

## ALTERAÇÕES TEGUMENTARES E NO ELETROFEROGRAMA DE PROTEÍNAS PLASMÁTICAS DE TILÁPIAS (*Oreochromis niloticus*) (Linnaeus, 1759) MACHO E FÊMEA, PROVOCADAS POR RADIAÇÃO GAMA

Fernando Henrique Rodrigues Borin<sup>1</sup>  
Paulo Roberto Rodrigues Ramos<sup>2</sup>  
Helton Carlos Delicio<sup>3</sup>  
Marco Antonio Rodrigues Fernandes<sup>4</sup>  
Joel Mesa Hormaza<sup>2</sup>

### RESUMO

O presente trabalho teve por objetivo avaliar a resposta de proteínas plasmáticas de sangue de tilápias macho e fêmea, à dose de 20Gy expostas à radiação gama. Observou-se um padrão diferencial entre os sexos, bem como diminuição e até mesmo supressão de determinadas bandas detectadas por eletroforese em gel de agarose.

**Palavras-chave:** radiação gama, eletroforese, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1759).

### CHANGES IN THE ELECTROPHORETIC PATTERN OF PLASMA PROTEINS OF MALE AND FEMALE TILAPIA (*Oreochromis niloticus*) (Linnaeus, 1759), CAUSED BY GAMMA RADIATION

### ABSTRACT

This study aimed to evaluate the response of plasma proteins from blood of male and female tilapia at a dose of 20Gy, exposed to gamma radiation. A differential pattern between the sexes was observed. A reduction and even elimination of certain bands were detected by electrophoresis in agarose gel.

**Keywords:** gamma radiation, electrophoresis, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1759).

### CAMBIO EN EL PATRÓN ELECTROFORÉTICO DE PROTEÍNAS PLASMÁTICAS DE TILAPIA (*Oreochromis niloticus*) (Linnaeus, 1759) MACHO Y HEMBRA, POR RADIACIÓN GAMMA

### RESUMEN

Este estudio tuvo como objetivo evaluar la respuesta de las proteínas del plasma de la sangre de tilapia macho y hembra, a dosis de 20Gy, expuestos a la radiación gamma. Se observó un patrón diferencial entre los sexos. La reducción e incluso la eliminación de ciertas bandas fueron detectadas por electroforesis en gel de agarosa.

**Palabras claves:** radiación gamma, electroforesis, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1759).

---

<sup>1</sup> Mestre em Biologia Geral e Aplicada, IBB - Unesp, Botucatu. Contato principal para correspondência

<sup>2</sup> Professor Assistente Doutor do Departamento de Física e Biofísica IBB, UNESP, Botucatu

<sup>3</sup> Professor Assistente Doutor do Departamento de Fisiologia, IBB, UNESP, Botucatu.

<sup>4</sup> Professor Assistente Doutor do Departamento de Dermatologia e Radioterapia, FMB, UNESP, Botucatu

## INTRODUÇÃO

Sabe-se que a energia nuclear é um poderoso agente mutagênico o qual tem sido estudado desde os eventos radiobiológicos ocorridos em Hiroshima e Nagasaki. Paralelamente, tem-se observado a utilização da energia nuclear em diversos campos da ciência, principalmente, em reatores nucleares. O descarte nuclear tem sido alvo de muitas críticas, pois, por não ser tão fácil e seguro, por vezes pode significar contaminação ambiental (1). Nas últimas décadas tem-se registrado muitos eventos relacionados a explosões e vazamentos nucleares como Fukushima e Chernobyl.

Desta forma cada vez mais se faz necessário o uso de técnicas que possam investigar os efeitos radiobiológicos de eventuais acidentes nucleares. A eletroforese é uma ferramenta que avalia a modificação de um padrão protéico de um tecido quer pela alteração quantitativa das frações, quer pela modificação das mobilidades relativas.

A radiação ionizante pode ser encarada como um estressor ambiental. Existem alguns trabalhos relacionando modificações bioquímicas e estresse ambiental em diferentes espécies de peixes: *Prochilodus lineatus* (2), *Piaractus mesopotamicus* (3,4), *Oreochromis niloticus* (5), *Colossoma macropomum* e *Hoplosternum littorale* (6), *Rhamdia quelen* (7), no híbrido tambacu *P. mesopotamicus* x *C. macropomum* (4,8) e *C. macropomum* (9,10). Poucos trabalhos são encontrados na literatura com o emprego de radiações ionizantes como agente estressor em peixes. O presente trabalho teve por objetivo verificar a resposta no nível de proteínas plasmáticas de sangue de tilápia macho e fêmea, à dose de 20Gy de emissão gama.

## RELATO DE CASO

Foram utilizados 2 exemplares de tilápias do Nilo, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1759), sendo um deles macho e a outra fêmea, selecionados pelo método de identificação macroscópica do sexo por meio da evidênciação da papila urogenital com azul de Metileno (1%), com comprimento padrão entre 11 e 12 centímetros e peso de 50 a 60 gramas.

