiovasculares (Laitinen; Valtonen, 1995), alterações hematológicas (Barcarolli; Martinez, 2004), metabólicas (Brodeur *et al.*, 2001; Vieira *et al.*, 2013), reprodutivas e endócrinas (Waring *et al.*, 1996; Vuorinen *et al.*, 2002; Vuorinen *et al.*, 2003; Correia *et al.*, 2010). Vuorinen e Vuorinen (1991) observaram que em ambientes onde o Al estava em altas concentrações e com pH ácido, as fêmeas de *Perca fluviatilis* não conseguiram, ou tiveram dificuldades para desovar, havendo também a redução no número de ovócitos e alteração na deposição de vitelo nas gônadas. Outros trabalhos que evidenciam os impactos causados pelo Al na fisiologia reprodutiva de teleósteos constataram a inibição da síntese de vitelogenina em culturas de hepatócitos de *Oncorhynchus mykiss* (Mugiya; Tanahashi, 1998; Hwang *et al.*, 2000).

As substâncias exógenas a um organismo, capazes de alterar suas funções endócrinas, são denominadas de desreguladores endócrinos (DEs). Os efeitos dos DEs sobre a fisiologia reprodutiva de teleósteos são bastante estudados, pois a manutenção de uma espécie em um ambiente depende de seu sucesso reprodutivo. Karels *et al.* (1998) verificaram em *Perca fluviatilis* e *Rutilus rutilus*, em ambiente natural, quando coletados próximo a efluentes industriais, um aumento nos níveis de dopamina, diminuição na síntese de gonadotropinas (hormônio folículo estimulante, FSH, e hormônio luteinizante, LH), de esteroides gonadais e vitelogenina.

As gonadotropinas, FSH e LH, são hormônios peptídicos sintetizados principalmente pela adeno-hipófise em resposta a neuro-hormônios liberados pelo hipotálamo e promovem, nas gônadas, a produção de hormônios esteroides, essenciais para a diferenciação, crescimento e funcionamento de ovários e testículos (Zohar *et al.*, 2010). Os principais esteroides sexuais produzidos pelos ovários de teleósteos são 17β -estradiol (E_2), testosterona (T), 17α -hidroxiprogesterona (17α OHP) e 17α , 20β -dihidroxi-4-pregnen-3-one (17α , 20β DHP). Durante a fase de desenvolvimento de ovócitos vitelogênicos, o E_2 , que é produzido nas células foliculares, estimula a síntese hepática de uma fosfolipoglicoproteína, a vitelogenina, que é incorporada pelos ovócitos apresentando importante função na nutrição endógena do embrião. Na fase de maturação final, os progestágenos são os principais esteroides gonadais que são produzidos para estimular a maturação final do ovócito, ovulação, e desova (Lubzens *et al.*, 2010).

Estudos recentes demonstraram o efeito do Al como um DE atuando sobre a fisiologia reprodutiva de fêmeas maduras de *Oreochromis niloticus*, em experimentos de exposição aguda, *in vivo*, em que houve a diminuição da concentração plasmática de 17α OHP (Correia *et al.*, 2010) e a diminuição da expressão gênica dos hormônios FSH e LH (Narcizo, 2009). Apesar destes dados evidenciarem a atuação do Al como um DE, até o presente momento não se sabe se este metal afeta diretamente um ou mais órgãos do eixo endócrino reprodutivo, trazendo as disfunções fisiológicas reprodutivas descritas para esta espécie. Experimentos *in vitro* têm sido considerados como importante ferramenta fisiológica para a elucidação da ação tóxica de substâncias químicas, melhorando o poder de previsão do agente tóxico em campo (Fent, 2001). Portanto, neste estudo utilizando experimentos *in vitro*, delineamos a hipótese de que o Al altera a liberação dos esteroides gonadais, 17β -estradiol (E_2) e 17α -hidroxiprogesterona (17α OHP), em células foliculares de ovarios vitelogênicos de *Oreochromis niloticus*.

Materiais e Métodos

Animais

Fêmeas maduras de *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) foram cedidas gentilmente pela Indústria Brasileira do Peixe (Jundiaí-SP) e também pela Rio Doce Piscicultura (Aguai-SP). Os animais com massa corpórea média de $114,39 \pm 9,46$ g (n=10) foram dessensibilizados em água com baixa temperatura e em seguida, foram mortos por secção da medula espinhal na altura do opérculo, no período da tarde (14h ~ 18h) nos meses de janeiro e fevereiro, maio e junho. Estes procedimentos experimentais foram realizados em conformidade com a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos - DBCA (Brasil, 2013) e foram aprovados pelo Comitê de Ética do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (CONCEA 102/2009).

Desenho experimental e análises fisiológicas

Em condições assépticas, quatro fragmentos de $50 \pm 0,5$ mg dos ovários de cada fêmea, foram acondicionadas em tubos plásticos de 1,5 ml (*Eppendorf*) com 200 μ l de solução tampão Krebs-Ringer-glucose-HEPES (120 mM NaCl, 49 mM KCl, 1,2 mM $MgSO_4$, 8,3 mM KH_2PO_4 , 10 mM glicose e 10 mM HEPES, pH 7,4) e foram submetidas a uma pré-incubação de 1 hora e 15 minutos sob leve agitação a 25°C em um misturador com controle de temperatura (*Thermomixer 5436- Eppendorf*) para a liberação de fatores remanescentes nos tecidos.

Após a pré-incubação as soluções tampão foram trocadas, os reagentes das condições experimentais acrescentados e os tecidos incubados sob leve agitação a 25°C por 4 horas (Pandolfi *et al.*, 2009). Os grupos experimentais foram: **1)** Grupo controle (Ctr): tecido ovariano exposto somente à solução de Krebs-Ringer-glucose-HEPES; **2)** Grupo gonadotropina coriônica humana (hCG): tecido ovariano exposto à 6 μ g/ml de hCG (Ovidrel[®]); **3)** Grupo (hCG+Al): tecido ovariano exposto à 6 μ g/ml de hCG (Ovidrel[®]) + cloreto de alumínio ($AlCl_3$), 10mM **4)** Grupo (Al): tecido ovariano exposto somente ao $AlCl_3$ 10mM.

As concentrações dos hormônios E_2 e $17\alpha OHP$ liberados na solução tampão foram quantificadas em duplicata por ensaio imunoenzimático (ELISA) com kits comerciais (Interkit - Intertech, Virginia, USA). As medidas de absorbância foram realizadas em um leitor de microplacas (Molecular Devices, CA, USA) e as validações

de ambos os kits, E₂ e 17 α OHP, foram realizadas através do cálculo do coeficiente de variação (CV%) intraensaio, com limite aceitável inferior de 20% (Sink *et al.*, 2008).

A concentração de hCG utilizada neste trabalho foi determinada por testes prévios de dose-resposta (hCG - E₂) e (hCG -17 α OHP), utilizando-se as concentrações de 1 μ g/ml; 3 μ g/ml; 6 μ g/ml e 12 μ g/ml de hCG (Ovidrel[®] - Laboratório Serono) e dosando-se a concentração dos hormônios esteroides de estudo conforme descrito acima. A concentração de AI utilizada foi baseada no trabalho de Hwang *et al.* (2000) em ensaios de experimento *in vitro* em culturas de hepatócitos de *Oncorhynchus mykiss*.

Análise histológica dos ovários

Após o período experimental os fragmentos ovarianos (n=5 para cada grupo) foram fixados em solução Bouin acético durante 24 horas e desidratados através de uma série de diluições crescentes de etanol, diafanizadas em xilol e incluídas em resina de metacrilato *Histo-resin Embedding Kit* (Leica) de acordo com as instruções do fabricante e procedimentos normais histológicos (Behmer *et al.*, 1976). Cortes histológicos de 5 μ m de espessura foram obtidos e corados com ácido periódico reativo de Schiff (PAS), hematoxilina férrica e *metanil yellow* (Quintero-Hunter *et al.*, 1991).

Análise estatística

Os dados apresentados são expressos como média $\pm$ EPM (erro padrão da média). Valores médios para as diferentes condições experimentais foram comparados utilizando-se análise de variância *one-way* (ANOVA), seguido pelo teste de *Holm-Sidak*. O nível de significância adotado foi de 95% ($P < 0,05$). Análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa SigmaStat software para Windows versão 3.10 (Systat Software, San Jose, CA, EUA).

Resultados

Para avaliar o efeito do Al sobre a liberação de esteroides gonadais foram realizados ensaios imunoenzimáticos para determinar a concentração de E_2 e $17\alpha OHP$. Os resultados obtidos mostraram que o tecido ovariano dos animais expostos à hCG em ambos os ensaios, E_2 (Figura 1) e $17\alpha OHP$ (Figura 2), apresentou um aumento significativo (respectivamente, $P < 0,001$ e $P = 0,002$) da liberação dos hormônios em relação aos demais grupos, demonstrando o efeito desta gonadotropina sintética na liberação destes esteroides gonadais. No entanto, a administração conjunta da hCG com o Al (hCG+Al) não gerou este aumento da produção dos esteroides em relação ao grupo controle. O mesmo ocorreu com o grupo no qual o tecido ovariano foi exposto somente ao Al, ou seja, não houve aumento ou diminuição da produção de ambos os esteroides gonadais. Os CVs intraensaio para os ensaios de ELISA apresentaram-se dentro do limite recomendado sendo 3,69% para E_2 e 4,82% para $17\alpha OHP$.

Figura 1. Concentração de E_2 na solução tampão Krebs-Ringer-glucose-HEPES em experimentos *in vitro* utilizando-se fragmentos de ovários maduros de *O. niloticus* após 4h de exposição à hCG $6\mu\text{g/ml}$; à hCG $6\mu\text{g/ml}$ e ao AlCl_3 10mM ; e somente ao AlCl_3 10mM . Os dados são apresentados como média $\pm$ EPM. Letras diferentes indicam diferença estatística entre os tratamentos ($P < 0,05$).

Figura 2. Concentração de 17αOHP na solução tampão Krebs-Ringer-glucose-HEPES em experimentos *in vitro* utilizando-se fragmentos de ovários maduros de *O. niloticus* após 4h de exposição à hCG 6μg/ml; à hCG 6μg/ml e ao AlCl₃ 10mM; e somente ao AlCl₃ 10mM. Os dados são apresentados como média ± EPM. Letras diferentes indicam diferença estatística entre os tratamentos (P <0,05).

Com o objetivo de se verificar o estágio reprodutivo dos animais utilizados e a capacidade do Al em causar alguma histopatologia ovariana durante o período experimental, foram realizadas análises rotineiras de histologia. Os resultados mostraram que os animais encontravam-se no estágio de maturação avançada e que não houve alteração morfológica entre os tratamentos (Figura 3) e principalmente durante a exposição ao Al comparando-se as figuras 3A (estado inicial), 3B (controle) e 3C (hCG) com 3D (hCG+Al) e 3E (Al).

Figura 3. Secções histológicas de ovários de fêmeas adultas de *O. niloticus*, após 4h de exposição à hCG 6µg/ml (hCG), à hCG 6µg/ml e ao AlCl_3 10mM (hCG+Al); e somente ao AlCl_3 10mM (Al); Em A: ovário fixado logo após a morte do animal, estado inicial; Em B: controle; Em C: hCG; Em D: hCG+Al; Em E: Al. OV - ovócito na fase vitelogênica com um grande número de grânulos de vitelo (asterisco) preenchendo o citoplasma. OP – ovócito perinucleolar, de crescimento primário, cabeça da seta em uma fase mais inicial, e seta em uma fase mais avançada. Coloração: *metanil yellow*. Imagem capturada em aumento de 100x. Escala: 100µm.

