

Mestrado em Biologia Marinha
2014/2015

*Avaliação do Impacto de Poluentes
Estrogénicos em Peixes*

Victor de Sousa Mendes

Tese para Obtenção do Grau de Mestre em Biologia Marinha

Faro

2015

Mestrado em Biologia Marinha

2014/2015

*Avaliação do Impacto de Poluentes
Estrogénicos em Peixes*

Victor de Sousa Mendes

Tese para obtenção do Grau de Mestre em Biologia Marinha

Orientadora: Professora Doutora Patrícia Pinto
Coorientadora: Professora Doutora Dulce Estêvão

Faro

2015

Avaliação do Impacto de Poluentes Estrogénicos em Peixes

Declaração de autoria de trabalho

Declaro ser o autor deste trabalho, que é original e inédito. Autores e trabalhos consultados estão devidamente citados no texto e constam da listagem de referências incluída.

O autor:

Victor de Sousa Mendes

Direitos de cópia ou Copyright

© **Copyright:** Victor de Sousa Mendes

A Universidade do Algarve tem o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicitar este trabalho através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, de o divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

*"Eu Não Sei Nada,
Mas Sei Aprender,
E Aprendo Rápido!"*

(Victor Mendes, 2015)

DEDICATÓRIA

Dedicado este trabalho, em memória do meu Irmão Wilson Ferreira Mendes e da minha irmã Leiny Furtado Mendes, ambos vítima de acidente de viação.

Devemos ser mais prudentes, quando estamos a lidar com a sensibilidade e a vida dos outros, porque um segundo é suficiente par cicatrizar uma vida.

Descansem em paz! Wilson e Leiny.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus, pela força, coragem e motivação durante todo o meu percurso académico que está a culminar nessa fase com esse trabalho.

À professora Doutora Patrícia Pinto, pela aceitação, coordenação, acolhimento no laboratório e por ter contribuído para o meu desenvolvimento académico e para o aumento do meu conhecimento científico nessa nobre área do conhecimento.

À professora Doutora Dulce Estevão, pela aceitação, coorientação desse trabalho, pelas nobres palavras motivadoras para aliciamento no tema, pelo tempo disponibilizado e por ter contribuído no meu engajamento em entender e perceber essa área do saber.

À Dra. Soraia Santos, enquanto técnica do projeto, com jeito meiga durante todo o trabalho, pelos preciosos ensinamentos das técnicas laboratoriais, pela paciência, pelas horas gastas em prol dos outros e principalmente pelo espírito de interajuda.

Ao Mestre André Andrade, enquanto técnico do projeto, pela atenção, paciência e ensinamento das técnicas laboratoriais.

A todos os elementos do grupo de endocrinologia molecular e comparada que, de algum modo, contribuíram para a minha integração nos trabalhos laboratoriais, por todas as ajudas e pelo bom ambiente proposto.

A todos os membros da coordenação do Mestrado em Biologia Marinha, em especial a professora Doutora Alexandra Teodósio, pela toda atenção e interajuda no decorrer do curso.

A todos os meus amigos e amigas um enorme apreço de consideração, principalmente os que estão nessa lista, que sei que há muitos mais que não estão aqui mas tem o seu lugar reservado sempre.

Aos meus amigos, Leonel Lucindo (Ginkelo), Amândio Lopes, Jorge Fernandes (Dukinha), Marlino Guilherme, Jailson Soares, Luís Gomes, Saturnino Borges (Silvino), Albertino Alberto (Dibeto), Carlos Lopes (Txarlis), Steve (Txuro), Humberto Júnior (Zuca), António Costa (Txabeta), António Correia (Xindoco), Adilson Tavares (Jacob), Elisangela Delgado (Ely), Maria Amarante (Nhonha), Ailine Lopes (Aline), Katy Fernandes (Katy) e Maria Semedo (Leiny) por toda a força nos momentos menos bom do meu percurso mas também pelos momentos de convivência e confraternização.

A todos os membros da Secção Autónoma dos Estudantes Africanos na Universidade do Algarve (SAEAualg), pelo contributo dado no meu enquadramento e engajamento na comunidade académica em especial na comunidade africana.

Ao Francisco dos Reis, Acácio Gongga, Isaque Silva, Stivam Santos e João Júnior pelos momentos compartilhados no nosso grande lar, residência universitária Lote O.

A Dona Lina e Noémia, pelas chamadas de atenção e companhia meiga na residência universitária, ajudando no maior engajamento na nossa família universitária.

À Domingas Quiatuhanga, Suzana Nicolau e Nelson Baião e a todos colegas do curso pela contribuição no meu engajamento e integração e por fim pela construção da nossa grande família dos primos, que no futuro irá produzir os seus frutos com certeza.

A toda família Fernandes em França (Paris), principalmente à Ginkelo, Dukinha, Dá, Rui, Copinho, Ady, Mingo, Lena, Maísa, Nununa, Neno, Teresa, Soraia, Sónia, Muna e Amílcar pelo

AGRADECIMENTOS

nobre acolhimento proporcionado e pelo espírito pertença que os proporciona, tornando-me num autêntico membro da família.

A todos os meus tios, tias e primas em Cabo Verde, pelas palavras calorosas e de incentivo dado para chegar onde cheguei.

À minha Tia Maria Fátima Mendes, pelas chamadas de atenção em todos os momentos menos esperados, mas também pelas grandes conversas meigas e grandes momentos de descontração proposto.

À minha Tia Maria Jesus Furtado, pelas conversas meigas e pelo todo espírito de interajuda em tentar compreender e ajudar no que é necessário.

À minha Tia Cesaltina Furtado, pela companhia mas também pela disponibilidade em tentar mostrar-me perceber o outro lado da vida.

A todos os meus irmãos e irmãs pelas chamadas de atenção e palavras de incentivo dado para chegar onde cheguei.

Aos meus primos, Frederico Tavares, Priscila Djenifer Varela, Jéssica Furtado, Cláudia Fernandes, Tatiana Semedo, André Fernandes, pelas convivências proporcionadas na minha estadia em Portugal.

Ao Evandro Tavares e Catarina Tavares, por me terem acolhido em suas casas e pelos momentos de confraternização durante a minha estadia.

Ao Dr. Carlos Veiga, pelas ajudas concebidas, no decorrer dessa caminhada.

A Câmara Municipal do Tarrafal, na pessoa do Presidente da Assembleia Municipal Dr. João Domingos, Presidente da Câmara Municipal Dr. José Pedro Soares e vereadores (Mestre José Soares, Eng.º. João Soares, Mestre Ricardo Rodrigues, Dr. Inácio Costa e Sra. Júlia Silva) pela política de formação do homem, cingido a educação.

Ao Marcelino Landim, Anilda Tavares, Octávio Varela e Policápio pelos momentos compartilhados durante a minha estadia como técnico da Câmara Municipal do Tarrafal de Santiago.

À minha Mãe Maria Furtado, por tudo o que ela vez por mim e que de algum modo aprende a lidar com os princípios da sociedade.

Aos meus Avos maternos, Francisco Furtado e Luiza Furtado, aproveitando ao mesmo tempo para parabeniza-los pelos seus 55 anos de casados proporcionado a família o dom da vida para perceber que vida tem os dois lados da moeda.

Ao meu pai Arnaldo Mendes, pela ajuda e conselho dado não só nesse percurso mais em tudo que ele fez em prol de mim tornando-o no que me tornei hoje.

Um agradecimento ainda mais especial aos meus Avôs paterno, Adelina Mendes e Paulo Delgado que as vossas almas se descansem em paz.

RESUMO

A contaminação com micropoluentes tem aumentado expressivamente nos últimos anos devido ao lançamento de resíduos industriais e domésticos no meio aquático. A acumulação destes poluentes pode afetar a sobrevivência e fisiologia dos organismos aquáticos incluindo o funcionamento do sistema endócrino, provocando uma possível acumulação e transferência na cadeia trófica. Um grupo particularmente afetado são os peixes, com elevado potencial de entrada de poluentes através das brânquias, pele/escamas e por ingestão de organismos contaminados, estando expostos por longos períodos de tempo e podendo bioacumular os poluentes. Com este trabalho, foi investigado o impacto da exposição a poluentes aquáticos nos ciclos de deposição/reabsorção de cálcio nas escamas de duas espécies de peixe, *Dicentrarchus labrax* (robalo) e *Oreochromis mossambicus* (tilápia), escolhidas como espécies modelo. As escamas dos peixes teleósteos são tecidos calcificados que contêm osteoblastos e osteoclastos, células responsáveis respetivamente pelos ciclos de deposição e reabsorção de minerais. A expressão dos recetores de estrogénio nucleares (ER α , ER β a e ER β b) e membranas (GPER) foi identificada nas escamas, suportando o seu potencial de responsividade a compostos estrogénicos. Seguidamente, foi aplicado um bioensaio de tratamento *in vitro* das escamas, para avaliar os efeitos da exposição a compostos poluentes organoestânicos, como o trifenilestano (TPT), e a ftalatos, como o (di-(2-etil-exil) ftalato (DEHP) e o butilbenzil ftalato (BBP), possíveis disruptores endócrinos estrogénicos. Os efeitos de tratamentos rápidos (30 minutos) e longos (24 horas) a diferentes concentrações (10^{-10} M, 10^{-8} M e 10^{-6} M) destes compostos foram medidos em termos das alterações na atividade de enzimas relacionadas com formação da matriz mineralizada, fosfatase alcalina (ALP), e com a reabsorção do tecido mineralizado, fosfatase ácida resistente ao tartrato (TRAP).

Nas escamas de robalos e tilápias, a atividade da TRAP não foi afetada pelo composto TPT, mas nos robalos a atividade da ALP foi aumentada por TPT, após tratamento com 10^{-6} M, durante 30 minutos. O DEHP, com a concentração 10^{-8} M, foi o tratamento que aumentou a atividade da TRAP em ambos os tempos do ensaio, nas escamas dos robalos. Nas escamas de tilápias, a atividade das enzimas não foi afetada pelo composto DEHP. Em escamas de robalo, a atividade da TRAP e da ALP não se alterou em resposta a BBP, enquanto em escamas de tilápias este composto diminuiu a atividade da ALP.

Em conclusão, TPT, DEHP e BBP afetaram tanto marcadores de reabsorção (atividade osteoclástica, medida pela atividade da TRAP) como de síntese da matriz mineralizada (atividade osteoblástica, medida pela atividade da ALP). O TPT parece não afetar a reabsorção das escamas de robalos e tilápias, afetando apenas o indicador de mineralização das escamas dos robalos em concentrações de 10^{-6} M, aplicadas por 30 minutos. O DEHP aumentou o indicador de deposição mineral em escamas de robalos em período de resposta curta e longa em concentrações de 10^{-8} M. O BBP não alterou o indicador de reabsorção do cálcio da matriz das escamas dos robalos e das tilápias. Estes resultados sugerem que a exposição ambiental a estes compostos poderá afetar a homeostasia dos tecidos mineralizados em peixes, com possíveis consequências para a sua saúde.

Palavras-chave: Escamas de peixes, poluentes estrogénicos, TRAP, ALP, osteoclasto e osteoblasto

ABSTRACT

Micropollutant pollution has significantly increased in recent years due to the release of industrial and domestic wastes into the aquatic environment which may affect survival and physiology of aquatic organisms, including the functioning of the endocrine system, causing a possible accumulation and transfer in the food chain. Fish are particularly affected as they have a high input potential through the gills, skin/scales and by ingestion of contaminated organisms, being exposed for long periods of time and possibly accumulating the pollutants. In this work, the impact of exposure to pollutants in the water on cycles of calcium deposition/resorption in scales in two fish species was investigated, *Dicentrarchus labrax* (Sea bass) and *Oreochromis mossambicus* (tilapia), chosen as model species. The scales of teleost fish are calcified tissue containing osteoblasts and osteoclasts, the cells responsible for the deposition and resorption of minerals, respectively. The expression of nuclear estrogen receptors (ER α , and ER β a ER β b) and membrane (GPER) was identified on the scales, supporting its potential responsiveness to estrogenic compounds. A bioassay of *in vitro* treatment of scales was applied to evaluate the effects of exposure to organotin compounds, such as triphenyltin (TPT), and phthalates, such as (di (2-ethyl-hexyl) phthalate (DEHP) and butylbenzyl phthalate (BBP). The effects of these compounds were tested at different concentrations (10^{-10} M, 10^{-8} M and 10^{-6} M), after rapid (30 minutes) and long (24 hours) treatments, by measuring the activity of enzymes associated with the mineralized matrix formation, alkaline phosphatase (ALP), and resorption, tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP).

In scales of both sea bass and tilapia, the TRAP activity was not affected by TPT, but in sea bass ALP activity was increased by TPT after treatment with 10^{-6} M for 30 minutes. DEHP, at the concentration 10^{-8} M, was that treatment increased the activity of TRAP in both the test time, the scales of sea bass. In sea bass scales, TRAP and ALP activities did not change in response to BBP, while in tilapia scales this compound decreased the activity of ALP.

In conclusion, TPT, DEHP and BBP affected markers of both both resorption (osteoclast activity as measured by the activity of TRAP) and synthesis of mineralized matrix (osteoblastic activity, as measured by the activity of ALP). TPT did not appear to affect resorption of both sea bass and tilapia scales but the scale mineralization indicator was modified in sea bass treated at concentrations of 10^{-6} M, applied for 30 minutes. DEHP increased mineral deposition indicator on sea bass scales after short and long treatments at concentrations of 10^{-8} M. BBP did not appear to affect calcium resorption from scale matrix of both sea bass and tilapia. These results suggest that environmental exposure to the tested compounds may affect the homeostasis of mineralized tissues in fish, with potential consequences for their health.

Key word: Fish scales, estrogenic pollutants, TRAP, ALP, osteoclast and osteoblast

ÍNDICE GERAL

DEDICATÓRIA	I
AGRADECIMENTOS	II
RESUMO	IV
ABSTRACT	V
ÍNDICE GERAL	VI
ÍNDICE DE FIGURAS	VIII
ÍNDICE DE TABELAS	IX
ÍNDICE DE ABREVIATURAS	X
<i>Capítulo 1 - INTRODUÇÃO</i>	1
1. INTRODUÇÃO	2
1.1. Espécie modelo para estudo	3
1.1.1. Robalo (<i>D. labrax</i>)	4
1.1.2. Tilápia (<i>O. mossambicus</i>)	5
1.2. Tecidos mineralizados em peixe	6
1.2.1. Cartilagem	7
1.2.2. Osso	8
1.2.2.1. Células do tecido ósseo	9
1.2.2.1.1. Osteócitos	9
1.2.2.1.2. Osteoblastos	10
1.2.2.1.3. Osteoclastos	10
1.3. Tipos de ossificação	11
1.3.1. Ossificação intramembranosa	12
1.3.2. Ossificação endocondral	13
1.4. Escamas	13
1.4.1. Tipos de escamas	14
1.5. Homeostase óssea	15
1.6. Hormonas que atuam sobre o tecido ósseo	16
1.7. Marcadores biológicos da atividade enzimática nas células ósseas	19
1.7.1. TRAP	19
1.7.2. ALP	19
1.8. Disrupção endócrina	20
1.8.1. Disrupção endócrina estrogénica	21
1.9. Mecanismos de ação dos estrogénios e dos EDCs	22
1.10. Classes de disruptores endócrinos	23
1.10.1. Compostos organoestânicos	24

1.10.2. Ftalatos	25
<i>Capítulo 2 - OBJETIVOS</i>	28
2. OBJETIVOS	29
2.1. Objetivo geral	29
2.2. Objetivos específicos	29
<i>Capítulo 3 - METODOLOGIA</i>	30
3. METODOLOGIA	31
3.1. Espécies utilizadas	31
3.2. Amostragem	31
3.3. Determinação da expressão dos genes para recetores de estrogénio	32
3.3.1. Extração de RNA de escamas	32
3.3.2. Síntese de cDNA	34
3.3.3. PCR aos recetores estrogénicos	35
3.4. Ensaio de escamas <i>in vitro</i>	36
3.5. Quantificação da atividade enzimática	37
3.5.1. Curva de calibração	38
3.5.2. Quantificação da atividade enzimática nos meios de incubação	39
3.5.3. Análises estatísticas	39
<i>Capítulo 4 - RESULTADOS</i>	40
4. RESULTADOS	41
4.1. Determinação da expressão dos recetores de estrogénio em escamas	41
4.2. Efeitos do TBT nas atividades enzimáticas TRAP e ALP	42
4.3. Efeitos do DEHP nas atividades enzimáticas TRAP e ALP	44
4.4. Efeitos do BBP nas atividades enzimáticas TRAP e ALP	47
<i>Capítulo 5 - DISCUSSÃO</i>	51
5. DISCUSSÃO	52
<i>Capítulo 6 - CONCLUSÃO</i>	60
6. CONCLUSÃO	61
<i>Capítulo 7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</i>	62
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63
<i>Capítulo 8 - ANEXOS</i>	74
8. ANEXOS	75
8.1. Anexo 1 – Preparação das soluções	75

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1: Robalo - <i>D. labrax</i> .	4
Figura 1.2: Tilápia - <i>O. mossambicus</i> .	5
Figura 1.3: Estrutura celular do osso.	9
Figura 1.4: Tipos de escamas encontradas em peixes ósseos.	15
Figura 1.5: Mecanismos envolvidos nas ações celulares dos estrógenos naturais e dos compostos de desregulação estrogénicos endócrinos.	22
Figura 1.6: Estrutura química do composto trifenilestanho (TPT).	24
Figura 1.7: Estrutura química dos compostos ftalatos. a - butilbenzil ftalato (BBP) e b - di-(2-etil-exil) ftalato (DEHP).	26
Figura 3.1: Robalo e tilápia com as zonas da extração de escamas marcadas.	32
Figura 3.2: Exemplo de desenho experimental do ensaio <i>in vitro</i> (ALP e TRAP).	37
Figura 4.1: Representação da expressão dos genes recetores estrogénicos em escamas de robalos e na tilápia, por RT-PCR semi-quantitativo.	41
Figura 4.2: Efeito do TPT sobre a atividade da TRAP em escamas de robalos, incubadas durante 30 min e 24 h.	42
Figura 4.3: Efeito de TPT sobre a atividade da ALP em escamas de robalos, incubadas a 30 min e 24 h.	43
Figura 4.4: Efeito de TPT sobre a atividade da TRAP em escamas de tilápia, incubadas a 30 min e 24 h.	43
Figura 4.5: Efeito de TPT sobre a atividade da ALP em escamas de tilápia, incubadas a 30 min e 24 h.	44
Figura 4.6: Efeito de DEHP sobre a atividade da TRAP em escamas de robalos incubadas a 30 min e 24 h.	45
Figura 4.7: Efeito de DEHP sobre a atividade da ALP em escamas de robalos, incubadas a 30 min e 24 h.	45
Figura 4.8: Efeito de DEHP sobre a atividade da TRAP em escamas de tilápia, incubadas a 30 min e 24 h.	46
Figura 4.9: Efeito de DEHP sobre a atividade da ALP em escamas de tilápia, incubadas a 30 min e 24 h.	46
Figura 4.10: Efeito de BBP sobre a atividade da TRAP em escamas de robalos, incubadas a 30 min e 24 h.	47
Figura 4.11: Efeito de BBP sobre a atividade da ALP em escamas de robalos, incubadas a 30 min e 24 h.	48
Figura 4.12: Efeito de BBP sobre a atividade da TRAP em escamas de tilápia, incubadas a 30 min e 24 h.	48
Figura 4.13: Efeito de BBP sobre a atividade da ALP em escamas de tilápia, incubadas a 30 min e 24 h.	49

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1.1: Algumas classes de compostos com e sem efeitos disruptores endócrinos no metabolismo ósseo dos mamíferos e peixes. 23

Tabela 3.1: Mix de síntese de cDNA. 34

Tabela 3.2: Condições dos ciclos de síntese de cDNA com os seus respetivos tempos e temperatura. 34

Tabela 3.3: Sequência dos primers para 18S..... 35

Tabela 3.4: Listas dos primer usado na expressão de cada gene em PCR semi-quantitativo, aos recetores nucleares e membranares..... 36

Tabela 3.5: Condições otimizadas do ensaio em função das condições de reação e enzimas. 38

Tabela 4.1: Resumo dos efeitos dos disruptores endócrinos testados (TPT, DEHP e BBP) na atividade das enzimas relacionadas com a homeostase dos tecidos mineralizados (TRAP e ALP), em escamas de robalo e tilápia após exposições de 30 min e 24 h. 50

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ALP - Fosfatase Alcalina (*alkaline phosphatase*)

BBP - Butilbenzil ftalato

C. auratus - *Carassius auratus* (peixe dourado)

DBP - Di-n-butil ftalato

DCHP - Dicicloexilo ftalato

DDT - Diclorodifeniltricloroetano

DEHP - Di-(2-etil-exil) ftalato

DEP - Dietil ftalato

DEPC - H₂O bicarbonato de dietilo (*diethyl dicarbonate*)

DIBP - Di-iso-butil ftalato

DIDP - Di-iso-decil ftalato

DINP - Di-iso-nonil ftalato

DIOP - Di-isoetil ftalato

DNA - Ácido Desoxirribonucleico (*Deoxyribonucleic Acid*)

DMP - Dimetil ftalato

DOP - Di-n-oetil ftalato

DE - Disruptores Endócrinos

D. labrax - *Dicentrarchus labrax* (robalo)

E₂ – Estradiol

ECB - Departamento Europeia de Produtos Químicos (*European Chemical Bureau*)

EDCs - Disruptores endócrinos estrogénicos

ER - Recetores de Estrogénios

ER α - Recetor Estrogénio *alfa* (*Estrogen Receptor alpha*)

ER β _a - Recetor Estrogénio *beta a* (*Estrogen Receptor beta a*)

ER β _b - Recetor Estrogénio *beta b* (*Estrogen Receptor beta b*)

EU - União Europeia (*European Union*)

EPA - Agência de Proteção Ambiental (*Environmental Protection Agency*)

GPER - Recetores de Estrogénio Acoplado à Proteína G (*G Protein-Coupled Estrogen Receptor*)

ÍNDECE DE ABREVIATURAS

IPCS - Programa Internacional de Segurança Química (*International Programme on Chemical Safety*)

LEOA - Laboratório Experimental de Organismos Aquáticos

MEM - Meio Mínimo Essencial (*Minimum Essential Medium*)

MS-222 - Tricaína Metano Sulfonato (*Tricaine Methanesulfonate*)

OC - Compostos Organoclorados

O. mossambicus - *Oreochromis mossambicus* (tilápia moçambicana)

OECD - Desenvolvimento de Métodos de Ensaio para os DE (*Development of Assay Methods for the DE*)

PCB - Bifenilos policlorados

PCR-quantitative - Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa (*Quantitative Polymerase Chain Reaction*)

PCR - Reação em Cadeia da Polimerase (*Polymerase Chain Reaction*)

pNP - p-Nitrofenol (*p-nitrophenol*)

pNPP - p-Nitrofenil-Fosfato (*p-Nitrophenyl Phosphate*)

POP - Poluentes Orgânicos Persistentes

PTH - Hormona Paratiróide

RNA - Ácido Ribonucleico (*Ribonucleic Acid*)

S. auratus - *Sparus auratus* (dourada)

TBT - Tributilestanho

TPT - Trifenilestanho

TRAP - Fosfatase Ácida Resistente ao Tartrato (*Tartrate-Resistant Acid Phosphatase*)

Capítulo 1 - INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Os micropoluentes (poluentes que estão presentes no meio ambiente em concentrações na ordem de μgL^{-1} e ngL^{-1}) têm aumentado expressivamente nos últimos anos, chamando muita atenção aos investigadores. Esta atenção deve-se, principalmente, aos efeitos destes poluentes no meio ambiente e, em particular, no ambiente aquático (Maia & Dezotti, 2007). Em consequência, os fármacos, os disruptores endócrinos (DE) e os poluentes orgânicos persistentes (POP) tornaram-se classes de substâncias muito investigadas (Maia & Dezotti, 2007; Omar, Saleh, & Marie, 2014).

Grandes esforços têm sido feitos na busca de soluções e alternativas para melhorar o quadro ambiental do nosso planeta, devido aos efeitos da poluição no mundo que têm servido de alerta para a população nos últimos anos, alterando visivelmente o crescente interesse pelo problema da contaminação que afeta a atmosfera, o solo, as florestas, os animais e os meios aquáticos. A biota e, em particular, a ictiofauna são prejudicadas pelo efeito danoso causado pelo lançamento de resíduos industriais e domésticos nos corpos de água que, além de alterarem as características físicas, químicas e biológicas da água, causam problemas de contaminação com poluentes e de eutrofização, com efeitos negativos para os peixes e outros organismos aquáticos e para a própria qualidade da água (Flavia, Godoi, & Favoreto, 2003; Souza et al., 2013).

Os hidrocarbonetos de petróleo, hidrocarbonetos halogenados, metais pesados, radioisótopos e matéria orgânica são considerados contaminantes críticos para os ecossistemas aquáticos (Denton, Concepcion, Wood, & Morrison, 2006). Dentro dos compostos halogenados, os compostos organoclorados (OC), os bifenilos policlorados (PCB) e alguns pesticidas (como, por exemplo, o diclorodifeniltricloroetano (DDT)), são compostos para os quais já foi demonstrado maior impacto no meio marinho. Apesar de o DDT já não ser utilizado, os demais ainda são utilizados com alguma frequência, acabando por chegar ao meio aquático por descargas nos cursos de água, escorrência dos solos ou por transporte atmosférico (Yogui, de Oliveira Santos, & Montone, 2003).

O aumento da poluição do ambiente aquático por metais pesados tem sido alvo de crescente interesse e tem suscitado uma grande variedade de estudos, com o intuito de avaliar os efeitos nas diversas espécies expostas (Al-Balwai, Al-Misned, Ahmad, & Al-Ghanim, 2013). Estes são considerados contaminantes críticos nos ecossistemas

aquáticos devido ao seu alto potencial de entrada nos organismos, acumulação e transferência na cadeia trófica. Os níveis de acumulação podem ser muito maiores do que aqueles encontrados no ambiente e pouco se sabe sobre os mecanismos da entrada, distribuição e seus efeitos exatos nos organismos aquáticos (Lichtenfels, Guimar, Macchione, Saldiva, & Poluifgo, 1996).