Inicialmente, os peixes foram aclimatados no biotério de peixes do Departamento de Fisiologia – IBB durante 30 dias em tanques de 2000 litros de água, mantendo-se as condições de temperatura entre 25 e 27°C, pH em torno de 7 e teor de amônia <0,04 ppm.

Após este período, as tilápias foram transferidas para o Laboratório de Fisiologia Digestório e Comportamento de Peixes do IBB e acondicionadas individualmente em aquários de vidro com capacidade de 19L (22cm x 22cm x 40cm) onde permaneceram por 14 dias.

Neste período, a qualidade da água foi monitorada diariamente a fim de se manterem os parâmetros físico-químicos estáveis e ideais para a espécie. A alimentação foi oferecida duas vezes por dia, na proporção de 3 % da biomassa de peixes, permanecendo disponível por uma hora.

Para determinação dos parâmetros basais de proteínas plasmáticas, foram colhidos por punção cardíaca em média 0,3 mL de sangue com auxílio de agulha e seringa heparinizadas. Para tanto, os peixes foram anestesiados em solução anestésica de benzocaína (12%). Sete dias após este procedimento, os peixes foram transferidos, individualmente, dos seus aquários de origem para recipientes de plásticos identificados, com capacidade de 1,5L (17cm x 13cm x 11,5cm).

Após acondicionamento, as tilápias foram expostas à radiação gama de corpo inteiro de dose única, por meio de uma unidade telecobaltoterapia, com campo de radiação envolvendo toda a extensão do espaço onde os peixes foram posicionados. Na determinação do tempo de exposição foram obedecidos os parâmetros radiométricos que garantiram a uniformidade do campo de radiação. Empregou-se a dose absorvida de 20Gy.

A dose foi aferida mediante o emprego de câmara de ionização calibrada para a energia de radiação do cobalto-60, seguindo o Protocolo de Dosimetria TRS-398 da Agência Internacional de Energia Atômica (AIEA). Ao término da irradiação das tilápias, elas retornaram ao laboratório para seus aquários de origem. A cada sete dias uma nova amostra de sangue foi retirada até o 14º dia.

Após estas coletas, as amostras foram centrifugadas a 3000 rpm por 10 minutos. O plasma assim obtido foi transferido para frascos tipo eppendorf e armazenado em -80º C.

Foram aplicados 4µL de plasma, com pipetador automático em gel de agarose geral (CELM) e submetidos à eletroforese em 100V por 20 minutos. Posteriormente, os géis foram corados com Negro de Amido, conforme indicação do fabricante. O gel obtido foi analisado quantitativamente (%) empregando-se a densitometria em VDS (PHARMACIA).

## DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Durante o período de monitoração, logo após a irradiação observou-se uma perda da coloração das listras características da espécie, tanto na tilápia macho como na tilápia fêmea (Figura 1a). Porém, esse fato teve uma maior intensidade na tilápia fêmea que recuperou parcialmente a sua coloração em 7 dias após a irradiação, na colheita de sangue, provavelmente devido ao stress do manuseio (Figura 1b), mas ainda possuía aparentes queimaduras nas extremidades das nadadeiras. O exemplar macho recuperou o padrão de coloração em torno de 24 horas após a irradiação.



Figura 1. Tilápia fêmea (*Oreochromis niloticus*), com perda da coloração das listras após irradiação (a) e na fase de recuperação da coloração por stress de manuseio (b).

Considerando-se que a dose absorvida, tendo em vista os padrões radiobiológicos, pode ser considerada alta, esperam-se reações fisiológicas imediatas devido à interação da radiação ionizante com moléculas biológicas. Essas reações podem aparecer nos organismos vivos num período que pode variar de horas a semanas. Tais observações ocorrem devido a reações

inflamatórias por conta de alterações na permeabilidade celular com liberação de histaminas. São exemplos o eritema, a mucosite, tanto no nível intestinal quanto oral, provocando até mesmo escamação da epiderme (11). É sabido que as células com alta taxa de proliferação são mais sensíveis à radiação ionizante. Os peixes possuem células mucosas (altamente proliferativas) na epiderme com função de proteção (12) e facilitação de deslocamento em seu ambiente.

Na eletroforese em gel de agarose, foram encontradas 11 bandas protéicas com Rfs variando de 0,12 a 0,81, resultando em diferentes padrões para macho e fêmea. Ambos tiveram 7 bandas protéicas, havendo coincidência nas bandas r3, r5 e r6 (Tabela 1). Quanto ao macho, observou-se a diminuição quantitativa das bandas r1, r3, r4 e r10, no decorrer do tempo. Na fêmea notou-se a diminuição quantitativa da banda r11, sendo que após o décimo quarto dia, ela, assim como a r9, não foram mais detectadas.