Discussão

O papel do Al atuando como um DE e prejudicando os processos reprodutivos em peixes já é conhecido. Este trabalho investigou a possível ação do Al diretamente

sobre o tecido gonadal a fim de avançar os estudos de ação tóxica deste metal sobre a fisiologia reprodutiva de fêmeas, utilizando-se a espécie *O. niloticus*. Nossos resultados mostraram que o Al inibiu a resposta celular das gônadas às gonadotropinas, ou seja, aos hormônios estimulantes da produção dos esteroides gonadais, mas sem afetar a morfologia dos ovários, ampliando as perspectivas de estudo sobre o mecanismo de ação do Al como um DE e o consequente bloqueio desta ação fisiológica.

As análises histológicas mostraram que para todos os animais investigados, seus ovários apresentaram muitos ovócitos na fase de vitelogênese, que é caracterizada por grandes ovócitos apresentando grânulos de vitelo por todo citoplasma e núcleo com contorno irregular, determinando assim a fase de maturação avançada reprodutiva dos animais (Honji *et al.*, 2009; Mlambo *et al.*, 2009), dado que está de acordo com o objetivo desta pesquisa. Além disso, estas análises mostraram que não houve alterações morfológicas nas células ovarianas nestas condições experimentais.

As possibilidades de mecanismos de ação do Al como um DE levando em consideração os resultados apresentados neste trabalho são inúmeras devido à complexidade dos processos de resposta celular. É bem estabelecido que os DEs possam alterar funções hormonais atuando sobre mensageiros bioquímicos, influenciando as vias de sinalização hormonais, alterando diretamente a transcrição de genes ou indiretamente como consequência da interferência nas vias de sinalização celular, modificando processos pós-transcricionais que podem apresentar como consequência alterações estruturais e funcionais do produto traduzido, ou ainda alterando os níveis de concentração de determinado hormônio ou receptor hormonal (Matthiessen; Sumpter, 1998; Goksøyr *et al.*, 2003).

Além destas ações, o Al, como metal e DE, pode substituir outros metais que ao contrário dele são essenciais ao metabolismo celular, como exemplo, pode atuar ligando-se a proteínas, ou a sítios ativos de enzimas por uma maior afinidade química ou mesmo por competição e causar toxicidade celular (Ananthanarayanan; Kerman, 2006) podendo levar a alterações fisiológicas, como as observadas neste experimento, e até mesmo a respostas carcinogênicas (Squibb; Fowler, 1981).

Algumas formas de atuação dos DEs instituem um efeito clássico, como a ação agonista em que os DEs mimetizam, total ou parcialmente, hormônios naturais e ligando-se a um receptor hormonal são capazes de promover sua resposta fisiológica e a

ação antagonista em que ocorre o bloqueio da ligação de um hormônio endógeno ao receptor hormonal ou mesmo o bloqueio do próprio receptor, sempre impedindo a resposta celular (Goksøyr *et al.*, 2003, Bila; Dezotti, 2007). As ações agonistas e antagonistas mais estudadas que afetam a reprodução de organismos aquáticos são as ações estrogênicas e antiestrogênicas, apresentando-se associadas a efeitos como feminilização e masculinização, diminuição da fertilidade e do sucesso de eclosão de ovos (Purdom *et al.*, 1994; Sumpter, 1995; Sumpter; Jobling, 1995; Tyler *et al.*, 1998; Goksøyr *et al.*, 2003).

Neste mesmo contexto, Yao *et al.* (1996) (*apud* Hwang *et al.*, 2000), sugerem a ação de metais como o Zn (zinco) e Cu (cobre) como agentes antagonistas em experimentos *in vitro* com hepatócitos de *goldfish*, pois propõem a atuação destes metais sobre o receptor de estradiol (ER) inibindo a ativação do gene da vitelogenina pelo E₂. Os dados deste mesmo trabalho juntamente com os dados de Hwang *et al.* (2000) apresentam, respectivamente, os efeitos do Cd (cádmio) e Hg (mercúrio) e Al e Zn na redução da produção de vitelogenina em nível transcricional. Com base nestes trabalhos e no resultado do presente estudo é possível sugerir que o Al tenha atuado nestes mesmos níveis celulares, podendo ter bloqueado a ligação das gonadotropinas aos seus receptores ou ter atuado reduzindo a expressão dos receptores de FSH e LH (Thomas, 2000; Levavi-Sivan, *et al.*, 2010), pois o grupo Ctr e Al apresentaram a mesma quantidade de E₂ e 17 α OHP, indicando que sua ação ocorre sobre a resposta celular e não sobre os hormônios já produzidos, caso contrário, seria esperado encontrar menor quantidade destes hormônios no grupo Al comparado ao grupo Ctr.

Vários estudos, utilizando-se de diferentes tipos celulares de peixes e poluentes diversos apontam que existe uma correlação positiva entre a citotoxicidade *in vitro* e a toxicidade aguda *in vivo* (Babich; Borenfreund, 1987; Dierickx; Van den Vyver, 1991; Segner; Lenz, 1993; Brüscheiler *et al.*, 1995; Castano *et al.*, 1996; Fent; Hunn, 1996). Correia *et al.* (2010), em experimentos de exposição aguda de fêmeas maduras de *O. niloticus* ao Al em pH ácido, observaram uma redução na concentração plasmática de 17 α OHP, tendo sido encontrado este mesmo efeito no presente experimento *in vitro*. No entanto, no experimento *in vivo* conduzido por Correia *et al.* (2010), não foi observada alteração significativa da concentração plasmática de E₂, o que difere do efeito do Al encontrado *in vitro*, para a mesma espécie.

Quando se discute toxicidade *in vivo*, são considerados processos bioquímicos e fisiológicos que envolvem a absorção, a distribuição no organismo, a conversão metabólica e a excreção do poluente (Cargouët *et al.*, 2007). Além disso, são importantes as interações entre os sistemas fisiológicos, que muitas vezes levam a respostas compensatórias de disfunção de um determinado órgão ou sistema. Assim, por estas interações estarem ausentes em experimentos *in vitro*, os resultados obtidos nestes sistemas poderiam subestimar ou superestimar o risco de um poluente em um organismo (Cargouët *et al.*, 2007). Por isso, são necessários outros estudos para melhor elucidar sob quais circunstâncias os resultados *in vitro* são fieis preditivos da toxicidade *in vivo*.

Este é o primeiro experimento *in vitro* a demonstrar que o Al inibe a liberação de esteroides em tecidos ovarianos de teleósteos, demonstrando sua interferência como um DE nos processos de produção e/ou liberação de esteroides sexuais (E_2 e $17\alpha OHP$). Desta forma, estes dados tornam-se importante ponto de partida para estudos futuros sobre os mecanismos de interação do Al em diferentes níveis de organização biológica como Al-moléculas; Al-células, considerando-se folículos ovarianos; Al-organismos, considerando-se a espécie estudada, permitindo extrapolar os conhecimentos dos efeitos e modo de ação do Al para populações e ecossistemas, o que contribui para o desenvolvimento das áreas que englobam esta pesquisa, a fisiologia e a ecotoxicologia.

Para melhor elucidar estes aspectos de investigação da atuação do Al no eixo endócrino reprodutivo, são sugeridas investigações sobre a hipófise, nos aspectos de expressão gênica das gonadotropinas (Narcizo, 2009) e liberação das gonadotropinas (Pandolfi *et al.*, 2006), podendo ser verificado através de histologia (Stoltenberg; Danscher, 2000) a deposição do Al sobre a adeno-hipófise e sobre os folículos ovarianos, além da investigação da expressão de receptores para GnRH (hormônio liberador de gonadotropinas) na hipófise (Hildahl *et al.*, 2011) e receptores gonadotrópicos nos folículos ovarianos (Thomas, 2000; Thomas *et al.*, 2006; Levavi-Sivan *et al.*, 2010). Contudo, não há dúvida de que os ensaios de citotoxicidade com células de peixes são importantes para a avaliação de risco ambiental, pois retrata prejuízos fisiológicos a uma determinada situação encontrada em ambiente natural (Fent, 2001; Cargouët *et al.*, 2007). Desta forma, os resultados aqui encontrados contribuem também para ações conservacionistas, inclusive de políticas públicas que tenham efeitos diretos nas legislações ambientais.

Conclusão

Nós concluímos que o Al inibiu a resposta celular dos folículos ovarianos à ação das gonadotropinas, atuando, portanto como um DE sobre um dos principais órgãos do eixo reprodutivo. Este efeito amplia as perspectivas de estudos sobre os mecanismos celulares de ação do Al e o consequente bloqueio desta ação fisiológica. Estes dados contribuem para o desenvolvimento de grandes áreas do conhecimento como a fisiologia e a ecotoxicologia.

Referências bibliográficas

- Alstad, N. E. W.; Kjelsberg, B. M.; Vøllestad, A. L.; Lydersen, E.; Poléo, A. B. S. 2005. The significance of water ionic strength on aluminium toxicity in brown trout (*Salmo trutta* L.). *Environmental Pollution*, 133: 333-342.
- Ananthanarayanan, V.S.; Kerman, A. 2006. Role of metal ions in ligand–receptor interaction: Insights from structural studies. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 246: 53-59.
- Babich, H.; Borenfreund, E. 1987. In vitro cytotoxicity of organic pollutants to bluegill sunfish (BF-2) cells. *Environmental Research*, 42: 229-237.
- Barcarolli, I. F.; Martinez, C. B. R. 2004. Effects of aluminum in acidic water on hematological and physiological parameters of the neotropical fish *Leporinus macrocephalus* (Anostomidae). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 72: 639-646.
- Behmer, O. A.; Tolosa, E. M. C.; Neto, A. G. F. 1976. *Manual de técnicas para histologia normal e patológica*. EDART. Livraria Editora Ltda, São Paulo.
- Bila, D. M.; Dezotti, M. 2007. Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e consequências. *Química Nova*, 30: (3) 651-666.
- BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA. *Diretriz brasileira para o cuidado e a utilização de animais para fins científicos e didáticos – DBCA*. Brasília, DF:

- MCT/CONCEA, 2013. 50 p. Disponível em: <
<http://web.fc.unesp.br/Home/Pesquisa/diretriz-brasileira-para-o-cuidado-e-a-utilizacao-de-animais-para-fins-cientificos-e-didaticos.pdf>>
- Brodeur, J. C.; Okland, F.; Finstad, B.; Dixon, D. G.; McKinley, R. S. 2001. Effects of subchronic exposure to aluminium in acidic water on bioenergetics of Atlantic Salmon (*Salmo salar*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 49: 226-234.
- Brüschweiler, B. J.; Würigler, F. E.; Fent, K. 1995. Cytotoxicity in vitro of organotin compounds to fish hepatoma cells PLHC-1 (*Poeciliopsis lucida*). *Aquatic Toxicology*, 32: 143-160.
- Camargo, M. M. P.; Fernandes, M. N.; Martinez, C. B. R. 2009. How aluminium exposure promotes osmoregulatory disturbances in the neotropical freshwater fish *Prochilodus lineatus*. *Aquatic Toxicology*, 94: 40-46.
- Cargouët, M.; Perdiz, D.; Levi, Y. 2007. Evaluation of the estrogenic potential of river and treated waters in the Paris area (France) using in vivo and in vitro assays *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 67: 149-156.
- Castano, A.; Cantario, M. J.; Castillo, P.; Tarazona, J. V. 1996. Correlations between the RTG-2 cytotoxicity test and in vivo LC50 rainbow trout bioassay. *Chemosphere*, 32: 2141-2157.
- Correia, T. G.; Narcizo, A. M.; Bianchini, A.; Moreira, R. G. 2010. Aluminum as an endocrine disruptor in female Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 151: 461-466.
- Dierickx, P. J.; Van den Vyver, I. E. 1991. Correlation of the neutral red uptake inhibition assay of cultured fathead minnow fish cells with fish lethality data. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 46: 649-653.
- Exley, C.; Chappell, C.; Birchall, J. D. 1991. A mechanism for acute aluminium toxicity in fish. *Journal of Theoretical Biology*, 151: 417-428.
- Exley, C.; Pinnegar, J. K.; Taylor, H. 1997. Hydroxyaluminosilicates and acute aluminium toxicity in fish. *Journal of Theoretical Biology*, 189: 133-139.

