

AMANDA DE MORAES NARCIZO

Avaliação da exposição aguda ao alumínio e variações do
pH na expressão de gonadotropinas em *Oreochromis
niloticus* (Teleostei: Cichlidae)

**São Paulo
2009**

AMANDA DE MORAES NARCIZO

Avaliação da exposição aguda ao alumínio e variações do
pH na expressão de gonadotropinas em *Oreochromis
niloticus* (Teleostei: Cichlidae)

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

Orientadora: Profa. Dra. Renata Guimarães Moreira

**São Paulo
2009**

Ficha Catalográfica

Narcizo, Amanda de Moraes

Avaliação da exposição aguda ao alumínio e variações do pH na expressão de gonadotropinas em *Oreochromis niloticus* (Teleostei: Cichlidae)

82 p.

Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Fisiologia Geral.

1. Peixes 2. Ecotoxicologia 3. Alumínio 4. pH 5. Reprodução
6. Gonadotropinas

I. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências.
Departamento de Fisiologia Geral.

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr.(a).

Orientador(a)

Dedico este trabalho aos meus pais por tudo o que me ensinaram, por todo o amor que tenho e recebi deles durante suas vidas e pelo exemplo de vida que são para mim.

Aos meus irmãos Renata de Moraes Narcizo e Rafael de Moraes Narcizo por caminharmos juntos e a toda minha família que sempre torce por mim.

Agradecimentos

Agradeço, antes de tudo, a Deus por sua presença em minha vida, por minha saúde, pelas pessoas que estiveram e que estão a minha volta, e por me dar oportunidade, vontade e disponibilidade para a realização deste trabalho.

À minha orientadora Profa. Dra. Renata Guimarães Moreira por sua dedicação ao trabalho e à formação de seus orientandos, por sua disponibilidade para discussões, por sua praticidade em administrar tarefas, paciência em ensinar, pelo respeito que tem a diferentes qualidades que existe dentro de cada pessoa de seu laboratório e com isso motivar cada uma delas a fazer seu melhor dentro do grupo, pela confiança depositada em mim e pela amizade. Agradeço pelo seu apoio diuturno indispensável para a realização deste trabalho.

À Profa. Dra. Lucile Maria Floeter-Winter pelo espaço cedido em seu laboratório para a execução dos experimentos de biologia molecular, pelo apoio material e científico. Sou grata por sua disponibilidade e tempo dedicados às discussões de meu trabalho, pelo conhecimento partilhado, confiança e respeito. Admirável por seu profissionalismo, dedicação à ciência e à formação de pesquisadores.

Ao Prof. Dr. Adalto Bianchini por ter dedicado seu tempo para ajudar a resolver problemas metodológicos no experimento ecotoxicológico, por seu conhecimento e experiência que foram essenciais para a adequada realização deste trabalho, obrigada também por disponibilizar seu laboratório para realização das análises de quantificação de alumínio.

Ao pesquisador Mario Gustavo Mayer por todo o tempo e paciência despendidos ao meu lado, pela atenção e interesse por este trabalho e também com minha formação, aprendi a ser melhor no que sou pelas experiências trocadas. Agradeço por seu empenho em me ajudar a resolver problemas experimentais e pelas discussões e conselhos.

Pelo tempo determinado para o mestrado e pelos problemas enfrentados nesta pesquisa seria impossível concluí-la sem vocês.

Agradeço ao Prof. Dr. André Fernando de Oliveira e a Profa. Dra. Astrea Filomena de Souza Silva pelo apoio nas análises de água de compostos nitrogenados.

Ao Prof. Dr. Carlos Eduardo Winter, à Profa. Dra. Célia Regina da Silva Garcia e ao Prof. Dr. Carlos Frederico Martins Menck, por disponibilizarem equipamentos de seus laboratórios para a realização desta pesquisa.

Ao Prof. Dr. Anselmo Sigari Moriscot e ao Dr. Marcelo Augusto Christoffolette, por cederem espaço no início de meus experimentos em biologia molecular.

À Industria Brasileira do Peixe por ter cedidos gentilmente exemplares de *Oreochromis niloticus* para a execução deste trabalho.

Ao Departamento de Águas e Energia Elétrica (DAEE) por disponibilizar a Piscicultura de Ponte Nova para a realização dos ensaios com *Oreochromis niloticus*.

Aos funcionários da Piscicultura de Ponte Nova: Marcos Daniel Reno de Faria, Milton Nunes de Santana e Denésio Leite de Almeida pelo apoio logístico na manutenção dos animais.

Agradeço a todas as pessoas que contribuíram com minha formação, todos os professores e colegas de disciplinas que freqüentei, agradeço a comissão do curso de inverno do ano de 2008, pois para mim foi muito gratificante a experiência que tive em dar aula e estágio para alunos de graduação.

A todos do Laboratório da Profa. Dra. Lucile, Maíra Natali Nassar que me acompanhou no começo dos experimentos, Ricardo de Andrade Zampieri que facilita a vida de todos na rotina do laboratório, Emerson Augusto Castilho Martins, Marcos Gonzaga dos Santos, Rafael Lemos Beirigo, Rafaella Marino Lafraia, Ana Carolina Stocco de Lima (Carol), Maria Fernanda Laranjeira da Silva e Camila Wielewski Leme pela disponibilidade a que fosse necessário.

Agradeço às pessoas que fazem meu dia-dia melhor e que me acompanham no crescimento profissional e pessoal sendo assim, como a Juli disse em sua dissertação:

“Agradeço aos meus irmãozinhos do laboratório”, afinal crescemos juntos. São: Aline Dal’Olio Gomes (Alininha), Bruno Cavalheiro Araújo, Carlos Eduardo Garcia (Tiboja), Carlos Eduardo Tolussi (Kadu), Cristiele da Silva Ribeiro (Cris), Jandyr de Almeida Rodrigues Filho (Jajá), Juliane Suzuki Amaral (Juli), Larissa Suzuki Amaral (Lari), Paulo Henrique de Mello (Drusca), Renato Massaaki Honji (Honji), Tiago Gabriel Correia e Vanessa Ap. Rocha de Oliveira Vieira (Van). Sei que sabem o quanto são importantes para mim. Obrigada pela amizade, conversa, carinho e momentos de alegria.

A todos vocês agradeço também por toda ajuda em coletas, e aqui incluo minha orientadora e seu veículo, ao Tiago por estarmos juntos neste projeto e dividirmos momentos de estresse do trabalho em que nada dava certo, à Lari pelo capricho e cuidado do laboratório e também em experimentos como a análise de água.

Aos meus irmãos Renata de Moraes Narcizo e Rafael de Moraes Narcizo, às minhas tias Cibele Aparecida Bueno de Moraes, Maria Santana Narcizo e Aparecida Olívia Narcizo por me apoiarem em todos os momentos e sempre me incentivarem a seguir com meus sonhos.

A todos deste Departamento de Fisiologia pelas conversas e solicitude que têm.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa concedida.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro do projeto (Processo: 06/50920-5).

Ao coordenador do Programa de Pós-graduação e a PROAP pelo trabalho que vocês realizam e pela verba concedida.

Enfim, agradeço por tudo e a todos pelo que aprendi nesta etapa da minha vida e início de carreira.

Mais uma vez, muito obrigada!

RESUMO

NARCIZO, A. M. Avaliação da exposição aguda ao alumínio e variações do pH na expressão de gonadotropinas em *Oreochromis niloticus* (Teleostei: Cichlidae). 2009. 82 f. Dissertação (Mestrado). Departamento de Fisiologia, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

O alumínio e o pH ácido exercem efeitos tóxicos sobre a fauna íctica. O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos do alumínio e do alumínio em pH ácido na fisiologia reprodutiva de *Oreochromis niloticus*. Para a condução deste experimento, fêmeas desta espécie foram expostas a concentração de 0,5 mg de Al L⁻¹ em pH neutro (Al – N), 0,5 mg de Al L⁻¹ em pH ácido (Al - Ác), somente em pH neutro (CTR – N) e somente em pH ácido (CTR – Ac) por 96h. Após o período de exposição aguda, os animais foram sacrificados e tecidos como encéfalo, brânquias, fígado, gônadas e músculo, foram retirados para a determinação da concentração de alumínio por espectrofotometria de absorção atômica. A hipófise foi coletada e congelada para a quantificação da expressão da subunidade β dos genes das gonadotropinas, FSH (hormônio folículo estimulante) e LH (hormônio luteinizante) por qRT-PCR. Os resultados mostraram que animais expostos ao alumínio, tanto em pH ácido quanto neutro, acumularam mais alumínio no encéfalo e no músculo esquelético em relação aos grupos controles. Nas brânquias, apenas quando os animais são expostos ao alumínio em pH neutro, acúmulos diferenciados são encontrados e, adicionalmente, fêmeas expostas ao pH ácido, independente da concentração do alumínio na água, acumulam mais metal nos filamentos branquiais. Nos ovários, tanto a presença de maiores concentrações deste metal na água, quanto a acidez da mesma foram determinantes na incorporação do alumínio. Os dados de expressão gênica evidenciam que, animais submetidos ao alumínio em pH 5,5 apresentaram uma redução na expressão do gene do FSH, no entanto em pH neutro esta alteração na expressão deste gene não foi encontrada. Os animais expostos ao alumínio, tanto em pH ácido quanto neutro apresentaram diminuição na expressão de LH. A análise dos resultados de expressão do LH combinada com o perfil dos progestágenos plasmáticos previamente conhecidos para os mesmos animais, mostram que, em condições adversas de pH (ácido) a ação do alumínio como um disruptor endócrino foi traduzida em alterações na fisiologia gonadal, limitando a produção do 17αOHP (hidroxiprogesterona), importante hormônio na ovulação. Por outro lado, quando as condições de pH foram favoráveis (neutro), a diminuição da expressão de LH não levou ao desajuste na produção de 17αOHP, ou seja, os animais de alguma forma, compensaram esta disfunção.

Palavras-chave: 1. Peixes 2. Ecotoxicologia 3. Alumínio 4. pH 5. Reprodução 6. Gonadotropinas.

ABSTRACT

NARCIZO, A. M. Evaluation of acute exposure to aluminum and pH variations in the expression of gonadotropins in *Oreochromis niloticus* (Teleostei: Cichlidae). 2009. 82 f. Dissertação (Mestrado). Departamento de Fisiologia, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

Aluminum and acidic pH are known to be toxic to the ichthyofauna. The main goal of the present study was to evaluate the effects of aluminum and acidic pH in the reproductive physiology of *Oreochromis niloticus*. To conduct this experiment, females were exposed to aluminum at 0.5 mg of Al L⁻¹ in neutral pH (Al – N), 0.5 mg of Al L⁻¹ in acidic pH (Al - Ac), a control group in neutral pH (CTR – N) and acidic pH (CTR – Ac) for 96h. After the acute exposition period, the animals were killed and the following tissues, brain, gills, liver, gonads and muscle, were frozen for aluminum determination by atomic absorption spectrophotometer. The pituitary was collected and also frozen to quantify the gene expression of the β subunit of the gonadotropins FSH (follicle stimulating hormone) and LH (luteinizing hormone) using qRT-PCR. The results showed that animals exposed to aluminum, even in acidic or neutral pH, accumulated more aluminum in brain and white muscle comparing with their control groups. In the gills, only when the animals were exposed to aluminum in neutral pH, different patterns of accumulation were found and, additionally, females exposed to acidic pH, independent of the water aluminum concentration, accumulated more metal in the gills filament. In the ovaries even the presence of higher aluminum concentration in water and the acidic pH were essential in aluminum deposition. The gene expression data showed that, animals exposed to aluminum in pH 5.5 reduce FSH gene expression, however in neutral pH this alteration was not observed. Animals exposed to aluminum, even in acidic or neutral pH, reduced LH expression. The data analyses of LH gene expression combined with the plasma progestagens, previously known for the same animals, showed that, in adverse pH conditions (acidic), the aluminum role as an endocrine disruptor was translated in alterations in gonad physiology, reducing the production of 17 α OHP (hidroxy progesterone), an important hormone in ovulation. On the other hand, when the pH conditions were optimum (neutral), the reduced LH gene expression did not reflect in impairments in the 17 α OHP production, which means the animals, somehow, compensated this dysfunction.

Keywords: 1. Fish 2. Ecotoxicology 3. Aluminum 4. pH 5. Reproduction 6. Gonadotropins

LISTA DE ABREVIACOES

- AlK(SO₄)₂ - Sulfato de alumínio e potássio
- ANOVA - Análise de variância
- BLAST - *Basic Local Alignment Search Tool*
- cDNA - DNA complementar
- CsCl - Cloreto de Césio
- DNA - cido desoxirribonucléico
- DNase - Desoxirribonuclease
- DP - Desvio padrão
- EDTA - cido etileno-diamino-tetra-acético
- EF1A - Fator de alongao 1 α
- EPM - Erro padrão da média
- FSH - Hormônio folículo estimulante
- IAG/USP - Instituto de Astronomia, Geofísica e Ciências Atmosféricas da USP
- IGS - ndice gonadossomático
- IPTG - Isopropil- β -D-tiogalactosídeo
- LH - Hormônio luteinizante
- mRNA - RNA mensageiro
- NaCl - Cloreto de Sódio
- NaOH - Hidróxido de sódio
- NH₃ - Amônia
- NIST - *National Institute of Standards and Technology*
- NO₂⁻ - Nitrito
- PCR – Reao em cadeia da polimerase
- qRT-PCR - PCR quantitativo em tempo real
- RNA - cido ribonucléico
- RNase - Ribonuclease
- RT-PCR – Reao da transcriptase reversa seguida de PCR
- SNK - Student-Newmann-Keuls
- TB - *Terrific Brouth*
- TE - Tampão Tris-EDTA
- X-gal - 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactosideo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
2 OBJETIVOS.....	20
3 MATERIAIS E MÉTODOS	21
3.1 Modelo animal.....	21
3.2 Desenho experimental ecotoxicológico	21
3.2.1 Grupos experimentais	21
3.2.2 Preparo do meio reacional	221
3.2.3 Análise de água.....	23
3.2.4 Coleta do material biológico.....	24
3.3 Desenho experimental de análises moleculares	25
3.3.1 Ensaio de padronização experimental.....	25
3.3.2 Ensaio experimental	27
3.4 Quantificação de alumínio em tecidos	29
3.5 Análise estatística.....	29
4 RESULTADOS	31
4.1 Experimentos ecotoxicológicos	31
4.1.1 Grupos experimentais	31
4.1.2 Análise de água.....	31
4.2 Experimentos biomoleculares.....	32
4.2.1 Ensaio de padronização experimental.....	32
4.2.2 Ensaio experimental	33
4.3 Quantificação de alumínio em tecidos	34
5 DISCUSSÃO.....	36
5.1 Qualidade da água em experimentos ecotoxicológicos	36
5.2 Acúmulo de Al em tecidos animais	39
5.3 Expressão gênica de gonadotropinas	41
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	46
7 REFERÊNCIAS	61

FIGURAS.....	48
Figura 1. Barragem de Ponte Nova - Salesópolis - SP	48
Figura 2. Piscicultura da Barragem de Ponte Nova - Salesópolis - SP	48
Figura 3. Tratamento da água do reservatório da Barragem de Ponte Nova.....	48
Figura 4. Laboratório da Barragem de Ponte Nova - Local onde ocorreram os experimentos ecotoxicológicos.	49
Figura 5. Exemplar de <i>Oreochromis niloticus</i> utilizado no experimento.....	49
Figura 6. Coleta da hipófise de <i>Oreochromis niloticus</i> do experimento de exposição aguda ao alumínio em pH neutro (7,0) e em pH ácido (5,5).	49
Figura 7. Índice gonadossomático (IGS) de <i>Oreochromis niloticus</i> submetidos a exposição aguda ao alumínio em pH neutro (7,0) e pH ácido (5,5) e seus respectivos grupos controle.	50
Figura 8. Concentração de oxigênio dissolvido na água ao longo do experimento de exposição aguda de <i>Oreochromis niloticus</i> ao alumínio em pH neutro (7,0) e pH ácido (5,5) e seus respectivos grupos controle.	50
Figura 9. Temperatura da água ao longo do experimento de exposição aguda de <i>Oreochromis niloticus</i> ao alumínio em pH neutro (7,0) e pH ácido (5,5) e seus respectivos grupos controle. ...	50
Figura 10. Valores do pH da água do experimento de exposição aguda de <i>O. niloticus</i> ao longo do período experimental.	51
Figura 11. Concentração de nitrito na água ao longo do experimento de exposição aguda de <i>O. niloticus</i> ao alumínio em pH neutro (7,0) e pH ácido (5,5) e seus respectivos grupos controle. ...	52
Figura 12. Concentração de amônia na água ao longo do experimento de exposição aguda de <i>O. niloticus</i> ao alumínio em pH neutro (7,0) e pH ácido (5,5) e seus respectivos grupos controle. ...	52
Figura 13. Concentração de alumínio na água ao longo do experimento de exposição aguda de <i>Oreochromis niloticus</i> ao alumínio em pH neutro (7,0) e pH ácido (5,5).	53
Figura 14. Concentração de alumínio na água ao longo do experimento de exposição aguda de <i>Oreochromis niloticus</i> ao alumínio em pH neutro (7,0) e pH ácido (5,5).	53
Figura 15. Eletroforese do produto da PCR utilizando-se o gradiente de 12 temperaturas de associação dos oligonucleotídeos degenerados para FSH em <i>O. niloticus</i> , sendo aplicados no gel de agarose 2% do poço 2 ao 13 e do 14 ao 25 (em A e em B) respectivamente os produtos gerados da menor para a maior temperatura de associação.	54
Figura 16. Eletroforese da PCR utilizando-se um gradiente de 8 temperaturas de associação dos oligonucleotídeos degenerados para LH em <i>O. niloticus</i>	54
Figura 17. Sequências consenso de EF1A, FSH e LH de <i>Oreochromis niloticus</i>	55
Figura 18. Comparação da quantidade do número de cópias do mRNA de FSH no experimento de exposição aguda de <i>Oreochromis niloticus</i> ao alumínio em pH neutro (7,0) e pH ácido (5,5) e seus respectivos grupos controle.	55
Figura 19. Comparação da quantidade do número de cópias do mRNA de LH no experimento de exposição aguda de <i>Oreochromis niloticus</i> ao alumínio em pH neutro (7,0) e pH ácido (5,5) e seus respectivos grupos controle.	56
Figura 20. Comparação da quantidade do número de cópias do mRNA de LH normalizado pelo número de cópias do mRNA do EF1A no experimento de exposição aguda de <i>Oreochromis niloticus</i> ao alumínio em pH neutro (7,0) e pH ácido (5,5) e seus respectivos grupos controle.	56
Figura 21. Concentração de alumínio no encéfalo de <i>Oreochromis niloticus</i> submetidos a exposição aguda ao alumínio em pH neutro (7,0) e pH ácido (5,5) e seus respectivos grupos controle.....	57

Figura 22. Concentração de alumínio nas brânquias de *Oreochromis niloticus* submetidos a exposição aguda ao alumínio em pH neutro (7,0) e pH ácido (5,5) e seus respectivos grupos controle. 57

Figura 23. Concentração de alumínio nas gônadas de *Oreochromis niloticus* submetidos a exposição aguda ao alumínio em pH neutro (7,0) e pH ácido (5,5) e seus respectivos grupos controle..... 58

Figura 24. Concentração de alumínio no músculo de *Oreochromis niloticus* submetidos a exposição aguda ao alumínio em pH neutro (7,0) e pH ácido (5,5) e seus respectivos grupos controle..... 58

Figura 25. Concentração de alumínio no fígado de *Oreochromis niloticus* submetidos a exposição aguda ao alumínio em pH neutro (7,0) e pH ácido (5,5) e seus respectivos grupos controle..... 59

TABELAS 60

Tabela 1. Oligonucleotídeos desenhados para qRT-PCR dos genes de FSH, LH e EF1A em *Oreochromis niloticus*. 60

Tabela 2. Dados da pureza e concentração do RNA total extraído de cada *pool* de hipófises de *O. niloticus* submetidos a exposição aguda ao alumínio em pH neutro (7,0) e alumínio em pH ácido (5,5) e seus grupos controle. 60

ANEXOS 70

Anexo 1. Protocolos e procedimentos para a análise de água 70

Anexo 2. Protocolos e procedimentos para as análises biomoleculares 76

1 INTRODUÇÃO

A partir das últimas décadas do século XX até o presente momento, tem estado cada vez mais explícita a dependência do homem em relação aos recursos naturais e sua real necessidade de protegê-los e utilizá-los de maneira sustentável, sendo isto reconhecido mundialmente na Conferência das Nações Unidas para o Meio Ambiente e o Desenvolvimento no Rio de Janeiro em 1992 (LAWRENCE; ELLIOTT, 2003).

No Brasil, os maiores impactos das mudanças climáticas devem atingir todas as regiões e biomas de forma diferenciada. Os recursos naturais, como os recursos hídricos e as plantações agrícolas serão os primeiros a sofrer escassez decorrente dessas alterações (PIVA; FURTADO; BAITELO, 2006). Essas alterações incluem a fragmentação dos sistemas aquáticos, o que pode levar a uma drástica redução na diversidade biótica local, seja imediatamente, através da perda da área, ou em longo prazo, através dos efeitos do isolamento. Existe um consenso de que os ambientes aquáticos são os que mais precisam de proteção imediata, pois neles são identificadas ameaças à biodiversidade como superexploração, destruição de *habitats*, invasão de espécies exóticas e poluição, sendo esta última, um dos maiores desafios a serem enfrentados pela humanidade, pois os ecossistemas aquáticos são considerados receptores finais de toda forma de poluição e todos os organismos, terrestres ou aquáticos, são dependentes da água para sobrevivência (LAWRENCE; ELLIOTT, 2003).

Por este motivo, avaliar o real estado de um corpo d'água tem sido muito importante, e a maneira mais eficiente de realizar esta avaliação é observar a ocorrência de organismos aquáticos, bem como seus aspectos populacionais. Quando se observam efeitos danosos no ecossistema como um todo, se evidencia o resultado de muito tempo de exposição às alterações ambientais (como por exemplo, os poluentes) podendo estes prejuízos ser irreversíveis.