A diversidade e complexidade dos poluentes resultam em diversos efeitos biológicos que estão relacionados com as suas características químicas. Para além disso, como há um elevado número de contaminantes presente na água, além dos fatores abióticos envolvidos, há que considerar o efeito global da mistura pois pode haver interação entre eles com possíveis efeitos sinérgicos, antagónicos, de potenciação ou adição (Pinheiro & Valadares, 2012). A fisiologia de organismos aquáticos, tais como os peixes, pode ser fortemente influenciada pela contaminação nos ecossistemas aquáticos (Naigaga et al., 2011) pois estes podem estar expostos a poluentes por longos períodos de tempo e através de múltiplas vias, incluindo a entrada através das brânquias, pele ou por ingestão de água ou de sedimentos ou organismos contaminados, podendo também ocorrer uma bioacumulação de alguns desses compostos. Assim, os peixes podem ser usados como modelos de estudo nos programas de avaliação dos impactos ecológicos das atividades antrópicas (resultantes da ação humana) sobre o meio ambiente aquático. No entanto, o impacto de contaminantes tem sido sobretudo estudado na sobrevivência ou funções reprodutivas dos peixes, e pouca atenção se tem dado às alterações provocadas noutros processos biológicos (De Coster & Larebeke, 2012).

1.1. Espécie modelo para estudo

O robalo, *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758) (*D. labrax*) e a tilápia moçambicana, *Oreochromis mossambicus* (Peters, 1852) (*O. mossambicus*), são duas espécies de fácil cultivo na aquacultura e são espécies com elevada taxa de reprodução, o que os torna como modelos vertebrados importantes no que se refere à experimentação laboratorial. Assim, têm sido cada vez mais utilizados na investigação sobre problemas correntes, especialmente no que concerne a estudos comportamentais, estudos de reprodução, a estudo que envolvem técnicas histoquímicas, electromicroscópicas, bioquímicas, ecológicas e a estudos dos compostos químicos presentes no meio ambiente aquático.

1.1.1. Robalo (*D. labrax*)

Os robalos são indivíduos da classe Actinopterygii, ordem Perciformes, família Moronidae e género *Dicentrarchus*, espécie *D. labrax* (figura 1.1). Encontram-se distribuídos pelo Atlântico Leste, desde a Noruega a Marrocos, às ilhas Canárias e ao Senegal. Também são conhecidos no Mediterrâneo e no Mar Negro. É uma espécie que habita em águas costeiras, até à profundidade de cerca de 100 m (normalmente no inverno), bem como em águas salobras de estuários e lagunas costeiras (no verão), podendo, ocasionalmente, ser encontrado em rios. Os juvenis são agregados, especialmente durante as migrações sazonais, formando cardumes (Kottelat & Freyhof, 2008; Papadaki et al., 2005), que durante o início do verão estão albergados mais próximo da abertura dos rios e durante o inverno migram para zonas mais frias, as zonas que se encontra mais a norte (Reis-Santos, Tanner, Elsdon, Cabral, & Gillanders, 2013).

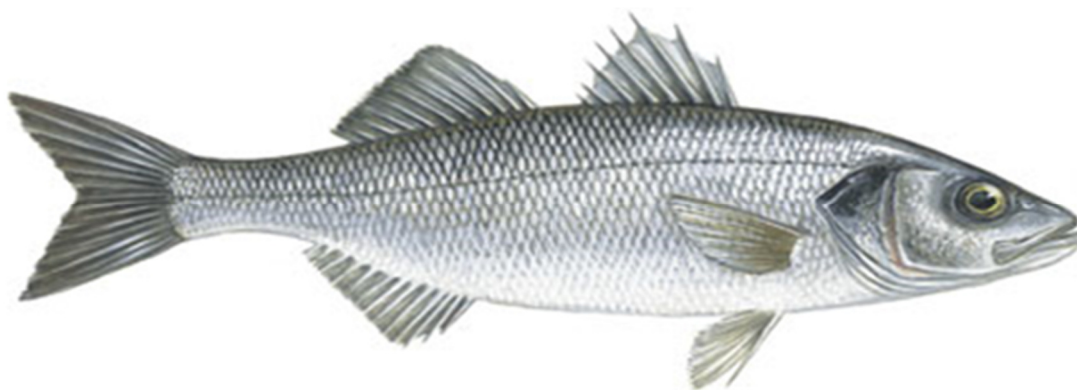


Figura 1.1: Robalo - *D. labrax* (Fischer & Schneider, 1987).

A alimentação desta espécie é à base de crustáceos, moluscos e peixes, principalmente na fase adulta (Reis-Santos et al., 2013). Os juvenis alimentam-se mais de crustáceos e moluscos, e só aperfeiçoam para a alimentação a base de vertebrados quando estão com idade mais avançada (Kousoulaki, Saether, Albrektsen, & Noble, 2015). Possuem ovos pelágicos e um único pico de desova durante o ano, que ocorre, normalmente, durante o início da primavera (Papadaki et al., 2005), ocorrendo a maturação das gónadas durante o inverno.

1.1.2. Tilápia (*O. mossambicus*)

A tilápia faz parte dos peixes africanos mais evoluídos, pertence à classe Actinopterygii, ordem Perciformes, família Cichlidae, género *Oreochromis* e espécie *O. mossambicus* (figura 1.2) (Kime & Hyder, 1983). Ocorre, naturalmente, na costa sudeste de África, no Baixo Zambezi e seus tributários, rios com direção oeste, e lagoas costeiras a sul do Rio Bushman, perto de Porto Elizabeth, na África do Sul (Bruton & Bolt, 1975). Em muitos países é considerada como espécie introduzida, por outro lado, é importante exemplo de peixe para o comércio, tanto em termos de pesca, como no que se refere à aquacultura e aquariofilia, sendo ainda uma espécie para a pesca desportiva.



Figura 1.2: Tilápia - *O. mossambicus* (Rainboth, 2003).

A tilápia é uma espécie que habita em águas doces e salobras, estando usualmente restrita a águas relativamente pouco profundas (Bruton & Bolt, 1975). É mais comum em estuários salobros e lagoas costeiras, mas pode também ser encontrada em lagoas quentes de correntes lentas, canais e lagos. É uma espécie tropical ocorrendo em temperaturas que vão desde de 8° C aos 42° C. É uma espécie geralmente omnívora, alimentando-se do que quer que esteja disponível, embora pareça mostrar preferência por matéria detritívora e plantas (Bruton & Bolt, 1975). Como acontece com a maioria dos ciclídeos, o seu crescimento ótimo ocorre próximo dos 30° C (Price, Stauffer, & Swift, 1985), com os machos a crescerem mais e mais rápido do que as fêmeas (Bruton & Allanson, 1974;

Bruton & Boltz, 1975). No entanto, as taxas de crescimento variam consoante a disponibilidade de alimento e a qualidade do habitat (Bruton & Allanson, 1974).

Possui um sistema de acasalamento semelhante a outros animais com reprodução em arenas. Durante o processo reprodutivo, os machos agregam-se em arenas de reprodução, em locais com fundo arenoso, onde escavam ninhos e defendem pequenos territórios centrados nesses ninhos de outros machos. As fêmeas movem-se em cardumes e visitam as arenas quando estão prontas para a postura, que ocorrem no substrato (Bruton & Boltz, 1975). As fêmeas transportam a descendência na boca até à sua independência (Oliveira & Almada, 1996). Como outros incubadores bucais, esta espécie é polígama, podendo os machos acasalar com várias fêmeas e estas, por seu turno, podem levar os seus ovos a vários machos, quando estes estão próximos. Em ciclídeos, os machos são geralmente mais coloridos que as fêmeas. O acasalamento é breve, tipicamente minutos, pelo que não se forma qualquer ligação entre o par. Durante a postura, a fêmea vira-se e vai recolhendo os ovos, enquanto o macho liberta o esperma, mas mesmo assim, alguns ovos são fertilizados já no interior da boca da fêmea. Por vezes as fêmeas morde a zona genital e/ou anal do macho para estimular a libertação do esperma. As fêmeas abandonam, seguidamente, as arenas, transportando os ovos na cavidade bucal (Bruton & Boltz, 1975). A reprodução não apresenta um pico sazonal claro, em águas tropicais reproduz-se durante todo o ano (Silva & Chandrasoma, 1980).

1.2. Tecidos mineralizados em peixe

Nos vertebrados, as estruturas mineralizadas desempenham, como funções principais a proteção, o apoio à locomoção e a regulação da homeostase mineral. O esqueleto dos peixes consiste num endosqueleto articulado, como nos mamíferos, mas também contém um exosqueleto formado por apêndices mineralizados, as escamas. Devido ao ambiente aquático habitado pelos peixes, o esqueleto é menos exposto a carga mecânica comparando com os vertebrados terrestres (Huyseune & Meunier, 1992).

O conhecimento da fisiologia e regulação do metabolismo ósseo é muito importante pois permite intervir de modo a prevenir o aparecimento de anomalias esqueléticas que constituem uma grande preocupação no caso dos peixes, uma vez que podem

comprometer a sua sobrevivência e o seu valor económico, quer na natureza, quer em aquacultura (Grosell, Farreal, & Brauner, 2011).

Em vertebrados terrestres, o osso serve como um reservatório de minerais, sendo a única fonte disponível externa a dieta; e assim, se houver um aumento da necessidade de cálcio (Ca), fósforo (P) ou outros minerais (ex. magnésio), o osso pode ser mobilizado (Guerreiro & Fuentes, 2007). Em contraste, as espécies de peixes marinhas estão rodeadas por uma fonte abundante de Ca que pode ser utilizada para colmatar as suas necessidades, enquanto o P é adquirido unicamente através da alimentação, que se torna uma fonte essencial para a aquisição deste ião. Por outro lado, para as espécies de água doce, há menos quantidade de iões Ca no ambiente, e, portanto, tal como nos mamíferos, a dieta é indispensável como fonte destes elementos. O desenvolvimento, crescimento e reprodução são processos condicionados pela quantidade de Ca, o que leva à mobilização do Ca e P de tecidos mineralizados quando existe uma carência. Em peixes, as escamas funcionam não só como uma barreira física e para melhorar a hidrodinâmica, mas têm também um papel importante na homeostase do Ca e do P, como será detalhado mais abaixo (Grosell et al., 2011; Suzuki, Suzuki, & Kurokawa, 2000). Segue-se uma secção sobre os diferentes tecidos mineralizados encontrados em peixes, a sua estrutura, desenvolvimento e funções.

1.2.1. Cartilagem

A cartilagem é um tecido de consistência rígida, embora menos resistente a pressões externas do que o tecido ósseo. É um dos primeiros tecidos adaptados para suportar peso e a sua eficiência nesse sentido é ultrapassada apenas pelo tecido ósseo, que tem as funções de suporte e proteção muito aperfeiçoadas (Junqueira & Carneiro, 2008). A cartilagem desempenha funções de suporte e de revestimento das superfícies articuladas, facilitando a movimentação. Possui uma superfície ligeiramente elástica e muito lisa, facilitando os deslizamentos. É constituída por células e abundante material extracelular, que forma a matriz. O seu funcionamento depende da estrutura físico-químico da matriz, que é constituída, maioritariamente, por colagénio, podendo incluir também elastina, em associação com glicoproteínas. A principal função das células é produzir uma matriz com características adequadas e mantê-la no estado normal (Junqueira & Carneiro, 2008).

Assim, as cartilagens são classificadas de acordo com a abundância e o tipo de fibras presentes na matriz: 1^a - A cartilagem hialina, que é mais comumente encontrada e cuja matriz possui moderada quantidade de fibras colágenas. 2 - A cartilagem elástica, que possui fibras colágenas e abundantes fibras elásticas, 3 - A cartilagem fibrosa, que apresenta matriz constituída quase inteiramente por fibras colágenas (Junqueira & Carneiro, 2005). Variações no teor e no tipo das fibras conferem propriedades especiais aos diferentes tipos de cartilagem. Nas áreas sujeitas a grandes pressões ou trações, o teor de fibras de colagénio é mais elevado, o que torna a cartilagem praticamente inextensível e muito resistente a tração. A presença de fibras, com reduzida percentagem de colagénio, dá origem a cartilagem fibrosa que é pouco rígida, flexível e elástica (Junqueira & Carneiro, 2008).

1.2.2. Osso

O osso é um órgão dinâmico que sente e que se adapta às forças mecânicas e desequilíbrios na homeostase mineral através dos processos de reabsorção e formação óssea (Junqueira & Carneiro, 2008; Lau et al., 2010). O osso é o constituinte principal do esqueleto, serve de suporte para as partes moles e protege os órgãos vitais, como os contidos nas caixas craniana, torácica e no canal raquidiano. Além dessas funções, proporciona apoio aos músculos esqueléticos, transformando as suas contrações em movimentos úteis, e constitui um sistema de alavancas que amplia as forças geradas na contração muscular. É um tecido com grande capacidade para suportar pressões (Junqueira & Carneiro, 2008).

O tecido ósseo é formado por células e um material intercelular calcificado, a matriz óssea (figura 1.3). Os tipos de célula encontrados no osso são 1 - os osteócitos, que se situam em cavidades ou lacunas no interior da matriz; 2 - os osteoblastos, produtores da parte orgânica da matriz; e 3 - os osteoclastos, células gigantes, normalmente multinucleadas, relacionadas com a reabsorção do tecido ósseo e que participam nos processos de remodelação dos ossos (Junqueira & Carneiro, 2005, 2008).

Nos peixes, tal como nos restantes vertebrados, o osso contém dois tipos principais de células: osteoblastos e osteoclastos, com funções idênticas às que desempenham nas outras espécies. O osso, nos peixes, é classificado como um tecido acelular por falta de osteócitos (Kardong, 1998), embora os salmonídeos e os ciprinídeos sejam uma exceção,

uma vez que possuem osteócitos na matriz óssea em alguns elementos do esqueleto e, portanto, são considerados como tendo ossos celulares (Huysseune & Meunier, 1992).

1.2.2.1. Células do tecido ósseo

As células do tecido ósseo podem subdividir-se em dois grupos, consoante a morfologia, atividade e localização em relação à matriz calcificada. Consideram-se, assim, as células da linha osteoblástica, responsáveis pelo processo de formação da matriz óssea e as células da linha osteoclástica, relacionadas com a sua reabsorção (Junqueira & Carneiro, 2008).

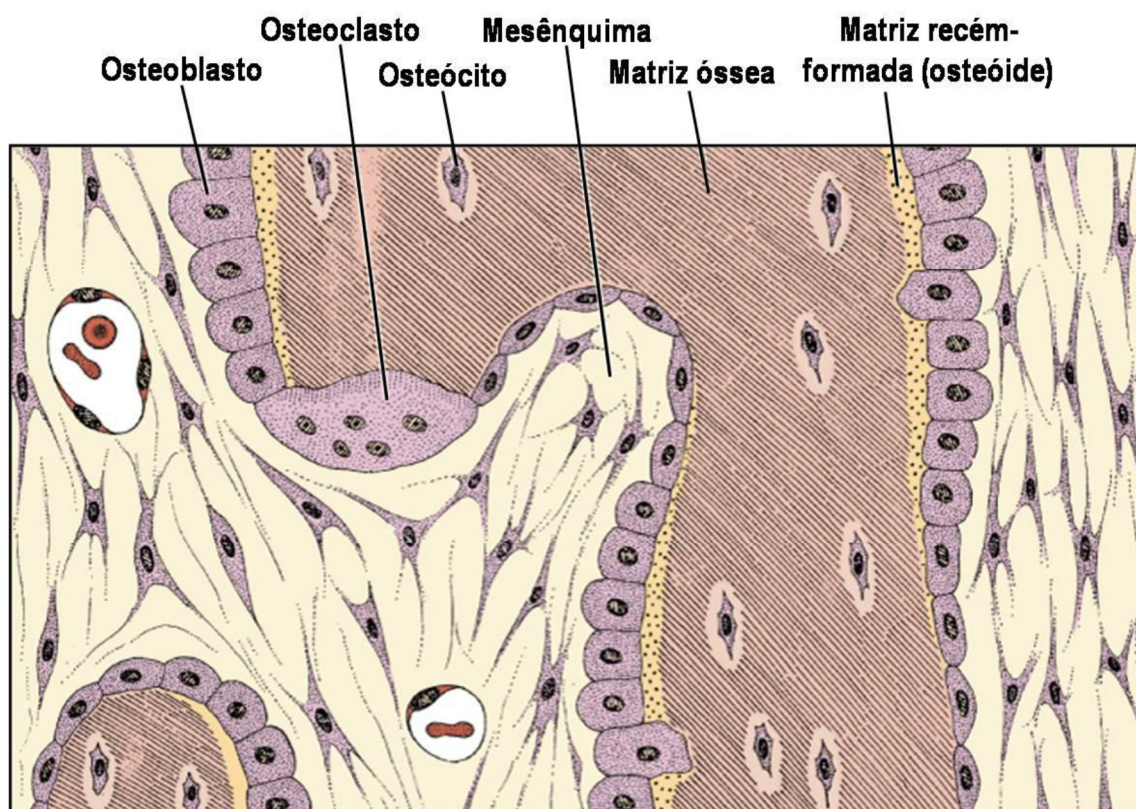


Figura 1.3: Estrutura celular do osso (Junqueira & Carneiro, 2005).

1.2.2.1.1. Osteócitos

São células existentes no interior da matriz óssea, achatadas e com prolongamentos citoplasmáticos. A comunicação com outros osteócitos faz-se através de canalículos, que se anastomosam (ou juntam) com os canalículos das lacunas vizinhas. Nos ossos recém-

formados, os osteócitos ocupam toda a extensão dos canalículos. Gradualmente, os osteócitos retraem os prolongamentos, deixando as partes terminais dos canalículos ocupados por uma substância fundamental amorfa. Nos osteócitos são encontradas pequenas quantidades de retículo endoplasmático rugoso, aparelho de Golgi pouco desenvolvido e núcleo com cromatina. Essas células são responsáveis pela manutenção do tecido ósseo vivo, uma vez que detetam as alterações físicas e químicas deste tecido recrutando, a seguir, osteoclastos e osteoblastos para as funções de síntese e reabsorção (Grosell et al., 2011; Junqueira & Carneiro, 2008).

1.2.2.1.2. Osteoblastos

São as células que sintetizam a componente orgânica (colagénio tipo I, proteoglicanos e glicoproteínas) da matriz óssea. Possuem prolongamentos citoplasmáticos que se ligam aos dos osteoblastos vizinhos. Estes prolongamentos tornam-se mais evidentes quando são envolvidos pela matriz, pois são responsáveis pela formação dos canalículos que permitem a passagem de líquido, gases e moléculas entre estas células e os vasos sanguíneos ou células vizinhas. Uma vez aprisionados pela matriz recém-sintetizada, os osteoblastos passam a ser designados por osteócitos. A matriz óssea adjacente aos osteoblastos ativos, e que não está ainda calcificada, recebe o nome de osteóide ou pré-osso (Junqueira & Carneiro, 2008).

Os osteoblastos sintetizam a matriz óssea, que é uma substância rica em colagénio (principalmente tipo I), que é essencial para a posterior mineralização, por aderência, de cristais de hidroxiapatite de Ca, magnésio, potássio, sódio e carbonato a fibrilas de colagénio. Por outro lado, foi identificada, nestas células, a presença de fosfatase alcalina (*alkaline phosphatase* - ALP), osteocalcina e de recetores para estrógenos, progesterona, glicocorticóides, testosterona e a Vitamina D₃, o que pode explicar a influência destas hormonas na formação óssea (Francis et al., 2002; Huang et al., 2014).

1.2.2.1.3. Osteoclastos

São células móveis, globosas, multinucleadas, extremamente ramificadas, que aparecem nas superfícies ósseas quando ocorre reabsorção do tecido. São formadas a partir de

precursores mononucleados provenientes da medula óssea que, em contacto com o tecido, se unem para formar os osteoclastos multinucleados. Possuem citoplasma granuloso, algumas vezes com vacúolos, fracamente basófilo nos osteoclastos jovens e acidófilo nos maduros. As áreas de absorção óssea podem ser identificadas pela presença de osteoclastos, ou ainda pela depressão da matriz. Possuem numerosos lisossomas, dando, portanto, reação histoquímica positiva para a fosfatase ácida (Junqueira & Carneiro, 2008).

Os osteoclastos são derivados de células mononucleares da medula óssea (pré-osteoclastos) que se enfileiram nas superfícies formadoras de tecido ósseo; na sua borda ondulada ocorre a reabsorção ativa do osso. A sua principal função é a desmineralização óssea e a digestão da matriz do osso (Huang et al., 2014).

Os osteoclastos secretam, para dentro destes microambientes fechados, ácidos (H^+), colagenase e outras hidrolases que atuam localmente digerindo a matriz orgânica e dissolvendo os cristais de sais de Ca. A atividade dos osteoclastos é coordenada por citocinas (pequenas proteínas sinalizadoras que atuam localmente) e por hormonas como a calcitonina, hormona produzida pela glândula tiróide, os estrogénios e a hormona paratiróide (PTH), secretada pelas glândulas paratiróides (Junqueira & Carneiro, 2008).

1.3. Tipos de ossificação

A estrutura óssea, quando vista a olho nu, apresenta-se de duas formas. O osso compacto (ou osso cortical), não tem cavidades visíveis enquanto no osso esponjoso, são visíveis muitas cavidades intercomunicantes. No esqueleto, podemos encontrar diferentes tipos de osso, considerando a sua morfologia, que, por sua vez, são constituídos por diferentes proporções de ossos compacto e esponjoso. Assim, os ossos longos são constituídos por osso esponjoso nas suas extremidades (epífises), que está coberto por uma camada delgada e superficial de osso compacto, enquanto a diáfise (zona longa e cilíndrica) e quase totalmente formada por osso compacto, com uma pequena quantidade de osso esponjoso na sua parte mais interna, delimitando o canal medular (Junqueira & Carneiro, 2005, 2008).

Os ossos curtos têm o centro esponjoso, sendo recobertos em toda a sua periferia por uma camada compacta. Nos ossos chatos, que constituem, por exemplo, a abóboda craniana, existem duas camadas de osso compacto, as tábuas interna e externa, separadas por osso esponjoso que, nesta localização, recebe o nome de díploe. As cavidades do osso

esponjoso e o canal medular da diáfise dos ossos longos são ocupados pela medula óssea (Junqueira & Carneiro, 2008).

Histologicamente existem dois tipos de tecido ósseo: o imaturo ou primário, e o maduro, secundário ou lamelar. O tecido primário é o que aparece primeiro, tanto no desenvolvimento embrionário como na reparação das fraturas, sendo temporário e substituído por tecido secundário. No tecido ósseo primário, as fibras colágenas dispõem-se irregularmente, sem orientação definida, enquanto no tecido ósseo secundário essas fibras se organizam em lamelas, que adquirem uma disposição muito peculiar. Portanto, durante o crescimento dos ossos podem-se ver, lado a lado, áreas de tecido primário e secundário. Uma combinação de formação e remoção de tecido ósseo persiste durante o crescimento do osso. Isto também acontece no adulto, embora em ritmo muito mais lento (Junqueira & Carneiro, 2005, 2008).

O tecido ósseo é formado por dois processos distintos: ossificação intramembranosa, que ocorre no interior de uma membrana conjuntiva, ou ossificação endocondral, em que a formação do osso se inicia sobre um molde de cartilagem hialina, que gradualmente é destruído e substituído por tecido ósseo formado a partir de células do conjuntivo adjacente.

1.3.1. Ossificação intramembranosa

A ossificação intramembranosa tem lugar no interior de membranas de tecido conjuntivo; é o processo da formação dos ossos frontal, parietal e de partes do occipital do temporal e dos maxilares superiores e inferior predominante nos ossos achatados. Além disso, contribui para crescimento dos ossos curtos e para aumento em espessura dos ossos longos. O processo de formação tem início pela diferenciação de células semelhantes a fibroblastos jovens que se transformam em grupos de osteoblastos. Estes sintetizam a componente orgânica da matriz, osteóide, que logo se calcifica englobando alguns osteoblastos que se transformam em osteócitos. Por mitose e diferenciação, as células do tecido conjuntivo formam novos osteoblastos que se colocam sobre as traves ósseas, continuando o processo de ossificação no centro de ossificação primária (Junqueira & Carneiro, 2008).

Nos peixes, alguns elementos esqueléticos tais como os centros das vértebras na coluna vertebral e os raios moles das barbatanas são formados por processo de ossificação

intramembranosa (Franz-Odendaal, 2006), embora a maioria dos ossos em peixe seja formada por ossificação endocondral.

1.3.2. Ossificação endocondral

A ossificação endocondral tem início sobre uma peça de cartilagem hialina, de forma parecida à do osso que se vai formar, mas de menor tamanho. Esse tipo de ossificação é a principal na formação dos ossos curtos e longos. Consiste, essencialmente, em dois processos. Primeiro, a cartilagem hialina sofre modificações, havendo hipertrofia dos condrócitos, que acabam por morrer deixando cavidades separadas por pequenas divisórias da matriz cartilaginosa, que se calcifica ao morrerem os condrócitos. Posteriormente, as cavidades das cartilagens calcificadas são invadidas por capilares sanguíneos e células mesenquimatosas indiferenciadas vindas do tecido conjuntivo adjacente. Essas células vão diferenciar-se em osteoblastos, que depositarão matriz óssea sobre os restos de cartilagem calcificada. Deste modo forma-se tecido ósseo onde antes era tecido cartilaginoso e os tabiques de matriz calcificada da cartilagem servem apenas de ponto de apoio à ossificação (Franz-Odendaal, 2006; Junqueira & Carneiro, 2008).

1.4. Escamas

As escamas são apêndices mineralizados da pele e uma importante barreira física inata (Khayr & Barthelat, 2014). São também o principal reservatório de Ca e P em peixes, minerais com importância vital para a sua saúde, reprodução e sobrevivência. Nelas ocorrem ciclos dinâmicos de libertação e deposição de Ca e P e parece ocorrer um aumento da mobilização em períodos de elevada necessidade de minerais, tais como a reprodução ou o jejum (Guerreiro & Fuentes, 2007; Kousoulaki, Fjellidal, Aksnes, & Albrektsen, 2010).