- Fent, K., Hunn, J. 1996. Cytotoxicity of organic environmental chemicals to fish liver cells (PLHC-1). *Marine Environmental Research*, 42: 377–382.
- Fent, K. 2001. Fish cell lines as versatile tools in ecotoxicology: assessment of cytotoxicity, cytochrome P4501A induction potential and estrogenic activity of chemicals and environmental samples. *Toxicology in Vitro*, 15: 477–488.
- Goksøyr, A.; Arukwe, A.; Larsson, J.; Cajaraville, M. P.; Hauser, L.; Nilsen, B. M.; Lowe, D.; Matthiessen, P. 2003. Molecular/cellular processes and the impact on reproduction. In: *Effects of Pollution on Fish: Molecular Effects and Population Responses*. Edited by: Lawrence, A.; Hemingway, K. Blackwell Science: Oxford, UK. 342p.
- Hildahl, J.; Sandvik, G. K.; Edvardsen, R. B.; Norberg, B.; Haug, T. M.; Weltzien, F. 2011. Four gonadotropin releasing hormone receptor genes in Atlantic cod are differentially expressed in the brain and pituitary during puberty. *General and Comparative Endocrinology*, 173: 333-345.
- Honji, R. M. ; Narcizo, A. M. ; Borella, M. I. ; Romagosa, E. ; Moreira, R. G. 2009. Patterns of oocyte development in natural habitat and captive *Salminus hilarii* Valenciennes, 1850 (Teleostei: Characidae). *Fish Physiology and Biochemistry*, 35: 109-123.
- Hwang, U. G.; Kagawa, N.; Mugiya, Y. 2000. Aluminium and cadmium inhibitor vitellogenin and its mRNA induction by estradiol-17 B in the primary culture of hepatocytes in the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *General and Comparative Endocrinology*, 119: 69-76.
- Karels, A. E.; Soimasuo, M.; Lappivaara, J.; Leppanen, H.; Aaltonen, T.; Mellanen, P.; Oikari, A. O. J. 1998. Effects of ECF-bleached kraft mill effluent on reproduction steroids and liver MFO activity in populations of perch and roach. *Ecotoxicology*, 7: 123-132.
- Laitinen, M.; Valtonen, T. 1995. Cardiovascular, ventilatory and haematological responses of brown trout (*Salmo trutta* L.) to the combined effects of acidity and aluminium in humic water at winter temperatures. *Aquatic Toxicology*, 31: 99-112.

- Levavi-Sivan, B.; Bogerd, J.; Mañanós, E. L.; Gómez, A.; Lareyre, J. J. 2010. Perspectives on fish gonadotropins and their receptors. *General and Comparative Endocrinology*, 165: 412-437.
- Lubzens, E.; Young, G.; Bobe, J.; Cerdà, J. 2010. Oogenesis in teleost: How fish eggs are formed. *General and Comparative Endocrinology*, 165: 367-389.
- Matthiessen, P.; Sumpter, J. P. 1998. Effects of estrogenic substances in the aquatic environment. In: (eds Braunbeck, E. T.; Hinton, D. E.; Streit, B). *Fish Ecotoxicology* Birkhäuser Verlag, Basel, 319-335.
- McCartney, A. G.; Harriman, R.; Watt, A. W.; Moore, D. W.; Taylor, E. M.; Collen, P.; Keay, E. J. 2003. Long-term trends in pH, aluminium and dissolved organic carbon in Scottish fresh waters; implications for brown trout (*Salmo trutta*) survival. *Science of the Total Environment*, 310: 133-141.
- Mlambo, S. S.; Van Vuren, J. H. J.; Barnhoorn, I. E. J.; Bornman, M. S. 2009. Histopathological changes in the reproductive system (ovaries and testes) of *Oreochromis mossambicus* following exposure to DDT. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 28: 133-139.
- Monette, M. Y.; McCormick, S. D. 2008. Impacts of short-term acid and aluminum exposure on Atlantic salmon (*Salmo salar*) physiology: a direct comparison of parr and smolts. *Aquatic Toxicology*, 86: 216-226.
- Mugiya, Y.; Tanahashi, A. 1998. Inhibitory effects of aluminium on vitellogenin induction by estradiol-17 β in the primary culture of hepatocytes in the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *General and Comparative Endocrinology*, 109: 37-43.
- Narcizo, A. M. 2009. *Avaliação da exposição aguda ao alumínio e variações do pH na expressão de gonadotropinas em Oreochromis niloticus (Teleostei: Cichlidae)*. Dissertação de Mestrado. Departamento de Fisiologia, IB - USP.
- Pandolfi, M.; Lo Nostro, F. L.; Shimizu, A.; Pozzi, A. G.; Meijide, F. J.; Vazquez, G. R.; Maggese, M. C. 2006. Identification of immunoreactive FSH and LH cells in the cichlid fish *Cichlasoma dimerus* during the ontogeny and sexual differentiation. *Anatomy and Embryology*, 211:355-65.

- Pandolfi, M.; Pozzi, A. G.; Cánepa, M. M.; Vissio, P. G.; Shimizu, A.; Maggese, M. C.; Lobo, G. 2009. Presence of b-FSH and b-LH transcripts in the brain of *Cichlasoma dimerus* (Perciformes: Cichlidae): effect of brain-derived gonadotropins on pituitary hormone release. *Neuroendocrinology*, 89: 27-37.
- Pérez, G.; Garbossa, G.; Sasseti, B.; Di Risio, C.; Nesse, A. 1999. Interference of aluminium on iron metabolism in erythroleukaemia K562 cells. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 76: 105-112.
- Peuranen, S.; Vuorinen, P. J.; Vuorinen, M.; Tuurala, H. 1993. Effects of acidity and aluminium on fish gills in laboratory experiments and in the field. *The Science of the Total Environment*, 134 (2): 953-967.
- Poléo, A. B. S. 1995. Aluminium polymerization – a mechanism of acute toxicity of aqueous aluminium to fish. *Aquatic Toxicology*, 31: 347-356.
- Poléo, A. B. S.; Ostybe, K.; Oxnevad, S. A.; Andersen, R. A.; Heibo, E.; Vollestad, L. A. 1997. Toxicity of acid aluminium – rich water to seven freshwater fish species: A comparative laboratory study. *Environmental Pollution*, 96: 129-139.
- Purdom, C. E.; Hardiman, P. A.; Bye, V. J. NC, E.; Tyler, C. R.; Sumpter, J. P. 1994. Estrogenic effects of effluents from sewage treatment works. *Journal of Chemical Ecology*, 8: 275-285.
- Quintero-Hunter, I.; Grier, H.; Muscato, M. 1991. Enhancement of Histological Detail Using Metanil Yellow as Counterstain in Periodic Acid Schiff's Hematoxylin Staining of Glycol Methacrylate Tissue Sections. *Biotechnic & Histochemistry*, 66 (4): 169-172.
- Segner, H.; Lenz, D. 1993. Cytotoxicity assays with the rainbow trout R1 cell line. *Toxicology in Vitro*, 7: 537-540.
- Sink, T. D.; Lochmann, R. T.; Fecteau, K. A. 2008. Validation, use and disadvantages of enzyme-linked immunosorbent assay kits for detection of cortisol in channel catfish, largemouth bass, red pacu, and golden shiners. *Fish Physiology and Biochemistry*, 34: 95-101.

- Squibb, K. S.; Fowler, B. A. 1981. Relationship between Metal Toxicity to Subcellular Systems and the Carcinogenic Response. *Environmental Health Perspectives*, 40: 181-188.
- Stoltenberg, M.; Danscher, G. 2000. Histochemical differentiation of autometallographically traceable metals (Au, Ag, Hg, Bi, Zn): Protocols for chemical removal of separate autometallographic metal clusters in Epon sections. *The Histochemical Journal*, 32: 645-652.
- Sumpter, J. P. 1995. Feminized responses in fish to environmental estrogens. *Toxicology Letters*, 82/83: 737-742.
- Sumpter, J. P.; Jobling, S. 1995. Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. *Environmental Health Perspectives*, 103 (7): 173-178.
- Thomas, P. 2000. Chemical interference with genomic and nongenomic actions of steroids in fishes: role of receptor binding. *Marine Environmental Research*, 50: 127-134.
- Thomas, P.; Dressing, G.; Pang, Y.; Berg, H.; Tubbs, C.; Benninghoff, A.; Doughty, K. 2006. Progestin, estrogen and androgen G-protein coupled receptors in fish gonads. *Steroids*, 71: 310-316.
- Tyler, C. R.; Jobling, S.; Sumpter, J. P. 1998. Endocrine disruption in wildlife: A critical review of the evidence. *Critical Reviews in Toxicology*, 28: 319-361.
- Vieira, V. A. R. O.; Correia, T. G.; Moreira, R. G. 2013. Effects of aluminum on the energetic substrates in neotropical feshwater *Astyanax bimaculatus* (Teleostei: Characidae) females. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 157: 1-8.
- Vuorinen, P. J.; Keinanen, M.; Seppo, P.; Tigerstedt, C. 2002. Reproduction, blood and plasma parameters and gill histology of vendace (*Coregonus albula* L.) in long-term exposure to acidity and aluminium. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 54: 255-276.
- Vuorinen, P. J.; Keinanen, M.; Seppo, P.; Tigerstedt, C. 2003. Reproduction, blood and plasma parameters and gill histology of vendace (*Coregonus albula* L.) in long-term

- exposure to acidity and aluminium. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 54: 255-276.
- Vuorinen, P. J.; Vuorinen, M. 1991. Effects of long-term prespawning acid/aluminium exposure on whitefish (*Coregonus wartmanni*) reproduction and blood and plasma parameters. *Finish Fisheries Research*, 12: 125-133.
- Waring, C. P.; Brown, J. A.; Collins, J. E.; Prunet, P. 1996. Plasma prolactin, cortisol, and thyroid responses of the brown trout (*Salmo trutta*) exposed to lethal and sublethal aluminium in acidic soft waters. *General and Comparative Endocrinology*, 102: 377-385.
- Yao, Z.; Van der Kraak, G. J.; Squires, E. J. 1996. *Effect of heavy metals on in vitro vitellogenin production from cultured hepatocytes of goldfish*, Proc. 3rd Int. Symp. *Fish Endocrinology* 27-31 May, 1996, Hakodate, 172.
- Zohar, Y.; Muñoz-Cueto, J.; Elizur, A.; Kah, O. 2010. Neuroendocrinology of reproduction in teleost fish. *General and Comparative Endocrinology*, 165: 438-455.