Outras observações como diminuição da taxa de crescimento e infecções, por exemplo, podem ser também utilizadas como avaliação do efeito da exposição a poluentes, no entanto, estas respostas fisiológicas são precedidas por respostas celulares, e quanto mais baixo for o nível de organização biológica na qual se possa detectar o efeito de um poluente, mais eficientes serão os trabalhos de minimização de impactos e/ou de controle preventivo e corretivo de seus efeitos, por isso é necessário que se

conheça a toxicidade de certos poluentes e sua influência sobre, por exemplo, a fauna íctica, pois a presença ou ausência de uma determinada espécie em um ambiente pode refletir as condições físico-químicas e biológicas em relação aos níveis tróficos do mesmo ambiente (ATTRILL; DEPLEDGE, 1997; LEVESQUE et al., 2002; LAWRENCE; ELLIOTT, 2003; MUCCI et al., 1987).

Assim, a ecotoxicologia relaciona as interações entre compostos químicos presentes no ambiente e a biocenose, focando efeitos adversos em diferentes níveis de organização biológica, desde moléculas, células, tecidos, órgãos, organismos, populações e ecossistemas. Para isto, esta área da ciência requer esforços multidisciplinares a cerca de processos físico-químicos, moleculares, toxicológicos, fisiológicos e ecológicos (FENT, 2001).

Sabe-se que muitas bacias hidrográficas próximas aos grandes centros urbanos são diariamente afetadas com dejetos domésticos e industriais que muitas vezes não recebem o tratamento adequado. A reunião destes compostos no ambiente pode resultar em interações toxicológicas com possíveis efeitos sinérgicos, antagônicos, de potenciação ou de adição (MOZETO; ZAGATTO, 2006).

Os compostos químicos encontrados nos ambientes aquáticos pertencem a inúmeras classes e se comportam de maneiras diferentes dependendo do tipo do ambiente (dulcícola, marinho, estuarino), e neste quadro estão inseridos os contaminantes químicos da classe dos metais. Os metais, devido as suas características bioacumulativas e não biodegradáveis são importantes poluentes aquáticos. Alguns metais são considerados essenciais ao metabolismo normal dos organismos como Co, Cu, Cr, Fe, Mn, Mo, Ni, Se e Zn enquanto outros não essenciais são considerados tóxicos como Ag, Al, Cd, Hg, Pb. Apesar desta distinção, todos eles em altas concentrações são classificados como tóxicos atuando sempre em combinação com moléculas orgânicas, geralmente proteínas (COSTA, 2007).

Vários trabalhos demonstraram prejuízos às populações ícticas em ambiente natural onde há grandes concentrações de alumínio (VUORINEN; VUORINEN, 1991; PEURANEN et al., 1993; RODUSHKIN, MOISEENKO, KUDRAVSJEVA, 1995; VUORINEN et al. 2002; VUORINEN et al. 2003; ALBERTI et al., 2005;). O alumínio juntamente com o pH ácido exerce fortes efeitos tóxicos sobre a fauna íctica, tendo reduzido e, até mesmo eliminado populações naturais de peixes em países escandinavos (EXLEY; PINNEGAR; TAYLOR, 1997; POLÉO et al., 1997).

A rede hidrográfica brasileira apresenta um grau de diversidade de grande riqueza e elevada complexidade, propiciando o desenvolvimento de múltiplas espécies vivas da flora e da fauna aquática. Esse conjunto de ecossistemas aquáticos comporta parte da rica biodiversidade brasileira, no entanto, nesta rede hidrográfica também são encontradas altas concentrações de alumínio, parte devido à natureza do solo e grande parte pelo descarte de vários compostos de origem industrial contendo alumínio.

O rio Tietê, por exemplo, apesar de nas regiões de cabeceira (Salesópolis-Mogi das Cruzes), suas condições serem mais propícias para a vida dos organismos aquáticos, já são encontrados alguns problemas com relação à qualidade da água que podem comprometer esse ambiente. Dentre as características físico-químicas da água, deve-se destacar o problema que vem ocorrendo com as altas concentrações de alumínio, que em determinadas épocas do ano atinge valores até 18 vezes maiores do que o tolerado pelas espécies de animais aquáticos (CONAMA, 2005). Além disso, dados descritos pela CETESB (2004, 2006) mostram que o pH da água desta região varia entre 5,3 a 6,8 aumentando assim, os efeitos tóxicos do alumínio (MOUNT; HOCKETT; GERN, 1988).

É geralmente aceito que as formas e complexos de alumínio de menor massa molecular, principalmente de natureza inorgânica, são os maiores responsáveis pela toxicidade na água porque são capazes de passar através de membranas biológicas (GENSEMER; PLAYLE, 1999) e tem sido sugerido que este processo está ligado à entrada de cátions na célula (BURY; WOOD, 1999), contudo poucos estudos foram conduzidos para investigar este processo de entrada.

De forma geral, a absorção de poluentes em peixes ocorre principalmente pelas brânquias e pelo alimento, podendo ser ainda através do muco e da água ingerida durante a alimentação. Estas substâncias, uma vez dentro do organismo, trazem graves danos fisiológicos como desequilíbrio iônico, desregulação da respiração, do sistema motor e dos sistemas sensoriais. Esses distúrbios podem impedir a reprodução e assim levar a espécie à extinção (HEATH, 1995).

Além dos sistemas citados acima, os poluentes afetam também o sistema endócrino, principalmente o eixo hipotálamo-hipófise-gônada, e podem ainda trazer prejuízos ao metabolismo hepático, o que prejudica mais uma vez a reprodução. Os compostos químicos responsáveis por esses desajustes são conhecidos na literatura como disruptores endócrinos (HEATH, 1995).

O controle da reprodução em peixes é modulado por fatores ambientais e endógenos. O sistema sensorial capta mudanças sazonais nos fatores ambientais (estímulos), que são transformados 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, sintetiza um neurohormônio conhecido como GnRH (hormônio liberador de gonadotropinas) que estimula a adenohipófise a sintetizar as gonadotropinas FSH (hormônio folículo estimulante) e LH (hormônio luteinizante) (ROCHA; ROCHA, 2006).

Em fêmeas adultas de peixes teleósteos, o FSH é transportado através do sangue até as gônadas (ovários), atuando sobre as células foliculares promovendo assim a síntese do hormônio esteróide 17β estradiol (E_2) (BILLARD, 1992). O E_2 é transportado até o fígado pela corrente sanguínea, e age no núcleo dos hepatócitos, que possui receptores específicos (ER) para este hormônio, ativando então, a transcrição de genes da vitelogenina (VTG), uma glicolipofosfoproteína (MOMMSEN; WALSH, 1988).

A VTG é transportada através do plasma sanguíneo até os oócitos juntamente com íons metálicos, como Ca^{2+} , Zn^{2+} e Mg^{2+} (MONTORZI; FALCHUK; VALLEE, 1994, 1995) e é incorporada por endocitose mediada por receptores de membrana também sob a ação do FSH (SHIBATA; YOSHIKUNI; NAGAHAMA, 1993). Com a elevação plasmática do E_2 , a hipófise estimulada pelo GnRH, passa a secretar LH que atua sobre as camadas foliculares oocitárias, estimulando a síntese do $17\alpha 20\beta$ dihidroxiprogesterona, o hormônio da maturação final e ovulação para a maioria dos teleósteos (NAGAHAMA, 1997).

Outro hormônio hipofisário que também tem sido relacionado a processos reprodutivos é a somatolactina (SL), que foi recentemente descoberta (RANDWEAVER et al., 1991) e até o momento foi encontrada somente em peixes. Planas et al. (1992) demonstraram em experimento *in vitro* com gônadas que a SL aumenta a produção de 11-cetotestosterona e testosterona em gônadas de machos e de estradiol em gônadas de fêmeas de maneira dose-dependente. No entanto, estes autores sugerem que o efeito esteroidogênico da SL comparado as gonadotropinas é mínimo.

Em resumo o controle da reprodução em peixes é feito pelo hipotálamo (mediado pelas variáveis ambientais e pineal), que produz o hormônio liberador de

gonadotropina (GnRH) e a dopamina. O GnRH estimula as células gonadotrópicas adenohipofisárias a sintetizar as gonadotropinas, FSH e LH. A dopamina por sua vez, inibe a síntese destas gonadotropinas. A ação das gonadotropinas é estimular, nas gônadas, a síntese dos esteróides (estrógenos, andrógenos e progestágenos) que participam da maturação e eliminação dos gametas (ROCHA; ROCHA, 2006). Em qualquer ponto deste eixo, os disruptores endócrinos podem atuar.

Karels et al. (1998) verificaram a diminuição na síntese dos esteróides gonadais, vitelogenina, gonadotropinas e aumento nos níveis de dopamina em *Perca fluviatilis* e *Rutilus rutilus* em ambiente natural quando coletado próximo a efluentes industriais. São relatados também o impedimento e/ou atraso no amadurecimento de espermatogônias em espermátocitos de *Oncorhynchus mykiss*, além da elevação e/ou diminuição dos níveis de esteróides fora do período reprodutivo e inibição da síntese de gonadotropinas, com simultâneo bloqueio sobre as gônadas de responderem à ação destas (COONEY, 1995).

Outros trabalhos sobre os efeitos dos disruptores endócrinos, como pesticidas, compostos estrogênicos e androgênicos, mostraram ações sobre as gonadotropinas, (LARKIN; KNOEBL; DENSLOW, 2003; URBATZKA et al., 2006), alteração da concentração de colesterol (HEATH, 1995) e esteróides gonadais (THIBAUT; PORTE, 2004), elevação dos níveis de cortisol e glicose (FOO; LAM, 1993; KENNEDY; FARRELL, 2006) evidenciando situações de estresse. Além disso, são conhecidas ainda modificações nas células ovarianas interferindo na posição da micrópila (HEATH, 1995) o que dificulta a fecundação. Muitos desses efeitos também são causados pelos metais como alumínio, cádmio, cobre, mercúrio e zinco e poluentes orgânicos como inseticidas e detergentes.

Vuorinen e Vuorinen (1991) observaram que em ambientes onde o alumínio estava em altas concentrações e com pH ácido, os machos de *Perca fluviatilis* não maturaram completamente, e as fêmeas não conseguiram, ou tiveram dificuldades para desovar, assim, a população dos peixes foi reduzida. Estes mesmos autores verificaram também a redução no número de ovos e alteração na deposição de vitelo nas gônadas. Outros trabalhos que evidenciam os impactos causados pelo alumínio na fisiologia reprodutiva constataram a inibição da síntese de vitelogenina em culturas de hepatócitos de *Oncorhynchus mykiss* (MUGIYA; TANAHASHI, 1998; HWANG; KAGAWA; MUGIYA, 2000).

Correia (2008) pesquisou o efeito do alumínio em peixes da região do Alto Tietê, *Astyanax fasciatus*, animal nativo da bacia do Alto Tietê que apresenta desova do tipo total e é um dos mais representativos desta região, e *Oreochromis niloticus*, animal exótico estabelecido neste ambiente, de desova do tipo parcelada e resistente a condições adversas, e verificou que o alumínio causou um aumento do estradiol no plasma de *A. fasciatus* e para *O. niloticus* houve uma diminuição na quantidade de 17α hidroxiprogesterona no plasma, podendo então o alumínio ser considerado um disruptor endócrino interferindo assim nos processos reprodutivos.

Visto toda a problemática dos poluentes no ambiente aquático e principalmente do alumínio sobre a fisiologia reprodutiva de peixes, tornou-se importante detectar o efeito do alumínio no eixo hipófise-gônadas de peixes do Alto Tietê. Os resultados obtidos por Correia (2008) em peixes desta bacia evidenciam o papel do alumínio como um disruptor endócrino, alterando em algum ponto o eixo hipófise-gônadas, haja vista as alterações na produção de esteróides gonadais, no entanto o ponto exato em que este metal atuou para conduzir às alterações na produção de esteróides não está ainda evidente.

O contexto apresentado e o pouco conhecimento sobre os efeitos do alumínio na fisiologia reprodutiva de teleósteos demonstram a necessidade de se investigar o real papel do alumínio no eixo hipófise-gônadas e para isso, considerou-se importante investigar a influência do alumínio em pH neutro e em pH ácido na expressão gênica das gonadotropinas em *Oreochromis niloticus*, espécie de teleósteo, que apesar de exótica, está estabelecida na bacia do Rio Tietê, local e fundamento desta abordagem experimental.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar efeitos do alumínio em pH neutro e em pH ácido na fisiologia reprodutiva de fêmeas de *Oreochromis niloticus*.

2.2 Objetivos específicos

- Verificar a influência do alumínio em pH neutro e em pH ácido na expressão gênica de gonadotropinas (FSH e LH).
- Verificar a deposição do alumínio em diferentes tecidos (encéfalo, brânquias, fígado, gônadas e músculo) nas duas condições propostas.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Modelo animal

Para a condução do presente experimento foram utilizadas fêmeas de tilápias, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) da variedade chitralada, cedidas gentilmente pela Indústria Brasileira do Peixe e cultivadas na Piscicultura da Barragem de Ponte Nova em Salesópolis – SP (Figuras 1 e 2), local onde foi conduzido o bioensaio, no mês de novembro de 2007.

A escolha desta espécie ocorreu devido a sua disponibilidade, característica de boa resistência a condições adversas, e também por apresentar desova do tipo parcelada. Esta última é caracterizada pelo tipo do desenvolvimento oocitário chamado assincrônico, pois não se evidenciam períodos de reprodução definidos e a liberação dos oócitos ocorre na medida em que estes atingem a maturação (VAZZOLER, 1996), no caso desta espécie, praticamente ao longo de todo ano, com exceção dos meses com temperaturas mais baixas.

Estas características favoreceram a condução deste experimento ecotoxicológico, pois, o alumínio e o pH ácido são fatores estressantes, e o tipo de desova apresentado por esta espécie permite maior flexibilidade experimental por seu longo período reprodutivo.

3.2 Desenho experimental ecotoxicológico

3.2.1 Grupos experimentais

Os peixes coletados com rede de arrasto no tanque de cultivo foram levados para o laboratório e mantidos em jejum em tanques menores (3,6 m²), de alvenaria, por 24 horas. Após este período 48 fêmeas foram selecionadas quanto ao tamanho (massa corpórea média de 86,14 g ± 5,72 g) e foram aleatoriamente distribuídas em 8 caixas de 145 litros contendo 130 litros de água (Figura 4). Para formar 4 grupos experimentais em duplicata, 6 tilápias foram mantidas em cada caixa. Por razões estruturais foram

realizados os experimentos dos grupos controle 120 horas antes dos grupos com alumínio.

Controles:

- Grupo CTR-N: Controle em pH neutro ($7,0 \pm 0,2$).
- Grupo CTR-Ac: Controle em pH ácido ($5,5 \pm 0,2$).

Exposição ao poluente:

- Grupo Al-N: Alumínio em pH neutro ($7,0 \pm 0,2$).
- Grupo Al-Ac: Alumínio em pH ácido ($5,5 \pm 0,2$).

Como 96 horas é considerado um período relativamente curto, as tilápias foram mantidas em jejum durante todo o período experimental, pois com o estresse, os animais tendem a não se alimentar e o excesso de matéria orgânica na água (ração) alteraria a concentração de alumínio dissolvido.

3.2.2 Preparo do meio reacional

A água utilizada neste experimento foi proveniente do reservatório da Barragem de Ponte Nova, sendo a mesma fonte de água que abastece os tanques de criação onde os animais viviam. Como esta água vem do Rio Tietê, sem tratamento prévio, foi necessário que a mesma passasse pelos processos de filtração e decantação para que as variáveis experimentais pudessem ser adequadamente controladas (Figura 3). Assim, foram utilizados filtros de carvão ativado para reter partículas sólidas, reduzir odores, matéria orgânica e contaminantes químicos, modelos: IMPAC – CEP 10 e Aqualimp FICZ-10.

Para o processo de decantação foi adicionada a esta água filtrada (145 litros por caixa, sua capacidade máxima) 17 ml de uma solução estoque de sulfato de alumínio e potássio ($AlK(SO_4)_2$), sendo esta a mesma solução utilizada para se manter as condições toxicológicas propostas.

Para o preparo desta solução estoque de alumínio 90g de $AlK(SO_4)_2$ foram secos em estufa a $50^\circ C$ durante 12 horas, em seguida foram pesados 76,074g deste sal, adicionados 1,5 ml de HNO_3 65% Suprapur (Merck) e água MilliQ para se fazer 1 litro

de solução (NIST, EUA). Assim, a concentração do metal Al nesta solução é de 4,333g por litro.

Após 12 horas de decantação 130 litros desta água foram bombeados cuidadosamente para outra caixa onde foi realizado o experimento, sendo adicionado mais 15 ml da solução estoque de $AlK(SO_4)_2$ somente aos grupos de exposição ao alumínio. O volume de 15 ml da solução estoque de Al para os 130 litros de água da condição do bioensaio foi determinado tomando-se por base a concentração somente do elemento Al, sendo assim, nestes 15 ml de solução foram obtidos 0,5 mg de Al por litro de água.

Estes procedimentos para o tratamento da água foram realizados diariamente para caixas estoque, pois todas as caixas experimentais tiveram 90% de sua água trocada a cada 24 horas. Este método permite melhor qualidade da água e garante a manutenção da concentração de Al à qual os animais foram expostos. Assim, este ensaio de toxicidade é caracterizado como semi-estático pela troca parcial da água e agudo por ser 96 horas o período de exposição (ZAGATTO, 2006).

Cada caixa recebeu aeração constante e o oxigênio dissolvido na água foi monitorado diariamente com o uso do oxímetro YSI, mod. 55. A temperatura mínima de 19 °C foi mantida com o uso de termostatos (ViaAqua) e o pH, aferido duas vezes ao dia, foi monitorado utilizando-se o pHmetro portátil, Gehaka. A correção do pH foi feita com a adição de hidróxido de sódio (NaOH) 1,0 M e/ou com a adição de ácido clorídrico fumegante (HCl) conforme o tratamento experimental. O fotoperíodo deste experimento foi o fotoperíodo natural de 12,3 : 11,7 (C:E) (IAG/USP).

Os demais parâmetros da qualidade da água como compostos nitrogenados (nitrito e amônia) e a concentração de alumínio foram analisados antes e depois de cada troca de água.

3.2.3 Análise de água

Durante o monitoramento experimental, alíquotas de água foram coletadas de cada caixa antes e após a troca de água, como dito anteriormente. As amostras coletadas para a análise de alumínio foram acidificadas a 0,1% de HNO_3 e conduzidas ao laboratório de análises ambientais: Rede Brasileira de Laboratórios de Ensaio acreditado

pela Cgcre/Inmetro de acordo com a NBR ISO/IEC 17025 sob o número CRL 0167, metodologia básica utilizada está descrita no "Standard Methods" 21ª edição.

As análises de nitrito e amônia foram realizadas com o apoio do Laboratório de Pesquisa em Química Analítica e Físico Química (LAPEQ) do Núcleo de Ciências Ambientais da Universidade de Mogi das Cruzes (UMC), utilizando-se métodos colorimétricos descritos no mesmo manual "Standard Methods" 18ª edição. Detalhes dos procedimentos estão descritos em anexo.

3.2.4 Coleta do material biológico

Após o período de exposição experimental as tilápias foram retiradas das caixas experimentais e foram dessensibilizadas com o abaixamento da temperatura com gelo em baldes de 20 litros. Suas medidas morfométricas e ponderais foram registradas (Figura 5), e em seguida os animais foram mortos por secção da medula espinhal na altura do opérculo, método proposto por Schreck e Moyle (1990).

Logo após a secção da medula, os peixes foram seccionados ventralmente para a retirada de suas gônadas, que foram analisadas quanto ao seu aspecto macroscópico (tamanho, cor, vascularização, estágio de maturação) e pesadas em balança analítica para a determinação do índice gonadossomático (IGS), que expressa a porcentagem das gônadas em relação à massa corpórea. Estas informações são úteis na determinação do estado funcional dos ovários (LIMA et al., 1991).

Para a coleta da hipófise, os animais foram decapitados na altura do opérculo, o encéfalo foi exposto e a hipófise foi retirada (Figura 6), congelada em nitrogênio líquido e mantida a -80°C para preservar a fidelidade dos resultados na análise de expressão gênica das gonadotropinas, sempre tomando o cuidado com o manuseio e prioridade em coletar e armazenar esta glândula.

Tecidos como músculo, ovários, fígado, brânquias e encéfalo também foram retirados e congelados em nitrogênio líquido para a determinação da concentração de alumínio.

3.3 Desenho experimental de análises moleculares

3.3.1 Ensaios de padronização experimental

A princípio, foi realizada a extração do RNA total, utilizando-se o reagente Trizol Reagent (Invitrogen) conforme o método desenvolvido por Chomczynski e Sacchi (1987), de hipófises de tilápias não expostas às condições do bioensaio a fim de se padronizar a melhor forma de analisar os grupos experimentais. Foi levado em consideração o rendimento da extração de RNA de uma hipófise, e do agrupamento de duas, e três hipófises. Assim, foi determinado que, para os animais do ensaio ecotoxicológico, as extrações do RNA total seriam realizadas a partir do agrupamento de 3 hipófises dentro do mesmo grupo experimental.

Ainda com o RNA total de hipófises deste grupo não experimental foram realizados testes para a reação de transcrição reversa utilizando-se oligo dT (Promega) e *Random primer* (pd(N)₆ - Invitrogen). Controles negativos foram realizados submetendo as mesmas amostras às mesmas condições sem a enzima de transcrição reversa.

Em seguida, a partir do produto de cada reação de transcrição reversa (DNA complementar – cDNA) foi conduzida uma reação de amplificação com iniciadores degenerados descritos por Parhar et al. (2003) (as sequências destes oligos também estão descritas em Anexos), da subunidade β das glicoproteínas FSH e LH, em diferentes temperaturas de associação dos oligonucleotídeos (52.0; 52.2; 52.7; 53.6; 54.7; 56.1; 57.7; 58.8; 60.1; 61.2; 62.0; 62.4°C) a fim de se verificar a melhor condição experimental para a obtenção do produto da PCR para β FSH e β LH.