As escamas têm origem na derme, ou seja, na camada profunda da pele e são formadas por tecido ósseo. Elas são um importante componente do esqueleto dermal que é osso dérmico formado no interior da derme e que cresce por acreção única, sendo a parte exterior do osso gradualmente depositada por osteoblastos. Normalmente são inseridas em bolsas no tecido epidérmico, sobrepostas entre si, cobrindo quase todo o corpo do

peixe. As escamas dos teleósteos são tecidos calcificados que contêm osteoblastos e osteoclastos (Suzuki & Hattori, 2003), tal como o osso. A maioria dos peixes ósseos (teleósteos) apresenta uma derme bem diferenciada com escamas do tipo elasmóide (Dean & Summers, 2006).

1.4.1. Tipos de escamas

O tipo, o tamanho e os números das escamas estão relacionados com a forma e o meio em que os peixes vivem. As escamas presentes na pele de peixe têm como função proteger e desempenham um papel importante na homeostase de Ca. Por esta razão, quando peixes teleósteos perdem escamas estas são rapidamente substituídas por um processo de regeneração que começa poucos minutos após a remoção da escama (Metz, Vrieze, Lock, Schulten, & Flik, 2012; Quilhac & Sire, 1998).

Nos peixes ósseos existem vários tipos de escamas: placóides, ganóides, placas *ósseas* e as escamas elasmóides que se subdivide em escamas ctenoides e cicloides (figura 1.4). As escamas placóides (figura 1.4 – a) são escamas minúsculas, (também designadas por dentículos dérmicos) que ocorrem em tubarões. Escamas ganóides (figura 1.4 – b) são escamas finas, cobertas por camadas de um material semelhante à dentina (cosmine) e um material semelhante a cristais de apatita (ganoine). Alguns peixes ósseos possuem escamas que formam placas ósseas (figura 1.4 – c).

As escamas elasmóides existentes na maioria do peixe ósseo são subdivididas em escamas cicloides e ctenoides. Escamas cicloides (figura 1.4 – d e e) são escamas redondas e planas encontrados em peixes pulmonados e alongados e as escamas ctenoides (figura 1.4 – f) são semelhantes, mas têm minúsculos projeções na região posterior (exposta) das escamas que, provavelmente, contribuem para melhorar a eficiência hidrodinâmica de natação (Sire & Akimenko, 2004).

A sequência de desenvolvimento de escamas em conjunto com a evidência morfológica para a diferenciação das células na derme e na camada basal da epiderme, sugere a existência de uma cascata genética que se correlaciona com a morfologia celular e o comportamento celular na epiderme e no mesênquima (Sire & Akimenko, 2004). Na maioria dos casos, as escamas aparecem pela primeira vez no pedúnculo caudal e espalham-se a partir daí para o resto do corpo (Nowak et al., 2010; Sire & Akimenko, 2004).

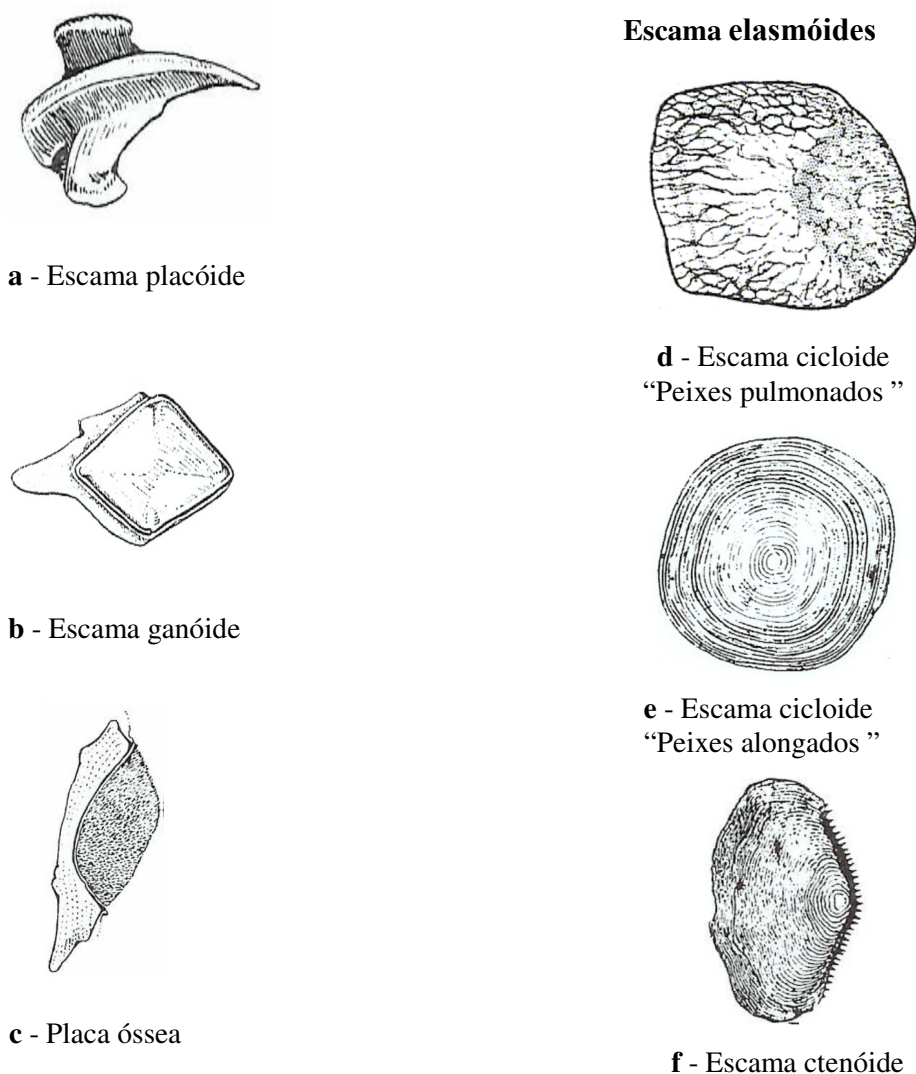


Figura 1.4: Tipos de escamas (ganóide, placas ósseas e elasmóides (ctenóide, cicloide)) encontradas em peixes ósseos e cartilagíneos (placóide) (Martin, Carter, George, & Davis, 2000).

1.5. Homeostase óssea

O Ca iônico é um fator crítico numa grande variedade de processos biológicos, como excitabilidade neuronal, contração muscular, permeabilidade celular, divisão celular, liberação hormonal e mineralização de tecidos ósseos (Kaneko & Hirano, 1993; Locker, 1996). O total de Ca extracelular representa menos de 1,0 % do Ca corporal total, e localiza-se, preferencialmente, no esqueleto (cerca de 99,4 %), mas também no meio intracelular (0,4 a 0,6 %) (Bonga, 1991). As quantidades de Ca presentes no esqueleto, além de conferirem força à estrutura, representam uma fonte de fácil acesso deste ião, que

pode ser mobilizado quando a sua concentração no fluido extracelular for baixa (Bonga, 1991).

O teor do Ca iônico no plasma dos peixes situa-se entre 1-3 nmol/l (Guerreiro & Fuentes, 2007; Kaneko & Hirano, 1993) e pequenas alterações deste valor, para além dos limites fisiológicos, causam perturbações neuronais, musculares e cardiovasculares, podendo resultar em tetania e em letargia. Ambas as condições podem ser letais (Evans, Piermarini, & Potts, 1999). No entanto, os níveis de Ca iônico são fortemente regulados por fatores endócrinos, como desenvolvido abaixo.

Tanto nos ossos como nas escamas de peixe ocorrem ciclos dinâmicos de libertação e deposição de Ca e P ao longo do tempo, um processo chamado de remodelação óssea. O processo de remodelação óssea dá-se em várias fases: 1º ativação: os pré-osteoclastos são estimulados e diferenciam-se, sob influência de citocinas e fatores de crescimento, transformando-se em osteoclastos maduros; 2º reabsorção: os osteoclastos formados secretam uma substância ácida, dissolvendo e digerindo a matriz orgânica e mineral do osso; 3º inversão: a reabsorção cessa quando a cavidade atinge uma certa profundidade; células derivadas de monócitos formam uma superfície mineralizada, que previne a erosão óssea adicional; 4º formação: os osteoblastos são atraídos para a cavidade de reabsorção e, sob influência de várias hormonas e fatores de crescimento, amadurecem para preencher a cavidade com um osso novo (Francis et al., 2002).

1.6. Hormonas que atuam sobre o tecido ósseo

O processo de remodelação óssea é regulado por várias hormonas e fatores de crescimento, tanto em mamíferos como em peixes, embora a natureza e efeito destas não seja necessariamente o mesmo nos dois tipos de organismo (Bonga, 1991; Karsenty & Oury, 2012; Pinto, Estêvão, & Power, 2014).

Seguem-se alguns exemplos.

A parte anterior da hipófise produz a hormona do crescimento, que estimula o crescimento em geral, tendo efeito particularmente acentuado sobre a cartilagem epifisária. Todavia, os efeitos desta hormona não são diretos. Ela estimula certos órgãos, principalmente o fígado, a sintetizar polipeptídeos denominados somatomedinas, que têm efeito sobre o crescimento. A falta desta hormona durante o crescimento produz nanismo

enquanto a sua produção excessiva, como ocorre em alguns tumores da hipófise, causa o gigantismo, com desenvolvimento excessivo do comprimento dos ossos longos. Em indivíduos mais velhos, como o excesso da hormona do crescimento atua quando já não existem cartilagens epifisárias, os ossos não podem crescer em comprimento, mas crescem em espessura (crescimento perióstico), dando origem à acromegalia, condição em que os ossos, principalmente os mais longos, se tornam muito espessos (Junqueira & Carneiro, 2008).

A PTH, uma hormona hipercalcémica (que aumenta os níveis de Ca em circulação) é um dos fatores que influenciam a formação do tecido ósseo através do aumento da atividade dos osteoclastos e osteoblastos em peixes (Rotllant et al., 2005). Se a sua secreção for elevada, a renovação óssea aumentará, mas a massa óssea não se reduzirá, já que o acoplamento entre reabsorção e formação de osso permanece intacto. Se a secreção de PTH for elevada, na presença de deficiência de vitamina D ou retenção de P, o ciclo de remodelação óssea é acelerado, com perda óssea (Rotllant et al., 2005; Suzuki et al., 2011).

A calcitonina é uma hormona hipocalcémica, também envolvida na regulação do metabolismo ósseo em peixes, estimula os osteoblastos e inibe os osteoclastos levando a uma renovação óssea reduzida em peixes (Suzuki et al., 2000).

Quantidade excessiva de glicocorticóides inibe os osteoblastos, com inibição da formação de matriz e diminuição da absorção de Ca no sistema reprodutor (Li, Liang, Shen, & Wronski, 1999; Nozaka et al., 2008).

As hormonas sexuais testosterona e estrogénios, também regulam este processo de remodelação óssea. Em mamíferos, o estradiol (E_2) exerce, essencialmente, um efeito protetor do osso por promover a atividade osteoblástica e o crescimento de novo tecido ósseo. Com o envelhecimento, o sistema esquelético sofre uma acentuada perda de Ca, resultando numa condição conhecida como osteoporose. Esta perda de Ca parece estar relacionada com vários fatores, incluindo a diminuição dos estrogénios em circulação (que em mulheres desce acentuadamente com a entrada em menopausa), e assim do seu efeito protetor no osso (Foster & Vincent, 2004; Gali, 2001). Outro efeito do envelhecimento é a redução da síntese de proteínas, o que diminui a produção da parte orgânica da matriz óssea. Como consequência, há uma acumulação da parte inorgânica da matriz. Em alguns indivíduos idosos, esse processo causa uma fragilização dos ossos, que se tornam mais suscetíveis a fraturas (Gali, 2001; Junqueira & Carneiro, 2008).

Os estrogénios provocam um depósito acentuado de osso dermal, o que constitui um dos mecanismos destinados a armazenar sais de Ca antes da ovulação (Starling & Evans, 1978). Nos mamíferos, E₂ protege o esqueleto ao favorecer a diferenciação dos osteoblastos e aumentando o seu tempo de vida, e também através da indução de mineralização óssea e por decréscimo da formação, atividade e tempo de vida de osteoclastos. Assim, em mamíferos, os estrogénios contribuem para o desenvolvimento e manutenção da massa óssea (Khosla, 2010).

Em peixes teleósteos, os estrogénios têm como principal função o controlo da reprodução, diferenciação sexual, acumulação de reservas na gema (vitelogénese) durante o crescimento dos oócitos e a regulação da homeostase do Ca (Lange, Hartel, & Meyer, 2003). O E₂ induz um aumento dos níveis plasmáticos de Ca e uma diminuição no teor de Ca nas escamas em períodos de maior carência, como a vitelogénese nas fêmeas (Nagler, Davis, Modi, Vijayan, & Schultz, 2010). Este efeito hipercalcémico parece ser mediado por vários mecanismos, incluindo um aumento no influxo de Ca a partir do ambiente (Guerreiro, Fuentes, Canario, & Power, 2002) e a estimulação da mobilização de Ca nos tecidos mineralizados, especialmente as escamas (Persson, Takagi, & Bjrnssonl, 1995). De facto, nas escamas de várias espécies de peixes marinhos e de água doce, o E₂ aumenta a atividade osteoclástica e no osso ainda não é claro se há mobilização ou mineralização induzidas por E₂ (Suzuki et al., 2000).

Em *Carassius auratus* (*C. auratus*, peixe dourado), uma espécie de água doce e em *Pseudolabrus sieboldi* (*P. sieboldi*), uma espécie marinha, o E₂ também provocou um aumento na atividade dos osteoblastos (Yoshikubo et al., 2005), o que sugere que os estrogénios podem afetar tanto a mineralização como a mobilização de Ca em escamas de peixe, dois processos que, muitas vezes, são acoplados em ossos de mamíferos (Khosla, 2010). Por outro lado, o E₂ parece induzir uma aceleração do processo de regeneração da pele e escamas em indivíduos maduros de *Sparus auratus* (*S. auratus*) (Ibarz, Pinto, & Power, 2013). No entanto, mais estudos são necessários para estabelecer de forma mais detalhada e em maior número de espécies, os efeitos da E₂ no conteúdo de Ca no esqueleto e nas escamas de peixe, ao longo do ciclo reprodutivo ou em relação aos estímulos ambientais ou internos (Pinto, Estêvão, & Power, 2014), assim como as consequências da exposição a poluentes estrogénicos nestas funções.

1.7. Marcadores biológicos da atividade enzimática nas células ósseas

Marcadores biológicos da atividade óssea são substâncias que indicam a formação ou a reabsorção óssea. Como a formação é dependente da ação dos osteoblastos, os marcadores de formação, na realidade, medem produtos decorrentes da ação destas células. Da mesma maneira, os marcadores de reabsorção medem a ação dos osteoclastos, o principal tipo celular envolvido na reabsorção da matriz óssea. Os marcadores aqui descritos são a fosfatase ácida resistente ao tartrato (*tartrate-resistant acid phosphatase* - TRAP) e a ALP, como marcadores dos osteoclastos e dos osteoblastos, respectivamente.

1.7.1. TRAP

A TRAP é uma enzima fosfatase que funciona em meio ácido, histologicamente associada aos osteoclastos e, conseqüentemente, à reabsorção da matriz óssea (Yliopisto, 2009). Apesar de não ser uma enzima específica dos osteoclastos, a TRAP é um marcador bastante útil para a sua identificação nos cortes histológicos (Blumer et al., 2012; Chao, Wu, & Janckila, 2010).

Tem sido utilizada em mamíferos como um marcador citoquímico para a atividade dos osteoclastos (Hollberg, 2002), permitindo localizar zonas de remoção óssea no tecido (Oddie et al., 2000). Em peixes, a TRAP também foi localizada em zonas de reabsorção e a sua atividade está associada a períodos de maior reabsorção, tal como a induzida por tratamento com E₂ (Persson, Sundell, & Bjornsson, 1994). Assim, tem sido usada também em peixes como marcador de atividade osteoclástica (Persson et al., 1995).

1.7.2. ALP

A ALP é uma enzima fosfatase que funciona no meio alcalino, catalisa diferentes reações que envolvem grupos fosfato (Ali et al., 2014). Nos ossos, são responsáveis pela secreção dos osteoblastos, aumentos na atividade osteoblástica correspondem a aumentos da síntese dos tecidos ósseos (Aisha et al., 2014). Estas enzimas são encontradas nas células intestinais, na placenta, nas células germinativas, no fígado, no rim e no osso (Ali et al., 2014; Caseli, Zaniquelli, Furriel, & Leone, 2002; MacGregor, Zambrowicz, & Soriano,

1995). A atividade enzimática máxima da ALP ocorre em pH alcalino, próximo de 10. Em mamíferos e em peixes tem sido usada como indicador de atividade osteoblástica (Caseli et al., 2002; Weser, Etspiiler, & Kaup, 1995; Yoshikubo et al., 2005).

1.8. Disrupção endócrina

Em termos gerais, a disrupção endócrina diz respeito ao efeito provocado por substâncias externas que interagem com os recetores de hormonas ou que causem outro tipo de desequilíbrio ou alteração no sistema endócrino, interferindo com o seu funcionamento (Maia & Dezotti, 2007).

Podem ser encontradas diferentes definições de disrupção endócrina consoante as organizações internacionais. Para a Agência de Proteção Ambiental (*Environmental Protection Agency* - EPA), por exemplo, disrupção endócrina ocorre quando um agente exógeno interfere com a síntese, secreção, transporte, ligação, ação ou eliminação das hormonas naturais no organismo, que são responsáveis pela manutenção, reprodução, desenvolvimento e/ou comportamento dos organismos (Ankley et al., 2009).

Por outro lado, para o Programa Internacional de Segurança Química (*International Programme on Chemical Safety* - IPCS), “disruptor endócrino é uma substância ou um composto exógeno que altera uma ou várias funções do sistema endócrino e que tem, conseqüentemente, efeitos adversos sobre a saúde num organismo intacto, sua descendência, ou (sub) populações” (Karsenty & Oury, 2012).

Assim, as substâncias denominadas por disruptores endócrinos são, uma categoria recente de poluentes ambientais que interferem nas funções do sistema endócrino. São encontradas no meio ambiente em concentrações da ordem de μgL^{-1} e ngL^{-1} e são suspeitas de causarem efeitos adversos à saúde humana e aos animais quando estão em contatos com os mesmos (Maia & Dezotti, 2007). Efeitos disruptores já descrito incluem a diminuição na eclosão de ovos de pássaros, peixes e tartarugas; feminização de peixes machos; problemas no sistema reprodutivo em peixes, répteis, pássaros e mamíferos e alterações no sistema imunológico de mamíferos marinhos. Em alguns casos, estes efeitos podem conduzir ao declínio da população. Em seres humanos estes efeitos incluem a redução da quantidade de esperma, o aumento da incidência de cancro de mama, de testículo e de próstata e, a endometriose, que se suspeitam estar relacionadas com o

aumento de exposição a disruptores endócrinos por exposição ambiental, por ingestão ou pelo uso de produtos de higiene pessoal (Maia & Dezotti, 2007).

1.8.1. Disrupção endócrina estrogénica

Os disruptores que afetem os processos regulados por estrogénios são referidos como estrogénios ambientais, estrogénios exógenos, exoestrogénios ou xenoestrogénios. Incluem diversos grupos de substâncias que não apresentam necessariamente alguma semelhança com a estrutura química do 17β -estradiol, mas que causam respostas antagonistas ou agonistas, possivelmente através de mecanismos de ação via recetores hormonais. A atividade agonista é a capacidade de uma substância se ligar a um recetor de uma hormona e desencadear uma resposta no mesmo sentido que a resposta da hormona. Em contrapartida, a atividade antagonista é a capacidade de uma substância se ligar a um recetor e bloquear a ação do ligando natural (por exemplo, uma hormona) e, assim, a sua resposta não será desencadeada ou será parcialmente inibida. Algumas destas substâncias, designadas como disruptores endócrinos estrogénicos (EDCs), podem ser identificadas pela sua capacidade de se ligarem aos recetores de estrogénio (ERs) e induzir ou atenuar uma resposta hormonal (Maia & Dezotti, 2007).

Como consequência dos diferentes mecanismos de ação e de disrupção (ver abaixo), a exposição aos disruptores endócrinos durante o período reprodutivo pode ter impacto na vida adulta dos organismos. Outros efeitos que têm sido descritos podem ser uma consequência da exposição em qualquer outro momento durante a vida. Vários outros tecidos e sistemas para além dos reprodutivos, tais como os tecidos mineralizados, podem também ser afetados por diversos contaminantes ambientais, embora tenham sido alvos de menos estudos. Diferentes efeitos de disruptores endócrinos foram já referidos para diferentes tipos de osso, em mamíferos (Agas, Sabbieti, & Marchetti, 2013) e, recentemente, foram revistos os compostos que já tiveram efeitos em tecidos mineralizados de peixes (Pinto, Estêvão, & Power, 2014), embora seja ainda um assunto pouco estudado.

1.9. Mecanismos de ação dos estrogénios e dos EDCs

As ações dos estrogénios são, na maioria das vezes, mediadas por recetores específicos, designados ERs, havendo, na maioria dos vertebrados dois genes: ER α e ER β . Nos peixes teleósteos, ocorreu duplicação do gene ER β e existem três formas de ER, um ER α e dois ER β s em várias espécies (McKenzie, 2011; Nelson & Habibi, 2013). Estes recetores são fatores de transcrição que, classicamente, regulam a transcrição de genes alvo no núcleo mas tanto o E₂ como EDCs podem também atuar por vários mecanismos alternativos (figura 1.8) (Laurentino et al., 2012). Podemos considerar as respostas genómicas, diretas e indiretas, que podem demorar horas ou dias, ou as respostas não genómicas, normalmente muito rápidas, que envolvem a ativação de respostas citoplasmáticas por ligação a um recetor de membrana (Laurentino et al., 2012).

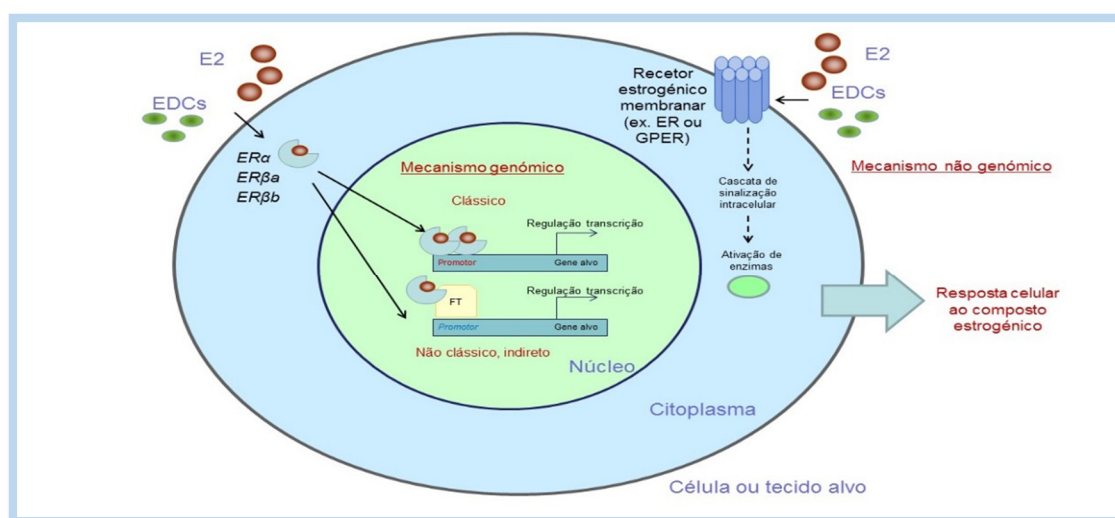


Figura 1.5: Mecanismos envolvidos nas ações celulares dos estrógenos naturais (ex.: 17 β -estradiol, E₂) e dos EDCs. No mecanismo genómico clássico, o composto estrogénico entra na célula alvo por difusão, liga-se e ativa os recetores de estrogénios intracelulares (em peixes, ER α , ER β a ou ER β b), que entram no núcleo; estes ligam-se especificadamente aos promotores de genes alvo e regulam a sua transcrição. Os possíveis mecanismos alternativos de ação incluem mecanismo genómico não clássico, em que a regulação da expressão dos genes é feita indiretamente por interação de ERs ligados ao ligando com outros fatores transcrição (FT). Outras ações são chamadas não genómicas, normalmente rápidas, que envolvem a ligação do composto estrogénico a um recetor estrogénico membranar (exemplo: ER ou GPER) e ativação de cascatas de sinalização intracelular que podem levar por exemplo a ativação de enzimas (Laurentino et al., 2012; Pinto, Estêvão, & Power, 2014).

A natureza dos recetores que medeiam as ações iniciadas na membrana permanece controversa, mas, provavelmente, inclui ambos os ERs clássicos e suas variantes, bem

como novos recetores da membrana, tais como o recetor de estrogénio acoplado à proteína G (GPER, anteriormente conhecido como GPR30), recentemente caracterizado em mamíferos e peixes (Kennedy, Osachoff, & Shelley, 2013; Thomas et al., 2010).

Em peixes, diferentes mecanismos de ação do E₂ também foram identificados e incluem: 1º - a regulação direta do gene da vitelogenina (um biomarcador de EDCs clássico) no fígado, por ERs intracelulares (Nagler et al., 2010); 2º - interrupção de vias de sinalização por contaminantes ambientais através da interação com outros fatores de transcrição (Bemanian, Male, & Goksoyr, 2004); 3º - a regulação indireta do gene da hormona luteinizante β gene por interação com outros fatores transcrição (Melamed, Koh, Preklathan, Bei, & Hew, 2002) e 4º - os efeitos rápidos mediados por GPER nas gónadas de peixe (Nelson & Habibi, 2013).

