
Alexandra Maria Mendes Guerra Ferreira e Silva Neto

**Efeitos do 17β -estradiol e de Alquilfenóis
(Pseudo-estrogénios) nos Peroxissomas Hepáticos de
Truta Fário (*Salmo trutta*)**

Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar

Universidade do Porto

Porto, 2001

TM

Alexandra Maria Mendes Guerra Ferreira e Silva Neto

**Efeitos do 17β -estradiol e de Alquilfenóis
(Pseudo-estrogénios) nos Peroxissomas Hepáticos de
Truta Fário (*Salmo trutta*)**

Mestrado em Ciências do Mar – Recursos Marinhos
(Biologia Marinha)

Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar
Universidade do Porto
Porto, 2001

Aos meus sobrinhos, Joaquina e Francisco, pelo seu carinho.

À minha amiga Paulinha, pela sua lealdade.

Aos meus padrinhos Migú e Carlos Lemos, pelo seu encorajamento.

Ao meu marido Carlos Manuel, pela sua paciência.

Aos meus paispor tudo.

“Por cada sonho tornado realidade fazemos uma conquista interior”

(Laurinda Alves, 2000)

Dissertação apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar para obtenção do grau de Mestre em Ciências do mar – Recursos Marinhos, área científica de Biologia Marinha (Resolução 12/SC/95, D.R. nº 169, II Série de 24 de Julho de 1995).

Este trabalho foi orientado pelo

Professor Doutor Alexandre Lobo da Cunha

e co-orientado pelo **Professor Doutor Eduardo Jorge Sousa da Rocha**

Figura da capa: Fotografia em microscopia electrónica de transmissão de hepatócitos de truta fário (*Salmo trutta*) ao fim de 30 dias de tratamento com 100 µg/L de 17β-estradiol.

AGRADECIMENTOS

Como não podia deixar de ser, este trabalho é o resultado de um esforço colectivo, e não seria curial da minha parte deixar de realçar o meu modesto agradecimento a todos os que, de uma maneira ou de outra, contribuíram para a sua concretização.

Ao Prof. Doutor Alexandre Lobo da Cunha, que com grande empenho e satisfação orientou esta tese, revelando sempre um espírito crítico bem presente e incentivador. A sua paciência, sabedoria e a confiança que em mim depositou foram os elementos geradores do gosto, cada vez maior, pela investigação. O meu “muito obrigado” nunca será suficiente para o exprimir.

Ao Prof. Doutor Eduardo Rocha que co-orientou este trabalho. Os seus conselhos, a sua dedicação e ajuda, bem como o seu exemplo (destaco o seu carácter alegre, empreendedor e com oportuno espírito crítico), foram vectores que constituíram traços marcantes na minha formação. Para além do mais, expresso o meu profundo agradecimento pela supervisão, passo a passo, de todo a análise estatística, por este efectuada.

À Licenciada Dolores Resende que me iniciou nas técnicas laboratoriais de bioquímica com paciência e empenhamento. Dela soube beber os princípios da persistência e do rigor que também foi apurando quando esta por vezes me dizia “Alexandra, o que estás a fazer?”. Aliás, devido à enorme quantidade de ensaios necessários para a concretização deste projecto, a realização deste tornar-se-ia impensável sem a sua preciosa ajuda.

Ao Prof. Doutor Pedro Monteiro que me deu a conhecer as técnicas de imunoensaio. Agradeço a supervisão feita por este, passo a passo, durante a realização dos ensaios para os doseamento de vitelogenina e 17 β -estradiol. Dele, para além de toda a sua bagagem científica, nunca poderei esquecer as suas qualidades humanas. A sua camaradagem e capacidade de entreatajuda foram inextinguíveis.

À Prof. Doutora Maria João Rocha que aplainou algumas dificuldades do meu trabalho. Todo o seu saber, e pronta afectividade, encorajaram-me a prosseguir e proporcionaram um bom ambiente de trabalho.

Aos técnicos do Laboratório de Biologia Celular do ICBAS: Sra. D. Laura Corral e Sr. João Carvalheiro. À primeira, pelos excelentes ensinamentos transmitidos para a realização dos cortes semifinos e ultrafinos; ao segundo, pelo empenho e profissionalismo demonstrado na execução do trabalho fotográfico, assim como pela sua camaradagem.

À Sra. D. Ana Campos, quer pelo cuidado que permitiu que todo o material de vidro se encontrasse sempre nas condições ideais de utilização, quer pela sua atenção para comigo.

A todos os que trabalham e dão a sua colaboração à investigação efectuada no laboratório de Biologia Celular, duma maneira muito particular às licenciadas Carla Batista Pinto e Graça Casal, que tanto nos momentos de euforia como nos de desânimo, se congratularam e me animaram, criando um excelente ambiente de trabalho, transformando o laboratório numa segunda casa.