Tabela 1. Mobilidades relativas, resultados densitométricos (%) e identificação de bandas das proteínas plasmáticas sanguíneas de tilápias (*Oreochromis niloticus*) macho e fêmea, separadas por eletroforese em gel de agarose, aos 7 e 14 dias pós-irradiação.

Bandas	Mob. relativas	Macho %			Fêmea %		
		Padrão	7 dias	14 dias	Padrão	7 dias	14 dias
r1	0,12	3,76	3,43	2,37	-	-	-
r2	0,14	-	-	-	3,46	3,05	3,19
r3	0,26	16,1	15,3	12,3	9,21	8,04	8,38
r4	0,41	7,18	5,82	5,16	-	-	-
r5	0,49	14,6	17,1	21,6	13,6	9,89	24
r6	0,58	5,09	3,9	4,94	13,1	13,2	12,4
r7	0,68	14,1	9,11	10,8	-	-	-
r8	0,71	-	-	-	6,16	8,17	4,1
r9	0,72	-	-	-	4,07	5,85	-
r10	0,79	4,67	4,56	4,17	-	-	-
r11	0,81	-	-	-	4,9	3,15	-

Os dados aqui observados demonstram a manifestação da síndrome aguda da radiação, visto que ocorreu o desaparecimento parcial das listras característica das tilápias sugerindo morte de células da epiderme do peixe e a diminuição e até mesmo o desaparecimento de frações proteicas. Numa exposição à radiação X ou gama, observa-se a possível queda de leucócitos, hemácias e plaquetas, sendo que estes valores podem retornar ao normal após algumas semanas (13). Entretanto, lesões que possam ter ocorrido em órgãos nem sempre se recuperam. O conjunto de efeitos biológicos num indivíduo, dependendo da gravidade das lesões, pode determinar sua morte ou a sobrevida em função do sistema de reparo.

Deverão ser realizados futuros estudos com o objetivo de tentar correlacionar alterações no padrão eletroforético de proteínas plasmáticas de tilápias com doses de radiação absorvida.

## REFERÊNCIAS

1. Griffiths AJF, Lewontin RC, Sean BC, Wessler SR. Introdução a genética. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1998.

2. Ranzani-Paiva MJT, Godinho HM. Hematological characteristics of the curimatá, *Prochilodus scrofa* Steindachner, 1881 (Osteichthyes, Characiformes, Prochilodontidae), stocked in experimental conditions. Bol Inst Pesca. 1986;13(2):115-20.
3. Martins ML. Efeito da suplementação com vitamina C sobre a reação inflamatória em *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 estressados [tese]. Jaboticabal: Centro de Aquicultura; 2000.
4. Martins ML, Moraes FR, Fujimoto RY, Nomura DT, Fenerick Jr J. Respostas do híbrido tambacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 macho x *Colossoma macropomum* Cuvier, 1818 fêmea) a estímulos simples ou consecutivos de captura. Bol Inst Pesca. 2002;28(2):195-204.
5. Barcellos LG, Souza SMG, Lucero LF. Estudos preliminares sobre o cortisol sérico em resposta ao estresse na tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*). Bol Inst Pesca. 1997;24:239-45.
6. Moura MAF, Farias IP, Val AL. Effects of temperature on leucocytes of *Colossoma macropomum* and *Hoplosternum littorale* (Pisces). Braz J Med Biol Res. 1994;27(7):1589-98.
7. Barcellos LJG, Woehl VM, Wassermann GF, Quevedo RM, Ittzés I, Krieger MH. Plasma levels of cortisol and glucose in response to capture and tank transference in *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard), a South American catfish. Aquac Res. 2001;32(3):121-3.
8. Martins ML, Onaka EM, Tavares-Dias M, Bozzo FR, Malheiros EB. Características hematológicas do híbrido tambacu, seis e 24 horas após a injeção de substâncias irritantes na bexiga natatória. Rev Ictiol. 2001;9(1-2):25-31.
9. Tavares-Dias M, Sandrim EFS, Moraes FR, Carneiro PCF. Physiological responses of “tambaqui” *Colossoma macropomum* (Characidae) to acute stress. Bol Inst Pesca. 2001;27(1):43-8.
10. Gomes LC, Araujo-Lima CARM, Roubach R, Chippari-Gomes AR, Lopes NP, Urbinati EC. Effect of fish density during transportation on stress and mortality of juvenile tambaqui *Colossoma macropomum*. J World Aquac Soc. 2003;34(1):76-84.
11. Okuno E, Yoshimura E. Física das radiações. São Paulo: Oficina de Textos; 2010.
12. Buddington RK, Krogdhal A, Bakke-McKellep AM. The intestine of carnivorous fish: structure and functions and the relations with diet. Acta Physiol Scand. 1997;161:67-80.
13. Tauhata L, Salati I, Di Prinzio R, Di Prinzio AR. Radioproteção e dosimetria: fundamentos. Rio de Janeiro: Comissão Nacional de Energia Nuclear; 2003.

**Recebido em: 23/04/2016**

**Aceito em: 11/07/2016**