Em peixes já se demonstrou que as escamas são um tecido responsivo aos estrogénios, que expressam EDCs (Suzuki & Hattori, 2002; Yoshikubo et al., 2005; Pinto et al., 2009). Nas escamas de indivíduos juvenis e adultos de *S. auratus* e tilápias, os três ERs foram detetados em grupos isolados de pequenas células redondas, na camada basal, que expressam TRAP, um marcador dos osteoclastos (Pinto, Estêvão, & Power, 2014).

1.10. Classes de disruptores endócrinos

Diversos compostos, de natureza química muito distinta, como os apresentados na tabela 1.1, têm sido identificados como poluentes e associados a processos de EDCs, nomeadamente no osso.

Tabela 1.1: Algumas classes de compostos com e sem efeitos EDCs no metabolismo ósseo dos mamíferos e peixes (Agas et al., 2013; Maia & Dezotti, 2007; Pinto et al., 2014).

Classe de Compostos	Com efeito descrito no metabolismo ósseo	
	Mamíferos	Peixes
Ftalatos	Sim	Sim
Alquilfenóis	Sim	Sim
Organoclorados	Sim	Não
Bisfenol	Sim	Sim
Parabenos	Sim	Não
Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos	Não	Não
Metais pesados	Sim	Sim

Pesticidas	Sim	Sim
Compostos organoestânicos	Sim	Sim
Policlorados de bifenilas	Não	Não
Retardantes de chama bromado	Não	Não
Fitoestrogénios	Não	Não
Agentes terapêuticos e farmacêuticos	Sim	Não
Estrogénios naturais	Sim	Sim

No presente trabalho será dada especial atenção a compostos pertencentes às classes dos compostos organoestânicos e dos ftalatos, ambos contaminantes presentes no meio aquático, que serão as classes de compostos estudadas nesse trabalho.

1.10.1. Compostos organoestânicos

Os compostos organoestânicos são atualmente utilizados numa grande variedade de indústrias e as descargas destes compostos no meio aquático tem vindo a aumentar (Flavia et al., 2003). Entre as atividades antropogénicas que podem introduzir estas substâncias químicas no ambiente aquático destacam-se o uso de tintas anti-incrustantes, aplicadas nos cascos de navios para evitar que algas, mexilhões e outros organismos se agarrem às embarcações e cujo princípio ativo é constituído por compostos organoestânicos, como o tributilestanho (TBT) ou o trifenilestanho (TPT), e as descargas de poluentes urbanos (Flavia et al., 2003; Mello et al., 2015).

O composto derivado de trifenilestanho (TPT) com a fórmula geral $C_6H_5)_3Sn-X$, onde X é um anião ou um grupo aniónico, tal como o cloreto, hidróxido e acetato (figura 1.6) (Flavia et al., 2003; Harada et al., 2015). A estrutura com anéis benzénicos do TPT, assemelha à estrutura dos estrogénios e por isso poderá ligar a ERs ou GPER.

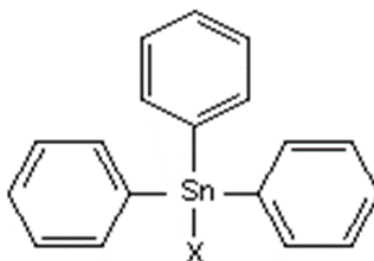


Figura 1.6: Estrutura química do composto trifenilestanho (TPT), onde X é um anião ou um grupo aniónico, tal como o cloreto, hidróxido ou acetato.

Um dos principais efeitos do uso destas substâncias é o envenenamento dos sistemas biológicos, alterando o património genético das espécies aquáticas, principalmente de moluscos e ostras, originando mutações e, eventualmente, condenando espécies à extinção (Flavia et al., 2003; Suominen et al., 2011), causando risco a seres humanos, ao ingerir peixes afetados por esse composto. Em particular, na concentração de 20 mg/kg, foi observada retardamento da ossificação da cintura pélvica, crânio e membros dos fetos. Enquanto doses de 10 mg/kg reduziu a formação óssea do esterno (Agas et al., 2013).

Em escamas de peixe TBT, afetou atividade osteoclastos e osteoblastos (Suzuki et al., 2006). Concentração muito baixas de TPT e TBT em invertebrados aquáticos e gastrópodes marinhos, induziu anomalia sexual irreversível (imposexo). Para os ERs são considerados composto com influência agonistas. Eles atuam como inibidores da ativação do gene transcrição, dependente de ERs (Cho et al., 2012). O impacto dos efeitos de TBT, sobre ciclo reprodutivo é pouco conhecido. O potencial tóxico do TBT no ciclo reprodutivo pode ser atribuído a alterações encontradas no peso do ovário, níveis desequilibrados de hormonas femininas sexuais e número de folículos ovarianos e corpo lúteo. TBT, diminuiu significativamente a percentagem, duração e regularidade do ciclo reprodutivo, as fases de proestro e diestro, e o número de células epiteliais em fase de pro-estro. Também aumentou a duração do metaestro e o número de células nesta fase em mamíferos. Por outro lado, afetou os níveis de 17β -estradiol no peso do soro dos ovários, acompanhada de um significativo aumento nos níveis de progesterona (Podratz et al., 2012). Os efeitos adversos acima de TBT e TPT em ossificação esquelético fetal poderiam ser associados com os distúrbios em homeostase da hormona da tiróide após a administração destes produtos químicos.

1.10.2. Ftalatos

Os ftalatos são compostos sintéticos produzidos e utilizados na indústria dos plásticos, estando presentes em muitos produtos tais como diversas embalagens utilizadas diariamente. São elementos de uma vasta família de compostos químicos derivados do ácido ftálico e dos seus sais correspondentes. Os ftalatos são compostos cancerígenos, e podem causar danos ao fígado, rins e pulmões, para além de anomalias no sistema reprodutivo, devido a alterações hormonais nos seres vivos (Mankidy, Wiseman, Ma, &

Giesy, 2013), pode causar anormalidades estruturais e reduzir a contagem de espermatozoides (Corradetti et al., 2013). A classe dos ftalatos inclui compostos como: dimetil ftalato (DMP), dietil ftalato (DEP), di-iso-butil ftalato (DIBP), di-n-butil ftalato (DBP), dicitcloexilo ftalato (DCHP), di-n-octil ftalato (DOP), di-isooctil ftalato (DIOP), di-iso-nonil ftalato (DINP), di-iso-decil ftalato (DIDP), butilbenzil ftalato (BBP) (figura 1.7 a) e di-(2-etil-exil) ftalato (DEHP) (figura 1.7 b) (Maia & Dezotti, 2007; Mankidy et al., 2013). Os compostos DEHP e BBP são dos compostos ftalatos mais estudados em termos de avaliação de impacto em organismos aquáticos (Planelló, Herrero, Guitarte, & Morcillo, 2011), tendo sido os compostos modelos dos ftalatos usados neste estudo para estudar possíveis efeitos em tecidos mineralizados, devido a estrutura com anéis benzênicos, assemelha à estrutura dos estrogénios e por isso poderá ligar a ERs ou GPER.

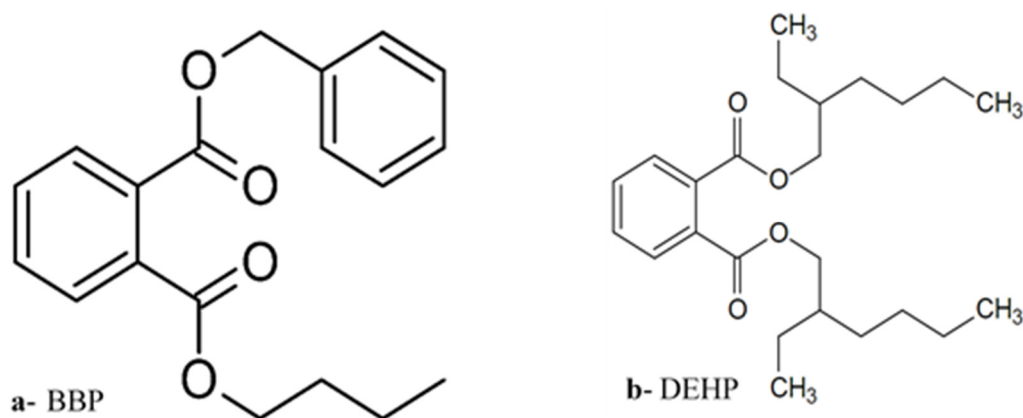


Figura 1.7: Estrutura química dos compostos ftalatos estudados nesse trabalho. **a** - butilbenzil ftalato (BBP) e **b** - di-(2-etil-exil) ftalato (DEHP).

DEHP, possuía fórmula $C_6H_4(C_8H_{17}COO)_2$, é também usado como plastificante (Maia & Dezotti, 2007; Mankidy, Wiseman, Ma, & Giesy, 2013), foi introduzido comercialmente em 1949, e a produção tem aumentado constantemente desde então (Waring et al., 2008). Produção DEHP em EUA e Japão são cerca de 125.000 toneladas/ano (Ankley & Johnson, 2004), cerca de 95 % da produção de DEHP é dirigida para o uso como um plastificante em vários tipos de plásticos, adicionado a resinas plásticas em quantidades de 20 % á 67 % em peso, lixivia-se lentamente a partir os plásticos durante a sua utilização (Jerry, 2000).

No peixe-zebra, DEHP afetou a oogénese durante a produção de embriões, reduzindo significativa fecundidade dos peixes expostos. Os sinais envolvidos no crescimento do

oócito vitelogênese, maturação e ovulação, prejudicaram profundamente as funções do ovário com graves consequências sobre a produção de embriões (Corradetti et al., 2013). Em outros tratamentos causou diminuição significativa em ALP no mRNA, também, revelou diminuição drástica em colagénio e ALP possibilitou mineralização da matriz óssea (Bhat et al., 2012).

O BBP com a fórmula $C_{19}H_{20}O_4$ é um ftalato do grupo éster de ácido ftálico, álcool benzílico e n-butanol, usado principalmente como plastificante em PVC (Maia & Dezotti, 2007; Mankidy, Wiseman, Ma, & Giesy, 2013), foi reivindicado como possível papel durante a diferenciação e a formação óssea, sugerindo que a embriotoxicidade e malformações esqueléticas, pode ser atribuída à interferência de ftalatos com a sinalização e funções de intracelular. De fato, foi observado que BBP aumentou proliferação de osteoblastos (Agas et al., 2013).

A preferência e a afinidade de ligação dos ERs ou GPERs, depende de espécie para espécie e de peixes para peixes, para cada composto estrogénico. A diferença de ligação, pode ser devido à variabilidade na sequência de aminoácidos nos seus respetivos domínios de ligação do ligando ao ERs ou GPER (Heindel, Jobling, Kidd, & Zoeller, 2012; Jobling, Reynolds, White, Parker, & Sumpter, 1995; Matthews & Zacharewski, 2000).

Capítulo 2 - OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

O principal objetivo deste trabalho foi investigar o impacto da exposição a poluentes aquáticos nos ciclos de deposição ou mineralização de cálcio (Ca) nas escamas de diferentes espécies de peixe, nomeadamente *D. labrax* (robalo) e *O. mossambicus* (tilápia). Estas espécies são muito importantes para a pesca e são excelentes exemplos de espécies usadas na aquacultura. Embora ambas as espécies sejam eurihalinas, o robalo é cultivado sobretudo em água salgada e a tilápia em água doce. Além disso, o robalo possuiu um único ciclo reprodutivo durante o ano enquanto a tilápia possui reprodução ao longo do ano, pelo que a comparação dos efeitos dos diversos poluentes nas duas espécies poderá permitir identificar a influência das características do habitat ou do tipo de ciclo reprodutivo.

2.2. Objetivos específicos

- 1) Avaliação da expressão dos recetores de estrogénio nucleares (ER α , ER β a e ER β b) e membranares (GPER) em escamas de robalo e tilápia, de modo a caracterizar o seu potencial de responsividade a compostos estrogénicos.
- 2) Aplicação de um bioensaio para tratamento *in vitro* de escamas de peixe (robalo e tilápia), para avaliar os efeitos da exposição a compostos poluentes organoestânicos (nomeadamente o trifenilestanho (TPT)) e ftalatos (nomeadamente o di-(2-etil-exil) ftalato (DEHP) e butilbenzil ftalato (BBP)).
- 3) Avaliar os efeitos de diferentes concentrações (10^{-10} M, 10^{-8} M e 10^{-6} M) destes compostos, após tratamentos de curta (30 minutos) e longa (24 horas) duração, na atividade de enzimas relacionadas com mobilização ou mineralização do Ca nomeadamente a fosfatase ácida resistente ao tartrato (TRAP) e a fosfatase alcalina (ALP)
- 4) Comparar o efeito dos compostos em estudo nas duas espécies modelo escolhidas (robalo e tilápia).

Capítulo 3 - METODOLOGIA

3. METODOLOGIA

3.1. Espécies utilizadas

Os peixes usados nesse estudo foram mantidos e manipulados de acordo com regulamento internacionais (Diretrizes do Conselho da União Europeia, 86/609/UE) e as orientações nacionais de ética para cuidados com os animais em experimentação.

Os robalos (*D. labrax*) foram obtidos a partir da empresa Atlantik Fish (Castro Marim, Portugal) e mantidos no laboratório experimental de organismos aquáticos (LEOA) na Universidade do Algarve, em tanques de 500 L, em circuito fechado de água do mar, à temperatura de 17-21° C, salinidade 36 ‰ e com uma taxa de alimentação de 1,5% relativamente à massa corporal.

As tilápias (*O. Mossambicus*) foram usadas de um *stock* obtido a partir de ovos fertilizados no LEOA e mantidas em aquários de circuito fechado de água doce, de 150 L, com circuito fechado, a uma temperatura de 24° C e com taxa de alimentação de 1,5% relativamente à massa corporal.

Os robalos usados tinham um peso médio de 177g (peso mínimo de 97 g e máximo de 287 g) enquanto as tilápias usadas variaram entre as 80 e 187 g, com uma média de 108 g.

3.2. Amostragem

O processo de amostragem ocorreu na LEOA, Universidade do Algarve. Para cada ensaio, foram capturados três indivíduos, que foram brevemente anestesiados com uma solução de 100 mg/l de metanosulfonato de tricaina (MS-222) e 200 mg/l de bicarbonato de sódio, diluído em água salgada para robalos ou doce para tilápia. Todos os indivíduos pescados foram pesados e lavados com água sem anestésico (salgada para robalos ou doce para tilápias) antes de iniciar a recolhas das escamas.

As escamas foram recolhidas com auxílio de uma pinça, previamente desinfetada com etanol 70 %, sendo extraídas, aleatoriamente, na zona abaixo da barbatana dorsal (figura

3.1). Foram colocadas em placas de 6 poços com água salgada (para escamas de robalo) ou água doce (para tilápia), sendo depois transportadas, à temperatura ambiente, para o laboratório onde decorreu o ensaio experimental.

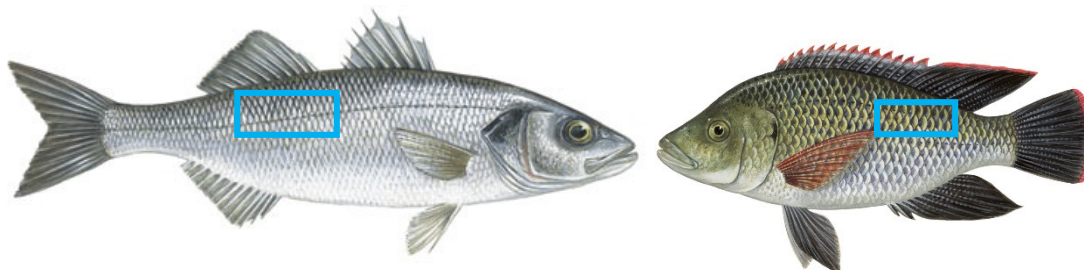


Figura 3.1: Robalo (*D. labrax*) e Tilápia (*O. mossambicus*) com as zonas da extração de escamas marcadas.

Depois da extração das escamas, os indivíduos foram desinfetados com uma solução iodada (betadine®) na zona da extração das escamas, colocados em balde sem anestésico e devolvidos aos respetivos tanques, depois de estarem recuperados.

3.3. Determinação da expressão dos genes para recetores de estrogénio

Para determinar a expressão dos genes que codificam para os recetores estrogénicos nas células das escamas de robalos e tilápias procedeu-se à extração do RNA total de cerca de vinte escamas por peixe, recolhidas de três peixes de cada espécie, com PureZOL™ RNA Isolation Reagent (Bio-Rad).

3.3.1. Extração de RNA de escamas

A extração de RNA utilizando o PureZol consiste numa mistura monofásica desnaturante muito forte constituída por isotiocianato de guanidina e fenol, que provoca lise celular e que dissolve eficazmente os ácidos nucleicos (DNA e RNA) e as proteínas. Após a adição de clorofórmio centrifugou-se a mistura, que se separou em três fases: uma fase aquosa que contém RNA, uma interfase onde se encontra o DNA, e uma fase orgânica que contém proteínas (Hummon, Lim, Difilippantonio, & Ried, 2007).

Neste procedimento foi usado 500 µl de PureZOL *Bio-Rad* para 100 mg de escamas, homogeneizou-se num homogeneizador mecânico Ultra Turrax (IKA Labortechnik, Alemanha) com uma haste para tecidos fibrosos e incubou-se durante 5 minutos à temperatura ambiente, de forma a dissociar os complexos nucleoproteicos.

Após a incubação, centrifugou-se a 12.000xg, durante 10 minutos, a 4° C, para remover todo o material insolúvel. De seguida adicionaram-se 200 µl de clorofórmio, agitou-se num vórtex durante cerca de 15 segundos e incubou-se durante 15 minutos à temperatura ambiente. De seguida, centrifugou-se a 12.000xg, por 15 min, a 4° C, obtendo-se a formação de três fases.

Transferiu-se a fase aquosa (superior) para um novo tubo e adicionaram-se 500 µl de isopropanol frio, misturou-se bem, por inversão, e incubou-se durante 10 minutos à temperatura ambiente. Procedeu-se a nova centrifugação durante 10 min a 12000xg, a 4° C. Descartou-se o sobrenadante e lavou-se o precipitado (*pellet*) de RNA com 1 ml de etanol a 75% (preparado com água tratada com bicarbonato de dietila (DEPC, *diethyl dicarbonate*). Agitou-se num vórtex, centrifugou-se a 12.000xg, a 4° C, durante 5 minutos, repetindo-se a lavagem. Deixou-se secar o *pellet* durante 5 a 10 minutos, e ressuspendeu-se em água sem *nucleases*. O volume da água adicionada variou entre 20 e 50 µl, dependendo da quantidade do *pellet* obtido.

De seguida, a concentração e pureza do RNA foram analisadas por espectrofotometria (Nanodrop 260 e 280 nm). A absorvância a 260 nm (Abs260) foi usada para calcular a concentração de ácidos nucleicos. Os ratios Abs260/Abs280 e Abs260/Abs230 medidos foram superiores a 1,8, indicando respetivamente pouca contaminação com proteínas ou com solventes como fenol. O rendimento e integridade do RNA foram avaliados por eletroforese em gel de agarose a 0,8%, em tampão TAE (Tris-Acetato-EDTA) preparado com água tratada com DEPC.

Efetou-se o tratamento do RNA com DNase (*Ambion*), durante 30 minutos a 37° C, para remover algum DNA genómico contaminante que possa estar presente. Após este período de incubação adicionaram-se 5 µl *DNase Inactivation Reagent*, para parar a reação, mantendo a solução durante 5 minutos, à temperatura ambiente e efetuando 2 agitações com vortex para mistura-lo ainda melhor. De seguida centrifugou-se durante 1,5 minutos a 10.000xg e removeu-se o sobrenadante. A concentração do RNA foi novamente quantificada no Nanodrop.

3.3.2. Síntese de cDNA

Procedeu-se, então, à síntese de cDNA, preparado um volume total de reação de 20 μ l, com 500 ng de RNA tratado e utilizando M-MLV *reverse transcriptase* (Revert-aid, Fermentas) e *Random Hexamers* (200 ng, Jena Bioscience). Misturaram-se o RNA, os *Random Hexamers* e 1 μ l de dNTP's 10 μ M num volume de 13 μ l, prefazendo com água DEPC se necessário. Incubou-se a 65° C, durante 5 minutos, para quebrar as estruturas secundárias do RNA e permitir a hibridação entre o RNA e os *Random Hexamers*. De seguida, os tubos foram colocados em gelo, durante 5 minutos para prevenir a reformação das estruturas secundárias do RNA e depois adicionou-se o *mix* de síntese (7 μ l, tabela 3.1).

Tabela 3.1: Mix de síntese de cDNA.

Compostos	Quantidade
M-MLV 5x reaction buffer	4 μ l
H ₂ O nuclease free	2,3 μ l
RiboLock RNase Inhibitor 40 U/ μ l	0,2 μ l (8 U)
M-MLV RT 200 U/ μ l	0,5 μ l (100 U)

A síntese foi feita num termociclador usando o programa indicado na tabela 3.2.

Tabela 3.2: Condições dos ciclos de síntese de cDNA com os seus respetivos tempos e temperatura.

	Etapas da síntese	Temperatura (°C)	Tempo (minutos)
Síntese	Desnaturação	20	10
	Síntese	42	50
	Inativação da enzima	70	10

Os cDNAs sintetizados foram diluídos 1:5 em água milliQ e armazenados a -20, até seu uso para PCR.

Após a síntese, seguiu-se amplificação por PCR do gene para o RNA ribossomal 18S (18S rRNA), que serviu como controlo interno.

O PCR ao 18S foi feito nas seguintes condições: 2.5 μ l de tampão de reação 10x, 0.1 μ l de Taq DNA polimerase (5U/ μ l, DreamTaq, Fermentas), 18.35 μ l de água milliQ, 0.3 μ l de dNTPs (10mM cada), 1 μ l de *primer forward* (ou direto, 10 pmol/ μ l), 1 μ l *primer*

reverse (ou inverso, 10 pmol/μl) (tabela 3.3), 1 μl de cDNA (diluído 1:5), obtendo um volume final de 25 μl.

Tabela 3.3: Sequência dos *primers* para 18S.

<i>Primers</i>	Sentido do <i>primer</i>	Sequência do <i>primer</i> (5' - 3')	Ta (°C)	Pb
18S	Fw	TCAAGAACGAAAGTCGGAGG	59	495
	Rv	GGACATCTAAGGGCATCACA		

Ta - Temperatura otimizada de emparelhamento, **Pb** - Tamanho fragmento amplificado em pares de base, **Fw** - *Primer* em sentido direto (*forward*) e **Rv** - Reverso (*reverse*).

Após o PCR 18S, o produto foi corrido em gel de agarose: adicionam-se 2 μl de tampão de migração a 5 μl dos produtos de PCR e aplicou-se a mistura em gel de agarose a 1,5%. Para a análise do produto PCR em gel observou-se uma banda com aproximadamente 495 pares de base e fotografada ficando como controlo interno.

3.3.3. PCR aos recetores estrogénicos

A expressão dos genes analisados, nas escamas das duas espécies, foram os recetores nucleares alfa, beta-a e beta-b (ER α , ER β a e ER β b) e o recetor membranar GPER, recetor de estrogénios acoplado à proteína G. Os *primers* para cada gene foram desenhados com bases nas sequências dos genes correspondentes no genoma do robalo (em <http://seabass.mpipz.de/>) (“European seabass (*D. labrax*) Genome Browser Gateway,” 2015) e da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*, em www.ensembl.org).

As reações de PCR foram efetuadas num volume de 15 μl contendo 1 μl de cDNA diluído a 1:5, 200 μM de dNTP, 1 mM MgCl₂, 5 U de Taq DNA polimerase (DreamTaq Fermentas) e 300 nM de cada *primer* (direto ou inverso, ver tabela 3.4).

Tabela 3.4: Listas dos *primer* usado na expressão de cada gene em PCR semi-quantitativo, aos recetores nucleares e membranares.

Recetores	Gene	Sentido do primer	Sequência do primer (5' - 3')	Ta (°C)	Pb
Recetores de estrogénio nucleares	<i>ERα</i>	Fw	AAACCACCTCAACACCCGTCTACAG	62	173
		Rv	GCACACGGCACAGAAACGCATA		
	<i>ERβ<i>a</i></i>	Fw	TGTCATCGGGCGGGAAGG	60	188
		Rv	GCTCTTACGGCGGTTCTTGTCT		
	<i>ERβ<i>b</i></i>	Fw	CGCAACCTCCGTCTCACCTG	60	158
		Rv	GGGCACCTCTAAACTCTGAAATGG		
Recetores de estrogénio membranar	<i>GPER</i>	Fw	GCCACCCTTCTCCCTTTCACC	62	157
		Rv	TTCGCCCAATCAGAGAGTAGCAT		

Ta - Temperatura otimizada de emparelhamento, **Pb** -Tamanho fragmento amplificado em pares de base, **Fw** - *Primer* em sentido direto (*forward*) e **Rv** - Reverso (*reverse*).

Os termociclos consistiram de 5 min a 95° C para desnaturação, seguidos de 40 ciclos de 10 s a 95° C, 10 s à temperatura de emparelhamento otimizada (60° C - 62° C- ver tabela 3.3) e 10 s 72° C para extensão, com a extensão final durante 5 min a 72° C.

Tendo concluído todo processo de PCR semi-quantitativo, o produto foi corrido em gel agarose; adicionam-se 2 μ l de tampão de migração a 5 μ l dos produtos de PCR e aplicou-se a mistura em gel de agarose a 1,5%. Para a análise do produto PCR em gel observaram-se bandas do tamanho esperado para cada gene.