Para o fator de alongação 1 α (EF1A), gene descrito como normalizador ideal para o tecido encefálico (OLSVIK et al., 2005), os oligonucleotídeos utilizados foram construídos para *O. niloticus* sem bases nitrogenadas degeneradas e na mesma região determinada por Olsvik et al. (2005), baseando-se na sequência disponível para esta espécie no GenBank (EF1A: n. de acesso AB075952).

Após este processo, os fragmentos gerados pela PCR, tendo o tamanho de pares de bases nitrogenadas equivalentes ao esperado, segundo os mesmos autores acima citados, foram purificados em gel de agarose (2% e 4% respectivamente para FSH/LH e EF1A), extraídos do gel utilizando-se o Kit Zymoclean – gel DNA Recovery Kit (Zymo

Research) e novamente submetidos à eletroforese em gel de agarose para quantificação em comparação com o marcador λ Hind III.

Em seguida, estes fragmentos foram ligados ao vetor plasmidial pGEM (pGEM-T Easy Vector Systems - Promega) e então, foi realizado o processo de transformação bacteriana, utilizando-se *Escherichia coli* competentes. Estas bactérias foram crescidas a 37°C por 24h em meio SOB sólido com ampicilina, isopropil- β -D-tiogalactosídeo (IPTG) e 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactosídeo (X-gal).

Das bactérias transformadas, foram selecionadas 8 colônias que continham o plasmídeo ligado ao fragmento correspondente ao FSH, 8 colônias que continham o plasmídeo ligado ao fragmento correspondente ao LH e 8 colônias que continham o plasmídeo ligado ao fragmento correspondente ao EF1A.

Cada um destes clones foi crescido em meio líquido SOB com ampicilina e então foi realizada a extração do DNA plasmidial (mini-prep) por lise alcalina com SDS (SAMBROOK; RUSSELL, 2001).

O DNA plasmidial extraído de cada clone foi diluído em 50 μ l de TE (tampão Tris-EDTA) e 2 μ l desta solução foram submetidos a reação de digestão plasmidial com a enzima NOT (Fermentas Life Science) de acordo com a instrução do fornecedor, a fim de se verificar a presença do vetor e o tamanho do fragmento inserido. Esta análise foi realizada por eletroforese comparando-se o DNA plasmidial digerido e não digerido.

Dos clones contendo o fragmento de interesse 4 foram submetidos à reação de sequência utilizando-se o tampão Save Money (200 mM Tris-HCl pH 9,0 e 5 mM MgCl₂), o Big Dye V3.0 (Applied Biosystem), *primer* T7 ou SP6 (3.2 μ M, Invitrogen), sendo os dois oligos utilizados para todos os clones em reações distintas, e água. A reação foi submetida ao termociclador nas seguintes condições: 96°C por 90 segundos, seguidos de 49 ciclos de 96°C por 20 segundos, 55°C por 20 segundos e 60°C por 4 minutos.

Após este processo, o DNA marcado foi precipitado com uma solução de etanol, NaOAc 3 M pH 5,2 e glicogênio, terminada a precipitação as amostras foram secas a 96°C por 2 minutos em termociclador. Estas amostras foram, então, submetidas a um sequenciador automático ABI 3100 (Applied Biosystem), no Instituto de Química da Universidade de São Paulo.

Os cromatogramas resultantes foram analisados com o auxílio do programa Bioedit Sequence Alignment Editor, e os clones de mesma natureza foram tratados eliminando-se o vetor e os oligos, então as sequências foram alinhadas par a par (sequência 5' - 3' e seu reverso complemento), e uma a uma analisada no BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) comparando com as sequências já existentes no banco de dados do GenBank.

Determinada a sequência de FSH e LH, foram desenhados iniciadores internos a sequência gerada, e específicos para a realização dos experimentos de PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR). Para isto, foi utilizado o programa oligocalc (www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html) e o programa Invitrogen – Perfect Primer Design with Invitrogen's OligoPerfect™ Designer (<http://tools.invitrogen.com/content.cfm?pageid=9716>) levando em consideração os seguintes fatores: o tamanho do fragmento, que juntamente com os *primers*, deve ter aproximadamente 100pb; os *primers forward* e *reverse* devem apresentar temperatura de desnaturação (*melting temperature-Tm*) muito próximas, isto é, devem ser próximas a temperatura na qual 50% dos oligonucleotídeos e seu complemento perfeito estão associados, esta característica tem relação com o conteúdo de bases C e G; é ideal que a última base da região 3' seja C ou G por apresentarem três ligações de hidrogênio com sua base complementar tornando a associação mais estável; e devem ser checados quanto a existência de complementaridade entre eles e neles mesmos.

Para o normalizador EF1A os oligonucleotídeos utilizados para a determinação da sequência são exatamente os mesmos que foram utilizados no experimento de qRT-PCR. A sequência dos oligonucleotídeos utilizados no qRT-PCR estão apresentados na tabela 1.

3.3.2 Ensaio experimentais

Padronizados todos os procedimentos para a análise experimental, o RNA total das hipófises foi extraído utilizando-se o reagente Trizol Reagent (Invitrogen) conforme o método desenvolvido por Chomczynski e Sacchi (1987), sua quantificação foi realizada em espectrofotômetro a 260 nm e a análise qualitativa, pela verificação da pureza (relação DO a 260 nm/DO a 280 nm) (SAMBROOK; RUSSELL, 2001).

Em seguida, foi realizado um tratamento com DNase I RNase *free* (Fermentas Life Science) por 30 minutos a 37°C, de acordo com as instruções do fabricante, e então as amostras foram submetidas a um processo de re-extração com Trizol LS Reagent (Invitrogen) e 0,1 µg de glicogênio RNase *free* para 1,0 µl de reação segundo as instruções do fabricante Fermentas Life Science, a fim de se obter RNA total com maior pureza, novamente foram quantificados e avaliados qualitativamente em espectrofotômetro.

Após a quantificação as amostras foram submetidas a uma reação de transcrição reversa (RT-PCR), esta reação foi realizada a partir de 500ng de RNA utilizando-se oligo dT e a enzima M-MLV (Promega) de acordo com as instruções do fabricante, e foi realizado também o controle negativo de cada reação com a ausência da enzima de transcrição reversa. A partir de 2,0 µl da reação de transcrição reversa positiva e negativa de cada amostra foi realizada a qRT-PCR utilizando-se o Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) e os oligos desenhados para cada gene FSH e LH sempre em reações distintas.

Para o EF1A ser considerado normalizador para os genes FSH e LH as condições experimentais, como reagentes e momento da ciclagem no termo-bloco, devem ser as mesmas. Neste trabalho o EF1A foi utilizado como normalizador para o LH, pois, havia a possibilidade da normalização com EF1A não ser necessária, por se tratar de quantificação absoluta, número absoluto de cópias de mRNA maduro, e não relativa. No entanto, devido à natureza dos dados dentro do mesmo grupo experimental para cada gene, esta normalização foi necessária.

Para a quantificação absoluta dos genes em estudo foi realizada uma curva padrão com 5 pontos correspondentes ao número de cópias de 10^4 a 10^8 para FSH, LH e EF1A (CASTILHO et al., 2008) utilizando este último como normalizador segundo Olsvik et al. (2005).

Para a construção da curva padrão um dos 4 plasmídeos que tiveram a sequência do inserto determinada para FSH, LH e EF1A, foram utilizados para transformação bacteriana novamente, estas bactérias foram crescidas a 37°C por 24h em meio sólido SOB com ampicilina, IPTG e X-gal. A colônia que recebeu o plasmídeo com o inserto foi coletada e crescida em meio líquido *Terrific Browth* (TB) com ampicilina e então foi realizada a extração do DNA plasmidial (maxi-prep) por lise alcalina com SDS (SAMBROOK; RUSSELL, 2001).

Após a extração, este DNA foi submetido a uma purificação e separação por gradiente de densidade com cloreto de Césio (CsCl) e brometo de etídio em ultracentrífuga, então o DNA plasmidial foi coletado com uma seringa e tratado com butanol saturado com cloreto de Sódio (NaCl) para a retirada do brometo de etídio, em seguida este DNA foi submetido a diálise em TE para a retirada do CsCl por difusão (SAMBROOK; RUSSELL, 2001).

Ao final deste processo, o DNA foi quantificado e 10 µg de plasmídeo contendo o inserto de cada gene foi digerido com a enzima ScaI por 16h de acordo com as instruções do fabricante (Fermentas Life Science) e a eficiência da digestão foi checada por eletroforese comparando-se DNA plasmidial digerido e não digerido juntamente com o marcador λ Hind III.

Sendo conhecido o tamanho do plasmídeo com o inserto pôde-se calcular em massa o correspondente a uma cópia do gene de interesse sendo assim construída a curva padrão de cada gene a partir de 10^4 a 10^8 cópias iniciais. Em anexo estão os protocolos e procedimentos do que foi acima descrito.

3.4 Quantificação de alumínio em tecidos

As amostras de tecidos como músculo, ovários, fígado, brânquias e encéfalo foram secas em estufa (50°C), digeridas em 1 ml de ácido nítrico Suprapur (Merck) e diluídas até completar 1,5 ml com água MilliQ. As leituras foram feitas com espectrofotômetro de absorção atômica (GBC - Avanta Plus, EUA), usando curva padrão montada com soluções padrões preparadas a partir de solução de calibração CELM (São Paulo, SP) que possui rastreamento com o padrão do NIST (EUA).

3.5 Análise estatística

Os dados dos parâmetros de qualidade de água foram expressos em média \pm desvio padrão (DP) das duplicatas de cada grupo experimental e, os dados do IGS, da concentração de alumínio nos tecidos e da quantificação em número de cópias do

mRNA para cada gene foram expressos em média \pm erro padrão da média (EPM) de cada grupo experimental.

As análises estatísticas foram realizadas, aplicando-se os testes de normalidade e homogeneidade de variância e cumprindo os requerimentos de uma análise paramétrica, os resultados foram comparados através do teste de Análise de Variância de uma via (one way ANOVA) seguido do teste de Student-Newmann-Keuls (SNK), utilizando o programa Jandel Sigma Stat (2.0). Para os dados que exigiram uma análise não paramétrica, os testes Kruskal-Wallis, Dunn's ou Holm Sidak foram aplicados utilizando-se o mesmo programa (ZAR, 1984).

4 RESULTADOS

4.1 Experimentos ecotoxicológicos

Em todos os parâmetros analisados, as duplicatas cumpriram os requerimentos para serem consideradas um único grupo. Entre os grupos experimentais as análises estatísticas foram realizadas comparando-os da seguinte forma: CTR-N e Al-N; CTR-Ac e Al-Ac; CTR-N e CTR-Ac; Al-N e Al-Ac.

4.1.1 Grupos experimentais

Em todos os grupos experimentais a sobrevivência dos exemplares de *O. niloticus* foi de 100%. O IGS entre os grupos experimentais não apresentou diferença estatística significativa ($P= 0,762$) (Figura 7), demonstrando assim homogeneidade no estágio do desenvolvimento gonadal dos espécimes selecionados para este experimento.

4.1.2 Análise de água

A concentração média de oxigênio dissolvido (OD) entre todos os grupos experimentais foi de $7,09 \pm 0,13$ mg/L sendo esta considerada ótima condição (Figura 8).

A temperatura média para os bioensaios foi próxima para os dois grupos, $20,8$ °C para os grupos com alumínio e $22,3$ °C para os grupos controle (Figura 9). Mesmo com a utilização de termostatos foi difícil manter constante a temperatura da água, pois fatores externos, como umidade e chuvas, influenciam neste parâmetro e, além disso, os grupos controle e alumínio foram realizados com intervalo de 120 horas.

Dois valores de pH foram selecionados para compor os grupos experimentais: pH neutro, $7,0 \pm 0,2$ e pH ácido, $5,5 \pm 0,2$. Para os grupos de pH ácido houve uma forte tendência do pH atingir valores próximos a 6, tendo isto ocorrido provavelmente devido a substâncias presentes na água que foram excretadas pelos animais (Figura 10).

Os compostos nitrogenados como NO_2^- (nitrito) (Figura 11) e NH_3 (amônia) (Figura 12) foram quantificados e as concentrações se mantiveram por volta de 0,01 mg/L e 0,03 mg/L respectivamente para nitrito e amônia em todos os tratamentos. Estas concentrações são consideradas não tóxicas para a vida aquática.

A concentração média de alumínio para o grupo com alumínio em pH neutro (Al-N) foi de 0,6 mg/L, valor este com 0,1 mg/L acima da concentração pretendida (Figura 13). Para o grupo com alumínio em pH ácido (Al-Ac) a concentração foi de 0,5 mg/L (Figura 14).

4.2 Experimentos biomoleculares

4.2.1 Ensaio de padronização experimental

Como não se sabe a posição do *primer* degenerado em relação ao gene, tornou-se interessante utilizar duas estratégias distintas para a reação de transcrição reversa, para produzir cDNA a partir de oligo dT ou a partir de iniciador aleatório, assegurando com este último que todo o transcrito seria coberto. Seguindo com estes ensaios de padronização, para cada cDNA gerado foi realizada uma PCR com um gradiente de 12 temperatura de associação dos oligos degenerados para FSH e em seguida foi feita a eletroforese destes produtos (Figura 15).

O resultado mostrou que os *primers* de FSH possuem uma melhor eficácia com os cDNA oriundos da reação com oligo dT. Com base neste resultado, a PCR com os *primers* degenerados para LH foi realizada com cDNA gerados também com oligo dT, utilizando-se somente as oito temperaturas de menor exigência de especificidade de associação dos *primers*, no entanto mantendo a especificidade do produto gerado (Figura 16).

Como foi possível observar, comparando-se os fragmentos gerados pela PCR com o marcador 100pb, verifica-se um resultado positivo em relação ao tamanho esperado de acordo com Parhar et al. (2003), de aproximadamente 270 pb, tanto para FSH como para LH. Para a PCR com os oligos para EF1A foi utilizada a ciclagem sugerida por Olsvik et al. (2005) e o fragmento gerado foi específico e de tamanho equivalente ao esperado.

Sendo assim, a próxima etapa foi a de certificar se estes fragmentos eram mesmo correspondentes a FSH, LH e EF1A. Para isso, os fragmentos foram clonados, sequenciados e as sequências obtidas foram determinadas como de FSH, LH e EF1A comparando-as com as sequências disponíveis no GenBank. Este procedimento foi realizado a fim de se verificar possíveis variações intraespecíficas para que, os oligos a serem desenhados e utilizados nos experimentos qRT-PCR para FSH e LH fossem realmente específicos para a variedade de tilápia utilizada. As sequências correspondentes de cada gene, iniciadas por T7 e SP6, foram alinhadas a fim de se obter um consenso (Figura 17). As sequências dos três genes apresentaram 100% de identidade com as respectivas sequências já descritas para *Oreochromis niloticus* (β FSH: n. de acesso AY294015, β LH: n. de acesso: AY294016 e EF1A: n. de acesso AB075952).

A partir da sequência consenso, foram desenhados os oligonucleotídeos para FSH e LH para a reação da qRT-PCR. Neste desenho, foi escolhida a posição do *primer* para que apresentasse T_m próximo ao T_m para o *primer* para EF1A, além de permitir gerar um produto de PCR com tamanho próximo a 100 pb, tamanho esse ideal para as reações de qRT-PCR. As condições de ciclagem de EF1A são as mesmas da melhor condição padronizada para os oligos de FSH e LH para a PCR em tempo real.

Cada produto foi então clonado, gerando o material para a execução da curva padrão do número de cópias de moléculas, a ser utilizada em cada qRT-PCR.

4.2.2 Ensaios experimentais

Na tabela 2 estão apresentados os valores da quantificação do RNA para cada *pool* de hipófises e também a relação 260/280 nm que traduz a pureza do RNA extraído sendo que este valor deve estar sempre próximo a 2.0 (SAMBROOK; RUSSELL, 2001).

A partir deste RNA foi realizada a reação de transcrição reversa e em seguida a partir de 1/10 desta reação foram realizados os ensaios de qRT-PCR comparando-se as amostras a curva padrão determinada no mesmo ensaio para cada gene.

As figuras 18 e 19 mostram respectivamente as quantificações do número de cópias absoluto para os genes de FSH e LH, sendo que para FSH foi encontrada

diferença estatística somente entre os grupos CTR-Ac e Al-Ac com $P=0,035$ existindo maior número de cópias o grupo CTR-Ac, e para o gene LH houve diferença estatística significativa entre os grupos da seguinte forma: CTR-N > Al-N ($P=0,004$); CTR-Ac > Al-Ac $P<0,001$; e Al-Ac > Al-N ($P=0,001$). O R^2 da curva padrão para o experimento de FSH foi de 0,998671 o que permite a segura interpolação dos dados das amostras e o dado da eficiência desta reação esteve em 83,3%. Para o experimento da quantificação do LH, o R^2 da curva padrão foi de 0,994317 e a eficiência desta reação foi de 91,7% sendo considerada boa essas condições.

Estes experimentos foram realizados em triplicatas por duas vezes e apesar do resultado da análise entre os grupos nos dois experimentos terem apresentado a mesma tendência, foi encontrada variações nos dados entre os dois experimentos o que não permitiu a união dos dados. Por isso, foi realizado novo experimento de qRT-PCR utilizando-se EF1A como normalizador para o gene LH, pois neste alvo foi encontrada alteração nos níveis de progestágenos no plasma (Correia, 2008) dos mesmos espécimes de *O. niloticus* utilizados neste experimento.

Assim, a figura 20 apresenta os valores médios do número de cópias do mRNA de LH após a normalização com o EF1A para cada grupo experimental, tendo sido encontrada diferença estatística entre os grupos, da seguinte forma: CTR-N possui maior número de cópias que Al-N com $P<0,001$; CTR-Ac tem maior número de cópias que Al-Ac com $P=0,032$; o grupo Al-Ac tem maior número de cópias que Al-N com $P=0,002$. O R^2 da curva padrão do EF1A foi de 0,999471 e a eficiência da reação foi de 98,84% e para o LH neste mesmo experimento o R^2 da curva padrão foi de 0,994017 e a eficiência foi de 73%.

Assim, a consistência estatística deverá ser buscada repetindo-se o experimento normalizado para atingir o n necessário para assegurar a significância, embora o resultado não normalizado indique a excelência das condições experimentais.

4.3 Quantificação de alumínio em tecidos

Na análise estatística realizada para o tecido encefálico (Figura 21), pode-se afirmar que foi acumulado mais alumínio nos grupos expostos ao alumínio, tanto em pH neutro ($P<0,001$) quanto ácido ($P<0,001$).

No tecido branquial (Figura 22) houve maior acúmulo de alumínio no grupo Al-N em relação ao grupo CTR-N ($P=0,002$) e no grupo CTR-Ac em relação ao grupo CTR-N ($P<0,001$).

Nas gônadas (Figura 23) pode-se afirmar que o grupo CTR-N tem mais alumínio acumulado que Al-N ($P<0,001$); o grupo Al-Ac tem mais alumínio acumulado que seu controle (CTR-Ac) ($P=0,002$); o grupo Al-Ac acumulou mais alumínio que o grupo Al-N ($P<0,001$).

No tecido muscular (Figura 24) foi encontrada maior concentração de alumínio nos grupos expostos a este metal em pH neutro ($P=0,002$) e ácido ($P<0,001$).

O fígado não apresentou incorporação de alumínio de forma diferenciada em relação aos grupos experimentais (Figura 25).

5 DISCUSSÃO

5.1 Qualidade da água em experimentos ecotoxicológicos

Os estudos ecotoxicológicos têm como foco, como o próprio nome diz, os aspectos e efeitos ecológicos e toxicológicos. Comumente estes estudos se baseiam em fatos observados anteriormente no campo, no entanto, muitas vezes é difícil estabelecer uma correlação entre o efeito e o resíduo químico causador, no ambiente natural. Normalmente, as ferramentas utilizadas nos estudos ecológicos, por si só, não são suficientes para identificar o agente causador dos efeitos tóxicos. Do mesmo modo que, a análise química de poluentes, sozinha, não fornece evidências de consequências toxicológicas sobre a biota (FENT, 2001).

Os ensaios laboratoriais que investigam potenciais efeitos toxicológicos podem ser extrapolados para campo, pois apesar de, nestes bioensaios serem negligenciados processos do ecossistema e também fatores ambientais que podem influenciar na toxicidade, estes bioensaios são considerados como importantes ferramentas para a caracterização da ação tóxica de substâncias químicas, melhorando o poder de previsão do agente tóxico em campo (FENT, 2001).

No presente experimento foram monitorados parâmetros físico-químicos da água que podem causar alterações fisiológicas como, temperatura e oxigênio dissolvido, pois estes fatores também podem influenciar na toxicologia e comportamento das substâncias presentes na água, como o próprio alumínio e ainda a amônia e o nitrito (ARAGÃO; ARAÚJO, 2006). Desta forma, para que se possa afirmar que os dados obtidos foram resultantes apenas do efeito do alumínio e/ou do pH (parâmetros controlados), foi necessário o monitoramento e a manutenção das condições ótimas e equivalentes entre os grupos experimentais para os fatores citados acima, garantindo que os dados dos efeitos encontrados não tenham sido resultantes de efeitos combinados a fatores não pretendidos, mas presentes no sistema do bioensaio. Neste contexto, o método de bioensaio semi-estático (troca de 90% da água das caixas a cada 24 horas) foi o que contribuiu com a manutenção da concentração de alumínio e baixas concentrações dos compostos nitrogenados neste experimento.

É bem estabelecido que a amônia é tóxica para peixes, até mesmo em baixas concentrações, independentemente da espécie. No entanto, segundo Ruyet et al. (1997) o tamanho do animal tem influência na sensibilidade a este composto tóxico, sendo assim, é difícil assegurar o limite da concentração de amônia capaz de causar danos fisiológicos, mas de acordo com Boyd (1990) e Lemarié et al. (2004) é sugerido que para animais de água doce o limite tóxico está entre 0,05 mg/L e 0,2 mg/L, sendo letal acima de 0,4 mg/L. Ao longo deste experimento a concentração de amônia se manteve abaixo do limite tóxico mínimo considerado por estes autores indicando, portanto que a mesma não teve influência sobre os resultados aqui apresentados.