Capítulo III

***Efeitos in vitro do alumínio como desregulador
endócrino sobre a hipófise de Oreochromis niloticus
(Teleostei: Cichlidae)***

Efeitos *in vitro* do alumínio como desregulador endócrino sobre a hipófise de *Oreochromis niloticus* (Teleostei: Cichlidae)

Resumo

O alumínio (Al) é um dos elementos químicos mais abundantes na crosta terrestre, tornou-se importante poluente aquático trazendo prejuízos a reprodução de teleósteos atuando como um desregulador endócrino. No entanto, em experimentos *in vivo* não é possível afirmar que os efeitos do Al no eixo endócrino reprodutivo são devido a sua atuação direta sobre os órgãos que o compõem. Por isso, este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito local do Al sobre hormônios hipofisários relacionados à reprodução, hormônio folículo estimulante (FSH), hormônio luteinizante (LH) e somatolactina (SL), de fêmeas de *Oreochromis niloticus* utilizando-se experimentos *in vitro*. Hipófises de fêmeas maduras foram incubadas utilizando-se as seguintes condições experimentais por 24 horas: **1) Ctr**: hipófise exposta somente ao meio L15 (controle interno); **2) GnRH**: hipófise exposta somente ao GnRH (controle de liberação de gonadotropinas); **3) GnRH+Al**: hipófise exposta ao GnRH + AlCl₃ 10mM e **4) Al**: hipófise exposta somente AlCl₃ 10mM. Após o período experimental, foram realizadas análises de qPCR (PCR quantitativo), imunohistoquímica, e de microscopia eletrônica. Os resultados mostraram que o Al (GnRH+Al e Al) afetou os cinco genes estudados (β FSH, β LH, SL, fator de alongação d e β actina), diminuindo a expressão destes genes. Os dados de microscopia eletrônica mostraram desestruturação celular nas hipófises que foram expostas ao Al e as análises de imunohistoquímica apontaram que o Al (GnRH+Al e Al) não interferiu na quantidade de grânulos de β LH e SL, mas diminuiu a quantidade de grânulos de β FSH, sugerindo que o Al afeta a dinâmica de síntese/liberação desta gonadotropina. Estes dados evidenciam a toxicidade do Al diretamente sobre a hipófise, tanto em nível de resposta celular quanto em nível estrutural, ampliando as perspectivas de estudo sobre o mecanismo de ação do Al como um desregulador endócrino.

Palavras chave: alumínio, desreguladores endócrinos, peixes, reprodução, gonadotropinas, somatolactina.

Introdução

O alumínio (Al) é o metal mais abundante e o terceiro principal elemento na crosta da Terra. Apesar da dinâmica e evolução natural da crosta terrestre e a reciclagem do Al na litosfera ser essencialmente completa, o Al é, tanto quanto se sabe, excluído da biosfera, o que explica sua falta de essencialidade a toda biota existente ao longo da evolução (Exley, 2013). Por muito tempo o Al foi considerado inócuo (Sorrentson *et al.*, 1974; Exley, 2013), mas diante do cenário biológico evolutivo, pesquisadores começaram a investigar o impacto do Al sobre sistemas biológicos, sugerindo sua toxicidade a bactérias (Reznikoff, 1926), plantas (Pineros; Kochian, 2001; Halman *et al.*, 2013), animais aquáticos (Flaten *et al.*, 1996; Vieira *et al.*, 2013), e seres humanos (Ganrot, 1986; Yokel, 2000; Exley, 2013).

Em peixes de água doce, são relatados efeitos tóxicos do Al sobre funções osmoregulatórias e respiratórias devido à deposição de Al^{3+} nas brânquias (Poléo, 1995, Camargo *et al.*, 2009), efeitos de toxicidade cerebral e hematológica, cardiovasculares (Exley, 1996; Alstad *et al.*, 2005), metabólicas, mudanças comportamentais (Vuorinen *et al.*, 2003; Vieira *et al.*, 2013) e efeitos genotóxicos (Galindo *et al.*, 2010). Todos estes efeitos indiretamente podem prejudicar o sucesso reprodutivo de peixes, ou potencializar os efeitos já conhecidos do Al *in vivo* sobre os processos reprodutivos, como a diminuição da fecundidade e viabilidade dos ovos (Mount *et al.*, 1988), a alteração do desenvolvimento das gônadas e a produção de gametas, atrasando no caso de fêmeas, a ovulação e a desova (Thomsen *et al.*, 1988; Vuorinen *et al.*, 1990; Vuorinen; Vuorinen, 1991).

Há pouco conhecimento sobre efeitos do Al no eixo endócrino reprodutivo de peixes. Quando um elemento, composto, substância ou mistura altera respostas endócrinas causando efeitos adversos à saúde, sendo estes exógenos ao organismo, diz-se ter atuação de um desregulador endócrino (DE) (WHO, 2002). De forma geral, o eixo endócrino reprodutivo é modulado por fatores ambientais e endógenos. O hipotálamo modulado por estes fatores, no período reprodutivo, sintetiza o neuro-hormônio conhecido como GnRH (hormônio liberador de gonadotropinas) que estimula a adeno-hipófise a sintetizar as gonadotropinas FSH (hormônio folículo-estimulante) e LH (hormônio luteinizante) sendo estes os principais hormônios relacionados à reprodução (Zohar *et al.*, 2010). O FSH é liberado no início do período reprodutivo (fase de

vitelogenese) tendo importante papel no desenvolvimento das gônadas. Nos ovários o FSH promove a síntese de 17β -estradiol nas células foliculares (granulosa), e o mesmo atua no fígado, estimulando a síntese de vitelogenina, uma fosfolipoglicoproteína, que é incorporada pelos ovócitos, também na presença do FSH, constituindo o vitelo. O LH é liberado pela adeno-hipófise na fase de maturação final e ovulação. Os níveis elevados de 17β -estradiol e testosterona estimulam a liberação de LH na corrente sanguínea e chegando aos ovários, nas células foliculares (também na granulosa), estimula a síntese do hormônio 17α , 20β -dihydroxy-4-pregnen-3-one, conhecido como o hormônio esteroide indutor da maturação final (MIS), e da ovulação na maioria dos teleósteos (Lubzens *et al.*, 2010).

Além das gonadotropinas, a somatolactina (SL) é outro hormônio adeno-hipofisário, exclusivo de peixes até o momento, que também é estimulado pelo GnRH e tem sido relacionado a processos reprodutivos (Mousa; Mousa, 1999; Mingarro *et al.*, 2002; Pandolfi *et al.*, 2009; Fiszbein *et al.*, 2010). Planas *et al.* (1992) comprovaram em experimento *in vitro* com gônadas que a SL aumenta de maneira dose-dependente a produção de 11 -cetotestosterona e testosterona em testículos, e de estradiol em ovários, mas afirmam que comparado às gonadotropinas o efeito esteroideogênico da SL é ínfimo.

Correia *et al.* (2010) e Narcizo (2009) comprovaram o efeito do AI como um DE atuando sobre a fisiologia reprodutiva de fêmeas maduras de *Oreochromis niloticus*, em experimentos de exposição aguda *in vivo*, em que houve a redução da concentração plasmática de 17α -hidroxiprogesterona, precursor do MIS, e a diminuição da expressão gênica dos hormônios FSH e LH. Os dados acima evidenciam o prejuízo à fisiologia reprodutiva de *O. niloticus*, mas devido a comunicação hormonal entre a hipófise e os ovários, o AI pode ter atuado sobre diferentes pontos do eixo hipófise-gônadas, trazendo os resultados observados. Assim, o objetivo desta pesquisa foi investigar o efeito do AI diretamente sobre a hipófise, em experimentação *in vitro*, avaliando o efeito do AI sobre a expressão gênica dos hormônios FSH, LH, SL, bem como sua presença nas células hipofisárias de *O. niloticus*.

Materiais e Métodos

Animais

Fêmeas maduras de tilápias, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758), foram cedidas gentilmente pela Indústria Brasileira do Peixe (Jundiaí-SP) e pela Rio Doce Piscicultura (Aguai-SP). As tilápias com massa corpórea média de $103 \pm 20,15$ g (n=24) foram dessensibilizadas em água com baixa temperatura e em seguida, mortas por secção da medula espinhal na altura do opérculo, no período da tarde (14h ~ 18h) nos meses de janeiro e fevereiro, maio e junho. Estes procedimentos experimentais foram realizados em conformidade com a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos - DBCA (Brasil, 2013) e foram aprovados pelo Comitê de Ética do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (CONCEA 102/2009).

Ensaio in vitro

As hipófises foram coletadas em condições assépticas, dissecadas e rapidamente lavadas em solução fisiológica; em seguida foram acondicionadas em placas de 24 poços com 200 µl de meio de cultura (Leibovitz – Gibco L15, pH 7,4, diluído a 80% v/v, 10% suplementado com soro fetal bovino, 10 mM HEPES, 100 IU/ml de penicilina e 100 µg/ml de estreptomicina) e mantidas no escuro a 25°C sob leve agitação. A cada 24h o meio de cultura foi trocado com o objetivo de liberar a maior quantidade de fatores remanescentes nas terminações nervosas da hipófise em um período de 48h (Astola *et al.*, 2004; Pandolfi *et al.*, 2006; Cánepa *et al.*, 2008; Pandolfi *et al.*, 2009). Após este período, as hipófises foram submetidas por mais 24h a diferentes condições experimentais formando os seguintes grupos: **1) Ctr**: hipófise exposta somente ao meio L15 (controle interno); **2) GnRH**: hipófise exposta somente ao GnRH (controle de liberação de gonadotropinas); **3) GnRH+Al**: hipófise exposta ao GnRH + AlCl₃ 10mM e **4) Al**: hipófise exposta somente AlCl₃ 10mM.

A concentração de GnRH (*sea bream* – Bachem) utilizada foi de 10µM como a utilizada para um outro ciclídeo *Cichlasoma dimerus* em experimentos similares (Cánepa *et al.*, 2008), e a concentração de Al utilizada foi baseada no trabalho de Hwang *et al.* (2000) em ensaios de experimento *in vitro* em culturas de hepatócitos de *Oncorhynchus mykiss*.

Adicionalmente, os ovários foram coletados, analisados quanto ao seu aspecto macroscópico (tamanho, cor, vascularização e ovócitos) e pesados para se obter a informação do índice gonadossomático (IGS), que corresponde em porcentagem a massa das gônadas em relação à massa do animal. Estas informações são úteis para a avaliação de estágio de maturação gonadal (Lima *et al.* 1986, 1991).

Expressão gênica de β FSH, β LH, SL, β Ac, EF1 α .

Para as análises de expressão gênica, o RNA total foi extraído de cada hipófise utilizando-se o kit RNAqueous (AMBION – AM1920), que inclui o tratamento com DNase I, de acordo com as instruções do fabricante. A fim de se obter amostras mais concentradas, foi utilizado o seguinte protocolo de precipitação de RNA para cada amostra: glicogênio (Fermentas Life Science) concentração final de 1 μ g/ μ l, acetato de sódio na concentração final de 2 M e 80% do volume total de isopropanol 100% (Merck), sendo estes reagentes livres de RNase. As amostras foram estocadas à -20°C *overnight*, centrifugadas a 14000 rpm por 20 minutos a 4°C, desprezado o sobrenadante e lavadas com etanol 70% (etanol Merck e água livre de RNase), centrifugadas a 14000 rpm por mais 20 minutos a 4°C e eliminado todo o etanol de cada tubo. O RNA total foi dissolvido em 10 μ l de água livre de RNase, cada amostra foi quantificada e avaliada quanto a sua pureza (260nm/280nm) no espectrofotômetro *nanodrop*.

Para cada reação de transcrição reversa (RT-PCR) foi utilizada a massa de 0,5 μ g de RNA total utilizando-se oligo dT e a enzima Superscript III Transcriptase Reversa (Life Technologies) de acordo com as instruções do fabricante. Foi realizado o controle negativo da RT-PCR (reação sem a enzima de transcrição reversa) para 48% das amostras, distribuídas entre os grupos experimentais.

O DNA complementar (cDNA) obtido nesta reação serviu de base para os ensaios de quantificação da expressão gênica de cada hormônio (β FSH, β LH, SL) e do EF1 α (fator de elongação 1 α) e da β Ac (β actina), por reação da polimerase em cadeia em tempo real (qPCR). Os valores de quantificação foram gerados a partir da utilização da curva padrão com 6 pontos correspondentes ao número de cópias de 10² a 10⁷ em número absoluto de moléculas para cada gene, em triplicata.