3.4. Ensaio de escamas *in vitro*

Este ensaio foi usado para avaliar os efeitos dos compostos em análise neste trabalho - trifenilestanho (TPT) e di-(2-etil-exil) ftalatos (DEHP) e butilbenzil ftalato (BBP) - nas atividades das enzimas fosfatase ácida resistente ao tartrato (TRAP) e a fosfatase alcalina (ALP). As escamas foram incubadas em meio de cultura (Meio Mínimo Essencial (MEM)) com antibiótico (solução de Penicilina/Estreptomicina (100 μ /mL), sem o composto em estudo (grupo controlo), ou em meio de cultura com diferentes concentrações (10⁻¹⁰ M, 10⁻⁸ M e 10⁻⁶ M) do composto nos grupos tratados. Foram realizados ensaios *in vitro* para avaliar os efeitos de tratamentos de curta duração (30 min) e de longa duração (24 h) e para cada caso foram testadas 4 escamas por tratamentos, 1 tratamento por poço em placas de 24 poços, com n=3 peixes por cada ensaio. A figura 3.2 mostra o desenho experimental de uma placa típica de ensaio de um composto, às 3 concentrações, nos dois tempos ensaiados e para uma das enzimas testadas.

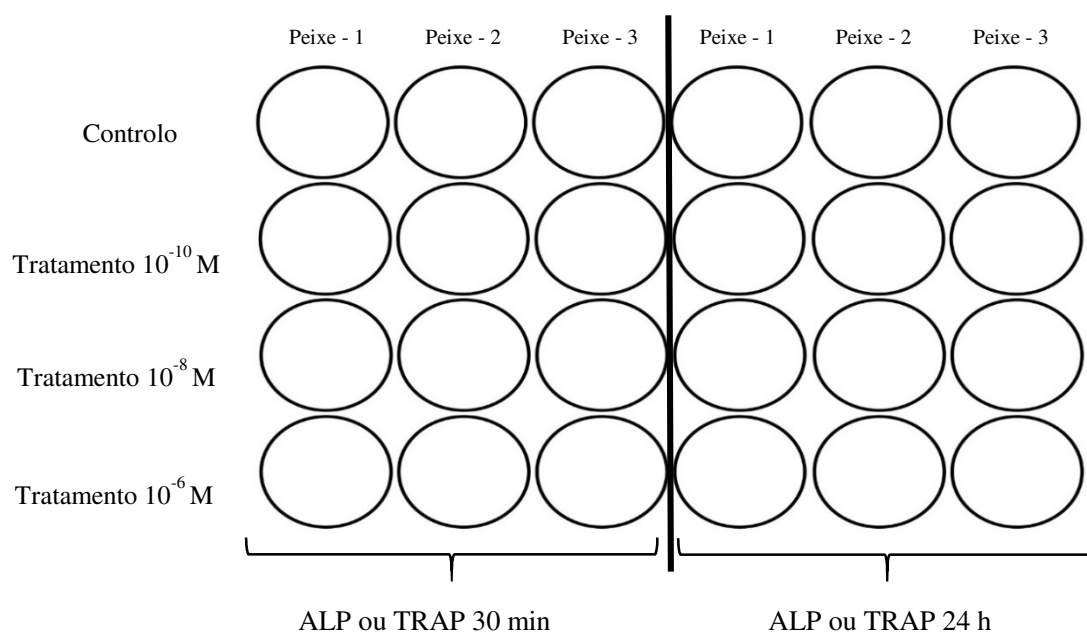


Figura 3.2: Exemplo de desenho experimental do ensaio *in vitro* (ALP e TRAP) por peixe (P1, P2 e P3), tratamentos (Controlo, 10^{-10} M, 10^{-8} M e 10^{-6} M) em 30 min e 24 h na placa de 24 poços.

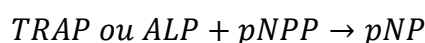
Para cada ensaio, prepararam-se os diferentes meios de cultura, em câmara de fluxo laminar previamente esterilizada, com o composto a testar (TPT, DEHP ou BBP) às concentrações adequadas. Transferiram-se, aleatoriamente, 4 escamas para cada poço (numa placa de 24 poços) com a ajuda de uma pinça, usando as escamas previamente recolhidas em água salgada (robalo) ou doce (tilápia). Adicionaram-se as soluções do meio de cultura com ou sem estímulo ($100 \mu\text{L}/\text{escama}$), preparadas previamente. Incubaram-se as placas na estufa, a 21°C , durante 30 min ou 24 h, consoante o tratamento a realizar, seguindo-se depois a medição das atividades enzimáticas TRAP ou ALP das escamas controlo ou tratadas.

3.5. Quantificação da atividade enzimática

A velocidade da reação catalisada por uma enzima é aumentada devido à diminuição da energia de ativação necessária para converter o substrato no produto (Halpern, 2005; Manso, Freire, & Azevedo, 1986). A velocidade da reação enzimática é expressa em termos de formação de produtos ou do consumo dos reagentes, por unidade de tempo. As enzimas TRAP e ALP convertem o substrato *p*-nitrofenil-fosfato (*p*-nitrophenyl-phosphate - pNPP) em produto *p*-nitrofenol (*p*-nitrophenol - pNP) e são extremamente

específicas para a reação que catalisam (ver equação 3.1), sendo neste caso analisadas a diferente pH (a TRAP é uma fosfatase ácida e a ALP é uma fosfatase alcalina).

Equação 3.1: Equação da reações enzimáticas estudadas:



Onde:

TRAP ou ALP - Enzima

pNPP - Substrato

pNP - Produto

A atividade enzimática é afetada por vários fatores, tais como a temperatura, o pH, e as concentrações de enzima e substratos presentes no meio de reação pelo que se torna importante otimizar as condições em que o ensaio de quantificação da atividade vai decorrer. A etapa de otimização realizada neste trabalho permitiu estabelecer as melhores condições de reação para cada uma das enzimas a analisar (TRAP e ALP), que se apresentam na tabela 3.5.

Tabela 3.5: Condições otimizadas do ensaio em função das condições de reação e enzimas.

Condições de reação	Enzimas	
	TRAP	ALP
Temperatura	30° C	30° C
pH	5,3	9,5
Concentração de Substrato pNPP	5 mM	5 mM
Tempo de incubação	15 min	30 min

3.5.1. Curva de calibração

Para cada enzima (TRAP ou ALP) foi preparada uma curva de calibração por cada dia de ensaio, com uma série de soluções de produto da reação enzimática obtendo as seguintes concentrações de pNP (200 µM, 100 µM, 50 µM, 25 µM, 12,5 µM, 6,25 µM, 3,125 µM, 0 µM). Foram colocados 250 µl de cada solução preparada em cada poço de uma placa de 96 poços, em duplicado e procedeu-se à leitura da absorvância a 405 nm, ao mesmo tempo que a leitura das placas experimentais (ver abaixo). Fez-se a leitura da absorvância

num leitor de placas (BIO-RAD Benchmark) programado para proceder a uma agitação de 5 segundos antes da leitura e para ler a absorvância a 405 nm.

3.5.2. Quantificação da atividade enzimática nos meios de incubação

Depois da incubação *in vitro* (30 min e 24 h) transferiram-se as escamas do meio de cultura para tubos *ependorf* de 2 ml (2 escamas para cada tubo, 2 tubos por cada tratamento). A cada tubo foram adicionados 400 µl da solução com o substrato enzimático pNPP preparada de fresco (ALP Mix, ou TRAP Mix, para a enzima ALP ou TRAP, respetivamente - Anexo 1) e agitou-se brevemente num vórtex.

Incubou-se na estufa (Biometra ov3) a 30° C, com agitação (60 rotações por min), durante o tempo de incubação adequado a cada enzima (tabela 3.5). Terminado o tempo de incubação, parou-se a reação por adição de 200 µl de uma solução de hidróxido de sódio 2 M (Anexo 1).

De seguida, centrifugou-se a 7.000xg, durante 5 minutos, a temperatura ambiente, depois transferiram-se 250 µl do sobrenadante de cada tubo para um poço, numa placa de 96 poços, em duplicado. Fez-se a leitura da absorvância nas mesmas condições das que foram usadas para a curva de calibração. A atividade enzimática é calculada a partir da curva de calibração preparada e é expressa em nmol/min.

3.5.3. Análises estatísticas

Obtendo o valor da atividade enzimática em nmol/min por cada tubo no programa *Excel*, com base na equação determinada para a curva de calibração, procedeu-se à elaboração dos gráficos no *software SigmaPlot versão 12.0*. Apresentaram-se no eixo dos *Xs* os tratamentos (Controlo, 10⁻¹⁰ M, 10⁻⁸ M e 10⁻⁶ M do composto em estudo) e no eixo dos *Ys* a média da atividade enzimática em nmol/min em cada um dos 3 peixes, com a barra do erro padrão em cada enzima e tempo do ensaio. De seguida efetuou-se tratamento estatístico *teste t*, para avaliar diferenças significativas ($P < 0.05$ ou $P < 0.01$) dos resultados de atividade para exposição a diferente concentração (10⁻¹⁰ M, 10⁻⁸ M ou 10⁻⁶ M) dos compostos *versus* o grupo Controlo.

Capítulo 4 - RESULTADOS

4. RESULTADOS

Os resultados apresentados descrevem a avaliação da expressão dos genes para os recetores estrogénicos nucleares ($ER\alpha$, $ER\beta a$ e $ER\beta b$) e membranar (o recetor de estrogénios acoplado à proteína G, *GPER*) nas escamas de robalo (*D. labrax*) e tilápia (*O. mossambicus*), para investigar se são responsivas a compostos estrogénicos. De seguida seguem-se resultados dos ensaios *in vitro* com escamas das mesmas espécies, realizados para avaliar o efeito de disruptores endócrinos estrogénicos (EDCs) na atividade de enzimas relacionadas com a homeostase dos tecidos mineralizados, nomeadamente a TRAP (marcador de atividade osteoclástica) e a ALP (marcador de atividade osteoblástica). Os compostos utilizados nestes ensaios foram o composto organoestânico TPT e ftalatos DEHP e BBP. As concentrações testadas para cada composto foram 10^{-10} M, 10^{-8} M e 10^{-6} M, e as amostras foram sujeitas a dois tratamentos com diferente duração, 30 minutos, que permite avaliar a ocorrência de respostas rápidas, e 24 horas para avaliar respostas mais lentas.

4.1. Determinação da expressão dos recetores de estrogénio em escamas

Tanto nas escamas de robalo como de tilápia, os recetores $ER\beta a$, $ER\beta b$ e *GPER* foram os mais expressivos (figura 4.1). *GPER* num dos indivíduos de tilápia, mostrou níveis de expressão baixa, enquanto os transcritos para $ER\alpha$, em ambas as espécies, foram detetados apenas a nível vestigiais. Os perfis de expressão dos recetores de estrogénio foram muito semelhantes entre as duas espécies.

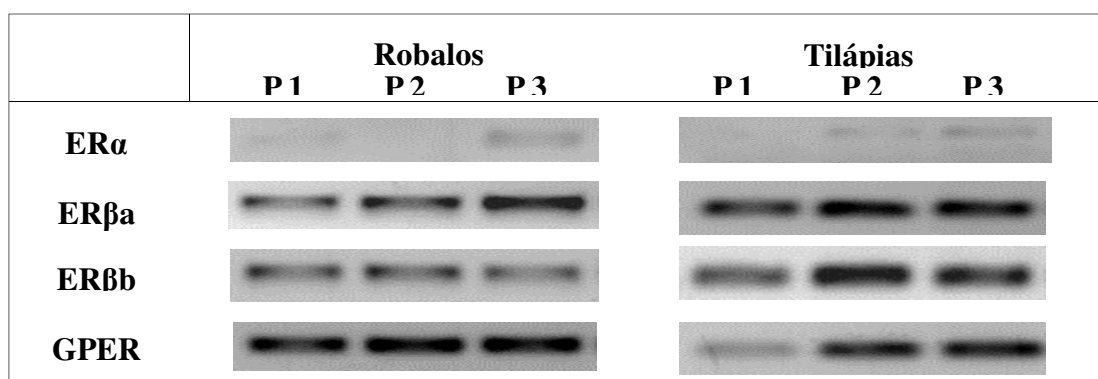


Figura 4.1: Representação da expressão dos genes recetores estrogénicos em escamas de robalos (peso médio = 117,33 g) e na tilápia (peso médio = 107,86 g), por RT-PCR semi-quantitativo. $ER\alpha$ (recetor de estrogénio alfa), $ER\beta a$ e $ER\beta b$ (recetores de estrogénio beta a e b) e *GPER* (recetor de estrogénios acoplado à proteína G), P1, P2 e P3 = número de peixe amostrados.

4.2. Efeitos do TPT nas atividades enzimáticas TRAP e ALP

Nos robalos (figura 4.2), a atividade da TRAP em escamas tratadas com TPT, durante 30 min, manteve-se praticamente idêntica à atividade dos controlos (escamas expostas a meio de cultura sem o composto), em todos os tratamentos. As amostras tratadas com este composto durante 24 h também mantiveram igual nível de atividade em todos os tratamentos, o que sugere que a atividade dos osteoclastos não se alterou nestas condições. Não se observaram diferenças significativas entre os tratamentos e os respetivos controlos.

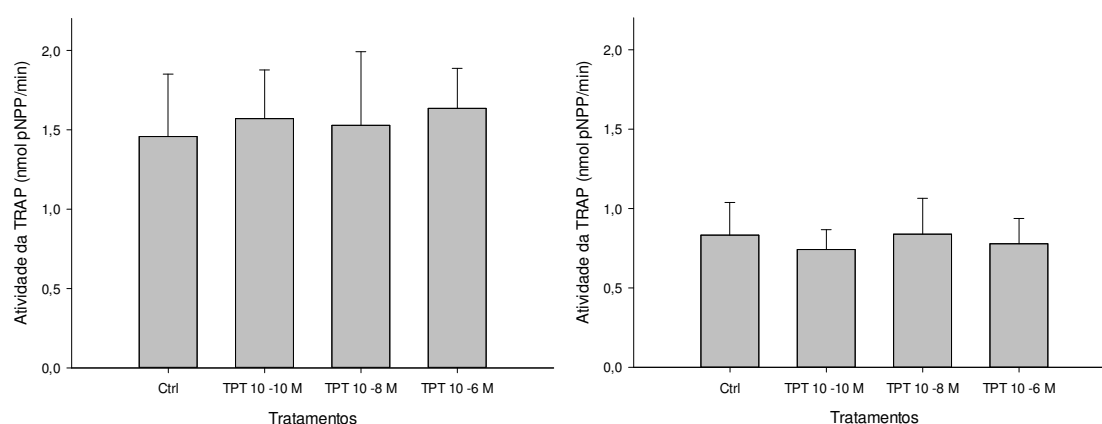


Figura 4.2: Efeito do TPT sobre a atividade da TRAP em escamas de robalos, incubadas durante 30 min e 24 h. Os resultados apresentados correspondem à média \pm erro padrão ($n=3$ peixes, 4 escamas cada).

A atividade da ALP em escamas de robalo tratadas com TPT durante 30 min (figura 4.3) mostrou uma tendência para aumento em todos os tratamentos, embora apenas se tenha verificado uma diferença significativa relativamente ao controlo no caso do tratamento com a concentração mais elevada (TPT 10⁻⁶ M, $p < 0.05$). No tratamento com TPT a 10⁻⁸ M, parece haver uma maior atividade desta enzima em relação aos restantes tratamentos, mas a diferença não foi estatisticamente significativa, possivelmente devido à grande variabilidade registada. Para a incubação por 24 h, a atividade da ALP revela um comportamento idêntico ao verificado no caso do tratamento por 30 min para a concentração mais elevada, ocorrendo um aumento significativo ($p < 0.01$), embora para concentrações menores de TPT 10⁻¹⁰ M e 10⁻⁸ M tenha havido uma ligeira mas não significativa diminuição da atividade enzimática. Estes resultados parecem indicar que a

enzima ALP é mais sensível à presença de TPT, o que sugere que a atividade dos osteoblastos pode ser afetada por este composto.

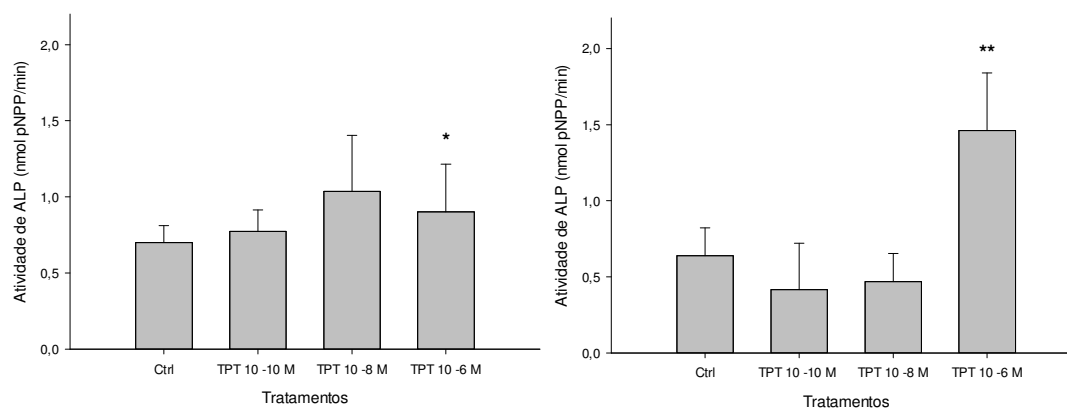


Figura 4.3: Efeito de TPT sobre a atividade da ALP em escamas de robalos, incubadas a 30 min e 24 h. * e ** indicam diferenças estatisticamente significativas com $p < 0.05$ e $p < 0.01$, respetivamente, relativamente aos valores nas escamas de controlo. Os resultados apresentados correspondem à média \pm erro padrão ($n=3$ peixes, 4 escamas cada).

Os tratamentos das escamas de tilápia com TPT durante 30 min e 24 h (figura 4.4) não provocaram alterações significativas na atividade da TRAP em nenhuma das concentrações (TPT 10^{-10} M, TPT 10^{-8} M e TPT 10^{-6} M) testadas, o que sugere que, tal como acontece nas escamas de robalos, a atividade das células osteoclásticas não é afetada pelo TPT nestas condições experimentais.

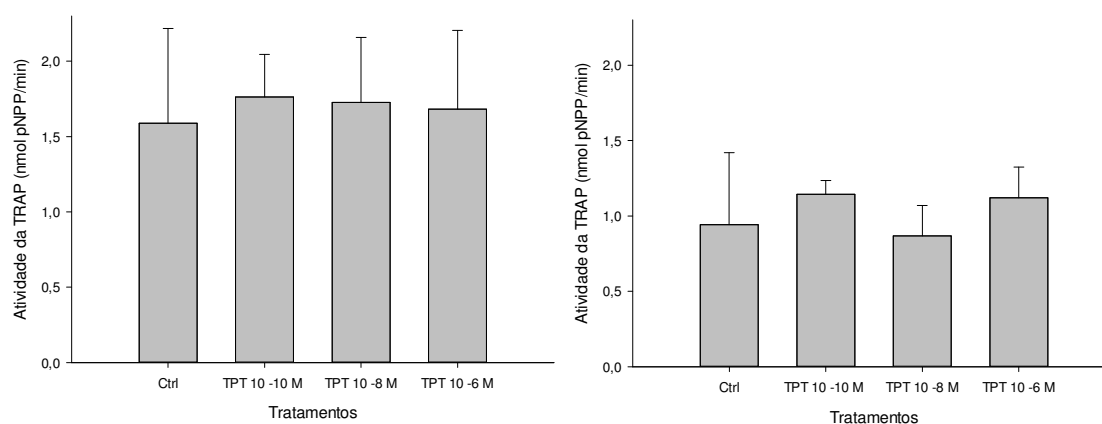


Figura 4.4: Efeito de TPT sobre a atividade da TRAP em escamas de tilápia, incubadas a 30 min e 24 h. Os resultados apresentados correspondem à média \pm erro padrão ($n=3$ peixes, 4 escamas cada).

A atividade ALP medida em escamas de tilápia após 30 min e 24 h em diversas concentrações de TPT podem ser observadas na figura 4.5. Verifica-se que o TPT afetou esta atividade a 10^{-6} M e 30min, com um ligeiro mas significativo aumento de atividade ($p < 0.05$), o que sugere que a atividade osteoblástica nas escamas de tilápia é alterada nessas condições de ensaio com TPT. No ensaio de 24 h, todos os tratamentos apresentaram praticamente a mesma atividade que o controlo.

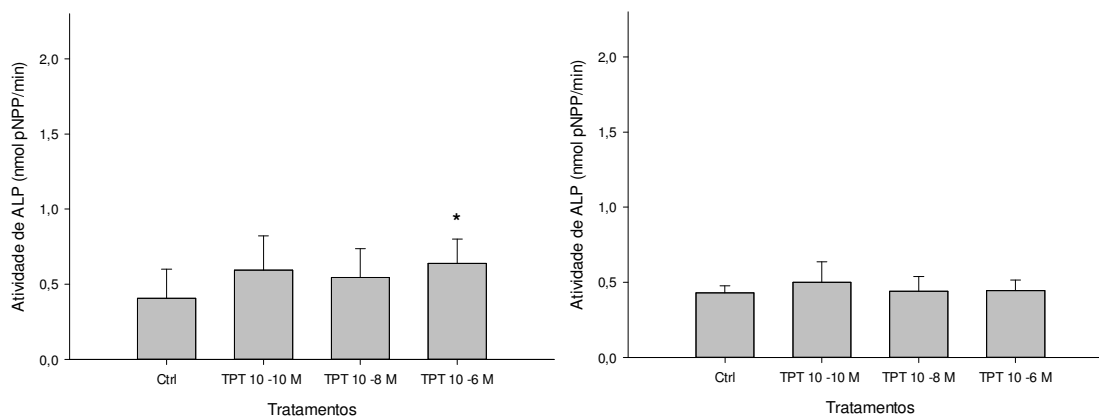


Figura 4.5: Efeito de TPT sobre a atividade da ALP em escamas de tilápia, incubadas a 30 min e 24 h. * indica diferenças estatisticamente significativas com $p < 0,05$, relativamente aos valores nas escamas de controlo. Os resultados apresentados correspondem à média \pm erro padrão ($n=3$ peixes, 4 escamas cada).

Os resultados aqui apresentados indicam que a enzima TRAP é mais sensível a TPT do que a enzima ALP nas escamas de tilápia, tal como em robalo, o que sugere que a atividade osteoclástica é mais influenciada por TPT do que a atividade osteoblástica nestas espécies.

4.3. Efeitos do DEHP nas atividades enzimáticas TRAP e ALP

Em escamas de robalos tratados com ftalato DEHP (figura 4.6), verificou-se que no ensaio de 30 min o tratamento com DEHP 10^{-8} M foi o que resultou em maior aumento de atividade da TRAP relativamente ao controlo, significativo com $p < 0,05$. No caso da resposta lenta em 24 h, verificou-se o mesmo comportamento do tempo de resposta rápida com aumento da atividade da TRAP, significativo à mesma concentração, sugerindo que a enzima TRAP em robalo é sensível à presença de DEHP e que a atividade osteoclástica pode ser afetada por este composto.

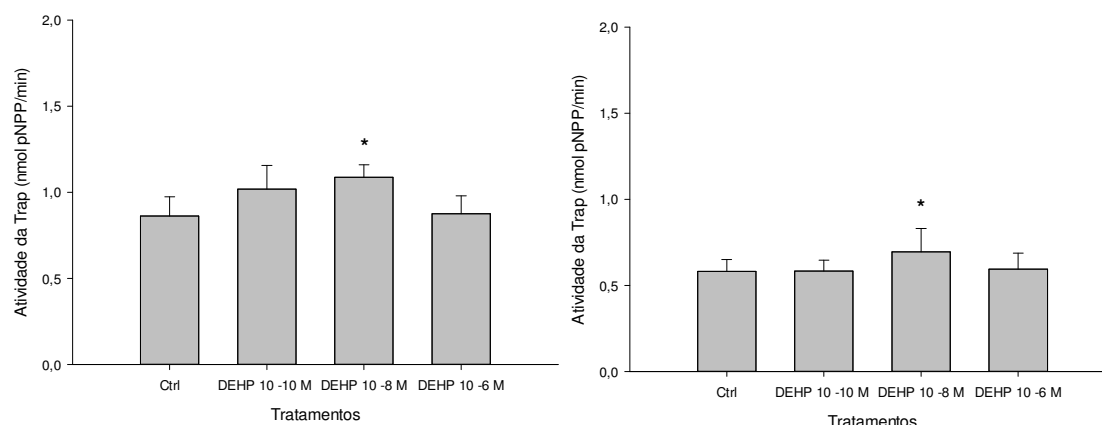


Figura 4.6: Efeito de DEHP sobre a atividade da TRAP em escamas de robalos incubadas a 30 min e 24 h. * indica diferenças estatisticamente significativas com $p < 0,05$, relativamente aos valores nas escamas de controlo. Os resultados apresentados correspondem à média \pm erro padrão (n=3 peixes, 4 escamas cada).

Em escamas de robalos tratadas com DEHP durante 30 min e 24 h não se verificaram diferenças significativas na atividade da ALP (figura 4.7). Verificou-se um ligeiro aumento no ensaio de 30 min com tratamento 10^{-8} M e ligeira diminuição no ensaio de 24 h com todos os tratamentos, mas não foram significativos, sugerindo que a atividade osteoblástica em escamas de robalos não altera nestas condições com DEHP.

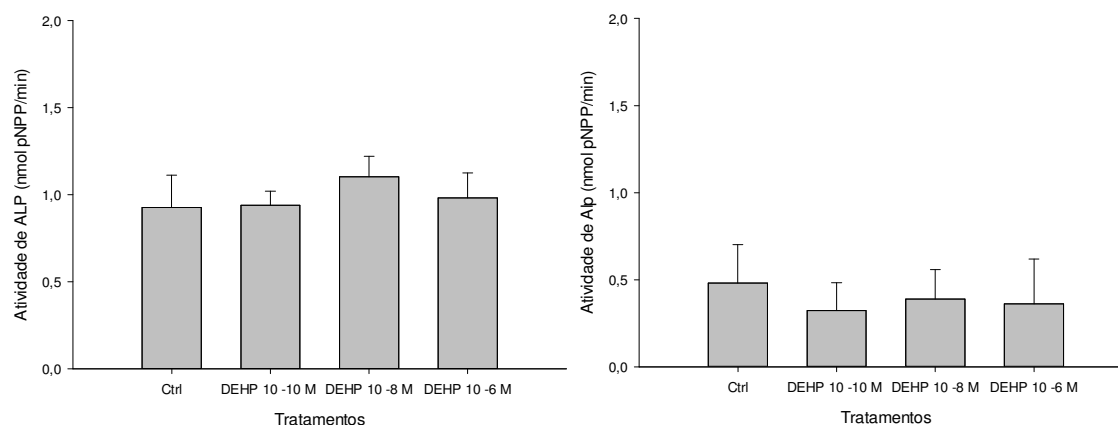


Figura 4.7: Efeito de DEHP sobre a atividade da ALP em escamas de robalos, incubadas a 30 min e 24 h. Os resultados apresentados correspondem à média \pm erro padrão (n=3 peixes, 4 escamas cada).