Da mesma forma ao que ocorre com a amônia, a sensibilidade à toxicidade do NO_2^- é diferente entre as espécies de peixes, e é provável que esta diferença esteja baseada na capacidade que cada espécie tem de acumular esta substância. De acordo com Boyd (1990), as concentrações seguras de NO_2^- estão entre 0,02 e 0,1 mg/L, valores acima desta faixa de tolerância seriam estressantes para os peixes, o que certamente não ocorreu neste experimento, pois as concentrações de nitrito permaneceram bem abaixo do limite máximo seguro à saúde do animal, segundo o mesmo autor. Willians e Eddy (1986) argumentam que é preciso ter cautela quando se compara a toxicidade do NO_2^- entre diferentes espécies de peixes, pois as características da água podem influenciar a toxicidade. A toxicidade do NO_2^- no meio aquático depende de vários fatores da água, por exemplo, a salinidade, a concentração de OD e a concentração de alguns íons, como exemplo, o Cl^- e o Na^+ , que apresentam forte efeito na diminuição da toxicidade do NO_2^- .

A absorção do NO_2^- em peixes se dá, como na maioria dos compostos, pelas brânquias, tendo como porta de entrada o mecanismo de troca iônica entre $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$, o que acarreta no fato de que espécies com altas taxas de absorção de Cl^- , como por exemplo a truta arco-íris e a perca, sejam mais sensíveis ao NO_2^- do que espécies com menores taxas de absorção deste íon (KROUPOVA; MACHOVA; SVODOBOVA, 2005).

O pH é um fator de qualidade de água que se sobressai como um dos mais importantes na influência da toxicidade de várias substâncias presentes na água, entres as quais estão os compostos nitrogenados (amônia, nitrato, nitrito), o cianeto e os metais (ARAGÃO; ARAÚJO, 2006). Do mesmo modo, a solubilidade do alumínio também ocorre em função do pH, que é o mais importante fator ambiental que controla a

disponibilidade e a toxicidade deste metal (MOUNT; HOCKETT; GERN, 1988; VUORINEN et al., 2003).

Neste experimento houve uma sensível variação na concentração de alumínio ao longo do período experimental, e esta variação foi observada durante os ajustes de concentração de Al nos intervalos de troca de água. Estes ensaios registraram uma concentração média de alumínio de 0,6 µg/ml, valor este com 0,1 µg/ml acima da concentração pretendida para o grupo com alumínio em pH neutro, e de 0,5 µg/ml para o grupo com alumínio em pH ácido. De qualquer forma os dados apresentados neste experimento permitem assegurar que os efeitos observados foram devido à exposição ao alumínio e ao pH.

Os filamentos branquiais são os principais alvos do alumínio e do pH ácido e os efeitos da toxicidade destes poluentes neste tecido manifestam-se por disfunções ionorregulatórias, osmorregulatórias, respiratórias (RAYMOND et al., 1983; NEVILLE, 1985; MOUNT; HOCKETT; GERN, 1988; PLAYLE; WOOD, 1989; EXLEY; CHAPPELL; BIRCHALL, 1991; GENSEMER; PLAYLE, 1999; CAMARGO; FERNANDES; MARTINEZ, 2009), acidose plasmática, hipóxia e redução da osmolalidade plasmática (POLÉO et al., 1997). Os problemas ionorregulatórios são causados pela interação de espécies de alumínio positivamente carregadas, principalmente o Al^{3+} com a superfície branquial carregada negativamente. Uma vez ligado na superfície branquial, o alumínio diminui a absorção ativa de íons pela redução da atividade da enzima Na^+/K^+ ATPase, por danificar as células de cloreto, ou talvez por interferir nos canais iônicos (CAMARGO; FERNANDES; MARTINEZ, 2009; GENSEMER; PLAYLE, 1999).

De uma forma geral, os distúrbios na regulação iônica envolvem principalmente a perda plasmática de Na^+ e Cl^- (MUNIZ; LEIVSTAD, 1980; VUORINEN et al., 2003), sendo esta a causa primária da morte de muitos peixes (SAYER et al., 1991), juntamente com a diminuição do hematócrito e das proteínas plasmáticas (MOUNT; HOCKETT; GERN, 1988; RAYMOND et al., 1983). Para que se possa dissociar estes efeitos daqueles atribuídos à exposição ao alumínio e pH ácido, além da presença do grupo controle, é interessante diagnosticar também se o alumínio acrescentado na água foi absorvido e depositado nos animais experimentais. Sabe-se que no processo de absorção pelo epitélio branquial, o Al se liga aos fosfolipídios da membrana, reduzindo a fluidez e alterando as propriedades seletivas da bicamada (SUWALSKY et al., 1999).

Esta afinidade do alumínio pelo fósforo foi sugerida como um mecanismo pelo qual este metal poderia interferir na reprodução de algumas espécies de peixes estudadas até o momento (VUORINEN; VUORINEN, 1991; VUORINEN et al., 2002). Este processo pode ocorrer devido à ligação do alumínio ao fósforo prejudicando a síntese de vitelogenina, que é uma glicolipofosfoproteína sintetizada nos hepatócitos, sob ação do estradiol (LUBZENS, et al., 2009). Além disso, a intoxicação por alumínio também altera a homeostase citosólica do cálcio (EXLEY; CHAPPELL; BIRCHALL, 1991), o que no contexto reprodutivo deve ser destacado, pois a vitelogenina requer cálcio para o seu transporte e as células adenohipofisárias gonadotrópicas também requerem o influxo celular do cálcio para a liberação de gonadotropinas (MUKHOPADHYAY et al., 1997; YEO; MUGIYA, 1997).

5.2 Acúmulo de Al em tecidos animais

Os metais em ambientes naturais fluviais podem alcançar altos níveis de concentração ao longo do ano, dependendo da atividade humana próxima a estes locais e dos fatores ambientais como temperatura e chuvas, causando estresse fisiológico e até mesmo a morte de muitos organismos, quando expostos a esta condição por um curto período de tempo como horas ou dias (OLSVIK et al., 2000).

Nos peixes, as brânquias são os órgãos mais vulneráveis a exposições agudas a metais e assim a primeira estratégia do organismo para evitar a entrada dos metais é o aumento da produção e secreção do muco branquial que se liga e imobiliza os metais fora do organismo evitando assim seu acúmulo (HANDY; EDDY, 1990). Órgãos como o fígado e rins são os mais afetados quando se trata de exposições prolongadas, ou crônicas, tanto quando a fonte do metal for de origem ambiental ou dietética.

No presente trabalho os animais expostos ao alumínio em pH neutro acumularam uma maior concentração de alumínio no epitélio branquial em relação ao seu controle e ainda, foi observado um papel do pH, nesta deposição, independente do metal, pois as fêmeas em pH ácido depositaram mais alumínio nas brânquias do que aquelas em pH neutro. Estes dados sugerem que, mesmo em baixas concentrações (por exemplo, no grupo controle) o alumínio é incorporado nas brânquias e a especiação deste metal poderia facilitar a entrada do mesmo (GENSEMER; PLAYLE, 1999).

Apesar de não serem encontradas diferenças na incorporação do alumínio no fígado entre os grupos experimentais, este foi o terceiro órgão de maior acúmulo deste metal dentre os cinco tecidos analisados independentemente do tratamento. Analisando desta mesma forma os cinco tecidos, observa-se que o órgão de maior acúmulo foi o encéfalo, em seguida as brânquias, depois o fígado e na sequência as gônadas e o músculo.

Rodushkin, Moiseenko e Kudravsjeva (1995) verificaram uma correlação positiva da concentração do alumínio na água e nos tecidos (rim, ossos, brânquias, fígado e músculo) em peixes de ambiente natural impactado por alumínio. Estes autores observaram que os tecidos hepático e muscular foram aqueles que apresentaram o menor acúmulo do metal e, os órgãos de maior acúmulo foram os rins, seguidos do tecido ósseo e brânquias. Como em vários outros trabalhos, estes autores também encontraram uma correlação negativa entre o aumento da concentração do alumínio presente em ambiente natural e a diminuição do pH.

Embora a forma iônica do alumínio cause efeitos tóxicos diretos em peixes, outros efeitos negativos podem estar associados ao acúmulo do alumínio em diferentes órgãos dependendo da concentração total. Em truta arco-íris foram encontradas neuropatologias resultantes do acúmulo sistêmico do alumínio uma vez que estes animais foram expostos ao alumínio por longo período de tempo (EXLEY, CHAPPELL; BIRCHALL, 1991).

Neste experimento de exposição aguda com *O. niloticus* foi encontrado maior acúmulo de alumínio nos grupos de Al-Ac e Al-N do que em seus respectivos controles para o tecido encefálico e muscular. Para as gônadas foi encontrado maior acúmulo de alumínio no grupo exposto ao alumínio em pH ácido comparado ao seu controle e mais alumínio no grupo Al-Ac que no Al-N sendo coerente respectivamente, com a concentração de alumínio e com as espécies de alumínio disponíveis dado o pH ácido.

Em trabalhos realizados sobre o acúmulo do alumínio em mamíferos detectaram níveis mais altos de alumínio gradativamente nos ossos, rins, fígado, gônadas, músculo esquelético e encéfalo. Apesar do encéfalo ter menos alumínio acumulado ele é um importante local de acúmulo no organismo, pois foi verificado que a massa cinzenta acumula duas vezes mais alumínio que a massa branca, e tem sido sugerido que doenças neuro-degenerativas em humanos, como Alzheimer e Parkinson, estão associadas à deposição deste elemento no encéfalo (NAYAK, 2002).

Uma vez que o metal esteja presente no ambiente é inevitável que o mesmo seja incorporado, e se tratando de exposição prolongada este processo pode resultar na tolerância à toxicidade do metal, e este ajuste fisiológico, pode ter papel importante até em processos evolutivos (McDONALD; WOOD, 1993). Em experimentos de exposições agudas foi mostrada a tolerância de peixes de água doce para concentrações subletais de Cd, Cu e Zn (McCARTER; ROCH, 1983; BRADLEY; DUQUESNAY; SPRAGUE, 1985; KLAVERKAMP; DUNCAN, 1987). Essa tolerância pode ser o resultado da mobilização do aparato de biosíntese das metalotioneínas que estão envolvidas na regulação de metais essenciais como o Zn e o Cu, mas também no armazenamento daqueles metais não essenciais como o Cd e Hg em uma forma não tóxica (CHERIAN; CHAN, 1993; OLSVIK et al., 2000). Tratando-se da incorporação celular do alumínio, foi visto que sua distribuição não é uniforme tendo sido encontrado em estruturas como o lisossomo, citoplasma, mitocôndria, núcleo e componentes nucleares como cromatinas. A presença do alumínio neste nível biológico permitiu que fosse feita a associação entre a presença do alumínio em compostos intra-nucleares e a formação de emaranhados neurofibrilares indicando mais uma vez seu efeito neurotóxico (NAYAK, 2002).

5.3 Expressão gênica de gonadotropinas

Os resultados de quantificação de mRNA para LH normalizados e não normalizados mostraram a mesma diferença estatística de expressão gênica para os grupos experimentais propostos, sendo assim, os dados para FSH não normalizados são tidos neste trabalho como confiáveis. Estes dados evidenciam que, animais submetidos ao alumínio em pH 5,5 apresentaram uma redução na expressão do gene do FSH, no entanto em pH neutro esta alteração na expressão deste gene não foi encontrada. O FSH é o hormônio adenohipofisário que modula a síntese de estradiol nas camadas foliculares dos ovários (ROCHA; ROCHA, 2006), apesar disso, as alterações de expressão aqui encontradas não revelaram distúrbios na produção de estradiol nestes animais (CORREIA, 2008), sugerindo inicialmente que este metal não comprometeu a fase vitelogênica da tilápia neste período em que foi conduzido o experimento. Este fato

talvez se explique, pois a vitelogênese é um processo conhecidamente mais longo na maioria dos teleósteos, não sendo afetado em períodos curtos de estresse ambiental.

Urbatzka et al. (2005) investigaram efeitos de disruptores endócrinos sobre o eixo hipotálamo-hipófise-gônadas de *Xenopus laevis*, determinando o potencial do impacto de compostos estrogênicos, anti-estrogênicos, androgênicos e anti-androgênicos, em machos e fêmeas, sobre a expressão dos genes GnRH, LH e FSH. Foi observado que, dentre todas as situações experimentais, a única que causou alguma alteração na expressão de FSH foi aquela em que fêmeas foram expostas a anti-estrógenos tendo como resposta um aumento da expressão de FSH, alteração atribuída a ausência do mecanismo natural de *feedback* negativo do estrógeno sobre as células adenohipofisárias. Neste mesmo trabalho, foi detectado que tanto os compostos estrogênicos como os androgênicos causaram, em machos, uma diminuição da expressão gênica de LH, enquanto em fêmeas somente o composto estrogênico induziu a uma redução na expressão gênica do mesmo hormônio, indicando o clássico mecanismo de *feedback* negativo. A expressão do gene do GnRH não variou em nenhum dos tratamentos, de qualquer forma para o mesmo período de exposição aos diferentes tratamentos a expressão do gene do LH apresentou mais rápida resposta de modulação.

Considerando então a fase de maturação final e os hormônios que a modulam, os resultados obtidos, no presente trabalho, evidenciam que a expressão do LH foi muito mais suscetível às condições experimentais propostas que a expressão do FSH. Os animais expostos ao alumínio, tanto em pH ácido quanto neutro apresentaram diminuição na expressão de LH e esta diminuição na expressão foi acompanhada por uma redução na concentração plasmática do progestágeno 17α -hidroxiprogesterona (17α OHP), precursor do hormônio responsável pela ovulação em peixes 17α - 20β -dihidroxiprogesterona, apenas em pH ácido (CORREIA, 2008). Sabe-se que a produção de 17α OHP é controlada pelo LH (ROCHA; ROCHA, 2006) o que corrobora os resultados aqui encontrados, para a diminuição da expressão do gene do LH neste mesmo grupo exposto a este metal e baixo pH.

A análise dos resultados de expressão do LH combinada com o perfil dos progestágenos plasmáticos analisados por Correia (2008), mostram que, em condições adversas de pH (ácido) a ação do alumínio como um disruptor endócrino foi traduzida em alterações na fisiologia gonadal, limitando a produção do 17α OHP, importante

hormônio na ovulação. Por outro lado, quando as condições de pH foram favoráveis (neutro), a diminuição da expressão de LH não levou ao desajuste na produção de $17\alpha\text{OHP}$, ou seja, os animais de alguma forma, compensaram esta disfunção.

Avaliando-se o papel apenas do pH na expressão de FSH e LH em *O. niloticus*, os dados do presente trabalho não mostram alterações para o FSH, mas sugerem que animais em pH ácido, na presença de alumínio, estariam expressando mais LH do que os animais em pH neutro, também na presença do alumínio. Estes dados são de difícil interpretação, haja vista que, na ausência do alumínio, este efeito do pH não foi constatado, evidenciando um efeito sinérgico do alumínio e baixo pH. Como foi relatado anteriormente, apesar das inúmeras tentativas em se manter o valor da concentração de alumínio em $0,5 \mu\text{g/ml}$, no grupo com pH neutro, este valor foi ligeiramente mais elevado, chegando a $0,6 \mu\text{g/ml}$, o que pode ter resultado nesta diferença. Além disso, pode ser sugerido que os animais deste grupo Al-Ac tiveram maior expressão do LH em relação ao grupo exposto ao Al-N também por não ter sido encontrado no plasma destes animais o progestágeno que atua sobre a hipófise em um processo de *feedback* negativo para a síntese do LH, induzindo assim a continuidade da expressão deste hormônio que estimula nos ovários a produção do $17\alpha 20\beta\text{P}$ hormônio efetivo da ovulação em peixes.

Além destas considerações, é importante ainda destacar que a alteração da expressão das gonadotropinas pode ter relação com algum possível efeito do alumínio na produção do GnRH hipotalâmico, uma vez que foram encontrados níveis elevados de acúmulo do alumínio no encéfalo.

Alguns trabalhos já avaliaram os efeitos do alumínio em pH ácido sobre a fisiologia de peixes e esses efeitos observados permitiram inferir que o alumínio e o pH ácido trazem danos ao processo reprodutivo. Esses danos podem ser resultado do estresse que altera a demanda energética para a sobrevivência em um ambiente não favorável, limitando desta forma a energia direcionada para a reprodução. Estas alterações no orçamento energético das espécies podem levar a efeitos adversos em diferentes etapas do processo reprodutivo, como o amadurecimento sexual e a qualidade e quantidade dos gametas (ROY et al., 1990; VUORINEN; VUORINEN, 1991; VUORINEN et al. 2003; VUORINEN et al. 2004).

Vuorinen et al. (2003) realizaram experimentos crônicos laboratoriais com *vendace*, nos quais fêmeas na fase final da vitelogênese endógena foram expostas as

condições de pH 4,75 e pH 5,25, com e sem alumínio. Na época normal de desova, quando 48% das fêmeas do grupo controle já tinham ovulado/desovado, 50% das fêmeas em pH 4,75 + Al não haviam ovulado. A proporção final de fêmeas completamente ovuladas foram, respectivamente, para os grupos pH 4,75 + Al, pH 4,75, pH 5,25 + Al, pH 5,25 e no grupo controle de, 14%, 36%, 25%, 61% e 81%, sendo a condição de exposição ao alumínio e pH ácido mais uma vez detectada como a causadora de piores efeitos fisiológicos (POLÉO, 1995). Os efeitos observados em *vendace* podem ser resultados de alterações na produção do LH, assim como encontrado neste experimento com *O. niloticus*.

Rask, Vuorinen e Vuorinen (1988) verificaram em uma pesquisa com enfoque em piscicultura que *whitefishes* cultivados em lagos com pH > 5,5 cresceram mais rápido que aqueles que estavam estocados em pH < 5,5. Roy et al. (1990) observaram uma diminuição no tamanho dos oócitos de truta-arco-íris que foram expostas a águas ácidas e sugeriram que esta ocorrência foi devido a uma diminuição da produção da vitelogenina. No entanto, é sabido que este processo é dependente de inúmeros fatores que envolvem os processos de síntese do eixo-hipotálamo-hipófise-gônadas, tendo principalmente, o FSH atuando na modulação da produção de estradiol e também na incorporação da vitelogenina nos oócitos. Fatores como o cálcio plasmático, como dito anteriormente, tem importante atuação neste eixo tanto na liberação do FSH, como no transporte da vitelogenina até as gônadas, e nos oócitos, com um importante papel no processo do desenvolvimento do embrião.

Outros trabalhos fizeram inferências da fisiologia reprodutiva de peixes avaliando a concentração de Ca^{2+} no plasma destes animais, tanto em ambientes cujo pH era próximo ao pH neutro, quanto em ambientes altamente acidificados, e o resultado mostrou que fêmeas maduras têm concentração de Ca^{2+} superior àquela de machos ou juvenis, indicando o papel deste íon no desenvolvimento de oócitos, pois durante a vitelogênese exógena a concentração total de Ca^{2+} no plasma em fêmeas aumenta (SCOTT et al., 1980).

Assim, foi detectado em *whitefish* e em *vendace* que em ambientes acidificados com ou sem Al as fêmeas estavam acelerando o processo de maturação para a desova, e os machos de *whitefish* estavam menos preparados para a desova que os machos em pH neutro. Entretanto, já havia sido documentado em laboratório o atraso da ovulação e desova para os mesmos peixes quando expostos a acidez e o agravamento deste quadro

quando o Al esteve presente (VUORINEN; VUORINEN, 1991; VUORINEN et al., 2003; VUORINEN et al. 2004).

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Na pesquisa ecotoxicológica, estudar os efeitos celulares são tão importantes quanto estudar os efeitos gerais sobre os organismos, porque a primeira interação do componente químico com a biota ocorre na superfície celular ou dentro da célula. Desta forma, a questão chave da ecotoxicologia é a relação entre resposta celular toxicológica e a toxicidade em níveis de maior organização. A afirmação de que um composto químico é capaz de induzir alterações na estrutura celular e na fisiologia e que, por este motivo é desencadeador de um efeito tóxico adverso, depende de muitos parâmetros integrativos, que incluem também as respostas adaptativas ao meio ambiente. Fatores como mecanismos compensatórios do organismo e a presença de efeitos indiretos podem influenciar a relevância da resposta toxicológica celular para os efeitos globais ecotoxicológicos de um determinado agente químico (FENT, 2001).

A hipótese de que alterações celulares podem influenciar processos importantes para populações, como o crescimento, desenvolvimento, saúde e reprodução já é comprovada (FENT, 2001). Assim, a toxicologia celular fornece conceitos essenciais ao entendimento dos processos ecotoxicológicos, uma vez que desempenha papel chave na elucidação de diagnósticos toxicológicos, modos de ação e efeitos de agentes tóxicos em níveis mais elevados de organização biológica.

No entanto, o efeito celular é frequentemente, mas não obrigatoriamente, determinante para efeitos adversos em altos níveis biológicos de organização. Os animais podem apresentar mecanismos de ajustes que, dependendo das condições do meio-ambiente, podem ou não resultar em respostas fisiológicas distintas dos organismos. As variações na expressão do LH em *O. niloticus* em decorrência da exposição ao alumínio deixam claro que, nas condições ambientais mais favoráveis, como pH neutro, estas alterações na expressão do gene não contribuíram para mudanças no perfil de progestágenos, que poderiam levar a disfunções na ovulação. Isso deixa claro que, de alguma forma, o animal ajustou as suas funções endócrinas na condição de pH considerada ideal para a sua sobrevivência. Por outro lado, em pH desfavorável (ácido), esse ajuste não foi possível a ponto de manter os seus níveis de progestágenos, e uma possível falha na ovulação poderia ser sugerida.