Para se obter a curva padrão, o produto de amplificação de cada gene estudado, β FSH, β LH, SL, incluindo os normalizadores, β Ac e EF1 α , foi ligado ao plasmídeo pGEM-T-Easy (Promega Co., Madison, WI) e transformado em *Escherichia coli* – *Sure* - células competentes (Life Technologies). Seleccionada a colônia isolada, em placas de meio SOB, o DNA plasmidial foi extraído por lise alcalina com SDS (Sambrook; Russel, 2001). Verificada a presença do inserto no plasmídeo por eletroforese para cada gene, os mesmos foram sequenciados em um sequenciador ABI 3100 (Applied Biosystems), no Instituto de Química da Universidade de São Paulo, utilizando-se o Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit v3.1 (Applied Biosystems) de acordo com as instruções do fabricante. As sequências de nucleotídeos foram identificadas pelo NCBI BLAST x programa (GenBank, NCBI).

O DNA plasmidial foi quantificado e 10 μ g de plasmídeo contendo o inserto de cada gene foi digerido com a enzima ScaI por 16h de acordo com as instruções do fabricante (Sinapse Biotecnologia) gerando o material para a construção da curva padrão em qPCR por quantificação absoluta.

Para as reações de qPCR foi utilizado, o cDNA/DNA plasmidial, o kit Maxima™ SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Sinapse Biotecnologia), conforme instruções do fabricante, e os *primers* de cada gene desenhados para o qPCR (Tabela 1.). A amplificação foi realizada no equipamento 7300 da Applied Biosystems.

Tabela 1. Genes e *primers* desenhados para qPCR.

Gene	Acesso GenBank	Sequência (5'→ 3')
β FSH <i>F</i>	AY294015	CGACACCACCATTGTGAAG
β FSH <i>R</i>	AY294015	GTAGGACCACTCTCCGTTGC
β LH <i>F</i>	AY294016	GTGGACACTGCATCACCAAG
β LH <i>R</i>	AY294016	CAATCGGGAAGCTCAAATGT
SL <i>F</i>	AB120767	TTAGGCGACTCAACCTTGC
SL <i>R</i>	AB120767	GTTGAAGAAAGGGCAAAGC
EF1 α <i>F</i>	AB075952	CCCCTGCAGGACGTCTACAAG
EF1 α <i>R</i>	AB075952	AACACGACCGACGGGTACA
β Ac <i>F</i>	EU887951	GATGGTGGGTATGGGTCAG
β Ac <i>R</i>	EU887951	CACAATACCGTGCTCAATGG

Os parâmetros de ciclagem para β FSH, β LH e EF1 α foram os seguintes: 50 °C (2 min), 95 °C (10 min), em seguida 50 ciclos do seguinte 95 °C (15 s), 56 °C (20 s), 72 °C (33 s) e para SL e β Ac os parâmetros de ciclagem foram: 50 °C (2 min), 95 °C (10 min), em seguida 50 ciclos do seguinte 95 °C (15 s), 60 °C (20 s), 72 °C (33 s). No final

da fase de amplificação para identificar um único produto de amplificação, foi realizada a curva de *melting* para cada par de *primers* 95 °C (15 s), 60 °C (30 s) e 95 °C (15 s).

Os parâmetros de análise de dados de qPCR foram a eficiência (E) das reações e R^2 das curvas padrão. Os valores de cada parâmetro para as amostras de cada gene foram: β FSH: E = 114,78%, R^2 = 0,983; β LH: E = 99,25%, R^2 = 0,983; SL: E = 116%, R^2 = 0,987; EF1 α E = 88%, R^2 = 0,978; β Ac E = 113,06%, R^2 = 0,984.

Imunohistoquímica

Após o período experimental as hipófises (n=3 para cada grupo) foram fixadas em solução Bouin acético durante 24 horas e desidratadas através de uma série de diluições crescentes de etanol, diafanizadas em xilol e incluídas em Paraplast® de acordo com os procedimentos normais histológicos (Behmer *et al.*, 1976). Os cortes histológicos foram realizados em série com 5 μ m de espessura, sendo fixados 3 cortes por lâmina, que foram submetidas à análise imunohistoquímica, em quadruplicata, pelo método de estreptavidina-biotina-peroxidase (Dako Cytomation LSAB2 System- HRP). Os anticorpos (anti-salmon β FSH/ β LH/SL) foram utilizados na diluição de 1:1.000 sendo todos cedidos pela Profa. Dra. Maria Inês Borella (ICB/USP) e fornecidos pelo Dr. H. Kawauchi (*Kitasato University*, Japão). Os ensaios de imunohistoquímica, para cada hormônio, foram realizados conforme descrito por Jesus *et al.*(2013).

Em cada lâmina analisada um corte era determinado como controle de especificidade de ligação de cada anticorpo, por omissão do anticorpo primário. Em todas as lâminas para todos os hormônios estudados (β FSH, β LH, SL) não foram observadas células positivas no corte controle.

Ao final do experimento, após a montagem das lâminas, os cortes foram examinados e documentados utilizando-se um analisador de imagem computadorizado composto por: microscópio de luz (Leica DM 1000), câmera fotográfica (Leica DFC295) e captura de imagens Leica Aplicação Profissional Suite, LAS V3.6. Com base na intensidade da imunorreação, os cortes para análise de cada hormônio foram classificados em muito forte, forte e moderado. Para estas análises, 6 observadores

distintos e sem conhecimento da classificação dos observadores anteriores foram considerados.

Microscopia eletrônica de transmissão

Para avaliar a integridade das células e organelas celulares, após o período experimental, as hipófises foram imediatamente imersas em glutaraldeído a 3% em tampão fosfato 0,1M, pH 7,2, por aproximadamente 18h, a 4 °C. Os fragmentos foram pós-fixados em solução de tetróxido de ósmio a 1% por 2h e posteriormente desidratados e incluídos em resina. Os blocos de resina foram desbastados para a exposição dos fragmentos hipofisários e cortados em ultramicrotomo Sorvall MT 2-B, cortes ultrafinos na espessura de 40 a 60 nm foram obtidos e colocados sobre telas de cobre de 200 *meshes* e foram contrastados utilizando-se acetato de uranila 2% em solução de álcool 70 °GL por 5 minutos e citrato de chumbo por 5 minutos. As micrografias foram obtidas no microscópio eletrônico Jeol 100 CX-II, 80.000 Kv, no Departamento de Histologia e Embriologia do Instituto de Ciências Biológicas da USP (Parreira, 1998).

Teste de osmolalidade

A determinação da osmolalidade no meio de incubação foi realizada a fim de verificar a homogeneidade desta variável entre os grupos experimentais, certificando-se que os dados discutidos estejam relacionados exclusivamente à presença do Al. Os testes de osmolalidade foram realizados em um osmômetro de pressão a vapor (Wescor 5500), após a calibração do equipamento, utilizando-se 10 µl de cada amostra sobre um papel filtro que foi em seguida inserido em sua caixa de vaporização. Cada amostra foi avaliada em triplicata, e os resultados foram gerados em mM de soluto/Kg de solvente.

Análise estatística

Os dados apresentados são expressos como média $\pm$ EPM (erro padrão da média). Valores médios para as diferentes condições experimentais foram comparados

utilizando-se análise de variância *one-way* (ANOVA), seguido pelo teste de *Dunn's*. O nível de significância adotado foi de 95% ($P < 0,05$). Análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa SigmaStat software para Windows versão 3.10 (Systat Software, San Jose, CA, EUA).

Resultados

Expressão gênica de β FSH, β LH, SL, β Ac, $EF1\alpha$.

Para avaliar o efeito do Al sobre a expressão gênica dos hormônios hipofisários β FSH, β LH, SL foram realizadas análises quantitativas de RNA mensageiro por qPCR. Os resultados obtidos mostraram que o Al interferiu na expressão de todos os genes analisados β FSH (Figura 1) e β LH (Figura 2), SL (Figura 3), incluindo os possíveis genes normalizadores avaliados, $EF1\alpha$ (Figura 4) e β Ac (Figura 5), pois houve diminuição significativa ($P < 0,001$, para todos os genes) dos grupos GnRH+Al e Al em relação ao grupo controle (Ctr) e ao grupo GnRH. Não houve diferença significativa entre os grupos Ctr e GnRH e GnRH+Al e Al.

Figura 1. Comparação da quantidade do número de cópias do mRNA de β FSH em experimentos *in vitro* a partir do mRNA extraído de hipófises de fêmeas maduras de *O. niloticus* após 24h de exposição ao GnRH 10 μ M; ao GnRH 10 μ M e ao AlCl₃ 10mM; e somente ao AlCl₃ 10mM. Os dados são apresentados como média $\pm$ EPM. Letras diferentes indicam diferença estatística entre os tratamentos ($P < 0,05$).

Figura 2. Comparação da quantidade do número de cópias do mRNA de β LH em experimentos *in vitro* a partir do mRNA extraído de hipófises de fêmeas maduras de *O. niloticus* após 24h de exposição ao GnRH 10 μ M; ao GnRH 10 μ M e ao AlCl₃ 10mM; e somente ao AlCl₃ 10mM. Os dados são apresentados como média $\pm$ EPM. Letras diferentes indicam diferença estatística entre os tratamentos (P <0,05).

Figura 3. Comparação da quantidade do número de cópias do mRNA de SL em experimentos *in vitro* a partir do mRNA extraído de hipófises de fêmeas maduras de *O. niloticus* após 24h de exposição ao GnRH 10 μ M; ao GnRH 10 μ M e ao AlCl₃ 10mM; e somente ao AlCl₃10mM. Os dados são apresentados como média $\pm$ EPM. Letras diferentes indicam diferença estatística entre os tratamentos (P <0,05).

Figura 4. Comparação da quantidade do número de cópias do mRNA de EF1α em experimentos *in vitro* a partir do mRNA extraído de hipófises de fêmeas maduras de *O. niloticus* após 24h de exposição ao GnRH 10μM; ao GnRH 10μM e ao AlCl₃ 10mM; e somente ao AlCl₃ 10mM. Os dados são apresentados como média ± EPM. Letras diferentes indicam diferença estatística entre os tratamentos (P < 0,05).

Figura 5. Comparação da quantidade do número de cópias do mRNA de βAc em experimentos *in vitro* a partir do mRNA extraído de hipófises de fêmeas maduras de *O. niloticus* após 24h de exposição ao GnRH 10μM; ao GnRH 10μM e ao AlCl₃ 10mM; e somente ao AlCl₃ 10mM. Os dados são apresentados como média ± EPM. Letras diferentes indicam diferença estatística entre os tratamentos (P < 0,05).

Imunohistoquímica

A hipófise de *O. niloticus*, como na maioria dos teleósteos, é constituída pela neuro-hipófise (NH) e pela adeno-hipófise (ADH). A ADH é subdividida em três áreas distintas: a *rostral pars distalis* (RPD), a parte anterior da glândula; *proximal pars distalis* (PPD), a parte central, e *pars intermedia* (PI), a parte posterior (Figura 6), sendo conhecidamente as células gonadotrópicas localizadas na PPD e as células somatolactínicas na PI.

Figura 6. Secção sagital da hipófise de *O. niloticus*, corada com ácido periódico reativo de Schiff (PAS), apresentando a neuro-hipófise (NH) e as três regiões da adeno-hipófise (ADH): a *rostral pars distalis* (RPD), a *proximal pars distalis* (PPD), e a *pars intermedia* (PI). Imagem capturada em aumento de 100x. Escala: 100µm.