Os resultados aqui apresentados sugerem que a enzima TRAP é mais sensível a DEHP do que a enzima ALP nas escamas de robalos, o que sugere que a atividade osteoclástica é mais influenciada por DEHP do que a atividade osteoblástica.

Apresenta-se na figura 4.8 os resultados dos tratamentos de escamas de tilápia tratadas com DEHP durante 30 min e 24 h. Não se encontraram diferenças significativas relativamente a cada grupo controlo, o que sugere que a atividade dos osteoclastos não se alterou nestas condições em tilápia.

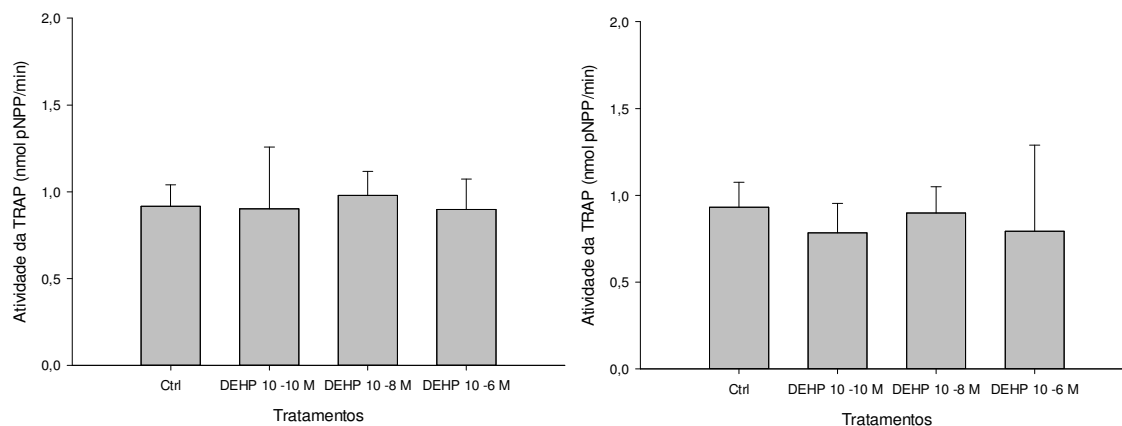


Figura 4.8: Efeito de DEHP sobre a atividade da TRAP em escamas de tilápia, incubadas a 30 min e 24 h. Os resultados apresentados correspondem à média \pm erro padrão (n=3 peixes, 4 escamas cada).

Tratamentos das escamas de tilápia com DEHP também não alteraram a atividade ALP após 30min (figura 4.9). No ensaio dos 24 h o tratamento DEHP 10⁻⁶ M parece ter aumentado a atividade ALP relativamente ao controlo, mas não o suficiente para ser efeito significativo com $p < 0,05$. Estes resultados sugerem que nem a atividade osteoblástica nem a osteoblástica de escamas de tilápia se alteram com as condições de DEHP a que foram expostas.

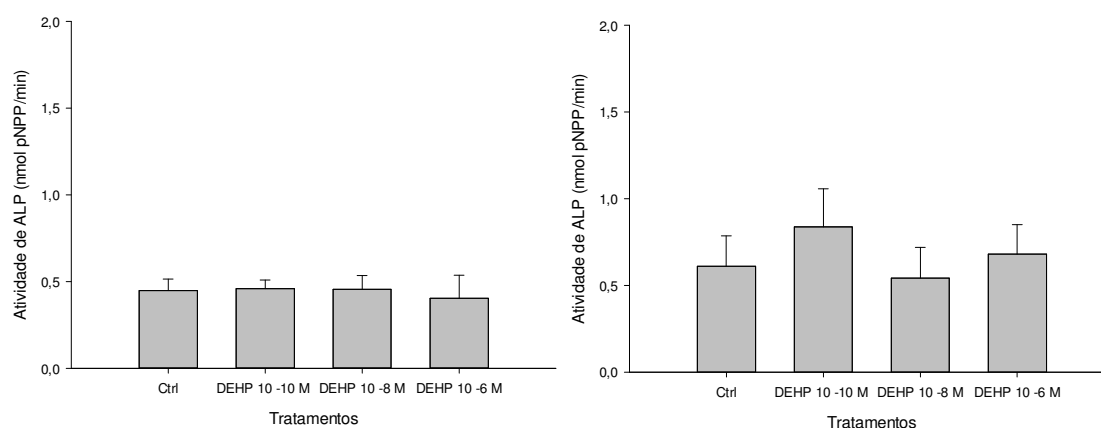


Figura 4.9: Efeito de DEHP sobre a atividade da ALP em escamas de tilápia, incubadas a 30 min e 24 h. Os resultados apresentados correspondem à média \pm erro padrão (n=3 peixes, 4 escamas cada).

4.4. Efeitos do BBP nas atividades enzimáticas TRAP e ALP

Escamas de robalo tratadas com o ftalato BBP (figura 4.10), quer nos ensaios 30 min e 24 h, não mostraram ser sensíveis a diferentes concentrações desse composto na atividade da enzima TRAP. Enquanto a atividade se manteve idêntica em todos os tratamentos no ensaio de 30 min, no ensaio de 24 h a atividade TRAP parece aumentar ligeiramente com todas as concentrações, mais evidente a 10^{-8} M de BBP, mas não significativamente. Estes resultados sugerem que a atividade dos osteoclastos em escamas de robalo não se alterou em resposta a BBP, nestas condições.

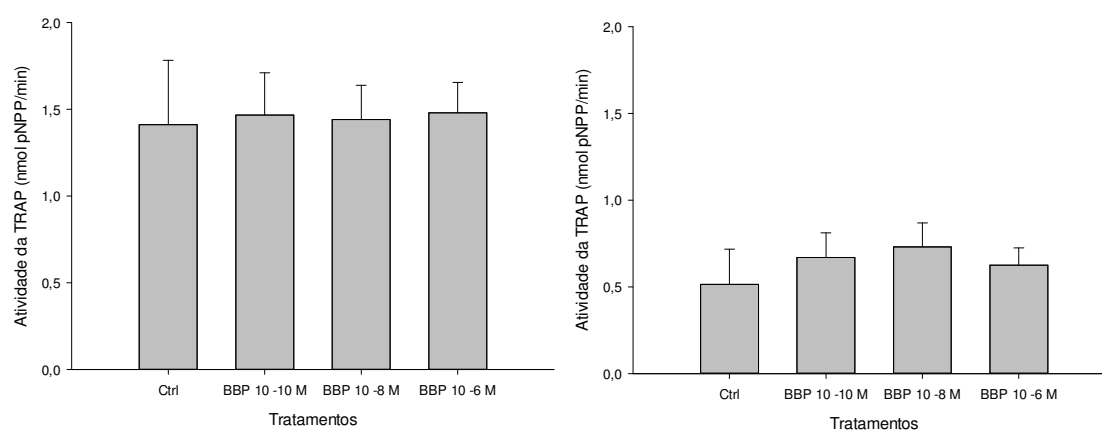


Figura 4.10: Efeito de BBP sobre a atividade da TRAP em escamas de robalos, incubadas a 30 min e 24 h. Os resultados apresentados correspondem à média \pm erro padrão ($n=3$ peixes, 4 escamas cada).

A figura 4.11 apresenta os efeitos da exposição a BBP na atividade ALP em escamas de robalo. Embora o tratamento BBP 10^{-10} M pareça ter maior atividade ALP do que tratamento controlo, este aumento não foi significativo, e elevada variabilidade foi observada na maioria dos grupos experimentais. Para o ensaio de 24 h também, não se encontraram diferenças entre os tratamentos.

Assim, os resultados obtidos indicam que as atividades TRAP e ALP (indicativas de atividades osteoclástica e osteoblástica, respectivamente) não foram afetadas pelas exposições ao composto BBP nas escamas de robalo.

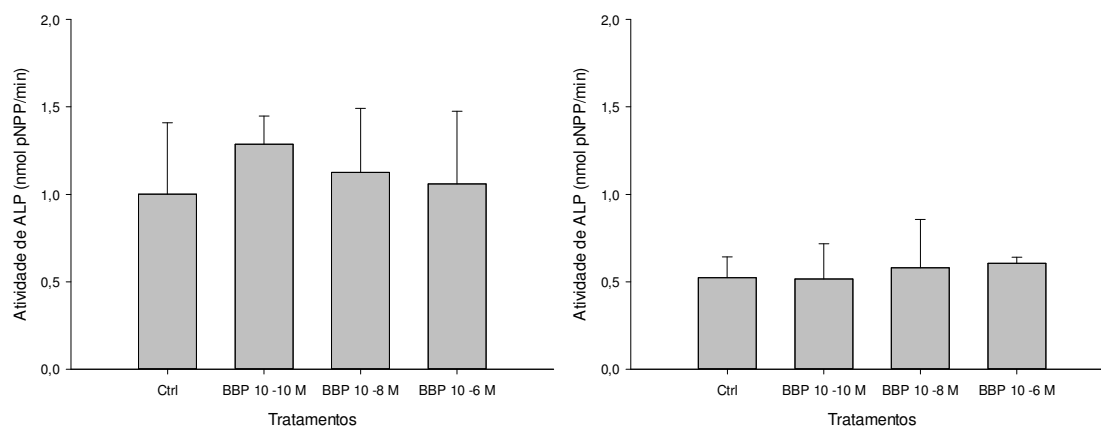


Figura 4.11: Efeito de BBP sobre a atividade da ALP em escamas de robalos, incubadas a 30 min e 24 h. Os resultados apresentados correspondem à média \pm erro padrão ($n=3$ peixes, 4 escamas cada).

Escamas de tilápia tratadas com BBP também apresentaram elevada variabilidade individual na atividade da TRAP medida após 30 min de exposição (figura 4.12). No ensaio de 24 h, observou-se um ligeiro aumento de atividade TRAP com BBP 10⁻⁸ M mas não ao ponto de ter diferenças significativas com $p < 0,05$, sugerindo que a atividade dos osteoclastos em escamas de tilápia não se alterou nestas condições de exposição ao ftalato BBP.

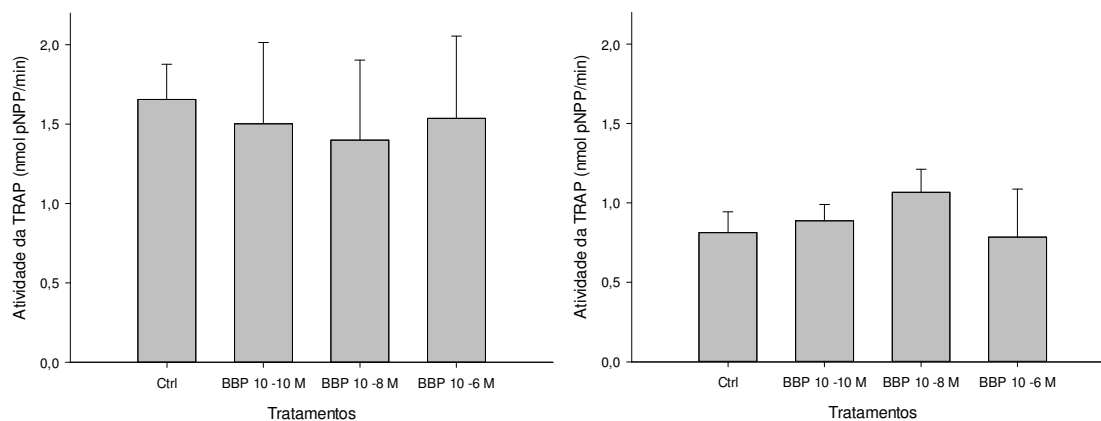


Figura 4.12: Efeito de BBP sobre a atividade da TRAP em escamas de tilápia, incubadas a 30 min e 24 h. Os resultados apresentados correspondem à média \pm erro padrão ($n=3$ peixes, 4 escamas cada).

Finalmente, escamas de tilápia tratadas com BBP não mostraram alterações na atividade da ALP após 30 min (figura 4.13). Para o ensaio de 24 h, o tratamento BBP 10⁻⁶ M causou uma diminuição significativa comparando com o controlo ($p < 0,05$), sugerindo que a atividade osteoblástica em escamas de tilápia é diminuída por BBP nestas condições.

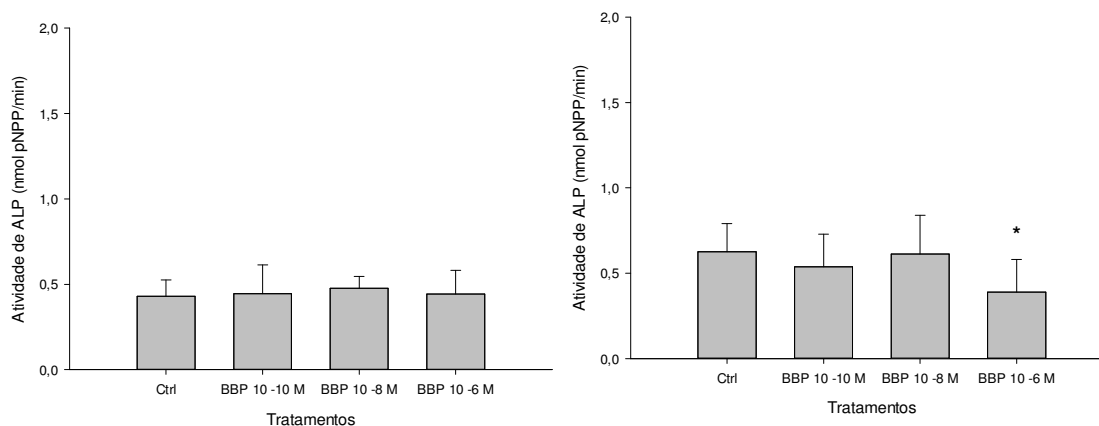


Figura 4.13: Efeito de BBP sobre a atividade da ALP em escamas de tilápia, incubadas a 30 min e 24 h. * indica diferenças estatisticamente significativas com $p < 0,05$ dos valores nas escamas de controlo. Os resultados apresentados correspondem à média \pm erro padrão ($n=3$ peixes, 4 escamas cada).

Apresenta-se na tabela 4.1 um resumo dos efeitos observados nas enzimas TRAP e ALP de robalo e tilápia com os compostos EDCs usados neste estudo (TPT, DEHP e BBP). Das enzimas analisadas a ALP foi influenciada pelo composto TPT e BBP, enquanto a enzima TRAP só foi influenciada pelo composto DEHP. Na tilápia, a enzima ALP teve um aumento rápido (30 min) com o TPT e uma diminuição visível após 24h com BBP. Nos robalos, a ALP aumentou a ambos os tempos com TPT e a TRAP foi afetada por DEHP, aumentando significativamente a ambos os tempos. Em resumo, os resultados apresentados permitiram identificar efeitos disruptores rápidos e lentos destes poluentes em enzimas relacionadas com a homeostase mineral.

Tabela 4.1: Resumo dos efeitos dos disruptores endócrinos testados (TPT, DEHP e BBP) na atividade das enzimas relacionadas com a homeostase dos tecidos mineralizados (TRAP e ALP), em escamas de robalo e tilápia após exposições de 30 min e 24 h. (↑) indica um efeito de aumento de atividade com a exposição ao composto, (↓) indica diminuição de atividade e (*) (**) indicam diferenças estatisticamente significativas relativamente a escamas controlo, com $p < 0.05$ e $p < 0.01$, respetivamente.

Compostos	Figuras	Enzimas	Espécies	Efeito 30 min	Efeito 24 h
TPT	Fig. 4.2	TRAP	Robalo	Sem alteração	Sem alteração
	Fig. 4.3	ALP	Robalo	↑ 10^{-6} M (*)	↑ 10^{-6} M (**)
	Fig. 4.4	TRAP	Tilápia	Sem alteração	Sem alteração
	Fig. 4.5	ALP	Tilápia	↑ 10^{-6} M (*)	Sem alteração
DEHP	Fig. 4.6	TRAP	Robalo	↑ 10^{-8} M (*), tendência de ↑ a 10^{-10} M	↑ 10^{-8} M (*)
	Fig. 4.7	ALP	Robalo	Sem alteração	Sem alteração
	Fig. 4.8	TRAP	Tilápia	Sem alteração	Sem alteração
	Fig. 4.9	ALP	Tilápia	Sem alteração	Sem alteração, tendência de ↑ 10^{-10} M
BBP	Fig. 4.10	TRAP	Robalo	Sem alteração	Sem alteração, tendência de ↑ a todas as concentrações
	Fig. 4.11	ALP	Robalo	Sem alteração	Sem alteração
	Fig. 4.12	TRAP	Tilápia	Sem alteração	Sem alteração, tendência de ↑ 10^{-8} M
	Fig. 4.13	ALP	Tilápia	Sem alteração	↓ 10^{-6} M (*)

Capítulo 5 - DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

Com este trabalho, pretendeu-se identificar a presença dos recetores estrogénicos nucleares (ER α , ER β a e ER β b) e membranas (GPER) em escamas de robalo e tilápia assim como avaliar o impacto da exposição a compostos organoestânicos, tais como o trifenilestano (TPT) e a ftalatos, tais como o (di-(2-etil-exil) ftalato (DEHP) e o butilbenzil ftalato (BBP), possíveis disruptores estrogénicos, no metabolismo mineral das escamas, um processo que pode ser regulado por estrogénios. Esta avaliação foi feita através da exposição a diferentes concentrações (10^{-10} , 10^{-8} e 10^{-6} M) dos compostos, em tratamentos de resposta curta (30 minutos) ou longa (24 horas) duração, seguidos da determinação da atividade de enzimas relacionadas com a reabsorção ou deposição de cálcio (Ca), respetivamente, a fosfatase ácida resistente ao tartrato (TRAP) e a fosfatase alcalina (ALP).

Atualmente, existe uma gama dos produtos químicos que são lançados no meio aquático e que podem mimetizar ou antagonizar a ação das hormonas (Schaedlich et al., 2015). Estes produtos químicos, causadores de desregulação endócrina, podem interagir com os sistemas fisiológicos e causar alterações no desenvolvimento, crescimento e reprodução em animais selvagens que se encontram expostos (Golshan et al., 2015).

No sentido de alcançar uma maior compreensão do efeito dos disruptores endócrinos na fisiologia dos organismos têm sido desenvolvidas técnicas de avaliação da disrupção endócrina, que podem ser aplicadas a uma variedade de espécies, para tentar perceber como estes compostos afetam a fisiologia dos organismos aquáticos (Jobling et al., 2003). No entanto, tem havido poucos estudos sobre o efeito destes compostos nos tecidos mineralizados dos peixes (em particular as escamas), que, para além da função protetora, podem funcionar como depósito de Ca e outros iões (Guerreiro & Fuentes, 2007), armazenando-os ou liberando-os, de maneira controlada, para manter relativamente constante a sua concentração fisiológica.

A mobilização ou deposição de minerais nas escamas (o chamado *turnover*) está sobre o controlo de várias hormonas, incluindo PTHrP ou estrogénios (Guerreiro et al., 2002; Rotllant et al., 2005), sendo assim também um possível alvo da ação de disruptores endócrinos estrogénicos (EDCs).

Neste estudo, foram identificados, nas escamas de robalos e tilápias, transcritos para os recetores estrogénicos nucleares (ER α , ER β a e ER β b) e membranas (GPER), com níveis de expressão muito semelhantes entre as duas espécies.

A deteção de ERs do tipo nuclear está em linha com estudos anteriores em que a expressão de ER α foi detetada a baixos níveis em osso e escamas de juvenis de truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), o que sugeriu que o efeito observado de diminuição da quantidade dos minerais em escamas (e aumento em osso) em resposta a E₂ pode ser fruto de uma ação direta desta hormona nestes tecidos, mediada diretamente por ER (Armour et al., 1997).

Nas escamas de peixe-dourado (*Carassius auratus*) verificou-se que os ERs são expressos durante o processo de regeneração das escamas, sendo expressos tanto em escamas ontogénicas como regeneradas, com maior expressão para a forma ER β a. Verificou-se também que os estrogénios participam na osteogénese, causando um aumento da atividade osteoblástica (ALP) em escamas ontogénicas e regeneradas, possivelmente pela atuação direta nos ERs detetados nestas escamas (Yoshikubo et al., 2005).

Nas escamas de dourada (*Sparus auratus*) e tilápia, foram identificadas os três ERs nucleares expressos em escamas e osso, por RT-PCR, com maior expressão para as formas ER β a e ER β b e baixa expressão do transcrito ER α , tal como neste estudo. A nível de proteína foram detetadas as três formas, que se demonstrou, por imunohistoquímica, estarem localizadas em pequenos grupos de células redondas, na camada basal das escamas, identificadas como prováveis osteoclastos (com expressão de TRAP) (Pinto et al., 2009). Assim, estes estudos sugeriram que o efeito da mobilização do Ca e aumento de atividade da TRAP por 17 β -estradiol detetados em escamas (Armour et al., 1997; Persson, Takagi, & Björnsson, 1995) se deve, provavelmente, à ação direta sobre os ERs localizadas em osteoclastos (Pinto et al., 2009). Ficou por investigar se os ERs também são expressos em osteoblastos, como em mamíferos (Centrella & McCarthy, 2012), o que poderá ser uma indicação de mecanismo direto dos efeitos na atividade osteoblástica (ALP) observados para E₂ em escamas de peixe (Suzuki et al., 2009; Yoshikubo et al., 2005), sugestivos de efeitos na mineralização.

Nos juvenis de truta arco-íris injetados com E₂ houve aumento da captação de Ca a partir do exterior, bem como a mobilização de Ca a partir de músculos e escama. A absorção do excesso de Ca em peixe encontra-se ligada a proteínas plasmáticas, implicando que os

sistemas de regulação da vitelogénese e equilíbrio do Ca estão integrados no nível mecânico ou endócrino tendo o E₂ mobilizado Ca em quantidade adaptada às necessidades da fêmea sexualmente madura (Persson et al., 1994).

No entanto, os estudos feitos até agora apenas demonstraram a expressão em escamas de ERs do tipo nuclear, que estão descritos como mediadores de estrogénios por mecanismos clássicos envolvendo transcrição de genes alvo, embora também possam atuar por mecanismos alternativos (Ex: Figura 1.5) (Laurentino et al., 2012; Pinto et al., 2014). Ainda não tinha sido detetado em escamas de peixes a expressão de recetores de membrana para estrogénios, como é o caso do recetor de membrana GPER, que se demonstrou em mamíferos e em peixes como podendo ligar a E₂ e compostos estrogénicos, ativando respostas rápidas não genómicas (Thomas et al., 2010).

A deteção de expressão de GPERs em escamas de tilápia e robalo feita neste estudo assim como a recente demonstração da sua regulação por E₂ em escamas de robalo, (Pinto, resultados não publicados) são resultados importantes para perceber os mecanismos de ação dos estrogénios (e dos EDCs) nas escamas de peixes, pois pela primeira vez se demonstra que estas podem ser alvo de ações diretas sobre recetores de membrana.

Os GPER detetados são possíveis candidatos a recetores que mediem respostas estrogénicas rápidas, provavelmente não genómicas (não envolvendo nova transcrição e síntese de proteínas), detetadas em escamas, como é o caso dos efeitos rápidos detetados neste estudo para o poluente TPT na atividade da ALP (que aumentou ao fim de 30 minutos em escamas de robalo e tilápia) e para o DEHP na atividade da TRAP (que aumentou também ao fim de 30 minutos em escamas de robalo). Efeitos rápidos foram também detetados para o E₂ que aumentou a atividade da TRAP em dourada ao fim de 1 hora (Rotllant et al., 2005) e o E₂ também parece afetar a atividade da ALP de modo rápido em escamas de robalo (Pinto, resultados não publicados).

Relativamente aos efeitos dos poluentes testados neste estudo, todos eles tiveram algum efeito nos indicadores de síntese e reabsorção de tecidos mineralizados nas escamas de robalos ou tilápias, embora com padrões diferentes, indicando que foram capazes de causar uma disrupção no seu metabolismo mineral.

O composto organoestânicos TPT não afetou a atividade osteoclástica (TRAP) durante períodos de resposta rápida ou de resposta longa (Tabela 4.1). Sendo assim, a reabsorção dos tecidos mineralizados nas escamas dos robalos e das tilápias parece não ter sido

afetada por TPT, pelo menos nas concentrações e tempos testados. Em contraste, a atividade osteoblástica (ALP) aumentou nas escamas de robalos e tilápias pelo TPT, sugerindo que este composto pode aumentar a mineralização do tecido, em períodos de resposta rápida 30 min (robalo e tilápia) e períodos de resposta longa 24 h (apenas em robalo), quando as escamas são expostas diretamente a este composto, as concentrações de 10^{-6} M.

Nas escamas de robalo e tilápia, TPT induziu síntese dos tecidos mineralizados através da atividade osteoblástica (ALP) em períodos de respostas rápidas e longas (Tsukamoto, Ishihara, Miyagawa-Tomita, & Hagiwara, 2004). Para concentrações de 3 a 30 nM, o TPT inibiu a mobilização da atividade osteoblástica (reduziu atividade da ALP) (Suzuki et al., 2006; Yonezawa et al., 2007). A atividade osteoclástica em peixe de água doce e peixes marinhos (Nibbler), dourada e *Girella punctataem*, em ambos os sexos a calcitonina foi suprimida em atividades osteoclastos (TRAP) (Suzuki, Suzuki, & Kurokawa, 2000).