Apesar da abordagem molecular apresentada neste trabalho favorecer a compreensão do real efeito do alumínio e variações do pH na expressão dos genes das

gonadotropinas, a interpretação destes resultados para o nível do organismo envolve as interações entre os diferentes sistemas fisiológicos do animal e o meio ambiente. Esta abordagem sustenta discussões pertinentes na área da fisiologia integrativa para refutar a idéia de que *“se soubermos tudo sobre o funcionamento dos níveis de organização mais basais, como os genes e as proteínas, tudo sobre um dado organismo ficaria claro para nós. Ou seja, poderíamos reconstruir o organismo inteiro a partir do estudo dos níveis mais baixos da cadeia”* (NOBLE, 2006).

FIGURAS



Figura 1. Barragem de Ponte Nova - Salesópolis - SP



Figura 2. Piscicultura da Barragem de Ponte Nova - Salesópolis - SP



Figura 3. Tratamento da água do reservatório da Barragem de Ponte Nova. Em A: água antes de se tornar ideal para a utilização nos bioensaios, em B: água com solução estoque de alumínio após o período de 12 horas para decantação das partículas em suspensão. Seta aponta para material decantado.



Figura 4. Laboratório da Barragem de Ponte Nova - Local onde ocorreram os experimentos ecotoxicológicos. **Figura 5.** Exemplar de *Oreochromis niloticus* utilizado no experimento.

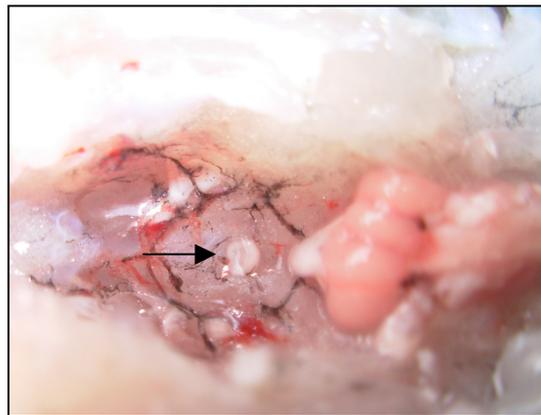


Figura 6. Coleta da hipófise de *Oreochromis niloticus* do experimento de exposição aguda ao alumínio em pH neutro (7,0) e em pH ácido (5,5). A seta aponta a glândula nas duas fotos.

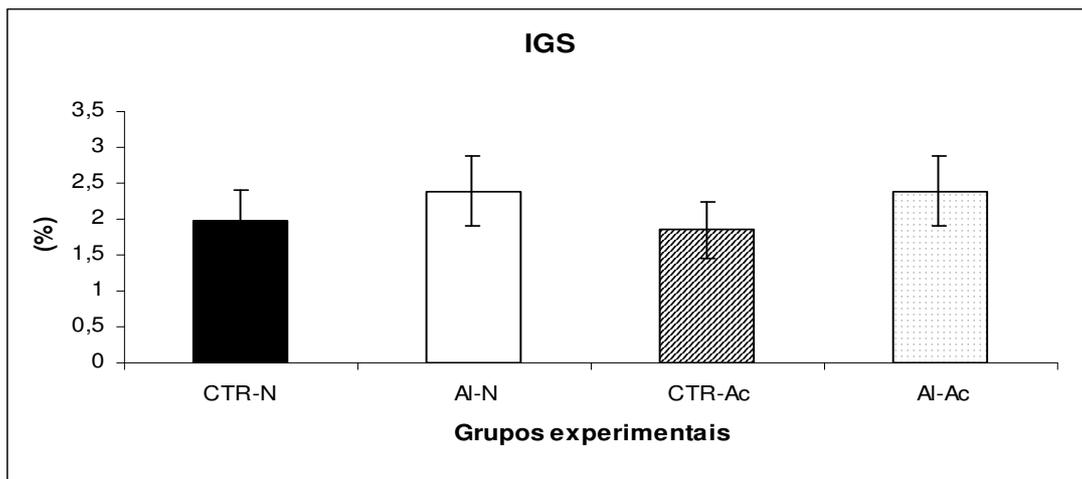


Figura 7. Índice gonadosomático (IGS) de *Oreochromis niloticus* submetidos a exposição aguda ao alumínio em pH neutro (7,0) e pH ácido (5,5) e seus respectivos grupos controle. Não houve diferença estatística entre os grupos.

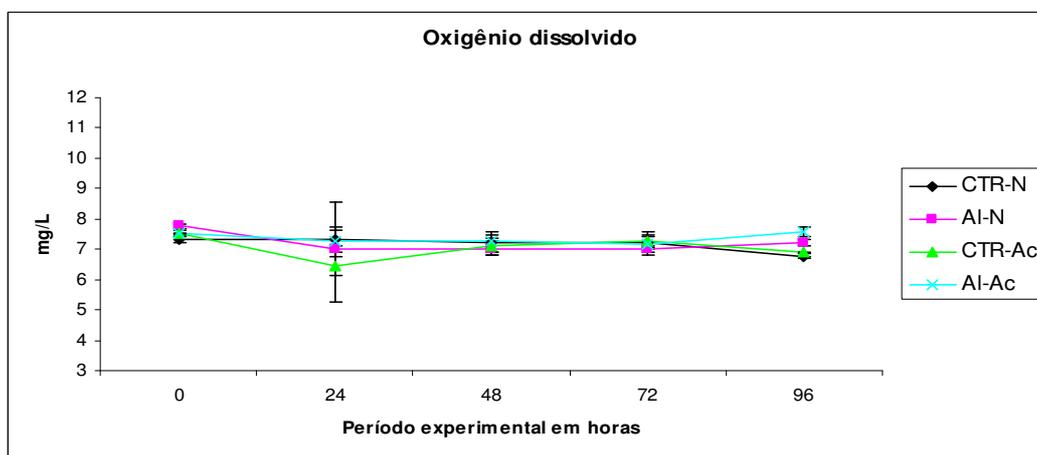


Figura 8. Concentração de oxigênio dissolvido na água ao longo do experimento de exposição aguda de *Oreochromis niloticus* ao alumínio em pH neutro (7,0) e pH ácido (5,5) e seus respectivos grupos controle.

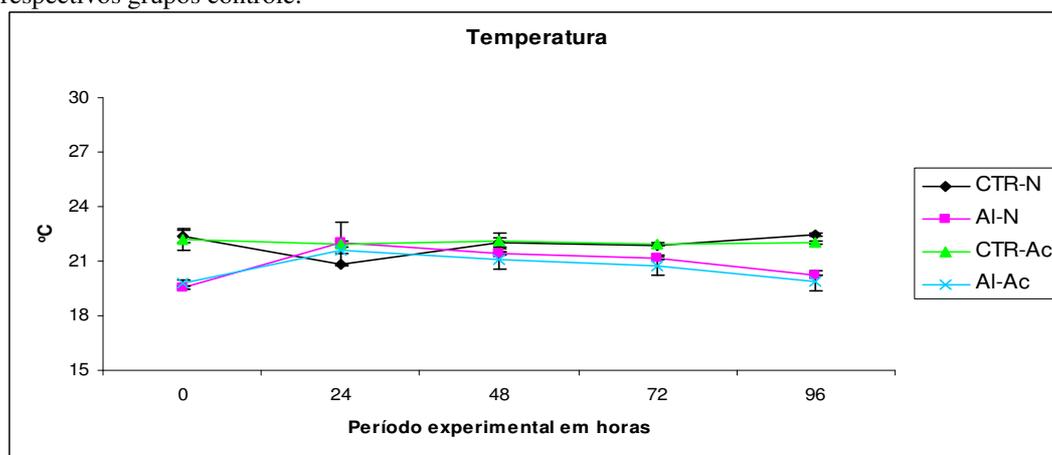


Figura 9. Temperatura da água ao longo do experimento de exposição aguda de *Oreochromis niloticus* ao alumínio em pH neutro (7,0) e pH ácido (5,5) e seus respectivos grupos controle.

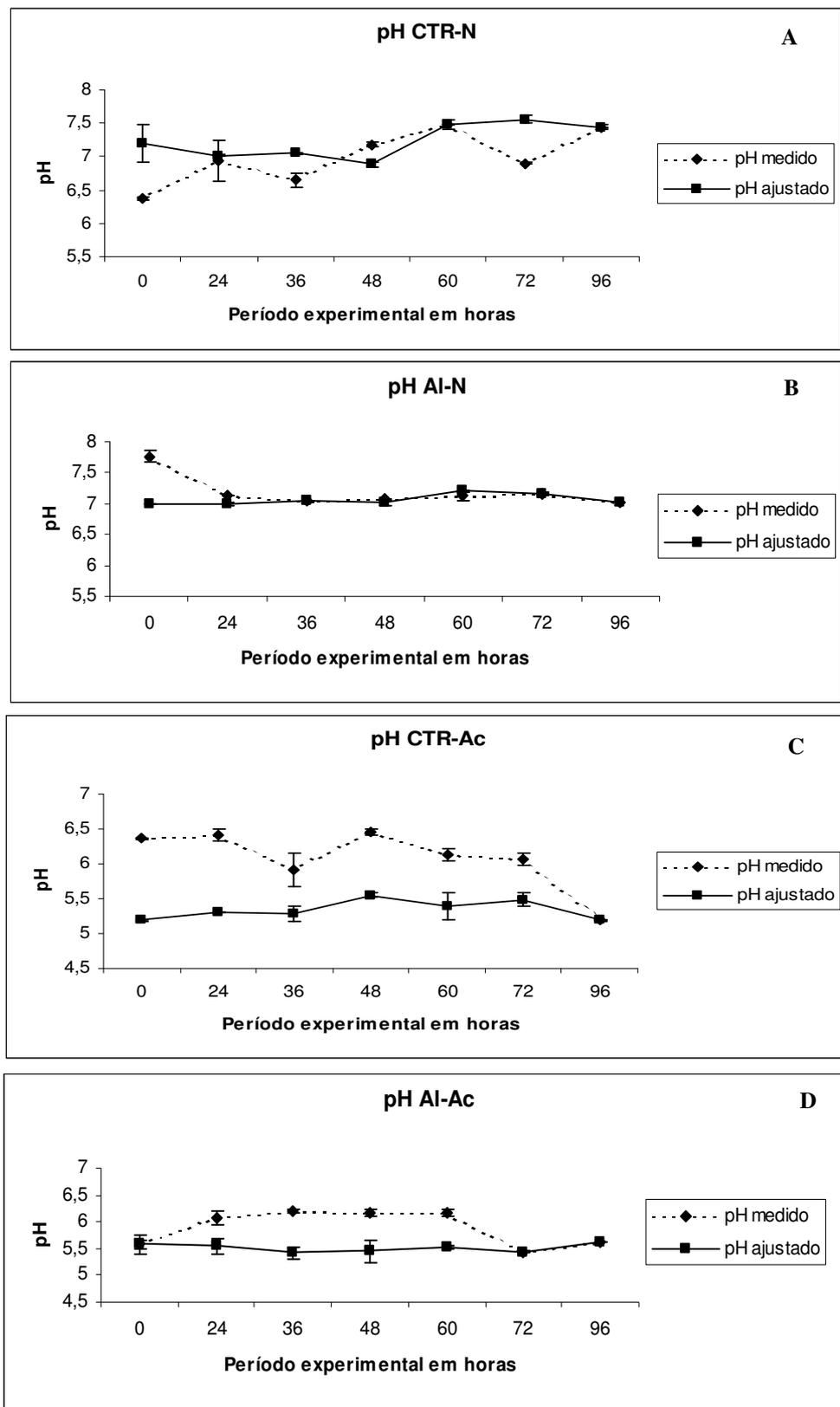


Figura 10. Valores do pH da água do experimento de exposição aguda de *O. niloticus* ao longo do período experimental.

Em A: ensaio do grupo controle em pH neutro (7,0). Em B: ensaio do grupo de exposição ao alumínio em pH neutro (7,0). Em C: ensaio do grupo controle em pH ácido (5,5). Em D: ensaio do grupo de exposição ao alumínio em pH ácido (5,5).

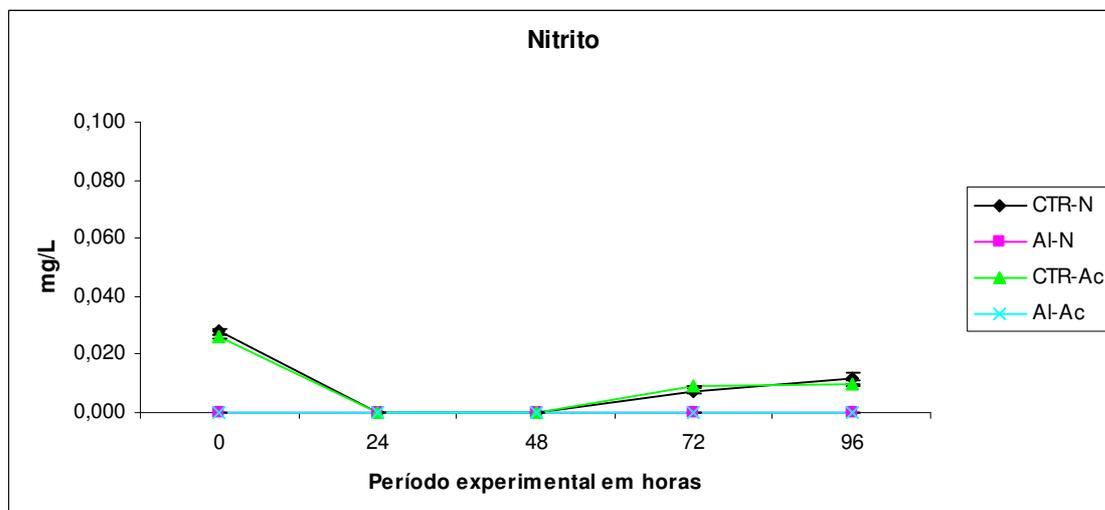


Figura 11. Concentração de nitrito na água ao longo do experimento de exposição aguda de *O. niloticus* ao alumínio em pH neutro (7,0) e pH ácido (5,5) e seus respectivos grupos controle.

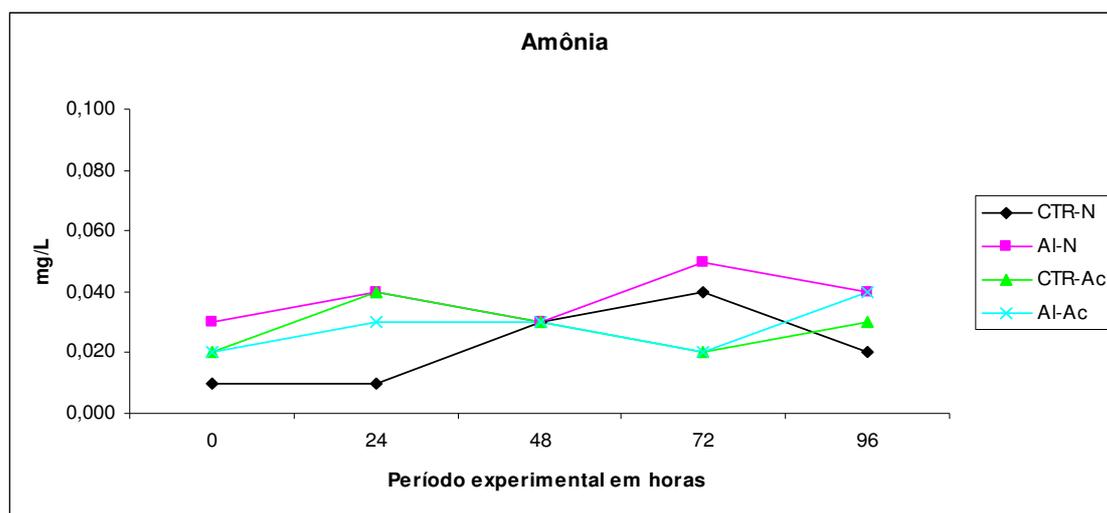


Figura 12. Concentração de amônia na água ao longo do experimento de exposição aguda de *O. niloticus* ao alumínio em pH neutro (7,0) e pH ácido (5,5) e seus respectivos grupos controle.

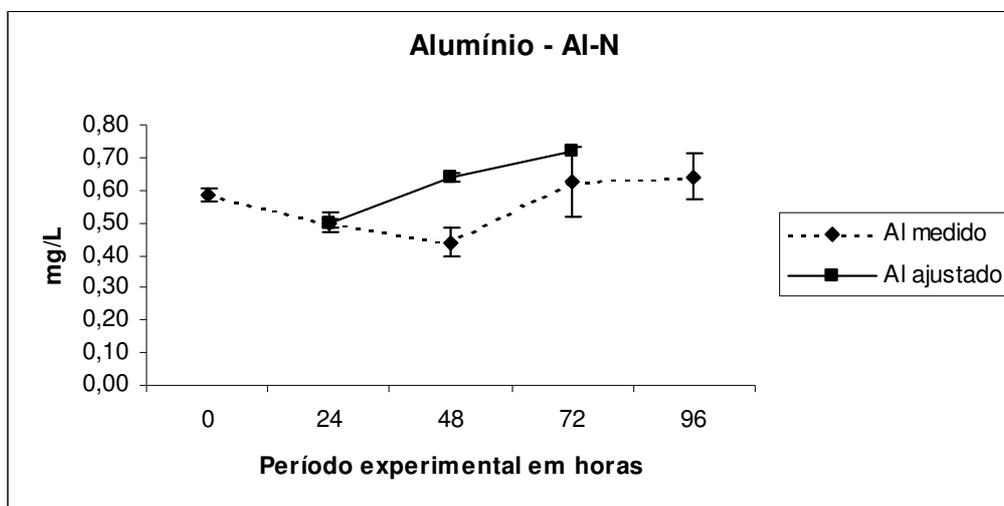


Figura 13. Concentração de alumínio na água ao longo do experimento de exposição aguda de *Oreochromis niloticus* ao alumínio em pH neutro (7,0).

Al medido: [Al] a cada 24h. Al ajustado: troca de 90% da água deste tratamento (alumínio em pH neutro) por nova solução de Al.

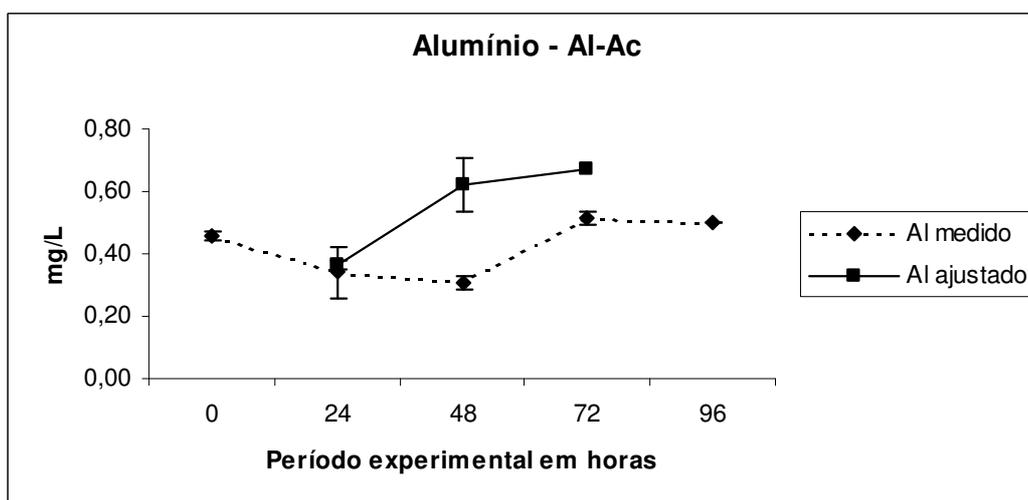


Figura 14. Concentração de alumínio na água ao longo do experimento de exposição aguda de *Oreochromis niloticus* ao alumínio em pH ácido (5,5).

Al medido: [Al] a cada 24h. Al ajustado: troca de 90% da água deste tratamento (alumínio em pH ácido) por nova solução de Al.

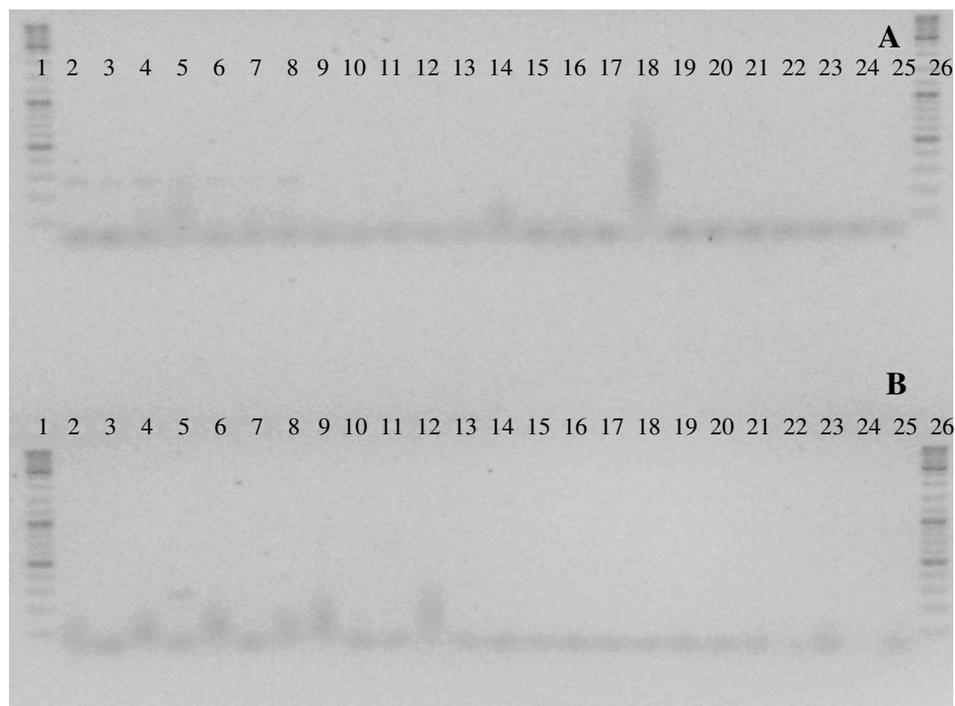


Figura 15. Eletroforese do produto da PCR utilizando-se o gradiente de 12 temperaturas de associação dos oligonucleotídeos degenerados para FSH em *O. niloticus*, sendo aplicados no gel de agarose 2% do poço 2 ao 13 e do 14 ao 25 (em A e em B) respectivamente os produtos gerados da menor para a maior temperatura de associação.