Os dados da tabela 2 são sugeridos com base na intensidade da coloração da imunorreacção (Figura 7), em quadruplicata, tendo sido padronizados o tempo de revelação para cada gene. Desta forma, o Al parece não interferir sobre a imunomarcação para LH, pois os grupos Ctr, GnRH+Al e Al, foram por seis pessoas não conhecedoras da questão e com boa saúde visual, classificados com a mesma intensidade de marcação. No entanto, o grupo GnRH foi classificado com menor intensidade em relação aos outros grupos, sendo sugerido que o GnRH possa ter estimulado a liberação do LH.

Para o FSH, os dados sugerem que os grupos Ctr e GnRH+Al apresentam a mesma intensidade de coloração, o grupo GnRH maior intensidade comparado ao grupo Ctr, e o grupo Al menor intensidade em relação ao grupo Ctr, sugerindo uma tendência do grupo estimulado com GnRH apresentar mais FSH, possivelmente em resposta ao

GnRH, e o grupo Al ter interferido ou na redução da produção ou no estímulo da liberação do FSH.

Sobre a SL, o Al parece não interferir na imunomarcação comparado ao grupo Ctr, pois os dados sugerem que os grupos Ctr, GnRH+Al e Al apresentam a mesma intensidade de marcação. Já o grupo estimulado com GnRH é classificado com imunomarcação mais forte em relação ao grupo Ctr, novamente sugerindo que há uma tendência de a hipófise aumentar a produção da SL em resposta ao GnRH.

Tabela 2. Imunorreação das células gonadotrópicas (β FSH e β LH) e somatolactínicas (SL) de *O. niloticus* em cortes seriados de hipófise. Anticorpos: *anti-salmon* β FSH, β LH e SL, Dr. H. Kawauchi

	Ctr	GnRH	GnRH+Al	Al
β FSH	++	+++	++	+
β LH	+++	++	+++	+++
SL	++	+++	++	++

Imunorreação: (+++) muito forte, (++) forte e (+) moderada.

Figura 7. Secções sagitais da hipófise de *O. niloticus* submetidas à reações de imuno-histoquímica, após 24h de exposição ao GnRH 10 μ M; ao GnRH 10 μ M e ao AlCl₃ 10mM; e somente ao AlCl₃ 10mM, em experimentos *in vitro*. Reações com *anti-salmon* β FSH: **A** - hipófise grupo Ctr; **B** - hipófise grupo GnRH; **C** - hipófise grupo GnRH+Al; **D** - hipófise grupo Al. Reações com *anti-salmon* β LH: **E** - hipófise grupo Ctr; **F** - hipófise grupo GnRH; **G** - hipófise grupo GnRH+Al; **H** - hipófise grupo Al. Reações com *anti-salmon* SL: **I** - hipófise grupo Ctr; **J** - hipófise grupo GnRH; **K** - hipófise grupo GnRH+Al; **L** - hipófise grupo Al. Imagem capturada em aumento de 100x. Escala: 100 μ m.

Microscopia eletrônica de transmissão

As imagens de micrografia eletrônica evidenciam desorganização celular das hipófises expostas ao Al, tanto no grupo GnRH+Al quanto no grupo Al. É possível observar (Figura 8), a organização celular e a presença de muitos grânulos de secreção nos grupos Ctr e GnRH (Figura 8 T1 e T2), e grandes vacúolos, cisternas do retículo endoplasmático rugoso ou granular, no grupo exposto ao GnRH (Figura 8 T2). Para as hipófises dos grupos expostos ao Al (Figura 8 T3 e T4) é possível observar a ausência de organização celular como a delimitação da célula e de estruturas celulares por membrana e cromatinas celulares condensadas.

Figura 8. Elétron-micrografia de transmissão da hipófise de *O. niloticus* após 24h de exposição ao GnRH 10 μ M; ao GnRH 10 μ M e ao AlCl₃ 10mM; e somente ao AlCl₃ 10mM, em experimentos *in vitro*. **T1** – grupo Ctr (aumento 3k); **T2** – grupo GnRH (aumento 3k); **T3** – grupo GnRH+Al (aumento 3k); **T4** – grupo Al (aumento 2k). Núcleo (N); Retículo Endoplasmático Rugoso (RER); Grânulos de secreção (*); Estruturas de membrana (seta) e Cromatinas condensadas (cabeça da seta).

Teste de osmolalidade

A tabela 3, apresentada abaixo, mostra que não há diferença significativa ($P > 0,05$) na osmolalidade do meio de cultura entre os grupos experimentais, ou seja, não ocorreu alteração da concentração osmótica quando o AlCl_3 foi adicionado.

Tabela 3. Osmolalidade do meio de cultura das amostras após 24h de exposição das hipófises às condições experimentais, do meio de cultura puro e após a adição do AlCl_3 (10mM). Os dados são apresentados como média $\pm$ EPM. Não houve diferença significativa entre os grupos experimentais.

Grupos experimentais	mM/Kg
Ctr	404,17 $\pm$ 16,17
GnRH	414,50 $\pm$ 2,17
GnRH + Al	421,33 $\pm$ 12,33
Al	438,00 $\pm$ 31,00
Meio puro	356,50 $\pm$ 3,50
Meio + Al	364,50 $\pm$ 2,50

O índice gonadossomático (IGS) traduz a porcentagem em massa que as gônadas representam em relação à massa corpórea total do animal. Este índice não apresentou diferença estatística entre os grupos experimentais, sugerindo forte homogeneidade no estágio de desenvolvimento gonadal das fêmeas utilizadas. Valores médios e erro padrão do IGS para cada grupo dos experimentos hipofisários: Ctr: $1,22 \pm 0,34$; GnRH: $1,55 \pm 0,61$; GnRH + Al: $1,19 \pm 0,15$ e Al: $1,30 \pm 0,39$.

Discussão

Com o intuito de avançar os estudos de ação tóxica do Al sobre a fisiologia reprodutiva de fêmeas, utilizando-se a espécie *O. niloticus*, este trabalho investigou efeitos do Al diretamente sobre a síntese e presença de gonadotropinas e somatolactina na hipófise. Nossos resultados mostraram que o Al reduziu a expressão gênica das gonadotropinas, da somatolactina e dos genes $\text{EF1}\alpha$ e βAc , os quais foram utilizados como genes normalizadores de expressão, quando comparados ao controle.

São relatadas na literatura dificuldades na eleição de genes constitutivos para experimentos de ecotoxicologia (McCurley; Callard, 2008; Liu *et al.*, 2013). McCurley e Callard (2008) estudaram a expressão gênica de oito genes (βAc , α tubulina, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, glicose-6-fosfato desidrogenase, proteína de

ligação TATAbox, β -2-microglobulina, EF1 α , e 18S ribossomal) comumente utilizados como normalizadores em métodos de qPCR, em *zebrafish*, em diferentes fases do desenvolvimento e em exposição a DE. Os resultados mostraram que, em condições de exposição aos poluentes, todos os normalizadores apresentaram variação de expressão gênica, assim como os resultados deste trabalho para os normalizadores EF1 α e β Ac, e afirmaram que os genes mais estáveis em exposição ao DE foram: α tubulina, β Ac e EF1 α .

Embora não se possa afirmar que o AI exerceu efeito tóxico sobre os genes de estudo β FSH, β LH e SL, devido à falta de um gene normalizador ideal, os dados aqui apresentados, permitem afirmar que o AI interferiu na resposta celular como um todo, pois comparado aos grupos Ctr e GnRH, o AI (grupos GnRH+AI e AI) promoveu uma diminuição de expressão gênica em uma escala de ao menos 200 vezes, para os cinco genes analisados. Adicionalmente, era esperado um aumento da expressão gênica para o grupo GnRH em comparação ao grupo Ctr, o que não ocorreu, mas ainda assim a diminuição da expressão gênica encontrada nos grupos expostos ao AI ratifica sua ação como um DE, nestas condições experimentais.

Em experimentos *in vivo* de exposição aguda de *O. niloticus* ao AI, o EF1 α apresentou consistência na expressão gênica entre os grupos experimentais, podendo ser utilizado como normalizador da expressão gênica de gonadotropinas (Narcizo, 2009), o que diverge dos resultados aqui obtidos. Assim, pode-se sugerir que essas condições de experimentação *in vitro*, foram mais tóxicas que as condições de experimentação *in vivo* avaliadas por Narcizo (2009), que também mostraram redução da expressão das gonadotropinas em fêmeas expostas ao AI. Podemos considerar que em experimentos *in vivo* outros sistemas fisiológicos possam reduzir os efeitos do AI, por excreção ou por reduzir seu efeito tóxico, como o que é realizado por enzimas como a metalotioneína, por exemplo (Pedersen *et al.*, 1997; Andrews, 2000). Ou ainda, pode-se, considerar que experimentos *in vitro* possam ser naturalmente mais tóxicos, e que por isso antecipem efeitos tóxicos agudos *in vivo*, sendo bons preditivos de prejuízos ecotoxicológicos (Fent, 2001).

Os resultados aqui encontrados contribuem para a elucidação dos efeitos biológicos observados *in vivo* como o atraso da ovulação e desova (Vuorinen *et al.*, 1990; Vuorinen; Vuorinen 1991) e as alterações hormonais descritas por Correia *et al.*

(2010) para *O. niloticus*. Outra consideração a ser realizada é ação do AI sobre o hipotálamo, no caso de experimentos *in vivo*, pois o AI é conhecidamente um agente neurotóxico (Nayak, 2002; Exley, 2013), e é possível que devido à hipófise de teleósteos, em geral, apresentar a neuro-hipófise interdigitada na adeno-hipófise, sua toxicidade sobre a hipófise possa ser favorecida, *in vivo* e *in vitro*.

Quanto à presença de grânulos dos hormônios FSH, LH e SL, detectados com auxílio da anticorpos para β FSH, β LH e SL, observamos que o AI parece não interferir na quantidade de LH e SL, mas parece diminuir a imunomarcaçã~~o~~^o β FSH, sugerindo que o AI afeta de alguma forma a dinâmica de síntese/liberação desta gonadotropina. Para os três hormônios estudados parece haver alteração na intensidade de marcação nos animais do grupo GnRH comparando-se ao controle. Sendo que para os hormônios FSH e SL é suposto um aumento na quantidade hormonal, o que seria natural quanto a função do GnRH sobre a hipófise, enquanto para o LH é suposto uma diminuição de grânulos podendo estar associada a um estímulo de liberação.

Deste modo, para o mesmo momento experimental e os mesmos hormônios, o retrato biológico não é coincidente, para as análises de qPCR e imuno-histoquímica, o que se explica, pois as ferramentas utilizadas mostram aspectos distintos. Os resultados de expressão gênica apontam a síntese hormonal, processo que ocorre no núcleo celular, enquanto os resultados da imuno-histoquímica mostram a presença destes mesmos hormônios, já sintetizados, no citoplasma da célula. Diante dos fatos, em que o AI inibe a síntese e diminui a quantidade de grânulos de FSH, parece mesmo que os animais expostos ao AI terão pouco FSH, considerando o mesmo momento do grupo Ctr, ou ainda pode-se sugerir que estes animais teriam adiantado a liberação do FSH. No caso dos hormônios LH e SL, o AI inibe a síntese, mas não altera a dinâmica de acúmulo/liberação destes grânulos, em relação ao Ctr neste mesmo momento, mas é possível questionar se a liberação destes hormônios, já produzidos, não seria afetada, uma vez que é conhecida a redução dos níveis plasmáticos ~~de~~^o β FSH em experimentos de exposição aguda de *O. niloticus* ao AI *in vivo* (Correia *et al.*, 2010).