Em Solha japonesa (*Paralichthys olivaceus*), o TPT diminuiu significativamente a atividade osteoblástica (Satone et al., 2011). Em *Bolinus brandaris*, a interferência de TPT foi significativa apenas nas fêmeas, revelando-se um forte inibidor da atividade da 5α -redutase, a 100 nM e não foram observadas diferenças entre os modos de ação (Lyssimachou, Ramón, & Porte, 2009). Em ratos, o TPT inibiu a diferenciação de osteoblastos em concentrações de 3 a 30 nM (Yonezawa et al., 2007). Assim, parece que, de acordo com estudos anteriores a atividade osteoclástica (TRAP) não é afetada por TPT enquanto a atividade osteoblástica (ALP) parece ser mais susceptível a este composto, embora se tenha verificado aumento ou diminuição de atividade da ALP, consoante a espécie, a concentração utilizada ou a duração do tratamento. Por exemplo, os efeitos observados neste estudo, em que se observou um aumento da atividade da ALP foram do tipo rápido (30 minutos de tratamento) enquanto os efeitos reportados se referem a efeitos ao fim de horas ou dias de incubação, podendo os diferentes efeitos observados estar dependentes do tempo de exposição ao composto.

Relativamente aos mecanismos de ação dos efeitos do TPT nas escamas, levantamos a hipótese de efeitos via recetores de estrogénios, dado que já se demonstrou a ligação deste composto a ERs ou GPERs na síntese da vitelogénese devido a sua estrutura com anéis benzénicos se poder assemelhar à estrutura dos estrogénios podendo, portanto, ligar-se aos ERs.

Nos teleósteos, o TPT inibiu a atividade osteoblástica (ALP) sem afetar a atividade dos osteoclastos (TRAP) e do metabolismo de cálcio, incluindo a ação da hormona calcitonina (Satone et al., 2011; Suzuki et al., 2006). A proteína relacionada com a hormona da paratiróide (PTHrP) induziu atividade osteoclástica em escamas de dourada (Rotllant et al., 2005). E em escamas de truta arco-íris, 17β -estradiol induziu atividade osteoclásticas, resultando no aumento da reabsorção dos tecidos mineralizados (Suzuki et al., 2006; Yonezawa et al., 2007).

O composto DEHP aumentou a reabsorção do tecido mineralizado nas escamas dos robalos, em período de respostas rápidas e longas, através do aumento da atividade osteoclástica (TRAP) (Tabela 4.1). Os seus mecanismos de ação nas escamas de robalos poderão incluir efeitos via ERs ou GPER, desencadeando mecanismos genômicos diretos ou indiretos (Ex: Figura 1.5) (Laurentino et al., 2012; Pinto et al., 2014). Nas escamas de tilápia, a atividade osteoblástica (ALP) e osteoclástica (TRAP) não foi afetada pelo DEHP (Tabela 4.1) pelo que a mineralização das escamas parece não ser afetada por esse composto nesta espécie, para o caso das concentrações usadas. Esta observação pode ser devida ao tamanho, peso e época reprodutiva dos peixes usados em ensaio *in vitro*, que são outros fatores que poderão interferir na síntese e mineralização dos tecidos mineralizados em robalos e tilápias.

A saúde reprodutiva de peixes-zebra macho (*Danio rerio*) expostos a 50 e 5000 mgkg⁻¹ DEHP foi comprometida devido a alterações na proporção das células germinais em fases específicas da espermatogénese e devido à redução na proporção de espermatozóides e aumento na proporção de espermatócitos, sugerindo que o DEHP pode inibir a progressão de meiose (Tamsyn, Lewis, Filby, Paull, & Santos, 2010). Por sua vez, o DEHP pode não ser um agente causador de anomalias reprodutivas vistas em animais selvagens, pelo menos como resultado da exposição a curto prazo (Tamsyn et al., 2010).

A reabsorção e a deposição do tecido mineralizado nos ensaio de resposta rápida 30 min e longa 24 h, em escamas de robalos, avaliadas através da determinação da atividade osteoblástica (ALP) e osteoclástica (TRAP) não foi afetadas pelo composto BBP (Tabela 4.1). Mais uma vez, esta observação poderá estar relacionada com o tamanho, peso e época reprodutiva dos peixes testados. Em escamas de peixe dourado (*Carassius auratus*) tratadas com 10^{-5} M de bisfenol A, devido a sua semelhança química, verificou-se uma supressão significativa da atividade osteoclástica e osteoblástica (Yachiguchi et al., 2014), enquanto o E₂ estimulou ambas as atividades (Suzuki & Hattori, 2003). Por outro

lado, a atividade dos osteoclastos (TRAP) nas escamas peixe dourado aumentou significativamente no mês de Abril, que é uma estação reprodutiva em comparação com o mês de Outubro que é uma temporada não reprodutiva (Azuma et al., 2007).

Os tecidos mineralizados em escamas de tilápias foi afetado pela síntese através da atividade osteoblástica (ALP) pelo composto ftalato BBP, em ensaios de resposta longas 24 horas. Isso, levantamos a hipótese de efeitos via recetores de estrogénios, dado que já se demonstrou a ligação deste composto a ERs ou GPERs na síntese da vitelogenese devido a sua estrutura com anéis benzénicos se poder assemelhar à estrutura dos estrogénios podendo, portanto, ligar-se aos ERs.

A dourada afetada durante a osteogênese indicaram que os osteoblastos em torno das escamas em regeneração nos 7 a 10 dias foram maiores em tamanho e número do que aqueles nas outras fases. Osteoblastos em todas as fases de escamas em regeneração foram mais ativos, do que os das restantes escamas ontogênica. As escamas em regeneração no 10º dia tiveram maior atividade osteoblastos. Além disso, verificou-se que o ERs, mRNA foi expressa nas escamas em regeneração devido aos estrogénios participam no crescimento e diferenciação dos osteoblastos em mamíferos. As escamas em regeneração podem ser utilizadas como um modelo de osteogênese em vertebrados (Yoshikubo et al., 2005).

A saúde reprodutiva de peixes-zebra macho (*Danio rerio*) em exposição de 50 e 5000 mgkg⁻¹ DEHP causou alterações na proporção das células germinais em fases específicas da espermatogénese e no testículo incluindo redução na proporção de espermatozoides e aumentando na proporção de espermátócitos, sugerindo que o DEHP pode inibir a progressão de meiose (Tamsyn, Lewis, Filby, Paull, & Santos, 2010). De mesmo modo que exposição a altas concentrações de DEHP interrompe espermatogênese em peixe-zebra adulto com consequente diminuição da capacidade de fertilizar oócitos gerados por fêmeas não tratadas, induzindo paragem da mitose durante a espermatogénese aumentando a fragmentação do DNA no esperma células, e reduzindo produção de embrião (até 90%) (Corradetti et al., 2013). Além disso, esses peixes são suscetíveis a ocorrer preferencialmente em via de sinalização PPAR no testículo e na sinalização estrogénica no fígado (Tamsyn et al., 2010). Por sua vez, DEHP pode não ser um agente causador de anomalias reprodutivas vistas em animais selvagens, pelo menos como resultado da exposição a curto prazo (Tamsyn et al., 2010). Isto implica que os sistemas reguladores vitelogenese e equilíbrio de Ca são integrados no nível mecanístico ou

endócrino, e que E₂ provoca a mobilização de Ca de uma grandeza adaptada às necessidades das fêmeas sexualmente amadurecido (Persson et al., 1994).

A combinação de DEHP e Sulfonato perfluoro-octana (PFOS) em *Oryzias melastigma*, o HSI dos peixes foram mais afetados do que em grupo exposto, somente a PFOS. O nível de mRNA de interleucina-1 beta (IL1B) foi regulado positivamente após a exposição em combinação de DEHP e PFOS, fez alteração da expressão dos genes (catalase (CAT), glutathiona peroxidase (GPx) e cluster de diferenciação 3 (CD3), não afetou os níveis de mRNA (Huang et al., 2015). Nos mexilhões *Mytilus galloprovincialis* ALP mostrou, variabilidade espacial e sazonal, em fêmeas a concentrações de ALP foi geralmente superior do que em machos (Pereira, 2009).

As principais diferenças entre habitats de água doce e marinhos os tamanhos tipicamente menores dos sistemas de água doce e as diferenças espaciais e temporais na mistura e transporte de partículas por forças físicas. Estas diferenças podem conduzir a diferenças no tipo de poluentes presentes. Por exemplo, os rios podem mostrar um padrão previsível nas características dos poluentes (tamanho, forma, abundância relativa), com base em fontes de resíduos (por exemplo doméstico vs. industrial) (Eerkes-Medrano, Thompson, & Aldridge, 2015).

A combinação de poluentes organoestânicos (TPT) e ftalatos (DEHP e BBP) no meio aquático torna-se um risco ainda maior em concentrações mais elevadas. Nos juvenis de *Oryzias melastigma*, tratados com DEHP e perfluorooctanosulfonatos (PFOS), verificou-se uma alteração do índice hepato-hepática (HSI) desses peixes conduzindo a toxicidade no fígado (Huang et al., 2015). Em *Oryzias latipes*, DEHP e BBP provocaram um atraso no tempo de incubação dos óvulos, sem dependência da dose, mas estes produtos químicos não tiveram efeito na taxa de eclosão. Por sua vez, esses compostos afetaram negativamente os embriões e as influências dos efeitos continuaram em fase adulta. Além disso, os efeitos não pareceram estar necessariamente dependentes da dose (Chikae, Hatano, et al., 2004). Em *Oryzias latipes*, o DEHP, o γ - hexaclorociclohexano e o E₂, influenciaram o aumento da taxa de mortalidade em grupos com maior concentração dos compostos, possibilitando distorção da razão sexual, redução do índice gonadossomático (IGS) em peixes machos, efeito na maturação sexual e mortalidade ou proporção entre os sexos (Chikae, Ikeda, et al., 2004). Os ftalatos (DEHP e BBP) alteram, a expressão genética em peixes dos ambos os sexos (Rochman, Kurobe, Flores, & Teh, 2014).

Nos peixes expostos a poluentes estrogênicos podem ocorrer alterações da diferenciação sexual e neural, causando reversão sexual de machos e fêmeas (McKenzie, 2011). Podem também provocar alteração comportamentais em machos, que são essenciais para atrair fêmeas, reduzindo a probabilidade de reprodução dos peixes (Bhandari et al., 2014), visto que, estrogênios controlam muitos processos fisiológicos em vertebrados femininos e masculino, principalmente mediadas por ER (Pinto, Passos, Martins, Power, & Canário, 2006). Estes produtos químicos causam alteração sexuais principalmente pela sua capacidade de agir como substâncias com capacidade androgénica ou mais frequentemente estrogénica, ligando-se a ERs (McKenzie, 2011). No meio aquático inúmeros compostos presentes em misturas complexas são disruptores endócrinos.

No entanto ainda há pouca informação sobre as sensibilidades relativas dos diferentes grupos de animais selvagens a esses produtos químicos, portanto, existem falhas importantes no nosso conhecimento sobre a importância ecológica da desregulação endócrina em animais selvagens (Ginani & Barboza, 2011; Lilley et al., 2012; Yost, Pow, Hawkins, & Kullman, 2014).

Estes resultados sugerem que a exposição ambiental a estes compostos poderá afetar a homeostasia dos tecidos mineralizados em peixes, com possíveis consequências para a sua saúde.

Capítulo 6 - CONCLUSÃO

6. CONCLUSÃO

Dos resultados obtidos nesse trabalho, conclui-se que nas escamas de robalos e tilápias, há expressão dos genes dos recetores estrogénicos nucleares (ER α , ER β a e ER β b) e do gene do recetor membranar GPER. Por sua vez, o gene do recetor nuclear ER β a, foi o gene mais expresso nas escamas de robalos, enquanto ER β b, ER α e GPER são menos expressos. Nas escamas da tilápia, os recetores nucleares ER β a e ER β b foram os mais expressos.

Quanto ao efeito dos disruptores endócrinos estrogénicos, conclui-se que os compostos organoestânicos (TPT) e os compostos ftalatos (DEHP e BBP) afetam a reabsorção e deposição do Ca nas escamas de robalos e das tilápias através da modificação das atividades osteoclástica e osteoblástica.

O TPT não afetou a reabsorção do Ca da matriz das escamas de robalos e tilápias afetando apenas a deposição do Ca na componente orgânica da matriz nas escamas de robalos na concentração (10^{-6} M) no período de resposta curta (30 min).

No caso dos compostos ftalatos, verificou-se que DEHP reduziu a reabsorção do Ca da matriz dos robalos em período de resposta curta (30 min) e em períodos de resposta longa (24 h), na concentração 10^{-8} M, não afetando a reabsorção do Ca da matriz das escamas de tilápia. Este composto não alterou a deposição do Ca em robalos ou tilápias. Por outro lado, o BBP não afetou a reabsorção do Ca em escamas de robalos e nem das tilápias em nenhum dos tempos dos ensaio, enquanto nas escamas de tilápias, em período de resposta longa, reduziu a deposição do Ca na matriz.

Capítulo 7 - REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agas, D., Sabbieti, M. G., & Marchetti, L. (2013). Endocrine disruptors and bone metabolism. *Archives of Toxicology*, 87(4), 735–751.
- Aisha, M. D., Nor-Ashikin, M. N. K., Sharaniza, B., Nawawi, H. M., Kapitonova, M. Y., & Froemming, G. R. (2014). Short-term moderate hypothermia stimulates alkaline phosphatase activity and osteocalcin expression in osteoblasts by upregulating runx2 and osterix *in vitro*. *Experimental Cell Research*, 326(1), 46–56.
- Al-Balwai, H. F. A., Al-Misned, F., Ahmad, Z., & Al-ghanim, K. (2013). A study on the concentration of heavy metals in water and sediments of natural water reservoir in wadi hanefah, Saudi Arabia and uptake of metals by a fish, *Poecilia latipinna*. *Zoological Society Of Pakistan*, 45(2), 613–618.
- Ali, A. T., Chirambo, G., Penny, C., Paiker, J. E., Ikram, F., Psaras, G., & Crowther, N. J. (2014). Ethnic differences in pre-adipocyte intracellular lipid accumulation and alkaline phosphatase activity. *International Journal of Clinical Chemistry*, 438(2015), 382–387.
- Ankley, G. T., Bencic, D. C., Breen, M. S., Collette, T. W., Conolly, R. B., Denslow, N. D., Edwards, S. W., Ekman, D. R., G.-R., N., Jensen, K. M., Lazorchak, J. M., Martinović, D., Miller, D. H., Perkins, E. J., Orlando, E. F., Villeneuve, D. L., Wang, R. L., Watanabe, K. H. (2009). Endocrine disrupting chemicals in fish: developing exposure indicators and predictive models of effects based on mechanism of action. *Aquatic Toxicology (Amsterdam, Netherlands)*, 92(3), 168–178.
- Ankley, G. T., & Johnson, R. D. (2004). Small Fish Models for Identifying and Assessing the Effects of Endocrine-disrupting Chemicals. *ILAR Journal*, 45(4), 469–483.
- Armour, K. J., Lehane, D. B., Pakdel, F., Valotaire, Y., Russell, R. G. G., & Henderson, I. W. (1997). Estrogen receptor mRNA in mineralized tissues of rainbow trout: calcium mobilization by estrogen. *FEBS Letters*, 411(1), 145–148.
- Azuma, K., Kobayashi, M., Nakamura, M., Suzuki, N., Yashima, S., Iwamuro, S., Ikegame, M., Yamamoto, T., Hattori, A. (2007). Two osteoclastic markers expressed in multinucleate osteoclasts of goldfish scales. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 362(3), 594–600.
- Bemanian, V., Male, R., & Goksøyr, A. (2004). The aryl hydrocarbon receptor-mediated disruption of vitellogenin synthesis in the fish liver : Cross-talk between AHR- and ER α -signalling pathways, 14, 11–14.
- Bhandari, R. K., Deem, S. L., Holliday, D. K., Jandegian, C. M., Kassotis, C. D., Nagel, S. C., Tillitt, D. E., vom S. F. S., Rosenfeld, C. S. (2014). Effects of the environmental estrogenic contaminants bisphenol A and 17 α -ethinyl estradiol on sexual development and adult behaviors in aquatic wildlife species. *General and Comparative Endocrinology*, 214, 195 – 219.

- Bhat, F. A., Ramajayam, G., Parameswari, S., Vignesh, R. C., Karthikeyan, S., Senthilkumar, K., Srinivasan, N. (2012). Di 2-ethyl hexyl phthalate affects differentiation and matrix mineralization of rat calvarial osteoblasts *-in vitro*. *Toxicology in Vitro*, 27(1), 250–256.
- Blumer, M. J. F., Hausott, B., Schwarzer, C., Hayman, A. R., Stempel, J., & Fritsch, H. (2012). Role of tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) in long bone development. *Mechanisms of Development*, 129(5-8), 162–176.
- Bonga, S. E. W. (1991). Control of calcium regulating hormones in the vertebrates: Parathyroid hormone, calcitonin, prolactin, and stanniocalcin. *International Review of Cytology*, 128, 139–213.
- Bruton, M. N., & Allanson, B. R. (1974). The growth of *Tilapia mossambica* Peters (Pisces: Cichlidae) in Lake Sibaya, South Africa. *Journal of Fish Biology*, 6(6), 701–715.
- Bruton, M. N., & Boltt, R. E. (1975). Aspects of the biology of *Tilapia mossambica* Peters (Pisces: Cichlidae) in a natural freshwater lake (Lake Sibaya, South Africa). *Journal of Fish Biology*, 7(4), 423–445.
- Caseli, L., Zaniquelli, M. E. D., Furriel, R. P. M., & Leone, F. A. (2002). Enzymatic activity of alkaline phosphatase adsorbed on dimyristoylphosphatidic acid langmuir–blodgett films. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 25(2), 119–128.
- Centrella, M., & McCarthy, T. L. (2012). Estrogen receptor dependent gene expression by osteoblasts - direct, indirect, circumspect, and speculative effects. *Steroids*, 77(3), 174–184.
- Chao, T.-Y., Wu, Y.-Y., & Janckila, A. J. (2010). Tartrate-resistant acid phosphatase isoform 5b (TRACP 5b) as a serum maker for cancer with bone metastasis. *International Journal of Clinical Chemistry*, 411(21-22), 1553–1564.
- Chikae, M., Hatano, Y., Ikeda, R., Morita, Y., Hasan, Q., & Tamiya, E. (2004). Effects of bis(2-ethylhexyl) phthalate and benzo[a]pyrene on the embryos of Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 16(3), 141–145.
- Chikae, M., Ikeda, R., Hatano, Y., Hasan, Q., Morita, Y., & Tamiya, E. (2004). Effects of bis(2-ethylhexyl) phthalate, gama-hexachlorocyclohexane, and 17beta-estradiol on the fry stage of medaka (*Oryzias latipes*). *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 18(1), 9–12.
- Cho, E.-M., Lee, H.-S., Moon, J.-S., Kim, I.-S., Sim, S., & Ohta, A. (2012). Organotin compounds act as inhibitor of transcriptional activation with human estrogen receptor. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22(3), 378–384.
- Corradetti, B., Stronati, A., Tosti, L., Manicardi, G., Carnevali, O., & Bizzaro, D. (2013). Bis-(2-ethylexhyl) phthalate impairs spermatogenesis in zebrafish (*Danio rerio*). *Reproductive Biology*, 13(3), 195–202.

- De Coster, S., & van Larebeke, N. (2012). Endocrine-disrupting chemicals: associated disorders and mechanisms of action. *Journal of Environmental and Public Health*, 20(12), 696–713.
- De Silva, S. S., & Chandrasoma, J. (1980). Reproductive biology of *Sarotherodon mossambicus*, an introduced species, in an ancient man-made lake in Sri Lanka. *Environmental Biology of Fishes*, 5(3), 253–259.
- Dean, M. N., & Summers, A. P. (2006). Mineralized cartilage in the skeleton of chondrichthyan fishes. *Zoology (Jena, Germany)*, 109(2), 164–168.
- Denton, G. R. W., Concepcion, L. P., Wood, H. R., & Morrison, R. J. (2006). Trace metals in marine organisms from four harbours in Guam. *Marine Pollution Bulletin*, 52(12), 1784–1804.
- Eerkes-Medrano, D., Thompson, R. C., & Aldridge, D. C. (2015). Microplastics in freshwater systems: a review of the emerging threats, identification of knowledge gaps and prioritisation of research needs. *Water Research*, 75, 63–82.
- European seabass (*Dicentrarchus labrax*) Genome Browser Gateway. (2015). Retrieved June 7, 2015, from <http://seabass.mpipz.de/cgi-bin/hgGateway?org=European+seabass&db=dicLab1>
- Evans, D. H., Piermarini, P. M., & Potts, W. T. W. (1999). Ionic transport in the fish gill epithelium. *Journal of Experimental Zoology*, 283(7), 641–652.
- Fischer, W., & Schneider, M. (1987). *Guide Fao d'Identification des Espèces pour les Besoins de la Pêche Méditerranée et Mer Noire - Zone de Pêche 37*. Retrieved from <http://www.fishbase.org/Summary/SpeciesSummary.php?ID=63&AT=robalo>
- Flavia, A., Godoi, L., & Favoreto, R. (2003). Contaminação ambiental por compostos organoestânicos. *Quimica Nova*, 26(5), 708–716.
- Foster, S. J., & Vincent, A. C. J. (2004). Life history and ecology of seahorses: implications for conservation and management. *Journal of Fish Biology*, 65, 1–61.
- Francis, M. J. O., Lees, R. L., Trujillo, E., Mart, P., Heersche, J. N. M., & Mobasheri, A. (2002). ATPase pumps in osteoclasts and osteoblasts. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 34, 459–476.
- Franz-Odendaal, T. a. (2006). Intramembranous ossification of scleral ossicles in *Chelydra serpentina*. *Zoology (Jena, Germany)*, 109(1), 75–81.
- Gali, J. C. (2001). Osteoporose. *Acta Ortopédica Brasileira*, 9(2), 3–12.
- Ginani, F., & Barboza, C. A. G. (2011). Influência da vitamina D na atividade osteoclástica em um modelo de cultura de órgãos ósseos. *Jornal Brasileiro de Patologia E Medicina Laboratorial*, 47(6), 619–623.

- Golshan, M., Hatef, A., Socha, M., Milla, S., Butts, I. a. E., Carnevali, O., Rodina, M., S.-M., M., Fontaine, P., Linhart, O., Alavi, S. M. H. (2015). Di-(2-ethylhexyl)-phthalate disrupts pituitary and testicular hormonal functions to reduce sperm quality in mature goldfish. *Aquatic Toxicology*, *163*, 16–26.
- Grosell, M., Farreal, A. P., & Brauner, C. J. (2011). The multifunctional Cut of Fish. *Fish Physiology and Biochemistry*, *30*, 166–199.
- Guerreiro, P.M.; Fuentes, J. (2007). Control of Calcium Balance in Fish. *In Fish Osmoregulation*; Baldisserotto, B., Mancera Romero, J.M., Kapoor, B.G., Eds.; CRC Press: Boca Raton, FL, USA.
- Guerreiro, P. M., Fuentes, J., Canario, A. V. M., & Power, D. M. (2002). Calcium balance in sea bream (*Sparus aurata*): the effect of. *Journal of Endocrinology*, *173*, 377–385.
- Halpern, M. J. (2005). *Bioquímica*. (Lidel, Ed.) (1ª ed.). Lisboa.
- Harada, S., Hiromori, Y., Nakamura, S., Kawahara, K., Fukakusa, S., Maruno, T., Noda, M., Uchiyama, S., Fukui, K., Nishikawa, J., Nagase, H., Kobayashi, Y., Yoshida, T., Ohkubo, T., Nakanishi, T. (2015). Structural basis for PPAR γ transactivation by endocrine-disrupting organotin compounds. *Scientific Reports*, *5*, 8520 – 8527.
- Heindel, J. J., Jobling, S., Kidd, K. A., & Zoeller, R. T. (2012). *Endocrine Disrupting Chemicals - 2012*.
- Herrero, Ó., Planelló, R., & Morcillo, G. (2015). The plasticizer benzyl butyl phthalate (BBP) alters the ecdysone hormone pathway, the cellular response to stress, the energy metabolism, and several detoxication mechanisms in *Chironomus riparius* larvae. *Chemosphere*, *128*, 266–277.
- Hollberg, K. (2002). Osteoclasts from mice deficient in tartrate-resistant acid phosphatase have altered ruffled borders and disturbed intracellular vesicular transport. *Experimental Cell Research*, *279*(2), 227–238.
- Huang, Q., Chen, Y., Chi, Y., Lin, Y., Zhang, H., Fang, C., & Dong, S. (2015). Immunotoxic effects of perfluorooctane sulfonate and di(2-ethylhexyl) phthalate on the marine fish *Oryzias melastigma*. *Fish & Shellfish Immunology*, *44*(1), 302–306.
- Huang, S., Eleniste, P. P., Wayakanon, K., Mandela, P., Eipper, B. a, Mains, R. E., Allen, M. R., Bruzzaniti, A. (2014). The Rho-GEF Kalirin regulates bone mass and the function of osteoblasts and osteoclasts. *Bone*, *60*, 235–245.
- Hummon, A. B., Lim, S. R., Difilippantonio, M. J., & Ried, T. (2007). Isolation and solubilization of proteins after TRIZOL extraction of RNA and DNA from patient material following prolonged storage. *BioTechniques*, *42*(4), 467–472.
- Huyseune, F. J., & Meunier. (1992). The concept of bone tissue in osteichthyes. *Netherlands Journal of Zoology*, *42*, 445–458.