Em A: poços 1 e 26 correspondem ao marcador 100 pb, poços de 2 a 13 correspondem a produtos de amplificação obtidos a partir de cDNA gerado com Oligo dT e os poços de 14 a 25 correspondem respectivamente aos controles negativos desta mesma reação. Em B: os poços 1 e 26 correspondem ao marcador 100 pb, nos poços de 2 a 13 estão apresentados os produtos da PCR utilizando-se o cDNA obtido com *Random primer*, os poços de 14 a 25 estão apresentados respectivamente os produtos desta mesma reação.



Figura 16. Eletroforese da PCR utilizando-se um gradiente de 8 temperaturas de associação dos oligonucleotídeos degenerados para LH em *O. niloticus*.

Os poços 1 e 18 correspondem ao marcador 100 pb, as reações positivas de transcrição reversa utilizando-se Oligo dT foram aplicadas no gel de agarose 2% do poço 2 ao 9 da menor para a maior temperatura de associação e os poços de 10 a 17 correspondem respectivamente aos seus controles negativos.

EF1A

CCC CTG CAG GAC GTC TAC AAG ATT GGC GGT ATC GGA ACT GTA CCC GTC GGT CGT GTT A

FSH

GGA CAC CTG CGG CTT CGT CGA CAC CAC CAT TTG TGA AGG ACA GTG TTT CCA GAA GGA
TCC CAA CTT CAT TCA TAC TGA CGA CTG GCC CAA ACA GAA AAC CTG CAA CGG AGA GTG
GTC CTA CGA GGT GAA ATA CAC AGA GCA ATG TCC ACG GGG TTT CAT CTA CCC TGT GGC
CAG GAA GTG CGA GTG CAC TGC ATG CAA TGC AAA CAC AGA CTG CGG GAC CTT GTC TGG
ATA CAT ACC CAG CTG TCT GTA

LH

TCC CAG CTG TCA CCC AGT AGA GAC AAC CAT CTG CAG TGG ACA CTG CAT CAC CAA GGA
CCC TGT CAT CAA GAT ACC ATT CAG CAA TGT GTA CCA GCA TGT GTG CAC ATA CCG GGA
CCT GTA CTA TAA AAC ATT TGA GCT TCC CGA TTG CCC ACC TGG TGT AGA CCC GAT CGT
CAC CTA CCC CGT GGC TTT GAG TTG CCA CTG CGG TCG CTG TGC CAT GGA

Figura 17. Sequências consenso de EF1A, FSH e LH de *Oreochromis niloticus*.

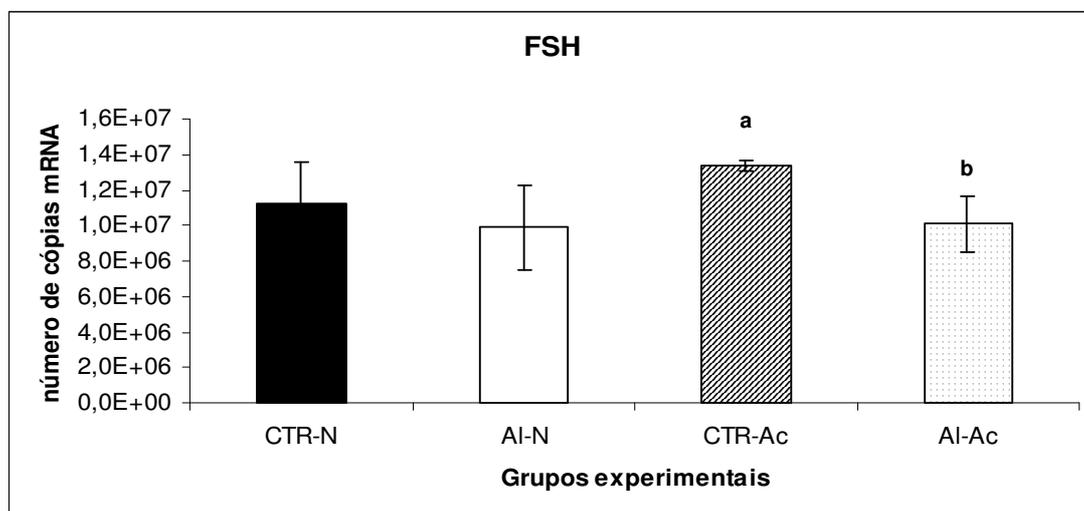


Figura 18. Comparação da quantidade do número de cópias do mRNA de FSH no experimento de exposição aguda de *Oreochromis niloticus* ao alumínio em pH neutro (7,0) e pH ácido (5,5) e seus respectivos grupos controle.

^{a,b} Letras diferentes correspondem a diferenças estatísticas com relação à concentração de alumínio;

*# Símbolos diferentes representam diferenças estatísticas com relação ao pH ($P < 0,05$).

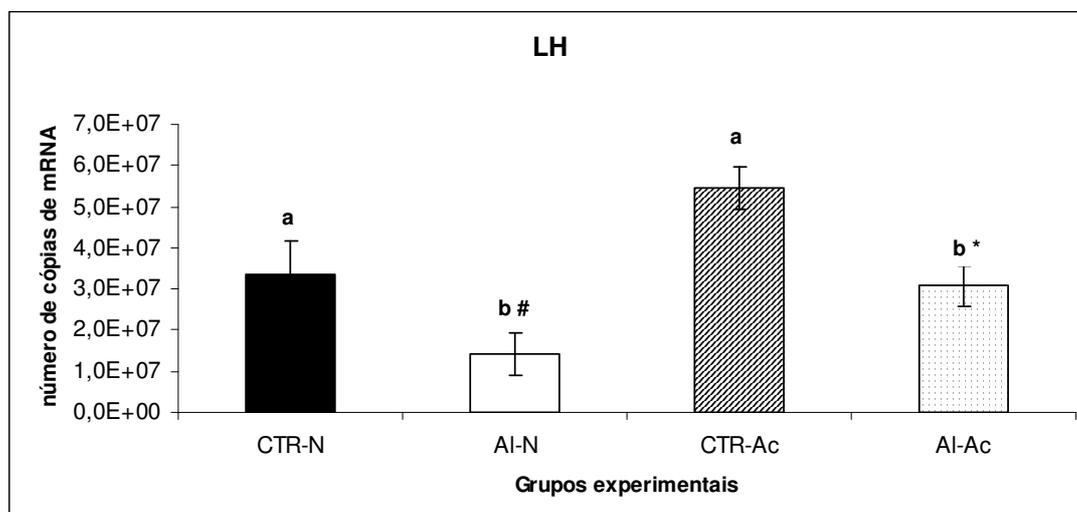


Figura 19. Comparação da quantidade do número de cópias do mRNA de LH no experimento de exposição aguda de *Oreochromis niloticus* ao alumínio em pH neutro (7,0) e pH ácido (5,5) e seus respectivos grupos controle.

^{a,b} Letras diferentes correspondem a diferenças estatísticas com relação à concentração de alumínio;

^{#*} Símbolos diferentes representam diferenças estatísticas com relação ao pH ($P < 0,05$).

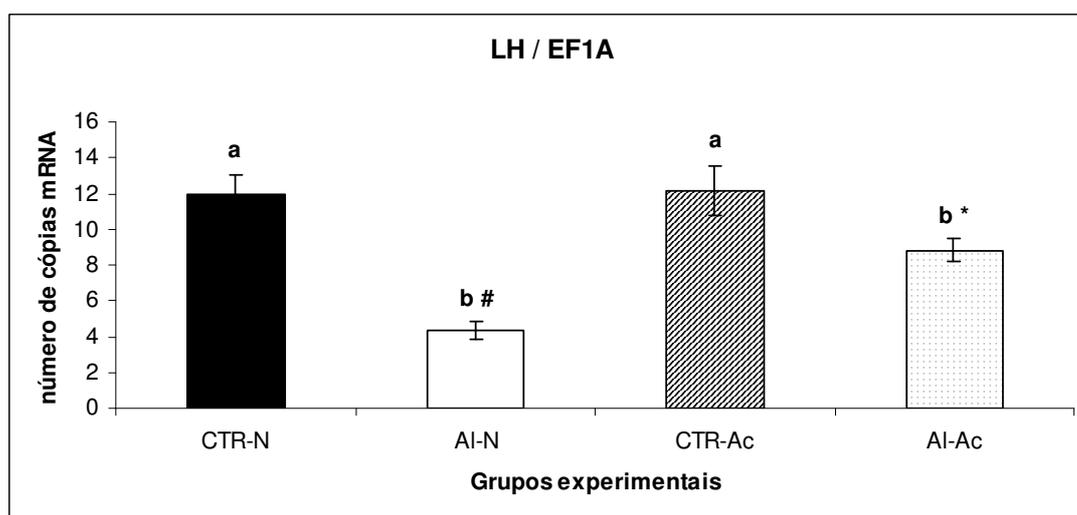


Figura 20. Comparação da quantidade do número de cópias do mRNA de LH normalizado pelo número de cópias do mRNA do EF1A no experimento de exposição aguda de *Oreochromis niloticus* ao alumínio em pH neutro (7,0) e pH ácido (5,5) e seus respectivos grupos controle.

^{a,b} Letras diferentes correspondem a diferenças estatísticas com relação à concentração de alumínio;

^{#*} Símbolos diferentes representam diferenças estatísticas com relação ao pH ($P < 0,05$).

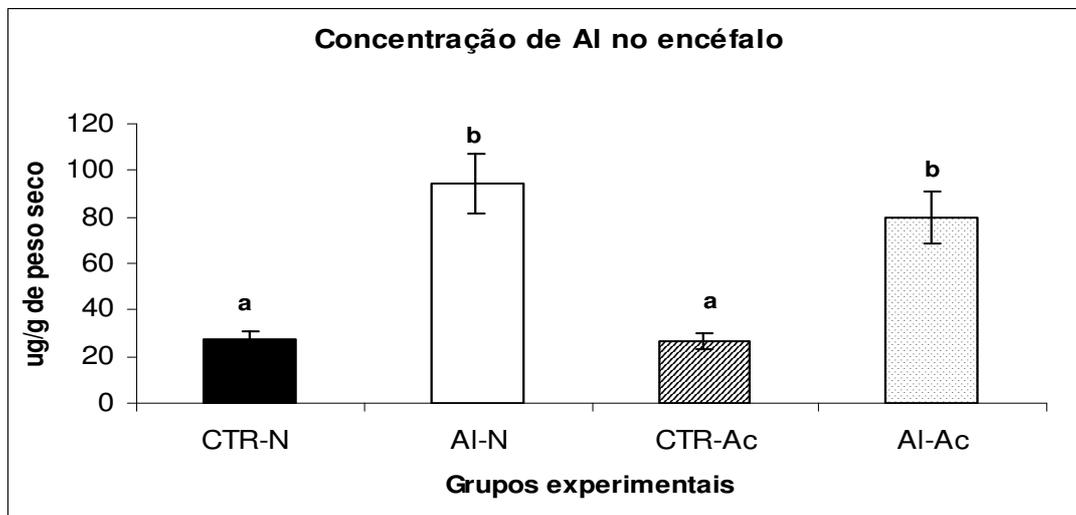


Figura 21. Concentração de alumínio no encéfalo de *Oreochromis niloticus* submetidos a exposição aguda ao alumínio em pH neutro (7,0) e pH ácido (5,5) e seus respectivos grupos controle.

^{a,b} Letras diferentes correspondem a diferenças estatísticas com relação à concentração de alumínio;

^{*#} Símbolos diferentes representam diferenças estatísticas com relação ao pH ($P < 0,05$).

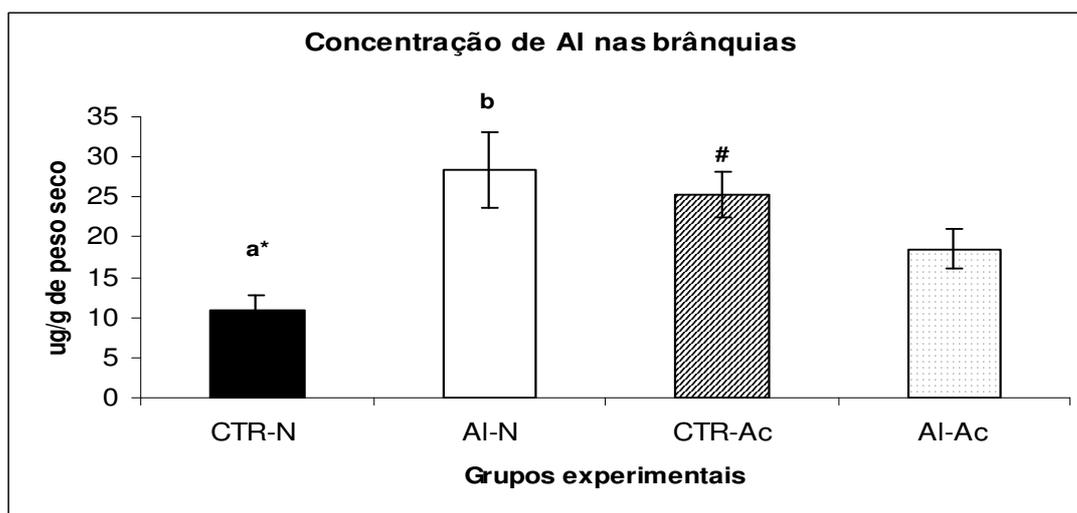


Figura 22. Concentração de alumínio nas brânquias de *Oreochromis niloticus* submetidos a exposição aguda ao alumínio em pH neutro (7,0) e pH ácido (5,5) e seus respectivos grupos controle.

^{a,b} Letras diferentes correspondem a diferenças estatísticas com relação à concentração de alumínio;

^{*#} Símbolos diferentes representam diferenças estatísticas com relação ao pH ($P < 0,05$).

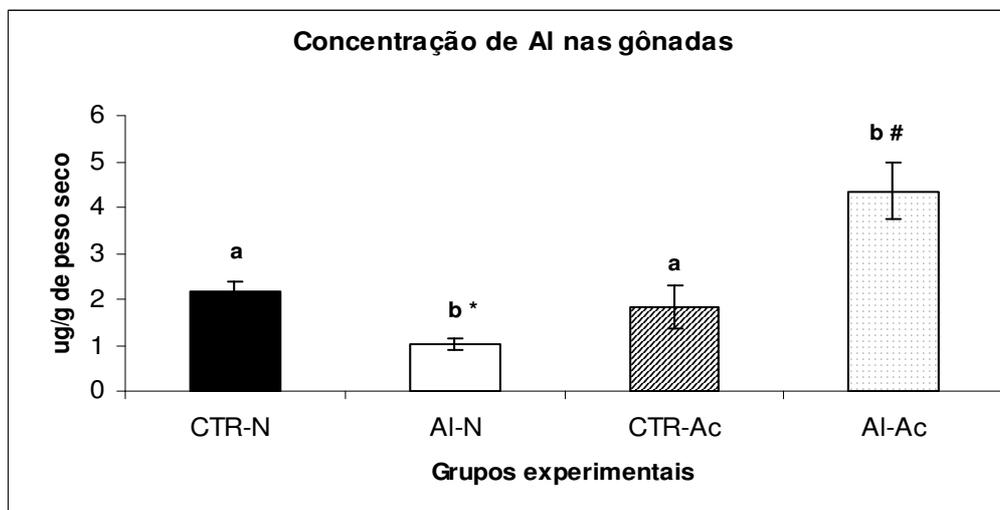


Figura 23. Concentração de alumínio nas gônadas de *Oreochromis niloticus* submetidos a exposição aguda ao alumínio em pH neutro (7,0) e pH ácido (5,5) e seus respectivos grupos controle.

^{a,b} Letras diferentes correspondem a diferenças estatísticas com relação à concentração de alumínio; [#] Símbolos diferentes representam diferenças estatísticas com relação ao pH ($P < 0,05$).

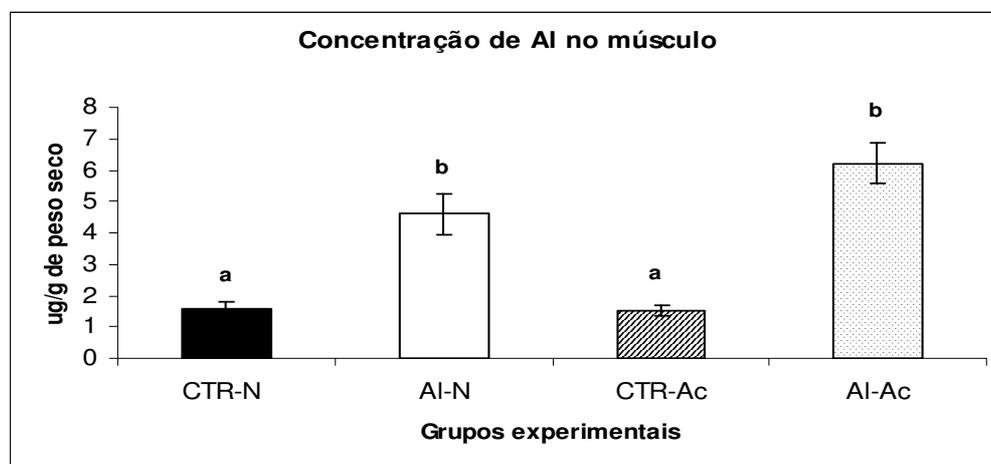


Figura 24. Concentração de alumínio no músculo de *Oreochromis niloticus* submetidos a exposição aguda ao alumínio em pH neutro (7,0) e pH ácido (5,5) e seus respectivos grupos controle.

^{a,b} Letras diferentes correspondem a diferenças estatísticas com relação à concentração de alumínio; [#] Símbolos diferentes representam diferenças estatísticas com relação ao pH ($P < 0,05$).

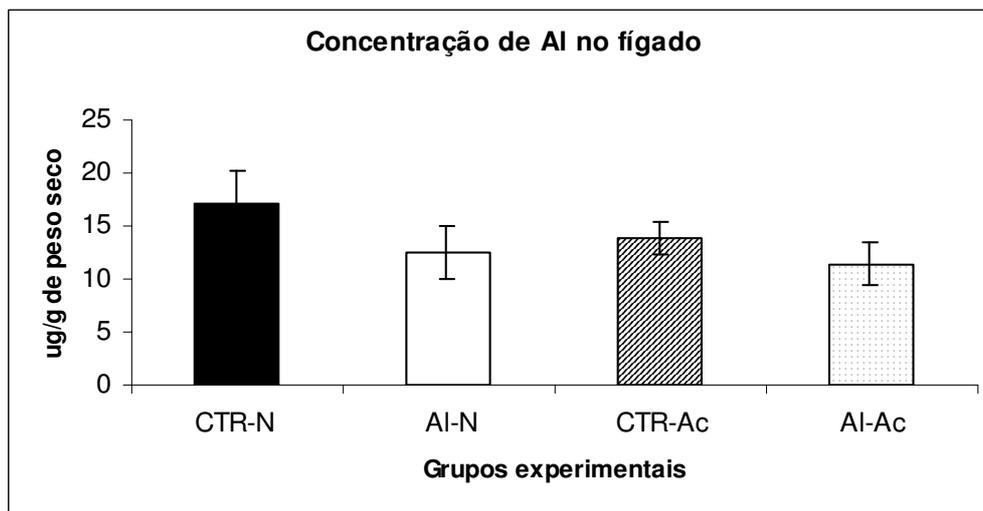


Figura 25. Concentração de alumínio no fígado de *Oreochromis niloticus* submetidos a exposição aguda ao alumínio em pH neutro (7,0) e pH ácido (5,5) e seus respectivos grupos controle.

Não houve diferença significativa entre os grupos.

TABELAS

Tabela 1. Oligonucleotídeos desenhados para qRT-PCR dos genes de FSH, LH e EF1A em *Oreochromis niloticus*.

Primer	FSH	LH	EF1A
Forward (5'-3')	CGACACCACCATTGTGAAG	GTGGACACTGCATCACCAAG	CCCCTGCAGGACGTCTACAAG
Reverse (5'-3')	GTAGGACCACTCTCCGTTGC	CAATCGGGAAGCTCAAATGT	AACACGACCGACGGGTACA

Tabela 2. Dados da pureza e concentração do RNA total extraído de cada *pool* de hipófises de *O. niloticus* submetidos a exposição aguda ao alumínio em pH neutro (7,0) e alumínio em pH ácido (5,5) e seus grupos controle.

As notificações de: Grupo, Grupo' e Grupo'' são referentes ao resultado de extração do agrupamento de 3 hipófises de *O. niloticus* do mesmo grupo experimental.

Amostras	[ng/μl] total de 10 μl	260/280 nm
CTR-N'	936,0	2,05
CTR-N''	630,8	2,05
CTR-N'''	523,9	2,03
CTR-Ac'	804,9	2,03
CTR-Ac''	933,8	2,02
CTR-Ac'''	969,3	2,04
Al-Ac'	1014,6	2,03
Al-Ac''	831,9	2,03
Al-Ac'''	1055,9	2,03
Al-N'	1309,6	2,04
Al-N''	921,2	2,05
Al-N'''	36,0	1,61

7 REFERÊNCIAS

ALBERTI, G.; DAGOSTINO, G.; PALAZZO, G.; BIESUZ, R.; PESAVENTO, M. 2005. Aluminium speciation in natural water by sorption on a complexing resin. *Journal of Inorganic Biochemistry* 99: 1779-1787p.

ARAGÃO, M. A.; ARAÚJO, P. A. 2006. Métodos de Ensaio de Toxicidade com Organismos Aquáticos. In: P. A. ZAGATTO; E. BERTOLETTI (Eds.). *Ecotoxicologia Aquática: Princípios e Aplicações*. São Carlos: Rima, p. 117-152.

ATRILL, M. J.; DEPLEDGE, M. H. 1997. Community and population indicators of ecosystem health: targeting links between levels of biological organization. *Aquatic Toxicology*, 38: 183-197p.

BILLARD, R. 1992. Reproduction in rainbow trout: sex differentiation dynamics of gametogenesis, biology and preservation of gametes. *Aquaculture*, 100: 263-298p.