Ao Prof. Doutor Pedro Rodrigues quero dirigir uma palavra de grande apreço. Graças à sua atenção e arguidade soube interpretar o meu interesse pelas áreas e limites – “não passar a baixo da célula” – científicos da minha preferência. Assim, a ele devo a tomada de conhecimento da excelente equipa de investigação dos Laboratórios de Biologia Celular e de Histologia e Embriologia do ICBAS que, posteriormente, vim a integrar.

Ao Prof. Doutor Rogério Monteiro que pela sua bagagem cultural, optimismo e acessibilidade possibilitaram agradáveis trocas de pontos de vista.

Ao Prof. Doutor Carlos Azevedo pelo bom acolhimento, apoio e incentivo.

Ao Prof. Doutor Mário de Sousa pelo encorajamento que sempre ressaltou das suas palavras.

À Sra. D. Elsa Oliveira e Sra. D. Helena Oliveira, técnicas, respectivamente, dos Laboratórios de Biologia Celular e de Histologia e Embriologia do ICBAS, quero manifestar o meu reconhecimento pelos seus conselhos metodológicos, pelo seu encorajamento e bons momentos de convívio.

Os meus agradecimentos estendem-se ainda a membros de outros Sectores e Serviços do ICBAS que comigo tenham colaborado.

Como este trabalho seria irrealizável sem a matéria-prima básica, a truta fário, não posso deixar de agradecer à Direcção Regional de Agricultura de Entre-Douro e Minho (DRAEDM) pelo fornecimento gratuito, de modo eficiente e sempre em bom estado sanitário, dos animais necessários aos estudos. A cedência dos peixes realizou-se ao abrigo de um protocolo de cooperação assinado entre aquela direcção regional e o Laboratório de Histologia e Embriologia do ICBAS. Um agradecimento particular ao Sr. Eng. Augusto Maia, e ao Sr. Eng. Álvaro Gonçalves. Uma palavra de apreço é também devido a todos os trabalhadores da DRAEDM, em especial ao Sr. Jorge e Sr. Lemos que, em Vila do Conde, zelaram com elevada competência pela manutenção dos animais em situação experimental.

O presente trabalho teve ainda o apoio financeiro da Fundação para a Ciência e Tecnologia através de um projecto (Ref.^ª PRAXIS/C/BIA/14268/98) liderado pelo Professor Doutor Alexandre Lobo da Cunha.

E seguindo o princípio de que os últimos serão os primeiros, não posso deixar de expressar o meu sincero agradecimento à Prof. Doutora Maria Armanda Henriques, Coordenadora de

Mestrado. O seu encorajamento. A palavra certa no momento certo. A sua disponibilidade. A sua capacidade na abertura de novas pistas. Em suma, a sua capacidade de coordenar, permitiram que levasse, não sem algumas tempestades, esta nau a bom porto.

Quero também dirigir algumas palavras de profundo reconhecimento aos amigos que estiveram sempre comigo, ao longo desta aventura.

Ao Professor Jorge Lima, nunca poderei esquecer as longas horas de ensinamento e “bate papo” que levaram ao despertar, em cada momento, pelo gosto de “aprender a aprender”.

Ao Dr. Fernando Paiva nem com todas as palavras do mundo seria capaz de esboçar a enorme alegria que sinto por ter estado sempre comigo, ao longo de mais esta caminhada.

À Dr.^a Cristina Maia estou-lhe grata por toda a sua paciência, ternura e encorajamento durante a realização do meu trabalho de investigação.

Aos pais do meu marido, Maria Luísa e José António, agradeço o ombro amigo nos momentos de menos coragem e os aplausos nos momentos de sucesso.

À Celeste, amiga que ao estar incondicionalmente ao meu lado com a sua voz, foi promovida a meu “Anjo da Guarda”.

À Leninha, companheira de longa data, o meu muito apreço pelo seu exemplo de vida empreendedor e determinado, que muito me influenciou e se tornou determinante na conquista pelas minhas convicções.

À minha querida amiga Lucinda, ao dar-me a sua mão num momento crítico da minha existência, restituiu-me não só a vontade de viver, mas também a fazê-lo de uma forma mais atenta e empreendedora. Por tudo isto, também cheguei até aqui.

Ao meu priminho Pedro (o tal dos moinhos de vento), não poderia deixar de transmitir a minha gratidão pela ajuda concedida na tradução do “abstract” deste trabalho, mostrando-se, assim, mais uma vez presente num dos momentos significativos da minha caminhada.

Aos meus irmãos, Francisco e Zira, não posso esquecer o sorriso ou a palavra amiga que oportunamente me dirigiam, facilitando, em muito, a realização deste meu trabalho.

E porque para mim o melhor do mundo são as crianças, para além dos nossos amigos, não poderia jamais deixar de expressar a minha gratidão para com o meu pequenino, o Tico. Os momentos de boa disposição que este me proporcionou em virtude do seu carinho, do seu mimo, da sua espontaneidade e da sua alegria, permitiram-me ultrapassar, da melhor maneira, alguns dos momentos mais difíceis e de maior pressão, ao restituir-me a serenidade e confiança na minha pessoa, factores imprescindíveis à concretização da minha tese.