- Ibarz, A., Pinto, P. I. S., & Power, D. M. (2013). Proteomic approach to skin regeneration in a marine teleost: modulation by oestradiol-17 β . *Marine Biotechnology*, 15(6), 629–646.
- Jerry, M. N. (2000). Bioaccumulation in Marine Organisms: Effect of Contaminants from Oil Well Produced Water. In Elsevier (Ed.), *Bioaccumulation in Marine Organisms* (first, pp. 215–224).
- Jobling, S., Casey, D., Rodgers-Gray, T., Oehlmann, J., Schulte-Oehlmann, U., Pawlowski, S., Baunbeck, T., Turner, A. P., Tyler, C. R. (2003). Comparative responses of molluscs and fish to environmental estrogens and an estrogenic effluent. *Aquatic Toxicology*, 65(2), 205–220.
- Jobling, S., Reynolds, T., White, R., Parker, M. G., & Sumpter, J. P. (1995). A variety of environmentally persistent chemicals, including some phthalate plasticizers, are weakly estrogenic. *Environmental Health Perspectives*, 103(6), 582–587.
- Junqueira, L., & Carneiro, J. (1971). *Histologia Básica*. (Guanabara Koogan, Ed.) *Histologia básica* (2^a ed.). Rio de Janeiro.
- Junqueira, L., & Carneiro, J. (2005). *Biologia Celular e Molecular*. (Koogan Guanabara, Ed.) (8^a ed.). Rio de Janeiro.
- Junqueira, L., & Carneiro, J. (2008). *Histologia Básica*. (G. Koogan, Ed.) (11 Edição). Rio de Janeiro.
- Kaneko, T., & Hirano, T. (1993). Role of prolactin and somatolactin in calcium regulation in fish. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 45, 31–45.
- Kardong, K. V. (1998). *Vertebrates: comparative anatomy, function, evolution*. (WCB McGraw-Hill, Ed.) (2nd ed, Vol. Segunda Ed). Boston.
- Karsenty, G., & Oury, F. (2012). Biology without walls: the novel endocrinology of bone. *Annual Review of Physiology*, 74, 87–105.
- Kennedy, C. J., Osachoff, H. L., & Shelley, L. K. (2013). 5 - *Estrogenic Endocrine Disrupting Chemicals in Fish*. *Fish Physiology* (First Edit, Vol. Volume 33). Elsevier Inc. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123982544000054>
- Khayer Dastjerdi, A., & Barthelat, F. (2014). Teleost fish scales amongst the toughest collagenous materials. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 10, 1–13.
- Khosla, S. (2010). Update on estrogens and the skeleton. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 95(8), 3569–3577.
- Kime, D. E., & Hyder, M. (1983). The effect of temperature and gonadotropin on testicular steroidogenesis in Sarotherodon (*Tilapia*) *mossambicus* *in vitro*. *General and Comparative Endocrinology*, 50(1), 105–115.

- Kottelat, M., & Freyhof, J. (2008). Handbook of European freshwater fishes. *Journal of Fish Biology*, 72(1), 315–321.
- Kousoulaki, K., Fjellidal, P. G., Aksnes, A., & Albrektsen, S. (2010). Growth and tissue mineralisation of atlantic cod (*Gadus morhua*) fed soluble P and Ca salts in the diet. *Aquaculture*, 309(14), 181–192.
- Kousoulaki, K., Saether, B.-S., Albrektsen, S., & Noble, C. (2015). Review on European sea bass (*Dicentrarchus labrax*, Linnaeus, 1758) nutrition and feed management: a practical guide for optimizing feed formulation and farming protocols. *Aquaculture Nutrition*, 21(2), 129–151.
- Lange, I. G., Hartel, A., & Meyer, H. H. D. (2003). Evolution of oestrogen functions in vertebrates. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*, 83, 219–226.
- Lau, E., Al-Dujaili, S., Guenther, A., Liu, D., Wang, L., & You, L. (2010). Effect of low-magnitude, high-frequency vibration on osteocytes in the regulation of osteoclasts. *Bone*, 46(6), 1508–1515.
- Laurentino, S., Pinto, P., Correia, S., Cavaco, J. E., Canário, A. V. M., & Socorro, S. (2012). Structural variants of sex steroid hormone receptors in the testis: from molecular biology to physiological roles. *OA Biotechnology*, 17, 1–8.
- Li, M., Liang, H., Shen, Y., & Wronski, T. (1999). Parathyroid hormone stimulates cancellous bone formation at skeletal sites regardless of marrow composition in ovariectomized rats. *Bone*, 24(2), 95–100.
- Lichtenfels, A. J. E. C., Guimar, E. T., Macchione, M., Saldiva, P. H. N., & Poluifgo, D. (1996). Effects of water pollution on the *Gill apparatus* of fish. *Journal of Comparative Pathology*, 115, 47–60.
- Lilley, T. M., Ruokolainen, L., Pikkarainen, A., Laine, V. N., Kilpimaa, J., Rantala, M. J., & Nikinmaa, M. (2012). Impact of tributyltin on immune response and life history traits of *Chironomus riparius*: Single and multigeneration effects and recovery from pollution. *Environmental Science and Technology*, 46(13), 7382–7389.
- Locker, F. G. (1996). Hormonal regulation of calcium homeostasis. *The Nursing Clinics of North America*, 31(4), 797–803.
- Lyssimachou, A., Ramón, M., & Porte, C. (2009). Comparative study on the metabolism of the androgen precursor androstenedione in two gastropod species: *In vitro* alterations by TBT and TPT. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology*, 149(3), 409–413.
- MacGregor, G. R., Zambrowicz, B. P., & Soriano, P. (1995). Tissue non-specific alkaline phosphatase is expressed in both embryonic and extraembryonic lineages during mouse embryogenesis but is not required for migration of primordial germ cells. *Development (Cambridge, England)*, 121(5), 1487–1496.

- Maia, D., & Dezotti, M. (2007). Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e consequências. *Quimica Nova*, 30(3), 651–666.
- Mankidy, R., Wiseman, S., Ma, H., & Giesy, J. P. (2013). Biological impact of phthalates. *Toxicology Letters*, 217(1), 50–58.
- Manso, C., Freire, M., & Azevedo, A. (1986). *Introdução á Bioquímica Humana*. (Fundação Calouste Gulbenkian, Ed.) (3^o edição). Lisboa.
- Martin, R. E., Carter, E. P., George, J. F. J., & Davis, L. M. (2000). *Marine and Freshwater Products Handbook*. (B. S. BOARD Roy E. Martin, Ed.) (1^a Edição). Pennsylvania: CRC Press.
- Matthews, J., & Zacharewski, T. (2000). Differential binding affinities of PCBs , HO-PCBs , and aroclors with recombinant human , rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*), and Green Anole (*Anolis carolinensis*) estrogen receptors , using a semi-high throughput competitive binding assay. *Toxicological Sciences : An Official Journal of the Society of Toxicology*, 339, 326–339.
- McKenzie, D. J. (2011). *Encyclopedia of Fish Physiology*. *Encyclopedia of Fish Physiology* (Vol. 2). Elsevier Inc. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123745538001519>
- Melamed, P., Koh, M., Preklathan, P., Bei, L., & Hew, C. (2002). Multiple mechanisms for Pitx-1 transactivation of a luteinizing hormone beta subunit gene. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(29), 26200–26207.
- Mello, M. S. C., Delgado, I. F., Favareto, A. P. a., Lopes, C. M. T., Batista, M. M., Kempinas, W. D.-G., & Paumgarten, F. J. R. (2015). Sexual maturation and fertility of mice exposed to triphenyltin during prepubertal and pubertal periods. *Toxicology Reports*, 2, 405–414.
- Metz, J. R., de Vrieze, E., Lock, E. J., Schulten, I. E., & Flik, G. (2012). Elasmoid scales of fishes as model in biomedical bone research. *Journal of Applied Ichthyology*, 28(3), 382–387.
- Nagler, J. J., Davis, T. L., Modi, N., Vijayan, M. M., & Schultz, I. (2010). Intracellular, not membrane, estrogen receptors control vitellogenin synthesis in the rainbow trout. *General and Comparative Endocrinology*, 167(2), 326–330.
- Naigaga, I., Kaiser, H., Muller, W. J., Ojok, L., Mbabazi, D., Magezi, G., & Muhumuza, E. (2011). Fish as bioindicators in aquatic environmental pollution assessment: A case study in Lake Victoria wetlands, Uganda. *Physics and Chemistry of the Earth, Parts A/B/C*, 36(14-15), 918–928.
- Nelson, E. R., & Habibi, H. R. (2013). Estrogen receptor function and regulation in fish and other vertebrates. *General and Comparative Endocrinology*, 192, 15–24.
- Nowak, M., Popek, W., Jagusiak, W., Deptuła, S., Popek, J., Tatoj, K., Klęczar, K., Epler, P. (2010). Zależność pomiędzy masą ciała a długością całkowitą u trzech gatunków

- ryb (*Leuciscus leuciscus*, *Phoxinus phoxinus* i *Salmo trutta*) z rzeki Strwiąż (dorzecze Dniestru). *Archives of Polish Fisheries*, 17(4), 313–316.
- Nozaka, K., Miyakoshi, N., Kasukawa, Y., Maekawa, S., Noguchi, H., & Shimada, Y. (2008). Intermittent administration of human parathyroid hormone enhances bone formation and union at the site of cancellous bone osteotomy in normal and ovariectomized rats. *Bone*, 42(1), 90–97.
- Oddie, G. W., Schenk, G., Angel, N. Z., Walsh, N., Guddat, L. W., de Jersey, J., Cassady, A. I., Hamilton, S. E., Hume, D. a. (2000). Structure, function, and regulation of tartrate-resistant acid phosphatase. *Bone*, 27(5), 575–584.
- Ohta, H., & Tanaka, H. (1997). Relationship between serum levels of human chorionic gonadotropin (hCG) and 11-ketotestosterone after a single injection of hCG and induced maturity in the male Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Aquaculture*, 153(1-2), 123–134.
- Oliveira, R., & Almada, V. (1996). Dominance hierarchies and social structure in captive groups of the Mozambique tilapia *Oreochromis mossambicus* (Teleostei Cichlidae). *Ethology Ecology & Evolution*.
- Omar, W. A., Saleh, Y. S., & Marie, M.-A. S. (2014). Integrating multiple fish biomarkers and risk assessment as indicators of metal pollution along the Red Sea coast of Hodeida, Yemen Republic. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 110C, 221–231.
- Papadaki, M., Piferrer, F., Zanuy, S., Maingot, E., Divanach, P., & Mylonas, C. C. (2005). Growth, sex differentiation and gonad and plasma levels of sex steroids in male- and female-dominant populations of *Dicentrarchus labrax* obtained through repeated size grading. *Journal of Fish Biology*, 66(4), 938–956.
- Pereira, C. G. (2009). *Estudo de ALP como biomarcador de disfunção endócrina em Mytilus galloprovincialis*. Universidade do Algarve.
- Persson, P., Sundell, K., & Bjornsson, B. T. (1994). Estradiol-17 β -induced calcium uptake and resorption in juvenile rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Fish Physiology and Biochemistry*, 13(5), 379–386.
- Persson, P., Takagi, Y., & Bjornsson, B. T. (1995). Tartrate resistant acid phosphatase as a marker for scale resorption in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*: effects of estradiol-17 β treatment and refeeding, 14(4), 329–339.
- Pinheiro, R. I., & Valadares, G. (2012). Toxicity of herbicides on *Escherichia coli* growth. *Brazilian Journal of Biology*, 72(1), 141–146.
- Pinto, P. I. S., Estêvão, M. D., & Power, D. M. (2014). Effects of estrogens and estrogenic disrupting compounds on fish mineralized tissues. *Marine Drugs*, 12(8), 4474–4494.

- Pinto, P. I. S., Estêvão, M. D., Redruello, B., Socorro, S. M., Canário, a V. M., & Power, D. M. (2009). Immunohistochemical detection of estrogen receptors in fish scales. *General and Comparative Endocrinology*, 160(1), 19–29.
- Pinto, P. I. S., Passos, A. L., Martins, R. S., Power, D. M., & Canário, A. V. M. (2006). Characterization of estrogen receptor β in sea bream (*Sparus auratus*): Phylogeny, ligand-binding, and comparative analysis of expression. *General and Comparative Endocrinology*, 145(2), 197–207.
- Podratz, P. L., Filho, V. S. D., Lopes, P. F. I., Sena, G. C., Matsumoto, S. T., Samoto, V. Y., Graceli, J. B. (2012). Tributyltin Impairs the Reproductive Cycle in Female Rats. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 75(16-17), 1035–1046.
- Price, E. E., Stauffer, J. R., & Swift, M. C. (1985). Effect of temperature on growth of juvenile *Oreochromis mossambicus* and *Sarotherodon melanotheron*. *Environmental Biology of Fishes*, 13(2), 149–152.
- Quilhac, A., & Sire, J.-Y. (1998). Restoration of the subepidermal tissues and scale regeneration after wounding a cichlid fish, *Hemichromis bimaculatus*. *The Journal of Experimental Zoology*, 281(4), 305–327.
- Rainboth, W. L. (2003). *Species identification field guide for fishery purposes*. Retrieved from <http://www.fao.org/fishery/species/2408/en>
- Reis-Santos, P., Tanner, S. E., Elsdon, T. S., Cabral, H. N., & Gillanders, B. M. (2013). Effects of temperature, salinity and water composition on otolith elemental incorporation of *Dicentrarchus labrax*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 446, 245–252.
- Rochman, C. M., Kurobe, T., Flores, I., & Teh, S. J. (2014). Early warning signs of endocrine disruption in adult fish from the ingestion of polyethylene with and without sorbed chemical pollutants from the marine environment. *Science of the Total Environment*, 493, 656–661.
- Rotllant, J., Redruello, B., Guerreiro, P. M., Fernandes, H., Canario, a V. M., & Power, D. M. (2005). Calcium mobilization from fish scales is mediated by parathyroid hormone related protein via the parathyroid hormone type 1 receptor. *Regulatory Peptides*, 132(1-3), 33–40.
- Satone, H., Lee, J. M., Oba, Y., Kusakabe, T., Akahoshi, E., Miki, S., Suzuki, N., Sasayama, Y., Nassef, M., Shimasaki, Y., Kawabata, S. I., Honjo, T., Oshima, Y. (2011). Tributyltin-binding protein type 1, a lipocalin, prevents inhibition of osteoblastic activity by tributyltin in fish scales. *Aquatic Toxicology*, 103(1-2), 79–84.
- Schaedlich, K., Schmidt, J.-S., Kwong, W. Y., Sinclair, K. D., Kurz, R., Jahnke, H.-G., & Fischer, B. (2015). Impact of di-ethylhexylphthalate exposure on metabolic programming in P19 ECC-derived cardiomyocytes. *Journal of Applied Toxicology*, 35(7), 861–869.

- Sire, J.-Y., & Akimenko, M.-A. (2004). Scale development in fish: a review, with description of sonic hedgehog (shh) expression in the zebrafish (*Danio rerio*). *The International Journal of Developmental Biology*, 48(2-3), 233–247.
- Souza, I. C., Duarte, I. D., Pimentel, N. Q., Rocha, L. D., Morozesk, M., Bonomo, M. M., Azevedo, V. C., Pereira, C. D. S., Monferrán, M. V., Milanez, C. R. D., Matsumoto, S. T., Wunderlin, D. A., Fernandes, M. N. (2013). Matching metal pollution with bioavailability, bioaccumulation and biomarkers response in fish (*Centropomus parallelus*) resident in neotropical estuaries. *Environmental Pollution*, 180, 136–144.
- Starling, E., & Evans, L. (1978). *Princípios de Fisiologia Humana*. (Fundação Calouste Gulbenkian, Ed.) (2º Edição). Lisboa.
- Sung, H.-H., Kao, W.-Y., & Su, Y.-J. (2003). Effects and toxicity of phthalate esters to hemocytes of giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Aquatic Toxicology (Amsterdam, Netherlands)*, 64(1), 25–37.
- Suominen, K., Hallikainen, A., Ruokojärvi, P., Airaksinen, R., Koponen, J., Rannikko, R., & Kiviranta, H. (2011). Occurrence of PCDD/F, PCB, PBDE, PFAS, and organotin compounds in fish meal, fish oil and fish feed. *Chemosphere*, 85(3), 300–306.
- Suzuki, N., Danks, J. a, Maruyama, Y., Ikegame, M., Sasayama, Y., Hattori, A., Nakamura, M., Tabata, M. J., Yamamoto, T., Furuya, R., Saijoh, K., Mishima, H., Srivastav, A. K., Furusawa, Y., Kondo, T., Tabuchi, Y., Takasaki, I., Chowdhury, V. S., Hayakawa, K., Martin, T. J. (2011). Parathyroid hormone 1 (1-34) acts on the scales and involves calcium metabolism in goldfish. *Bone*, 48(5), 1186–1193.
- Suzuki, N., & Hattori, A. (2002). Melatonin suppresses osteoclastic and osteoblastic activities in the scales of goldfish, 33, 253–258.
- Suzuki, N., & Hattori, A. (2003). Bisphenol A suppresses osteoclastic and osteoblastic activities in the cultured scales of goldfish. *Life Sciences*, 73(17), 2237–2247.
- Suzuki, N., Hayakawa, K., Kameda, T., Triba, A., Tang, N., Tabata, M. J., Takada, K., Wada, S., Omori, K., Srivastav, A. K., Mishima, H., Hattori, A. (2009). Monohydroxylated polycyclic aromatic hydrocarbons inhibit both osteoclastic and osteoblastic activities in teleost scales. *Life Sciences*, 84(13-14), 482–488.
- Suzuki, N., Suzuki, T., & Kurokawa, T. (2000). Suppression of osteoclastic activities by calcitonin in the scales of goldfish (freshwater teleost) and nibbler fish (seawater teleost). *Peptides*, 21(1), 115–124.
- Suzuki, N., Kitamura, K., Nemoto, T., Shimizu, N., Wada, S., Kondo, T., Tabata, M. J., Sodeyama, F., Ijiri, K., Hattori, A. (2007). Effect of vibration on osteoblastic and osteoclastic activities: Analysis of bone metabolism using goldfish scale as a model for bone. *Advances in Space Research*, 40(11), 1711–1721.
- Suzuki, N., Tabata, M. J., Kambegawa, A., Srivastav, A. K., Shimada, A., Takeda, H., Kobayashi, M., Wada, S., Katsumata, T., Hattori, A. (2006). Tributyltin inhibits

- osteoblastic activity and disrupts calcium metabolism through an increase in plasma calcium and calcitonin levels in teleosts. *Life Sciences*, 78(21), 2533–2541.
- Tamsyn, M., Lewis, C., Filby, A. L., Paull, G. C., & Santos, E. M. (2010). Mechanisms of toxicity of di(2-ethylhexyl) phthalate on the reproductive health of male zebrafish. *Aquatic Toxicology*, 99(3), 360–369.
- Thomas, P., Alyea, R., Pang, Y., Peyton, C., Dong, J., & Berg, a H. (2010). Conserved estrogen binding and signaling functions of the G protein-coupled estrogen receptor 1 (GPER) in mammals and fish. *Steroids*, 75(8-9), 595–602.
- Tsukamoto, Y., Ishihara, Y., Miyagawa-Tomita, S., & Hagiwara, H. (2004). Inhibition of ossification *in vivo* and differentiation of osteoblasts *in vitro* by tributyltin. *Biochemical Pharmacology*, 68(4), 739–746.
- Waring, R. H., Ayers, S., Gescher, a J., Glatt, H.-R., Meinel, W., Jarratt, P., Kirk, C. J., Pettitt, T., Rea, D., Harris, R. M. (2008). Phytoestrogens and xenoestrogens: the contribution of diet and environment to endocrine disruption. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 108(3-5), 213–220.
- Weser, U., Etspiiler, H., & Kaup, Y. (1995). Enzymatic and immunological activity of 4000 years aged bone alkaline phosphatase. *Federation of European Biochemical Societies*, 375(16298), 280–282.
- Yachiguchi, K., Matsumoto, N., Haga, Y., Suzuki, M., Matsumura, C., Tsurukawa, M., Suzuki, N. (2014). Polychlorinated biphenyl (118) activates osteoclasts and induces bone resorption in goldfish. *Environmental Science and Pollution Research International*, 21(10), 6365–6372.
- Yliopisto, T. (2009). *Osteoclastic tartrate-resistant acid phosphatase - 5b Diagnostic Use and Biological Significance in Bone Physiology*. University of Turku - Finland.
- Yogui, G. T., de Oliveira Santos, M. C., & Montone, R. C. (2003). Chlorinated pesticides and polychlorinated biphenyls in marine tucuxi dolphins (*Sotalia fluviatilis*) from the Cananéia estuary, southeastern Brazil. *The Science of the Total Environment*, 312(1-3), 67–78.
- Yonezawa, T., Hasegawa, S. I., Ahn, J. Y., Cha, B. Y., Teruya, T., Hagiwara, H., Nagai, K., Woo, J. T. (2007). Tributyltin and triphenyltin inhibit osteoclast differentiation through a retinoic acid receptor-dependent signaling pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 355(1), 10–15.
- Yoshikubo, H., Suzuki, N., Takemura, K., Hosono, M., Yashima, S., Iwamuro, S., Iwamuro, S., Takagi, Y., Tabata, M. J., Hattori, A. (2005). Osteoblastic activity and estrogenic response in the regenerating scale of goldfish, a good model of osteogenesis. *Life Sciences*, 76(23), 2699–2709.
- Yost, E. E., Pow, C. L., Hawkins, M. B., & Kullman, S. W. (2014). Bridging the Gap From Screening Assays to Estrogenic Effects in Fish: Potential Roles of Multiple Estrogen Receptor Subtypes. *American Chemical Society*, 48, 5211–5219.

Capítulo 8 - ANEXOS

8. ANEXOS

8.1. Anexo 1 – Preparação das soluções

Meio MEM suplementado com antibiótico (diluição 1:100)

Na câmara de fluxo laminar, em um tubo falcon estéril, adicionou-se a solução de penicilina+estreptomicina (100 U/ml) ao meio MEM. Foi guardado a 4°C até ser usado. (ex.: para 50 ml de meio, adicionar 500 µl de antibiótico a 49,500 ml de meio MEM).

NaOH 2 M (50ml)

Pesou-se 4 g de NaOH, diluído até 50 ml em H₂O elix.

TRAP Buffer

0,1 M Acetato de sódio á pH 5,3 e 20 mM tartrato de sódio potássio, constitui-se a soluções stock usadas para a preparação da solução de trabalho:

1 M Acetato de sódio pH 5,3 (50 ml):

Pesou-se 4,1 g e diluído até 25 ml de H₂O elix, o valor de pH foi ajustar com HCl 10% e perfazeu-se até 50 ml com H₂O elix.

1M Tartrato de sódio potássio (50 ml):

Pesou-se 14,1 g e foi diluído até 50 ml em H₂O elix.

TRAP Mix – Solução stock

0,1 M acetato de sódio pH 5,3; 20 mM tartrato de sódio potássio; 80mM pNPP

Ex: Para preparar 15 ml stock TRAP Mix: Foi pesado 0,554 g pNPP e dissolveu-se em 15 ml de TRAP Buffer para obter uma concentração final de 80 mM.

Depois preparar alíquotas de 1,1 ml e armazenar em tubos revestidos de papel de alumínio, a -20°C.

TRAP Mix - Solução de trabalho

A solução de trabalho foi preparada sempre a fresco, para isso, foi colocada: 0,1 M Acetato de sódio pH 5,3; 20mM tartrato de sódio; 5mM pNPP).

Como exemplo, para preparar 16 ml (concentração final de pNPP = 5 mM): foi adicionado 1 ml da solução STOCK de TRAP Mix a 15 ml de TRAP Buffer.

Solução stock para a curva padrão da atividade enzimática da TRAP

Solução 10 mM de pNP (10 ml):

Pesou-se 0,01391 g de pNP e adicionou-se 10 ml de 0.1 M de acetato de sódio pH 5.3-
Podes ser guardar a 4 °C pelo período máximo de 1-3 meses.

ALP Buffer

0,1 M Tris HCl pH 9,5

1 mM cloreto de magnésio

0,1 mM cloreto de zinco

Solução stock usadas para a preparação da solução de trabalho:

1 M Tris HCl pH 9,5 (50 ml):

0.96 g de Tris HCl e 5.32 g de Tris Base

25 ml de H₂O elix, ajustar o pH com NaOH 1M e perfazer com H₂O elix até 50 ml

1 M Cloreto de magnésio (50 ml):

Pesar 10.17 g

50 ml de H₂O elix.

0.1 M Cloreto de zinco (50ml):

Pesar 0.68g.

50 ml de H₂O elix.

ALP Mix - 80mM pNPP

0,1 M Tris HCl pH 9,5;

1 mM cloreto de magnésio;

0.1 mM cloreto de zinco

80mM pNPP - STOCK

Para preparar 15 ml da solução 80 mM: Foi usado 0,554 g pNPP, 15 ml de *ALP Buffer* para obter uma concentração final de 80 mM. Preparou-se alíquotas de 1,1 ml e armazenar em tubos revestidos de papel de alumínio, a -20°C.

ALP Mix - 5mM pNPP

0,1 M Tris HCl pH 9,5;

1 mM cloreto de magnésio;

0.1 mM cloreto de zinco;

5mM pNPP – Solução de trabalho

Por exemplo para preparar 16 ml da solução com a concentração final de pNPP 5 mM, foi usado-se 1 ml da solução STOCK de ALP Mix e 15 ml de ALP *Buffer*.

Para a cursa da atividade enzimática ALP, foi usado 0,1 M Tris HCl pH 9,5; 1 mM cloreto de magnésio e 0.1 mM cloreto de zinco.

Solução 10 mM de pNP (10 ml):

0,01391 g de pNP

10 ml de ALP *Buffer*

Guardar a 4°C pelo período máximo de 1-3 meses.

Diluição dos compostos**Composto organoestânico (TPT)**

Para prepara a solução de 10^{-2} M TPT, deliu-se 4 μ l da solução TPT em 996 μ l da solução ácido tetrahidrofólico (THF), obtendo a solução base de trabalho (TPT 10^{-2} M).

Composto ftalatos (DEHP e BBP)

Para prepara a solução de 10^{-2} M DEHP, deliu-se 3,965 μ l ~ 4 μ l da solução DEHP em 996 μ l da solução do solvente Dimetilsulfóxido (DMSO), obtendo a solução base de trabalho (DEHP 10^{-2} M).

Para prepara a solução de 10^{-2} M BBP, deliu-se 2,84 μ l ~ 3 μ l da solução BBP em 997 μ l da solução DMSO, obtendo a solução base de trabalho (DEHP 10^{-2} M).