

Efeitos de fitoestrogénios no metabolismo mineral em escamas de robalo e de tilápia moçambicana

M. Dulce Estêvão ^(1,2), Patrícia Pinto ⁽¹⁾, Soraia Santos ⁽¹⁾, André Andrade ⁽¹⁾ e Deborah Power ⁽¹⁾

(1) Centro de Ciências do Mar (CCMAR), Universidade do Algarve, Campus de Gambelas, Faro, Portugal. (2) Escola Superior de Saúde, Universidade do Algarve, Faro, Portugal. Email: mestevao@ualg.pt

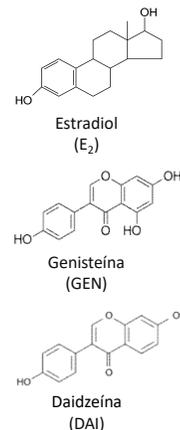
INTRODUÇÃO

O rápido desenvolvimento da aquacultura nas últimas décadas fez aumentar a procura por fontes proteicas adequadas para incluir nas rações dos peixes. A soja tem sido muito utilizada com fonte proteica de origem vegetal mas é particularmente rica em fitoestrogénios, incluindo a genisteína (GEN) e a daidzeína (DAI), que são as principais isoflavonas presentes na soja.

Os peixes podem estar expostos aos fitoestrogénios no ambiente ou através das dietas que os contêm, como é o caso da soja. Estes compostos podem ter atividades estrogénicas e efeitos disruptivos na reprodução mas o seu impacto nos tecidos mineralizados continua a ser desconhecido.

As escamas de peixe são um tecido mineralizado que, tal como o osso de mamíferos, é mantido por ciclos de formação e reabsorção, mediado por osteoblastos (OSB) e osteoclastos (OSC), respetivamente. As escamas são um tecido responsivo aos estrogénios e expressam os recetores de estrogénio nucleares (ERs). As atividades das enzimas fosfatase alcalina (ALP) e fosfatase ácida resistente ao tartrato (TRAP) são usadas como marcadores das atividades dos OSB e OSC, respetivamente, e são modificadas pelo estradiol (E₂) nas escamas de várias espécies de peixe.

Usando um ensaio *in vitro*, investigámos o possível impacto da exposição a GEN e a DAI no metabolismo mineral em escamas. O efeito destes compostos foi avaliado através da determinação das atividades de TRAP e ALP em escamas de robalo (*Dicentrarchus labrax*), uma espécie marinha, e de tilápia moçambicana (*Oreochromis mossambicus*), mantida em água salgada (AS) e em água doce (AD).



Condições do ensaio *in vitro* com escamas

Espécies: Robalo (90-185g)

Tilápia moçambicana (água doce: 90-160g; água salgada: 110-130g)

N= 4 escamas/peixe e 3 peixes/tratamento (dose e tempo)

Compostos e doses testadas: GEN e DAI a 10⁻⁶, 10⁻⁸ ou 10⁻¹⁰ M

Tempo de exposição das escamas aos compostos: 30 min e 24h

Atividades enzimáticas determinadas: TRAP (marcador de OSC); ALP (marcador de OSB)

Método: método colorimétrico usando p-nitrofenil fosfato (pNPP) como substrato, seguido pela quantificação do produto, p-nitrofenol (pNP) a 405nm

MÉTODOS



Amostragem das escamas



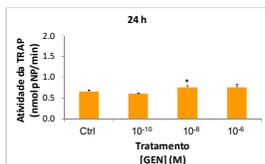
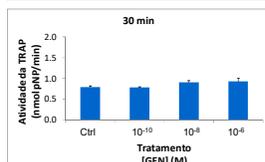
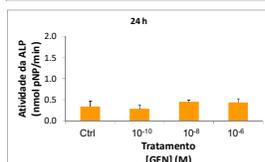
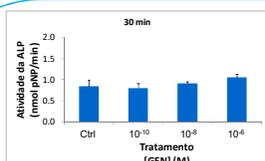
Incubação *in vitro*