BOYD, C. E. 1990. Water quality in ponds for aquaculture. *Alabama Agricultural Experimental Station*, Auburn University, Alabama, USA.

BRADLEY, R. W.; DUQUESNAY, C.; SPRAGUE, J. B. 1985. Acclimation of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, to zinc: kinetics and mechanism of enhanced tolerance induction. *Journal of Fish Biology*, 27: 367-380p.

BURY, N. F.; WOOD, C. M. 1999. Mechanism of branchial apical silver uptake by rainbow trout is via the proton-coupled Na channel. *American Journal of Physiology*, 277: 1385-1391p.

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: 40-46p.

CASTILHO, T. M.; CAMARGO, L. M. A.; MCMAHON-PRATT, D.; SHAW, J. J.; FLOETER-WINTER, L. M. 2008. A Real-Time Polymerase Chain Reaction Assay for the Identification and Quantification of American *Leishmania* Species on the Basis of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase. *American Journal Tropical Medicine and Hygiene*, 78: (1) 122-132p.

CETESB. 2005. Relatório de Qualidade das Águas Interiores do Estado de São Paulo - 2004.

CETESB. 2006. Relatório de Qualidade das Águas Interiores do Estado de São Paulo - 2006.

CHERIAN, M. G.; CHAN, H. M. 1993. Biological functions of metallothionein — a review. In: Suzuki, K.T., Imura, N., Kimura, M. (Eds.), *Metallothionein III. Biological Roles and Medical Implications*. Birkhauser Verlag, Basel, p. 87–109.

CONAMA, 2005. Resolução número 357, de 17 de março de 2005. *Ministério do Meio Ambiente*. 1-23p.

COONEY, J. D. 1995. Freshwater tests. In: RAND, G. M. (Ed). *Fundamentals of aquatic toxicology* 2 th ed. 1125p.

CORREIA, T. G. 2008. *Influência do alumínio e do pH ácido sobre a fisiologia reprodutiva de peixes teleósteos continentais*. Dissertação de Mestrado. Departamento de Fisiologia, IBUSP.

COSTA, H. M. S. 2007. *Purificação e caracterização de uma tripsina sensível a metal pesado do peixe *Caranx hippos**. Dissertação de Mestrado. Departamento de Bioquímica, CCB - UFPE.

EXLEY, C.; CHAPPELL, C.; BIRCHALL, J. D. 1991. A mechanism for acute aluminium toxicity in fish. *Journal of Theoretical Biology*, 151: 417-428p.

EXLEY, C.; PINNEGAR, J. K.; TAYLOR, H. 1997. Hydroxyaluminosilicates and acute aluminium toxicity in fish. *Journal of Theoretical Biology*, 189: 133-139p.

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: 477–488p.

FOO, J.; LAM, T. 1993. Serum cortisol response to handling stress and the effect of cortisol implantation on testosterone level in tilapia *Oreochromis mossambicus*. *Aquaculture*, 115: 115 –145p.

GENSEMER, R. W.; PLAYLE, R. C. 1999. The Bioavailability and Toxicity of Aluminum in Aquatic Environments. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 29 (4):315-450p.

HANDY, R.D.; EDDY, F.B. 1990. The interaction between the surface of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*, and waterborne metal toxicants. *Functional Ecology*, 4:385–392p.

HEATH, A. G. 1995. *Water pollution and fish physiology*. Boca Raton; CRC Press, 359p.

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: 69-76p.

KENNEDY, C.; FARRELL, A. 2006. *Do altered cortisol dynamics play a role in the multifaceted toxicities of oil exposure in teleosts?* VII International Congress on the Biology of Fish, St. John's, Canada. Abstracts, 136p.

KLAVERKAMP, J. F.; DUNCAN, D. A. 1987. Acclimation to cadmium toxicity by white suckers: cadmium binding capacity and metal distribution in gill and liver cytosol. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 6: 275–289p.

KORF, H. W. 2006. The pineal organ. In: REINECKE, M.; ZACCONE, G.; KAPOOR, B. G. (Eds) *Fish Endocrinology*. Vol 2. USA. Science Publishers. p. 541-567.

KROUPOVA, H.; MACHOVA, J.; SVODOBOVA, Z. 2005. Nitrite influence in fish: a review. *Veterinary Medicine – Czech*. 11: 461-471p.

LARKIN, P.; KNOEBL, I.; DENSLOW, N.D. 2003. Differential gene expression analysis in fish exposed to endocrine disrupting compounds. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 136B: 149-161p.

LAWRENCE, A. J.; ELLIOTT, M. Introduction and Conceptual Model. 2003. In: *Effects of Pollution on Fish: Molecular Effects and Population Responses*. Edited by: LAWRENCE, A.; HEMINGWAY, K. Blackwell Science: Oxford, UK. 342p.

LEMARIÉ, G.; DOSDAT, A.; COVÉS, D.; DUTTO, G.; GASSET, E.; RUYET, P. 2004. Effect of chronic ammonia exposure on growth of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. *Aquaculture*, 229: 479-491p.

LEVESQUE, H. M.; MOON, T. W.; CAMPBELL, P. C. G.; HONTTELA, A. 2002. Seasonal variation in carbohydrate and lipid metabolism of yellow perch (*Perca flavescens*) chronically exposed to metals in the field. *Aquatic Toxicology*, 60: 257-267p.

LIMA, R. 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: 1-46p.

LUBZENS, E.; YOUNG, G.; BOBE, J.; CERDÀ, J. 2009. Oogenesis in teleosts: How fish eggs are formed. *General and Comparative Endocrinology*. doi:10.1016/j.ygcen.2009.05.022

McCARTER, J. A.; ROCH, M. 1983. Hepatic metallothionein and resistance to copper in juvenile coho salmon. *Comparative Biochemistry Physiology Part C Comparative Pharmacology Toxicology*, 74(1): 133–137.

McDONALD, D. G.; WOOD, C. M. 1993. Branchial mechanisms of acclimation to metals in freshwater fish. In: Rankin, J.C., Jensen, F.B. (Eds.), *Fish Ecophysiology*. Chapman and Hall, London, p. 297–321.

MOMMSEN, P. T.; WALSH, P. J. 1988. Vitellogenesis and oocyte assembly. IN: *Fish Physiology*. Vol. XI: 347-405p.

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

MONTORZI, M.; FALCHUK, K. H.; VALLEE, B. L. 1995. Vitellogenin and lipovitellin: zinc proteins of *Xenopus laevis* oocytes. *Biochemistry*. 34: 10851-10858p.

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*). Vitellogenesis and ormoregulation. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 45: 1633-1642p.

MOZETO, A. A.; ZAGATTO, P. A. 2006. Introdução de Agentes químicos no ambiente. In: P. A. ZAGATTO; E. BERTOLETTI (Eds.). *Ecotoxicologia Aquática: Princípios e Aplicações*. São Carlos: Rima, p. 15 – 38.

MUCCI, J. L. N.; DAMATO, M.; MALAGRINO, W.; ROCHA, A. A. 1987. Estudos comparativos da ação tóxica de efluentes da indústria petroquímica sobre *Poecilia reticulata* e *Poecilia vivipara*. *Revista DAEE*, 47: 150 –275.

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.

MUKHOPADHYAY, B.; ROY, P.; CHATTERJEE, A. ; BHATTACHARYA, S. 1997. Intracellular events in response to GnRH causing gonadotropin release from pituitary cells of a channid fish, *Channa punctatus* (Bloch). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 118: 129-136p.

MUNIZ, I. P.; LEIVSTAD, H. 1980. *Acidification effects on freshwater fish*. In: Ecological Impact of Acid Precipitation: Proceedings of an International Conference, Sandfjord, Norway, 84-92p. Drablos, D. and Tollan, A., (Eds.) Oslo, Norway, SNSF Project.

NAGAHAMA. Y. 1997. 17 α , 20B, dihydroxy – 4 – pregnen – 3 – one, a maturation inducing hormone in fish oocytes: Mechanisms of synthesis and action. *Steroids*. 62: 190- 196p.

NAYAK, P. 2002. *Review: Aluminum: Impacts and disease*. *Environmental Research section A* 89: 101-115p.

NEVILLE, C. M. 1985. Physiological response of juvenile rainbow trout, *Salmo gairdneri*, to acid and aluminum prediction of field responses from laboratory data. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 42: 2004-2019p.

NOBLE, D. 2006. *The music of life: Biology beyond the genoma*. Oxford University Press. pp. 10-24.

OLSVIK, P. A.; GUNDERSEN, P.; ANDERSEN, R. A.; ZACHARIASSEN, K. E. 2000. Metal accumulation and metallothionein in two populations of brown trout, *Salmo trutta*, exposed to different natural water environments during a run-off episode. *Aquatic Toxicology* 50: 301-316p.

OLSVIK, P. A.; LIE, K. K.; JORDAL, A. E. O.; NILSEN, T. O.; HORDVIK, I. 2005. Evaluation of potential reference genes in real-time RT-PCR studies of Atlantic salmon. *BMC Molecular Biology*, 6: 21.

PARHAR, I. S.; SOGA, T.; OGAWA, S.; SAKUMA, Y. 2003. FSH and LH- β subunits in the preoptic nucleus: ontogenic expression in teleost. *General and Comparative Endocrinology*, 132: 369–378p.

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): 953-967p.

PIVA, L. H.; FURTADO, M.; BAITELO, R. L. 2006. *Mudanças Climáticas e Medidas Nacionais de Mitigação*. Rev. Gestão Integrada em Saúde do Trabalho e Meio Ambiente.

PLAYLE, R. C.; WOOD, C. M. 1989. Water pH and aluminum chemistry in the gill microenvironment of rainbow trout during acid and aluminum exposures. *Journal and Comparative Physiology*, B 159: 539-550p.

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: 129-139p.

POLÉO, A.B.S. 1995. Aluminium polymerization – a mechanism of acute toxicity of aqueous aluminium to fish. *Aquatic Toxicology* 31: 347-356 P.

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.

RASK, M.; M. VUORINEN; VUORINEN, P. J. 1988. Whitefish stocking: an alternative in mitigating acidification effects? *Finnish Fish Research* 9: 489-495p.

RAYMOND, M.; SHELBY, L.; GERSKING, D.; JEZIERSKA, B. 1983. Electrolyte balance and energy mobilization in acid – stressed rainbow trout, *Salmo gairdneri*, and their relation to reproductive success. *Environmental Biology of Fish*, 8: 115-123p.

ROCHA, M. J.; ROCHA, E. 2006. Morphofunctional aspects of reproduction form synchronus to asynchronus fishes – An overview. 570 – 624. In: Reinecke, M., Zaccane, G.; Kappor, B. G. 2006. *Fish Endocrinology Science Publishers*. Volume 02: 871p.

ROY, R. L.; RUBY, S. M.; IDLER, D. R.; SO, Y. 1990. Plasma vitellogenin levels in pre-spawning rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, during acid exposure. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 19: 803-806p.

RUDUSHKIN, I.; MOISEENKO, T.; KUDRAVSJEVA, L. 1995. Aluminium in the surface waters of the Kola Peninsula, Russia. *The Science of the total Environment* 163: 55-59.

RUYET, J. P. L.; GALLAND, R.; ROUX, A. L.; CHARTOIS, H. 1997. Chronic ammonia toxicity in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*). *Aquaculture* 154: 155-171p.

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.

SAYER, M. D. J.; READER, J. P.; DALZIEL, T. R. K.; MORRIS, R. 1991. Mineral content and blood parameters of dying brown trout (*Salmo trutta* L.) exposed to acid and aluminium in soft water. *Comparative Biochemistry and Physiology, C* 99: 345-348p.

SCHRECK, C.B.; MOYLE, P.B. 1990. *Methods for Fish Biology*. American Fisheries Society, Bethesda, 684 p.

SCOTT, A. P.; BYE, V. J.; BAYNES, S. M.; SPRINGATE, J. R. C. 1980. Seasonal variation in plasma concentrations of 11-ketotestosterona and testosterona in male rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Journal of Fish Biology*. 17: 495-505p.

SHIBATA, N; YOSHIKUNI, M; NAGAHAMA, Y. 1993. Vitellogenin in incorporation into oocytes or rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, in vitro. Effects of hormones on denuded oocytes. *Development, growth & differetiation*, 35: 115-121p.

Standard methods for the examination of water and wastewater, 21ª edição. Washington: American Public Health Association, 2005.

SUWALSKY, M.; UNGERER, B.; VILLENA, F.; NORRIS, B.; CARDENAS, H.; ZATTA, P. 1999. Interactions of Al(acac)₃ with cell membranes and model phospholipid bilayers. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 75: 263-268p.

THIBAUT, R.; PORTE, C. 2004. Effects of endocrine disrupters on sex steroid synthesis and metabolism pathways in fish. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 92, 485-494.

URBATZKA, R.; LUTZ, I.; OPITZ, R.; KLOAS, W. 2006. Luteinizing hormone, follicle stimulating hormone, and gonadotropin releasing hormone mRNA expression of *Xenopus laevis* in response to endocrine disrupting compounds affecting reproductive biology. *General and Comparative Endocrinology*, 146: 119-125.

VAZZOLER, Anna Emília Amato de Moraes 1996. *Biologia da reprodução de peixes teleósteos: Teoria prática*. Editora da Universidade Estadual de Maringá. Paraná. 169p.

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: 255-276P.

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.; LAPPALAINEN, A.; PEURANEN, S.; RASK, M. 2004. Physiological status of whitefish (*Coregonus lavaretus pallasii*) prior to spawning in lakes of differing acidity. *Aquatic Science*, 66: 305-314p.

WILLIAMS, E. M.; EDDY, F. B. 1986. Chloride uptake in fresh water teleost and its relationship to nitrite uptake and toxicity. *Journal of Comparative Physiology*, B. 156: 867 –872p.

YEO, I.; MUGIYA, Y. 1997. Effects of extracellular calcium concentrations and calcium antagonists on vitellogenin induction by 17 β in primary hepatocyte culture in

the rainbow trout. *Oncorhynchus mykiss*. *General and Comparative Endocrinology*, 105: 294- 301p.

ZAGATTO, A. P.; BERTOLETTI, E. (Eds) 2006. *Ecotoxicologia Aquática – princípios e aplicações*. São Carlos: Rima. 478p.

ZAR, J. H. 1984. *Bioestatistical Analysis*. New Jersey, Prentice Hall, 718 p.

ANEXOS

Anexo 1. Protocolos e procedimentos para a análise de água

O início do experimento foi contado a partir do momento em que os peixes foram colocados nas caixas. Assim, como descrito nos materiais e métodos, a coleta de água para análise de alumínio, nitrito e amônia ocorreu no início do experimento, antes e após a troca de 90% da água a cada 24 horas.

O pH da água de cada caixa foi aferido diariamente com eletrodo de vidro previamente calibrado (pHmetro portátil Gehaka), e se o pH estivesse acima do valor desejado para cada grupo experimental, CTR-Ac/Al-Ac ($5,5 \pm 0,2$) e CTR-N/Al-N ($7,0 \pm 0,2$), era retirado desta caixa o volume de 500 ml de água com o auxílio de um béquer, então era adicionado ou HCl concentrado ou a solução NaOH (1,0 M) de forma a se obter na água do béquer o pH requerido. Esta água era devolvida a caixa de origem, sendo homogeneizada aos poucos, e o pH da água na caixa era aferido novamente. Este procedimento foi realizado quando necessário e repetido até que nas caixas os valores de pH fossem correspondentes ao determinado experimentalmente.

Coleta de água para análise química

Para cada caixa, sempre depois do pH ter sido ajustado, 250 ml de amostra de cada canto e da posição central eram coletados, misturados e homogeneizados. Então, desta composição eram retirados 250 ml para análise de alumínio, sendo este volume filtrado em membrana de 0,45 μm , acidificado para a concentração de 0,1% de HNO_3 e armazenado em frasco plástico fornecido pelo Laboratório de Análises Ambientais e conduzido ao mesmo para análise de quantificação de alumínio. O método empregado é baseado na reação entre o íon alumínio e o corante eriocromocianina R (ECR), que em pH próximo a 6,00, forma um complexo de cor avermelhada na exata proporção do alumínio presente na amostra, a detecção deste complexo é feita em espectrofotômetro utilizando-se o comprimento de onda de 532nm.

A partir da mesma composição de água descrita para a análise de alumínio de cada caixa, foram coletados 80 ml para a análise de nitrito e 80 ml para a análise de amônia, sendo acondicionados em frascos de vidro âmbar.

Para as amostras em que o nitrito foi quantificado era necessário que a análise fosse realizada no mesmo dia da coleta, então, assim que coletadas, as amostras eram levadas em gelo ao Laboratório LAPEQ onde foram realizados os ensaios de quantificação.

As amostras coletadas para a quantificação da amônia podem ser mantidas sem aditivos se conservadas em geladeira e analisadas no máximo em 24 horas. No presente experimento foi necessário armazená-las por período maior, sendo assim, as amostras foram acidificadas ainda em campo a 0,01% de ácido sulfúrico (H_2SO_4) concentrado e preservadas em geladeira. Neste caso, pode-se analisar dentro de um prazo máximo de 28 dias.

Para cada amostra coletada os frascos foram identificados com as seguintes informações: data da coleta, horário, pH medido inicialmente, valor de pH ajustado e tipo de análise.

Determinação de Nitrito pela Reação de Griess (1879)

A reação mais comumente utilizada para determinação de nitrito é a reação de Griess (1879), baseada na reação de diazotização da sulfanilamida com nitrito, seguido do acoplamento do produto dessa reação com a N-1-naftiletilenodiamina em meio ácido.

O composto formado, de coloração púrpura, é proporcional à quantidade de nitrito presente na amostra e apresenta máximo de absorção em 540nm.

Preparo das soluções:

No preparo das soluções usar preferencialmente água tipo 1 (Milli Q) ou água deionizada. Neste experimento as soluções foram preparadas com água do tipo Milli Q.

- Solução do reagente colorimétrico (RC): formada pela mistura de 4 g de sulfanilamida com 0,100 g de cloridrato de naftiletilenodiamina e 10 ml de ácido fosfórico concentrado para 100 ml de solução. Após o preparo, esta solução foi

armazenada em frasco âmbar e mantida em geladeira para posterior utilização, no entanto, dentro do prazo de sete dias se a mesma se mantiver incolor, caso contrário deverá ser descartada.

- Solução padrão estoque (E_1) de nitrito de sódio ou potássio: contém o equivalente a 200 mg N/L. Para isto 0,986 g de NaNO_2 ou 1,214 g de KNO_2 deve ser dissolvido em 1 L de água Milli Q e adicionados 2 ml de clorofórmio depois de pronta. Deve ser armazenada em geladeira. Neste experimento foi utilizado NaNO_2 .

- Solução padrão estoque (E_2) de nitrito de sódio ou potássio contendo 20 mg N/L preparada pela diluição de 10 ml da solução estoque E_1 para o volume final de 100 ml. Deve ser armazenar em geladeira.

- Padrões de nitrito na faixa de 0,02 a 0,5 mg N/L preparados por diluição da solução estoque E_2 . Estes padrões devem ser preparados no momento da análise e sobras devem ser descartadas.

Procedimento:

Foram preparados 100 ml dos padrões, diluídos conforme as proporções da tabela abaixo. Depois de completado o volume, homogeneizar e transferir para frascos âmbar devidamente identificados:

Conc. padrão mgN/L	Alíquota solução E2	Volume final (c/ água)
0 (água)	0	100ml
0,02	100ul	100ml
0,05	250ul	100ml
0,10	500ul	100ml
0,20	1000ul	100ml
0,40	2000ul	100ml
0,50	5000ul	100ml

No momento da análise, a solução do reagente colorimétrico, os padrões e as amostras devem estar em temperatura ambiente.

Para cada concentração da curva padrão descrita acima adicionar 0,5 x o volume do reagente colorimétrico (exemplo: 4 ml do padrão 0,02 mg N/L e 2 ml do reagente colorimétrico), em triplicata, misturar e homogeneizar bem.

Para análise das amostras, os ensaios foram realizados da mesma forma, no entanto cada amostra dever ter o seu valor de absorvância da água sem a adição da solução do reagente colorimétrico. O quadro abaixo mostra como este procedimento foi realizado.

Identificação	Amostra (ml)	RC (ml)	Água (ml)	Determinação
Amostra A	4	2	0	Replicata 1 A
Amostra A	4	2	0	Replicata 2 A
Amostra A	4	2	0	Replicata 3 A
Branco amostra A	4	0	2	Branco amostra A
Amostra B	4	2	0	Replicata 1 B
Amostra B	4	2	0	Replicata 2 B
Amostra B	4	2	0	Replicata 3 B
Branco amostra B	4	0	2	Branco amostra B

Após 20 minutos da adição do reagente colorimétrico, as absorvâncias devem ser medidas em 540 nm (região visível do espectro) para todos os meios reacionais preparados (padrões, amostras e branco das amostras).

As amostras que tiveram valores de absorvância acima da absorvância do padrão de maior concentração, foram diluídas com água Milli Q, e o branco da mesma amostra também, anotando-se o fator de diluição.

Determinação de Amônia pelo Método do Fenolato

O mecanismo proposto para a reação de Berthelot consiste na reação da amônia com íon hipoclorito, formando um composto intermediário chamado de monocloroamina (reação I). Na sequência, a monocloroamina reage com o fenol formando o composto intermediário da reação II. O intermediário da reação II também reage com fenol, produzindo um composto de coloração azul chamado de indofenol (reação III), o qual absorve em 632 nm. Nitroprussiato de sódio é geralmente incorporado no meio reacional porque aumenta a velocidade da reação e a sensibilidade do método. Citrato de sódio em meio alcalino é utilizado como complexante para evitar a interferência de cálcio e magnésio.