Este questionamento tem por base o conhecimento de que *in vivo* os níveis plasmáticos para LH ocorrem como um pico no momento de ovulação e desova, enquanto o FSH é continuamente circulante na fase de vitelogênese (Levavi-Sivan *et al.*, 2010). Levando esta informação em consideração, apesar dos resultados deste

experimento *in vitro* ter apresentado alterações na expressão de β FSH e na dinâmica acúmulo/liberação de grânulos do mesmo hormônio, indicando maiores prejuízos neste momento em relação ao LH, os resultados apresentados por Correia *et al.* (2010) em que os níveis plasmáticos de E_2 não se alteraram nas tilápias expostas ao Al, podem sugerir que o perfil biológico do FSH permita que o organismo realize ajustes fisiológicos não sendo evidente a influência do Al sobre o E_2 .

O mapa de distribuição dos tipos celulares da hipófise de *O. niloticus* foi realizado e descrito por Kasper *et al.* (2006). Sendo assim, já são conhecidas as áreas de marcação para os hormônios estudados. As células gonadotrópicas localizam-se na PPD e as células somatolactínicas na PI, o objetivo da utilização desta metodologia foi o de complementar os dados de expressão gênica diante das condições experimentais. A especificidade dos anticorpos (*anti-salmon*) utilizados já era conhecida, sendo discutida a dualidade celular da marcação deste anticorpo entre β FSH e β LH (Kasper *et al.*, 2006). Por isso, é sugerido que estes dados sejam analisados por métodos estereológicos, para que esta informação seja verificada nos resultados aqui apresentados, podendo incluir análises como a medição do tamanho do citoplasma e contagem celular e também a avaliação da intensidade da marcação imuno-histoquímica (Honji *et al.*, 2013).

Quanto à micrografia eletrônica, não foi possível saber exatamente qual era a região hipofisária fotografada. Contudo, as características das células pertencente ao grupo estimulado com GnRH (T2) sugerem que sejam células gonadotrópicas, por suas características de grandes vacúolos, ou cisternas, e a presença de muitos grânulos de secreção (Peute *et al.*, 1984; Kaneko *et al.*, 1986). E com esta técnica foi possível observar uma desorganização celular, como se as membranas celulares não estivessem mais presentes na maioria das células hipofisárias dos animais dos grupos que foram expostos ao Al (T3 e T4), pois não foi possível visualizar estruturas celulares adjacentes ao núcleo. Galindo *et al.* (2010) mostraram o efeito do Al como um agente genotóxico, em experimentos *in vivo*, utilizando-se de testes de micronúcleo e de anormalidade celular de hemácias, ensaios cometa em *Prochilodus lineatus*, em células das brânquias e fígado tendo sido observados danos ao DNA e verificado células anormais, mostrando mais uma vez efeito tóxico celular do Al. Além disso, assim como há diferença de acúmulo do Al em tecidos ou órgãos alvo, na célula este acúmulo também não é

uniforme, sendo acumulado, principalmente, no lisossomo, núcleo celular e cromatina (Nayak, 2002).

Os resultados de morfologia e expressão gênica, aqui apresentados, sugerem a toxicidade do Al tanto em nível de resposta celular quanto estrutural, não sendo possível afirmar se há especificidade de ação do Al a um gene ou tipo celular, mas deixa claro que o Al interrompe respostas e/ou o funcionamento de células podendo, pela desestruturação observada levar a célula à morte. Este é o primeiro experimento *in vitro* a demonstrar a atuação do Al como um DE diretamente sobre a hipófise de teleósteos.

Conclusão

Nosso trabalho explicita o efeito tóxico do Al sobre a resposta de síntese celular e estrutura celular, ampliando as perspectivas de estudo sobre o mecanismo de ação do Al como um DE, e contribui para a reformulação da ideia de inocuidade do Al em nosso dia-dia, fazendo-nos repensar nossas atitudes a favor do desenvolvimento sustentável.

Referências bibliográficas

- Alstad, N. E. W.; Kjelsberg, B. M.; Vøllestad, A. L.; Lydersen, E.; Poléo, A. B. S. 2005. The significance of water ionic strength on aluminium toxicity in brown trout (*Salmo trutta* L.). *Environmental Pollution*, 133: 333-342.
- Andrews, G. K. 2000. Regulation of metallothionein gene expression by oxidative stress and metal ions. *Biochemical Pharmacology*, 59: 95-104.
- Astola, A.; Calduch-Giner, J. A.; Ortiz, M.; Pérez-Sánchez, J.; Valdivia, M. M. 2004. Genomic structure and functional analysis of promoter region of somatolactin gene of sea bream (*Sparus aurata*). *Marine Biotechnology*, 6: 411-418.
- Behmer, O. A.; Tolosa, E. M. C.; Neto, A. G. F. 1976. *Manual de técnicas para histologia normal e patológica*. EDART. Livraria Editora Ltda, São Paulo.
- BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA. *Diretriz brasileira para o cuidado e a utilização de animais para fins científicos e didáticos – DBCA*. Brasília, DF: MCT/CONCEA, 2013. 50 p. Disponível em:

<<http://web.fc.unesp.br/Home/Pesquisa/diretriz-brasileira-para-o-cuidado-e-a-utilizacao-de-animais-para-fins-cientificos-e-didaticos.pdf>>

- Camargo, M. M. P.; Fernandes, M. N.; Martinez, C. B. R. 2009. How aluminium exposure promotes osmoregulatory disturbances in the neotropical freshwater fish *Prochilodus lineatus*. *Aquatic Toxicology*, 94: 40-46.
- Cánepa, M.; Pozzi, A.; Astola, A.; Maggese, M. C.; Vissio, P. 2008. Effect of salmon melanin-concentrating hormone and mammalian gonadotrophin-releasing hormone on somatolactin release in pituitary culture of *Cichlasoma dimerus*. *Cell Tissue Research*, 333: 49-59.
- Correia, T. G.; Narcizo, A. M.; Bianchini, A.; Moreira, R. G. 2010. Aluminum as an endocrine disruptor in female Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 151: 461-466.
- Exley, C. 1996. Aluminium in the brain and heart of the rainbow trout. *Journal of Fish Biology*, 48: 706-713.
- Exley, C. 2013. Human Exposure to Aluminium. *Environmental Science: Processes Impacts*, 15: 1807-1816.
- Fent, K. 2001. Fish cell lines as versatile tools in ecotoxicology: assessment of cytotoxicity, cytochrome P4501A induction potential and estrogenic activity of chemicals and environmental samples. *Toxicology in Vitro*, 15: 477-488.
- Flaten, T. P.; Alfrey, A. C.; Birchall, J. D.; Savory, J.; Yokel, R.A. 1996. Status and future concerns of clinical and environmental aluminium toxicology. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 48: 527-541.
- Fiszbein, A.; Cánepa, M.; Vázquez, G.R.; Maggese, C.; Pandolfi, M. 2010. Photoperiodic modulation of reproductive physiology and behaviour in the cichlid fish *Cichlasoma dimerus*. *Physiology & Behavior*, 99: 425-432.
- Galindo, B. A.; Troilo, G.; Cólus, I. M. S.; Martinez, C. B. R.; Sofia, S. H. 2010. Genotoxic Effects of Aluminum on the Neotropical Fish *Prochilodus lineatus*. *Water, Air, & Soil Pollution*, 212:419-428.

- Ganrot, P. O. 1986. Metabolism and possible health effects of aluminum. *Environmental Health Perspectives*, 65: 363-441.
- Halman, J. M.; Schaberg, P. G.; Hawley, G. J.; Pardo, L. H.; Fahey, T. J. 2013. Calcium and aluminum impacts on sugar maple physiology in a northern hardwood forest *Tree Physiology*, 33: 1242-1251.
- Honji, R. M.; Nóbrega, R. H.; Pandolfi, M.; Shimizu, A.; Borella, M. I.; Moreira, R. G. 2013. Immunohistochemical study of pituitary cells in wild and captive *Salminus hilarii* (Characiformes: Characidae) females during the annual reproductive cycle. *SpringerPlus*, 2: 460-173.
- Hwang, U. G.; Kagawa, N.; Mugiya, Y. 2000. Aluminium and cadmium inhibitor vitellogenin and its mRNA induction by stradiol-17 B in the primary culture of hepatocytes in the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *General and Comparative Endocrinology*, 119: 69-76.
- Jesus, L. W. O.; Chehade, C.; Costa, F. G.; Borella, M. I. 2013. Pituitary gland morphogenesis and ontogeny of adenohypophyseal cells of *Salminus brasiliensis* (Teleostei, Characiformes). *Fish Physiology and Biochemistry*, DOI 10.1007/s10695-013-9895-2.
- Kaneko, T.; Aida, K.; Hanyu, I. 1986. Ultrastructural changes in the pituitary gonadotropes during the annual reproductive cycle of the female chichibu-goby *Tridentiger obscurus*. *Cell and Tissue Research*, 246: 137-144.
- Kasper, R. S.; Shved, N.; Takahashi, A.; Reinecke, M.; Eppler, E. 2006. A systematic immunohistochemical survey of the distribution patterns of GH, prolactin, somatolactin, β -TSH, β -FSH, β -LH, ACTH, and α -MSH in the adenohypophysis of *Oreochromis niloticus*, the Nile tilapia. *Cell Tissue Research*, 325: 303-313.
- Levavi-Sivan, B.; Bogerd, J.; Mañanós, E. L.; Gómez, A.; Lareyre, J. J. 2010. Perspectives on fish gonadotropins and their receptors. *General and Comparative Endocrinology*, 165: 412-437.
- Lima, R. L. V. A.; Val-Sella, M. V.; Torquato, V. C. 1986. Organização e desenvolvimento das gônadas do dourado (*Salminus maxillosus* Val.) durante o ciclo reprodutivo. *Boletim de Fisiologia Animal*, 10: 139-154.

- Lima, R. L. V. A.; Bernardino, G.; Val-Sella, M. V.; Fava-De-Moraes, F.; Schemy, R. A.; Borella, M. I. 1991. Tecido Germinativo Ovariano e ciclo reprodutivo de pacus (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887) mantidos em cativeiro. *Boletim Técnico do Cepta*, 4: 1-46.
- Liu, Q.; Basu, N.; Goetz, G.; Jiang, N.; Hutz, R. J.; Tonellato, P. J.; Carvan III, M. J. 2013. Differential gene expression associated with dietary methylmercury (MeHg) exposure in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and zebrafish (*Danio rerio*). *Ecotoxicology*, 22:740–751.
- Lubzens, E.; Young, G.; Bobe, J.; Cerdà, J. 2010. Oogenesis in teleost: How fish eggs are formed. *General and Comparative Endocrinology*, 165: 367-389.
- McCurley, A. T.; Callard, G. V. 2008. Characterization of housekeeping genes in zebrafish: male-female differences and effects of tissue type, developmental stage and chemical treatment. *BioMedCentral Molecular Biology*, 9: 102-113.
- Mingarro, M.; Celis S. V.; Astola, A.; Pendón, C.; Valdivia, M. M.; Pérez-Sánchez, J. 2002. Endocrine mediators of seasonal growth in gilthead sea bream (*Sparus aurata*): the growth hormone and somatolactin paradigm. *General and Comparative Endocrinology*, 128: 102-111.
- Mount, D. R.; Hockett, J. R.; Gern, W. A. 1988. Effect of long – term exposure to acid, aluminum, and low calcium on adult brook trout (*Salvelinus fontinalis*). Vitelogenesis and osmoregulation. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 45: 1633-1642.
- Mousa, M. A.; Mousa, S. A. 1999. Immunocytochemical study on the localization and distribution of the somatolactina cells in the pituitary gland and the brain of *Oreochromis niloticus* (Teleostei, Cichlidae). *General and Comparative Endocrinology*, 113: 197-211.
- Narcizo, A. M. 2009. Avaliação da exposição aguda ao alumínio e variações do pH na expressão de gonadotropinas em *Oreochromis niloticus* (Teleostei: Cichlidae). Dissertação de Mestrado. Departamento de Fisiologia, IB - USP.
- Nayak, P. 2002. Aluminum: Impacts and disease. *Environmental Research*, A 89: 101-115.