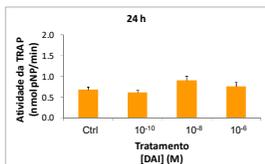
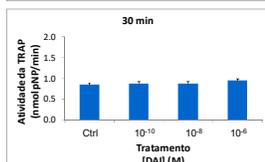
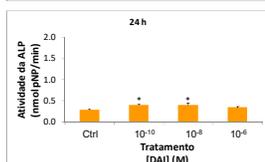
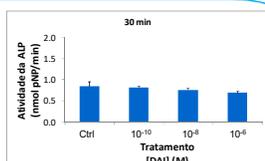
Método colorimétrico para a atividade enzimática (405 nm)

RESULTADOS

Genisteína (GEN)

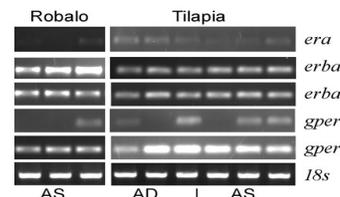


Daidzeína (DAI)



Atividade enzimática da fosfatase alcalina (ALP) e da fosfatase ácida resistente ao tartrato (TRAP) em escamas de robalo após tratamento *in vitro* com genisteína (GEN) e daidzeína (DAI) por 30 minutos e 24 horas. Os resultados são apresentados como média ± erro padrão. * indica diferenças significativas por comparação com o controlo (p < 0.05, t-student).

Expressão dos recetores de estrogénios nas escamas



Expressão do mRNA dos recetores de estrogénios nucleares (*era*, *erba* e *erbb*) e membranares (recetores de estrogénio membranares acoplado à proteína G (*gper* e *gperl*)) em escamas de robalo e tilápia mantidos em água doce (AD) ou salgada (AS), determinada por RT-PCR e usando como controlo interno o RNA 18S ribossomal.

- Em escamas de robalo, a exposição a GEN (10⁻⁸ M) aumenta significativamente a atividade da TRAP mas não afeta a atividade da ALP
- Ao contrário, a exposição de escamas de robalo a DAI (10⁻¹⁰ and 10⁻⁸ M) não altera a atividade da TRAP mas aumenta significativamente a atividade da ALP
- Em tilápia, mantida em água doce ou água salgada, a GEN e a DAI não provocam alterações significativas nas atividades de TRAP ou ALP, nas concentrações usadas (resultados não apresentados)
- Os recetores de estrogénio nucleares (principalmente o subtipo ERβ) e um recetor de estrogénio membranares (GPERL) são expressos nas escamas de ambas as espécies
- A expressão de recetores nuclear ERα e membranares GPER é muito baixa em escamas
- Os recetores de estrogénio detetados nas escamas poderão mediar as ações disruptivas da GEN e da DAI, que foram observadas
- Os resultados sugerem que ambos os compostos estudados (GEN e DAI) podem influenciar o ciclo de renovação (*turnover*) de cálcio (como indicado pelas atividades da TRAP e da ALP) *in vivo* em robalo, o que se parece com o conhecido efeito do estradiol

CONCLUSÕES

- A presença de recetores de estrogénios nucleares e membranares em escamas de robalo e de tilápia indica que estes tecidos são responsivos a estrogénio
- A exposição a GEN e a DAI pode provocar efeitos disruptivos no metabolismo *in vivo* de tecidos mineralizados em robalo
- As concentrações utilizadas não afetaram o metabolismo mineral em tilápia (de água doce e salgada) o que sugere que os fitoestrogénios testados podem ter um efeito que depende da espécie
- Os mecanismos de ação da GEN e da DAI continuam desconhecidos mas podem incluir a interrupção do sistema estrogénico, uma vez que estes compostos se ligam aos recetores de estrogénio e afetam outros processos regulados por estrogénios em peixe