Preparo das soluções:

- Solução de nitroprussiato 0,5%.
- Solução alcalina de citrato de sódio 20% em NaOH 1%: Pesar 20 g de citrato de sódio di-hidratado e 1 g de NaOH. Misturar, dissolver e diluir em balão volumétrico para 100 ml.
- Hipoclorito de sódio 2,5%.
- Solução oxidante: 100 ml da solução alcalina de citrato de sódio misturada com 50 mL de hipoclorito de sódio 2,5%.
- Solução de fenol 0,126 mol/L: 11,1 ml de fenol liquefeito diluído para 100 ml com etanol absoluto. Densidade do fenol = 1,071g/ml; mw=94,11g/mol.
- Solução estoque E₁ contendo 3,819 g/L de NH₄Cl (1000mg N/L), preparada em H₂SO₄ 0,018 mol/L
- Solução estoque E₂ 100 mg N/L preparada a partir da solução E₁, diluída em H₂SO₄ 0,018 mol/L
- Padrões de NH₄Cl contendo 0,05; 0,1; 0,2; 0,5 e 1 mg N/L, preparados por diluição de E₂, em H₂SO₄ 0,018 mol/L

concentração (mgN/L)	alíquota de E ₂ = 100 mg/L	Vol. Final diluído com H ₂ SO ₄ 0,018 mol/L
0,05	50 µL	100 mL
0,1	100 µL	100 mL
0,2	200 µL	100 mL
0,5	500 µL	100 mL
1	1000 µL	100 mL

A utilização da solução de ácido sulfúrico no preparo dos padrões foi importante para equiparar sua acidez a das amostras (tornar as matrizes similares). Se o teor de

amônia nas amostras for superior à faixa analítica de trabalho, diluir as amostras e seus respectivos brancos também com esta solução de ácido sulfúrico.

Procedimento:

Para preparo dos meios reacionais de amostras e padrões, usar frascos âmbar de 10 ml para evitar a incidência de luz. É de extrema importância seguir a ordem de adição de reagentes recomendada. Qualquer alteração no procedimento leva à formação de produtos diferentes do indofenol. Todos os reagentes devem estar a temperatura ambiente no momento da análise.

Análise de amostras e padrões:

Alíquotas de 5 ml de cada um dos padrões na faixa de 0,05-0,1 mg N/L foram transferidas para os frascos âmbar de 10 ml, acrescentando-se em cada um deles 250 µl de solução do fenol, 250 µl de nitroprussiato de sódio 0,5% e 500 µl de solução oxidante. O conteúdo dos vidros foi homogeneizado após a adição de cada reagente. Os frascos foram tampados e armazenados no escuro por 1 hora.

Alíquotas homogêneas de 5 ml de amostras foram distribuídas em 3 diferentes vidros âmbar com capacidade para 10 ml cada um. Nos 2 primeiros vidros, foram acrescentados, como nos padrões, 250 µl da solução de fenol, 250 µl de nitroprussiato de sódio 0,5% e 500 µl da solução oxidante para a determinação do teor de amônia em duplicata, no terceiro vidro foi preparado o branco da amostra, acrescentando 1000 µl de água Milli Q. Todo conteúdo foi homogeneizado após a adição de cada reagente, então os frascos foram tampados e mantidos no escuro por 1 hora.

Após este período, os espectros dos padrões e das amostras, em duplicata e de seus respectivos brancos, foram aferidos em 632 nm. O aparelho foi calibrado com água Milli Q.

Anexo 2. Protocolos e procedimentos para as análises biomoleculares

Extração de RNA total

Em um microtubo de 1,5 ml eram colocadas 3 hipófises do mesmo grupo experimental, adicionados 500 µl de Trizol Reagent (Invitrogen Life Technologies), e eram então maceradas utilizando-se um homogeneizador elétrico com pistilo apropriado para microtubo de 1,5 ml e incubadas por 5 minutos a temperatura ambiente. Em seguida foram adicionados 0,1 ml de clorofórmio (Merck) e agitados vigorosamente por 15 segundos, incubados de 2-3 minutos em temperatura ambiente e foram submetidos à centrifugação de não mais que 12.000 g por 15 minutos a 4°C.

Após a centrifugação a mistura se separa em três fases: fase fenol-clorofórmio (vermelho claro), uma interface e fase aquosa, na face superior. É na fase aquosa que se encontra todo o RNA e o volume desta fase é de aproximadamente 60% do volume do Trizol Reagent utilizado para a homogeneização.

Esta fase aquosa foi transferida para um novo microtubo, evitando encostar a ponteira na interface e fase orgânica a fim de não carregar DNA e proteínas para a fase aquosa. Em seguida, foram adicionados 0,250 ml de isopropanol (Merck) para a precipitação do RNA, homogeneizado e incubado a temperatura ambiente por 10 minutos, centrifugado a 12.000 g por 10 minutos a 4°C. O RNA precipitado frequentemente é invisível antes da centrifugação e após este processo é possível visualizar um *pellet*, feito um gel, no fundo do tubo.

Descartado todo o isopropanol, o RNA foi lavado adicionando-se 0,5 ml de etanol (Merck) 75 %, homogeneizado e então foi submetido a centrifugação de não mais de 7.500 g por 5 minutos a 4°C.

No final do processo, descartado todo etanol, o RNA foi brevemente seco a temperatura ambiente, não por mais que 15 minutos, dissolvido em 10 µl de água livre de RNase passando-o várias vezes pela pipeta. A quantificação e a avaliação da pureza do material (razão 260/280nm) foram realizadas em espectrofotômetro e/ou no nanodrop.

Tratamento com DNA I RNase free

Para cada 1 µg de RNA foi adicionado 1 µl de 10x *buffer* com MgCl₂, 1 µl de desoxirribonucleoase I RNase *free* (1u/µl) e água livre de RNase para o volume final de 10 µl, homogeneizado com pipeta suavemente e incubado a 37°C por 30 minutos (protocolo fornecido pelo fabricante: Fermentas Life Science).

Re-extração do RNA total

Foi realizada da mesma maneira como descrito para a primeira extração. Porém foi feito ajuste do volume para cada amostra, da seguinte forma: para cada 0,25 ml de amostra digerida com Dnase I foi acrescentado 0,75 ml de Trizol LS Reagent (Invitrogen Life Technologies), 0,1 µg de glicogênio RNase *free* para 1,0 µl de reação segundo as instruções do fabricante Fermentas Life Science, e como as amostras digeridas não completaram este volume (0,25 ml), foi adicionado água livre de RNase, e então dado o mesmo tratamento. O volume dos outros reagentes utilizado foi proporcional ao volume de Trizol.

RT-PCR

Cada amostra foi processada em um microtubo livre de RNase, foi adicionado 1,0 µg de *primer* (Oligo dT – *Random*) para 2,0 µg de RNA total e água para um volume menor ou igual a 15 µl. Em seguida, os tubos foram aquecidos a 70°C por 5 minutos para fundir estruturas secundárias da amostra, resfriados em gelo imediatamente para evitar que a estrutura secundária se re-estabelecesse, e foram submetidos a uma breve centrifugação e mantidos no gelo.

Após este procedimento, foi adicionado a cada tubo uma mistura com 1,25 µl de dNTPs (10 mM), 5 µl do *buffer* 5x M-MLV (250 mM Tris-HCl pH 8,0 a 25°C; 375 mM KCl; 15 mM MgCl₂ e 50 mM DTT), 1,0 µl do Inibidor de ribonuclease (25 u) e 1,0 µl da enzima M-MLV (200 u), para um volume final de 25 µl para cada amostra.

Então, a mistura foi gentilmente homogeneizada e incubada por 60 minutos a 37°C (Protocolo fornecido pelo fabricante: Promega Product Information).

Reação em cadeia da polimerase (PCR)

A reação de amplificação foi realizada utilizando-se 1,0 µl do cDNA obtido na RT-PCR em um volume final de 50 µl, com os seguintes reagentes: 5,0 µl de *Buffer* 10x, 3,0 µl de MgCl₂ (25 mM), 1,0 µl dNTPs (10mM), 1,0 µl de oligo *Forward* (10µM), 1,0 µl de oligo *Reverse* (10µM), 0,4 µl de Taq DNA polimerase (500u), e 37,6 µl de água de seringa, todos os reagentes provenientes da Fermentas Life Sciences.

As sequências dos *primers* degenerados são as descritas por Parhar *et al.* (2003): oligonucleotídeo FSH *forward* (5'-ACC AAC ATC AGC ATC MCC GT-3') e FSH *Reverse* (5'-NC AGA CAG CTG GGT ATG T-3'), e LH *forward* (5'-TCT STG GAG AAG GAD GGC TG-3') e LH *reverse* (5'-CGA WGG TRC AGT CGG ANG TG-3') os códigos usados: D = A + G + T; M = A + C; N = A + C + G + T; R = A + G; S = G + C; W = A + T. Os fragmentos gerados por estes oligos devem apresentar cerca de 268 e 259 pares de bases (pb) respectivamente para FSH e LH.

Programa utilizado para a amplificação em gradiente:

- Tampa do termociclador aquecida a 105°C.

Passos do ciclo	Temperatura °C	Tempo
1°.	94	2 minutos
2°.	94	30 segundos
3°.	52 – 62,4 (R=3 G=5)	30 segundos
4°.	72	30 segundos
5°.	72	7 minutos

Os passos 2, 3 e 4 foram repetidos 40x, e são correspondentes respectivamente aos processos de desnaturação das dupla-fitas, associação dos oligos e extensão das fitas de DNA.

Purificação do fragmento amplificado

Após esta reação, os produtos de PCR de FSH e LH foram purificados, por eletroforese em gel de agarose (2%) e extraídos utilizando-se o Kit Zymoclean-gel DNA Recovery Kit (Zymo Research).

Eletroforese de DNA:

Cada amostra foi aplicada em gel de agarose 2% (2% de agarose em água e TAE 1x final – Tris acetato 40mM e EDTA 1mM – e brometo de etídeo 2,5 µg/l) em uma cuba de eletroforese preenchida por tampão TAE 1x e brometo de etídeo 2,5 µg/l. Foram aplicados 10 µl de cada amostra da PCR adicionando-se 1,0 µl de tampão de amostra (0,25% azul de bromofenol, 0,25% de xileno cianol FF, 15% Ficoll – tipo 400, Pharmacia) e foi também aplicado no gel 10 µl do marcador 100pb (Fermentas Life Science).

As amostras foram submetidas a eletroforese aplicando-se uma diferença de potencial de 7 Volts/cm por tempo suficiente para que as bandas do marcador utilizado estivessem bem distintas e isso era marcado pela migração do corante bromofenol em aproximadamente 2/3 ou 3/4 do comprimento do gel.

O gel foi visualizado sobre um transluminador – mesa com iluminação ultravioleta (modelo TFX, Life Technologies, EUA) cuja emissão de ondas ultravioleta permite a identificação das bandas de DNA (dupla-fita) intercalados com brometo de etídeo. O registro foi feito utilizando-se uma câmara digital (Kodak EasyShare C743. Kodak, EUA).

Extração da banda de interesse do gel de agarose

A partir do gel de agarose, a banda do fragmento esperado foi extraída com uma lâmina e transferida para um microtubo de 1,5 ml. Pesado o fragmento cortado, foi adicionado 3x o volume da solução ADB *Buffer*, incubado a 37°C de 5-10 minutos até que a agarose tenha sido dissolvida completamente.

Então, esta solução foi transferida para a coluna Zymo-Spin no tubo coletor, centrifugada a 12.000 rpm por 1 minuto, e a solução que passou para o tubo coletor neste processo foi descartada. Adicionou-se 200 µl de tampão de lavagem na coluna, e o tubo foi centrifugado novamente nas mesmas condições, foi descartado o que passou pela coluna e o processo de lavagem foi repetido.

Foram adicionados 10 µl de água diretamente na coluna, e a mesma foi colocada sobre um microtubo novo e centrifugado a 12.000 rpm por 1 minuto para a eluição do DNA.

Este produto foi quantificado em gel de agarose (2%) em comparação com o marcador λ *Hind* III, aplicando-se 3,0 µl de amostra 6,0 µl de água e 1,0 µl de tampão

de amostra. Esta quantificação permite realizar adequadamente a ligação deste fragmento com vetor plasmidial para posterior transformação bacteriana. O vetor utilizado foi o plasmídeo pGEM (pGEM-T Easy Vector Systems - Promega) e as bactérias competentes *Escherichia coli*. Recomenda-se que exista na reação de ligação 3x o volume, em moléculas, do fragmento em relação ao vetor.

Reação de ligação

Em um microtubo foi adicionado o fragmento a ser clonado (FSH/LH ~ 300pb 7,5 ng e EF1A ~ 57 pb 1,5 ng) na concentração de 3x o número de moléculas do vetor, pGEM (3000pb - 25 ng), tampão 5x, T4 DNA ligase (2u) e água para 20 µl. Foram realizados controles de ligação utilizando-se plasmídeos sem adição de qualquer fragmento sendo um experimento com e outro sem a enzima ligase. Cada amostra foi homogeneizada em vortex por 15 segundos, centrifugada brevemente e mantida em temperatura ambiente por 1 hora.

Transformação bacteriana

Foram utilizados 6 microtubos com 200 µl de solução de bactérias competentes *Escherichia coli* para cada situação apresentada a seguir:

- 1) Experimento FSH; 2) Experimento LH 3) Experimento EF1A 4) Controle da ligase; 5) Controle do vetor; 6) Controle da transformação com plasmídeo fechado PUC; 7) Controle do meio de cultura com ampicilina e manipulação com bactérias sem plasmídeo.

Estas bactérias foram descongeladas em gelo por 20 minutos e foram adicionados no microtubo 1) os 20 µl da reação de ligação do fragmento de FSH; no tubo 2) 20 µl da reação de ligação do fragmento de LH; tubo 3) 20 µl da reação de ligação do fragmento de EF1A; 4) os 20 µl da reação do vetor com ligase; tubo 5) os 20 µl do controle do vetor sem ligase; no tubo 6) 20 ng do plasmídeo PUC; e nada foi adicionado ao tubo 6). Cada tubo teve seu conteúdo homogeneizado delicadamente e todos permaneceram no gelo por mais 20 minutos.

Em seguida, foram incubados por 1,5 minutos a 42°C em banho-maria e foram colocados novamente no gelo por mais 2 minutos. A cada tubo foram adicionados 800 µl de meio de cultura SOC, contendo meio SOB (solução aquosa de: trptona 20 g/L,

extrato de levedura 5 g/L, NaCl 0,58 g/L, KCl 2,5 mM, MgCl₂ 10mM) e glicose, sem ampicilina e posteriormente os tubos foram incubados por 1 hora a 37°C em estufa.

As bactérias transformadas foram semeadas em meio SOB sólido contendo ampicilina (100µg/mL, Invitrogen), IPTG e 0,04% de X-Gal (Invitrogen), sendo duas placas para cada ensaio: uma placa com apenas 100 µl de bactérias transformadas e outra com o equivalente aos 900 µl restantes (pois, foram centrifugados descartado ~ 700 µl e semeados ~ 200 µl), as placas foram incubadas por 20 horas a 37°C.

Obtenção dos clones transformados e extração de DNA plasmidial

Após a avaliação dos controles que seria a eficiência das bactérias pela incorporação do plasmídeo PUC; a ausência de bactérias no controle de manipulação; e poucas colônias azuis nas placas que continham o vetor sem fragmento de inserção com e sem ligase; 8 colônias brancas resultantes da transformação bacteriana com plasmídeos contendo o fragmento de inserção putativo para FSH, LH e EF1A, foram selecionadas, coletadas com palito estéril e colocadas em tubos de ensaio contendo 3 ml de meio SOB com 3 µl de ampicilina (100 µg/µl) então, foram mantidas sob agitação a 250 rpm por 20 horas a 37°C.

Após este período, as culturas bacterianas foram centrifugadas brevemente a fim de se descartar o meio de cultura. A cada uma delas foi adicionado 300 µl da solução de lise I (Tris HCl pH 8,0 50 mM, EDTA 10 mM, RNase 100 µg/ml) e foram homogeneizadas em vortex. Em seguida, foram adicionados 300 µl de outra solução de lise II (NaOH 0,2 N, SDS 1%), e todos os tubos foram incubado em temperatura ambiente por 5 minutos, após este período foram adicionados 300 µl de acetato de potássio 3 M então os tubos foram brandamente invertidos e deixados no gelo por 10 minutos.

Logo após, os tubos foram submetidos à centrifugação por 10 minutos a 12.000 rpm em temperatura ambiente, então a fase aquosa foi recuperada em um novo microtubo e acrescidos 600 µl de clorofórmio, homogeneizado em vórtex e mais uma vez foram centrifugados a 12.000 rpm por 5 minutos. Novamente o sobrenadante foi recuperado em outro tubo e foram adicionados 400 µl de isopropanol, para a precipitação do DNA, homogeneizando-se em vortex.

Em seguida, os tubos foram centrifugados a temperatura ambiente por 15 minutos a 14.000 rpm, após a centrifugação o sobrenadante foi descartado e foram adicionados 600 µl de etanol 70%, mais uma vez foram centrifugados a 14.000 rpm por 5 minutos, em seguida todo o etanol 70% foi descartado, os tubos foram mantidos em temperatura ambiente para que o *pellet* secasse e então os mesmos foram ressuspensos em 50 µl de TE (Tris 10 mM e EDTA 1,0 mM).

Digestão plasmidial

Para cada clone foi realizada a seguinte reação: 2,0 µl do DNA plasmidial, 1,0 µl do tampão 10x (para a enzima NOT), 0,3 µl da enzima NOT (3u), água para um total de 10 µl final de reação. Os reagentes foram homogeneizados com a pipeta deixados por uma hora a 37°C (Invitrogen).

Após a digestão, os 10 µl da reação de digestão e a mesma massa de DNA plasmidial não digerido (2,0 µl) de cada clone foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 2% tendo sido adicionados 1,0 µl de tampão de amostra e o marcador utilizado foi o 100pb (Fermentas Life Science). Isto foi realizado para a verificação da presença do plasmídeo, eficiência da extração do DNA plasmidial, e do tamanho do fragmento inserido.

Reação para sequenciamento

Para esta reação foram utilizados 2,0 µl de cada amostra de DNA plasmidial extraído, 7,0 µl do tampão Save Money (200 mM Tris-HCl pH9,0 e 5 mM MgCl₂) 3,0 µl do primer T7 ou SP, em reações distintas, (3.2 µM, Invitrogen), 1,0 µl de Big Dye V3.0 (Applied Biosystem), 8,0 µl de água, em um volume final de 20 µl. A reação foi submetida ao termociclador nas seguintes condições: 96°C por 90 segundos, seguidos de 49 ciclos de 96°C por 20 segundos, 55°C por 20 segundos e 60°C por 4 minutos.

Reação de precipitação do DNA marcado

Para cada reação foram adicionados 33,3 µl do mix descrito a seguir:

Mix para 16 amostras: 550 µl de etanol 100%, 22 µl de NaOAc 3 M pH 5,2 e 22 µl de glicogênio 1ug/µl.

As amostras com o *mix* foram homogeneizadas em vortex, e mantidas por 15 minutos no freezer -20°C. Após este período, foram centrifugadas a 12.000 rpm por 10 minutos a 4°C, todo o sobrenadante foi desprezado, e foram adicionados 50 µl de etanol 70% gelado a cada tubo. Os tubos foram centrifugados novamente nas mesmas condições, foi desprezado todo o etanol, e as amostras foram secas por 1 minuto a 96°C. As amostras foram embrulhadas em alumínio e armazenadas em freezer -20°C até o momento do sequenciamento.

Observações:

Durante todo o procedimento descrito a cima foi tomado o cuidado de proteger as amostras da luminosidade.

O sequenciamento das amostras do presente trabalho foi realizado pelo Instituto de Química da Universidade de São Paulo.

Extração em larga escala de DNA de plasmídeos de culturas bacterianas

Foi feito um inóculo de 25mL da bactéria com o plasmídeo de interesse (FSH, LH e EF1A) em 500 ml de SOB contendo ampicilina e cada recipiente foi mantido em um agitador a 250 rpm a 37°C por um período de 12 a 18 horas. Em seguida, essas bactérias foram centrifugadas a 3000 g por 10 minutos a 4°C, então o meio de cultura foi descartado e as bactérias foram lavadas com 100 ml de STE (0,1M de NaCl; 10 mM de tris-HCl com pH 8,0; 1 mM de EDTA pH 8,0).

Posteriormente, foram centrifugadas a 3000 g por 10 minutos e ressuspensas em 20 ml de solução I (glicose 50 mM; 25 mM de Tris-HCl; 10 mM de EDTA pH 8,0). Depois foi adicionada lisozima e a solução foi deixada no gelo até mudar sua viscosidade. Quando ocorreu tal mudança foram adicionados 20 ml de solução II (0,2 N de NaOH e 1% de SDS) para cada 500 ml de cultura de cada um dos genes, então foram deixadas por 5 minutos em temperatura ambiente. Passado esse tempo, foram adicionados 20 ml da solução III (KOAc 3M) e os frascos foram deixados por 10 minutos no gelo.

Em seguida, foram centrifugados a 4000 rpm por 15 minutos a 4°C, e então essa solução foi passada em um filtro de gaze dupla. Ao filtrado, foi adicionado 0,6 volume de isopropanol e deixado por 10 minutos em temperatura ambiente. Depois foi centrifugado em 1500 rpm por 30 minutos em temperatura ambiente e o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com etanol 70% gelado.

Esse precipitado foi ressuspendido em TE e foi dissolvido 1g de cloreto de cézio para cada ml da solução de DNA. Em seguida, adicionou-se 0,8 ml de brometo de etídeo 10 mg/ml para cada 10 ml da solução de DNA e centrifugou-se por 5 minutos a 8000 rpm. Essa solução foi transferida para tubo de ultracentrifugação e centrifugada utilizando os seguintes passos: 100000 g por 4 horas e 45 minutos, 98000 g por 15 minutos, 94000 g por 30 minutos, 90000 g por uma hora e 84000 g por até 34 horas.

A banda correspondente ao plasmídeo foi coletada utilizando-se uma seringa com agulha e o brometo de etídeo foi retirado por lavagens sucessivas com um volume de 1-butanol saturado com cloreto de sódio 1M. Essa solução contendo o plasmídeo foi dialisada em TE por um período de 4 horas por troca de tampão, totalizando 5 trocas. A solução resultante foi quantificada em espectrofotômetro (GeneQuant *pro*, Amersham Biosciences). A pureza da amostra foi averiguada pela razão entre as absorbâncias dos comprimentos de ondas 260/280 nm.