- Pandolfi, M.; Lo Nostro, F. L.; Shimizu, A.; Pozzi, A. G.; Meijide, F. J.; Vazquez, G. R.; Maggese, M. C. 2006. Identification of immunoreactive FSH and LH cells in the cichlid fish *Cichlasoma dimerus* during the ontogeny and sexual differentiation. *Anatomy and Embryology*, 211: 355-65.
- Pandolfi, M.; Pozzi, A. G.; Cánepa, M. M.; Vissio, P. G.; Shimizu, A.; Maggese, M. C.; Lobo, G. 2009. Presence of b-FSH and b-LH transcripts in the brain of *Cichlasoma dimerus* (Perciformes: Cichlidae): effect of brain-derived gonadotropins on pituitary hormone release. *Neuroendocrinology*, 89: 27-37.
- Parreira, S. F. 1998. Células gonadotrópicas de curimatá *Prochilodus scrofa* (Steindachner, 1981) (Pisces, Teleostei). Estudo ultra-estrutural e imuno-histoquímico. Dissertação de Mestrado. Departamento de Histologia e Embriologia, ICB - USP.
- Pedersen, S. N.; Lundebye, A. K.; Depledge, M. H. 1997. Field application of metallothionein and stress protein biomarkers in the shore crab (*Carcinus maenas*) exposed to trace metals. *Aquatic Toxicology*, 37: 183-200.
- Peute, J.; Leeuw, R.; Goos, H.J.Th.; van Oordt, P.G.W.J. 1984. Ultrastructure and immunolabeling of gonadotrops and thyrotrops in the pituitary of the African catfish, *Clarias lazera*. *Cell and Tissue Research*, 238:95-103.
- Pineros, M. A.; Kochian, L. V. 2001. A patch-clamp study on the physiology of aluminum toxicity and aluminum tolerance in maize: Identification and characterization of Al(3b)-induced anion channels. *Plant Physiology*, 125: 292-305.
- Planas, J. V.; Swanson, P.; Rand-Weaver, M.; Dickhoff, W. W. 1992. Somatolactin stimulates *in vitro* gonadal steroidogenesis in coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*. *General and Comparative Endocrinology*, 87: 1-5.
- Poléo, A. B. S. 1995. Aluminium polymerization – a mechanism of acute toxicity of aqueous aluminium to fish. *Aquatic Toxicology*, 31: 347-356.
- Reznikoff, P. 1926. Micrurgical studies in cell physiology. *The Journal of General Physiology*, 9-21.

- Sambrook, J.; David, W. R. 2001. *A laboratory manual*. Third Edition by Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York. Volumes: 1, 2 e 3.
- Sorrenson, J. R. J.; Campbell, I. R.; Tepper, L. B.; Lingg, R. D. 1974. Aluminum in the environment and human health. *Environmental Health Perspectives*, 8: 3-95.
- Thomsen, A.; Korsgaard, B.; Joensen, J. 1988. Effects of aluminium and calcium ions on survival and physiology of rainbow trout *Salmo gairdneri* (Richardson) eggs and larvae exposed to acid stress. *Aquatic Toxicology*, 12: 291-300.
- Vieira, V. A. R. O.; Correia, T. G.; Moreira, R. G. 2013. Effects of aluminum on the energetic substrates in neotropical feshwater *Astyanax bimaculatus* (Teleostei: Characidae) females. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 157: 1-8.
- Vuorinen, P. J.; Vuorinen, M.; Peuranen, S. 1990. Long-term exposure of adult whitefish (*Coregonus wartmanni*) to low pH/ aluminium: effects on reproduction, growth, blood composition and gills. In: P. Kauppi, P. Anttila and K. Kenttämies (eds.), *Acidification in Finland*, Springer-Verlag, Berlin, pp. 941–961.
- Vuorinen, P. J.; Vuorinen, M. 1991. Effects of long-term prespawning acid/aluminium exposure on whitefish (*Coregonus wartmanni*) reproduction and blood and plasma parameters. *Finish Fisheries Research*, 12: 125-133.
- Vuorinen, P. J.; Keinanen, M.; Seppo, P.; Tigerstedt, C. 2003. Reproduction, blood and plasma parameters and gill histology of vendace (*Coregonus albula* L.) in long-term exposure to acidity and aluminium. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 54: 255-276.
- World Health Organization (WHO). *Global Assessment of the State-of-the-Science of Endocrine Disruptors*; World Health Organization: Geneva, Switzerland, 2002; pp. 1–3.
- Yokel, R. A. 2000. The toxicology of aluminum in the brain: A review. *Neurotoxicology*, 21: 813-828.
- Zohar, Y.; Muñoz-Cueto, J.; Elizur, A.; Kah, O. 2010. Neuroendocrinology of reproduction in teleost fish. *General and Comparative Endocrinology*, 165: 438-455.

Capítulo IV

Discussão Geral e Conclusões

Discussão Geral e Conclusões

Para testar a hipótese de que o AI teria uma ação direta na produção de esteroides gonadais e gonadotropinas hipofisárias em fêmeas adultas de *O. niloticus*, foram realizados experimentos *in vitro*, a fim de se obter resultados de respostas destes órgãos isolados. Os resultados obtidos corroboraram nossa hipótese confirmando a atuação do AI como um DE para ambos os órgãos.

Nossos resultados mostraram que sobre os ovários o AI inibiu a resposta celular às gonadotropinas, comparação entre os grupos Ov e Ov+AI, e também que o AI não interferiu na resposta natural das células, comparação entre os grupos Ctr e AI, sugerindo que o bloqueio da resposta celular tenha ocorrido em níveis transcricionais ou de receptores hormonais levando a sua atuação como um DE. Estes dados contribuem para o avanço nos estudos da interação do AI em um sistema fisiológico e seu mecanismo de atuação.

Sobre a hipófise o AI (GnRH+AI e AI) diminuiu a expressão gênica dos cinco genes estudados β FSH, β LH, SL, EF1 α e β Ac, e os dados de microscopia eletrônica mostraram desestruturação celular nas hipófises que foram expostas ao AI, contudo não é possível avaliar cada um destes fatos como causa ou consequência dos prejuízos celulares observados, mas sim evidenciar sua toxicidade em nível celular. As análises de imunohistoquímica apontaram que o AI (GnRH+AI e AI) não interferiu sobre quantidade de grânulos de β LH e SL, mas o grupo AI indicou ter ~~diminuiu~~ quantidade de grânulos de β FSH, sugerindo que o AI afeta a dinâmica de síntese/liberação desta gonadotropina, considerando o período experimental.

Comparando nossos resultados com os experimentos *in vivo* de exposição aguda de *O. niloticus* ao AI, nos quais Narcizo (2009) observou diminuição da expressão gênica das gonadotropinas e Correia *et al.* (2010) a diminuição da concentração plasmática do 17 α OHP e não do E₂, sugere-se que o AI tenha *in vivo* atuado também sobre os dois órgãos estudados. No entanto, como o perfil biológico da fase de vitelogênese é mais longa (Levavi-Sivan *et al.*, 2010), é possível que o animal tenha reajustado seu *set point* para a continuação do processo reprodutivo, mas com prováveis prejuízos nos processos de ovulação e desova, pois os experimentos *in vivo* e *in vitro* demonstraram uma diminuição dos hormônios relacionados, LH e 17 α OHP.

Comparando-se os dados dos dois experimentos *in vitro* é possível sugerir que o Al seja mais tóxico sobre a hipófise do que sobre os ovários, pois a expressão gênica na presença do Al foi acentuadamente reduzida, já a ação do Al sobre os esteroides gonadais foi menos marcante; a concentração do E₂ liberado foi reduzida em duas vezes e meia e do 17 α OHP foi reduzida pela metade. Este fato pode estar relacionado à alta afinidade do Al ao sistema nervoso (Nayak, 2002) e adicionalmente, como observado nos experimentos *in vivo* de exposição aguda de *O. niloticus* ao Al, dos cinco tecidos analisados, encéfalo, brânquias, fígado, ovários e músculos, o encéfalo foi o órgão de maior acúmulo do Al (Narcizo, 2009).

Para dar continuidade aos estudos da atuação do Al no eixo endócrino reprodutivo, sugerimos investigações da expressão de receptores para GnRH (hormônio liberador de gonadotropinas) na hipófise (Hildahl *et al.*, 2011) e receptores gonadotrópicos nos folículos ovarianos (Thomas, 2000; Thomas *et al.*, 2006; Levavi-Sivan *et al.*, 2010) o que certamente contribuirá para o desenvolvimento de grandes áreas do conhecimento como a fisiologia e a ecotoxicologia, assim como contribuiu o presente estudo.

No contexto da ecotoxicologia, a tilápia apesar de ser uma espécie exótica é bem estabelecida em nossas bacias e apresenta características de resistência a situações adversas (Kubitza, 2000). Este fato pode significar que os prejuízos a ela descritos possam ser muito mais graves para espécies nativas mais sensíveis ao estresse fisiológico aqui evidenciado. Portanto, este trabalho também é uma importante ferramenta para a avaliação de risco ambiental, pois retrata prejuízos fisiológicos a uma determinada situação encontrada em ambiente natural (Fent, 2001; Cargouët *et al.*, 2007), e assim, contribuem também para ações conservacionistas, inclusive de políticas públicas que tenham efeitos diretos nas legislações ambientais, cumprindo o papel da ciência diante dos desafios do século XXI, a favor do desenvolvimento sustentável.

Referências bibliográficas

Cargouët, M.; Perdiz, D.; Levi, Y. 2007. Evaluation of the estrogenic potential of river and treated waters in the Paris area (France) using *in vivo* and *in vitro* assays *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 67: 149-156.

- Correia, T. G.; Narcizo, A. M.; Bianchini, A.; Moreira, R. G. 2010. Aluminum as an endocrine disruptor in female Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 151: 461-466.
- Fent, K. 2001. Fish cell lines as versatile tools in ecotoxicology: assessment of cytotoxicity, cytochrome P4501A induction potential and estrogenic activity of chemicals and environmental samples. *Toxicology in Vitro*, 15: 477-488.
- Hildahl, J.; Sandvik, G. K.; Edvardsen, R. B.; Norberg, B.; Haug, T. M.; Weltzien, F. 2011. Four gonadotropin releasing hormone receptor genes in Atlantic cod are differentially expressed in the brain and pituitary during puberty. *General and Comparative Endocrinology*, 173: 333-345.
- Kubitza, F. 2000. *Tilápia: Tecnologia e planejamento na produção comercial*. 1ª Edição. São Paulo: Degaspari, 285p.
- Levavi-Sivan, B.; Bogerd, J.; Mañanós, E. L.; Gómez, A.; Lareyre, J. J. 2010. Perspectives on fish gonadotropins and their receptors. *General and Comparative Endocrinology*, 165: 412-437.
- Narcizo, A. M. 2009. *Avaliação da exposição aguda ao alumínio e variações do pH na expressão de gonadotropinas em Oreochromis niloticus (Teleostei: Cichlidae)*. Dissertação de Mestrado. Departamento de Fisiologia, IB - USP.
- Nayak, P. 2002. Aluminum: Impacts and disease. *Environmental Research*, A 89: 101-115.
- Thomas, P. 2000. Chemical interference with genomic and nongenomic actions of steroids in fishes: role of receptor binding. *Marine Environmental Research*, 50: 127-134.
- Thomas, P.; Dressing, G.; Pang, Y.; Berg, H.; Tubbs, C.; Benninghoff, A.; Doughty, K. 2006. Progestin, estrogen and androgen G-protein coupled receptors in fish gonads. *Steroids*, 71: 310-316.