A todos vós um abraço amigo e o meu sincero obrigado.

RESUMO

Em truta fário (*Salmo trutta*) foi anteriormente encontrada uma correlação entre as variações morfológicas sazonais dos peroxissomas hepáticos e o estado de maturação das gónadas, sendo estas variações mais acentuadas nas fêmeas. Assim, foi proposta uma nova hipótese biológica, segundo a qual os peroxissomas hepáticos de truta poderiam ser regulados de uma forma natural, e segundo um determinado padrão, pelas mesmas hormonas esteróides que promovem a maturação da gónada – como seja o 17 β -estradiol. Mais se equacionou que se tal era previsível em relação a esta hormona tipicamente feminina, então, certos xenobióticos com conhecida actividade estrogénica, tal como acontece com os alquilfenóis (químicos industriais que são simultaneamente poluentes do meio aquático), também poderiam interferir na estrutura e funcionamento dos peroxissomas. O presente trabalho procurou contribuir para um melhor conhecimento dos efeitos do 17 β -estradiol e de vários alquilfenóis na ultra-estrutura e actividades enzimáticas dos peroxissomas hepáticos da truta fário.

Trutas imaturas com cerca 1 ano de idade, foram mantidas, durante 30 dias, em sistemas de tanques em circuito fechado, estando expostas a 17 β -estradiol e a alquilfenóis, dissolvidos na água, nas concentrações nominais 1 μ g/L, 50 μ g/L e 100 μ g/L de 17 β -estradiol; 750 μ g/L de 4-tert-butilfenol, 750 μ g/L de 4-nonilfenol e 750 μ g/L de uma mistura, em partes iguais, destes dois pseudo-estrogénios. Findo o período da exposição, os peixes foram anestesiados, tendo sido recolhidas amostras de sangue e o fígado. Este, foi seccionado, sendo uma parte das secções destinada à quantificação das actividades de enzimas peroxissomais (catalase, oxidades dos D-aminoácidos, glicolato, urato e palmitoil-CoA) e a outra processada para estudos morfológicos, incluindo eventuais modificações ultra-estruturais dos peroxissomas. Neste trabalho, estas últimas foram estudadas apenas nas trutas submetidas à acção do 17 β -estradiol nas concentrações de 1 μ g/L e 100 μ g/L, tendo-se recorrido à detecção citoquímica da catalase de modo a bem evidenciar os peroxissomas. A sua avaliação estereológica foi efectuada por métodos clássicos a partir de imagens de microscopia electrónica de transmissão.

Foi feito o doseamento por imunoensaio (EIA) dos níveis plasmáticos de 17 β -estradiol existente nos peixes do grupo controlo e nos animais expostos ao 17 β -estradiol. Por outro lado, de modo a comprovar a resposta estrogénica nos peixes devido à exposição ao 17 β -estradiol e aos alquilfenóis, procedeu-se à quantificação dos níveis plasmáticos de vitelogenina também por uma técnica de imunoensaio (ELISA).

Entre o grupo de trutas controlo e o tratado com 1 $\mu\text{g/L}$ de 17β -estradiol não se registaram diferenças significativas nos parâmetros estereológicos analisados. Por outro lado, constatou-se que os peroxissomas dos peixes sujeitos à concentração mais elevada de 17β -estradiol (100 $\mu\text{g/L}$) exibiram um decréscimo significativo de tamanho em relação ao controlo e aos peixes tratados com 1 $\mu\text{g/L}$, embora não tenha havido alteração na densidade volumétrica (V_v). Acresce que, nas trutas sujeitas ao 17β -estradiol na dose de 100 $\mu\text{g/L}$, houve um aumento de aproximadamente 100% na densidade numérica dos peroxissomas (N_v), quer em comparação com o grupo de controlo, quer com o tratado com o 1 $\mu\text{g/L}$. No que se refere à densidade de superfície (S_v) e à razão superfície/volume (S/V), o aumento detectado relativamente aos outros dois grupos foi de menor magnitude, sendo ligeiramente inferior a 1/3 e a 1/4, respectivamente. Nas variáveis absolutas estudadas, nomeadamente superfície (\bar{s}_N) volume (\bar{v}_N) e diâmetro (\bar{d}_{sphere}) médios, registaram-se decréscimos de cerca de 40%, 50% e 33%, respectivamente, nos animais sujeitos ao 17β -estradiol na concentração de 100 $\mu\text{g/L}$, comparativamente com os outros dois grupos.

Relativamente às actividades enzimáticas peroxissomais, verificou-se que o 17β -estradiol induziu uma acção repressora muito superior à exercida pelos alquilfenóis, sendo esta mais relevante no caso da urato oxidase nos peixes sob influência desta hormona na dose de 100 $\mu\text{g/L}$, que induziu o seu “desaparecimento”. Contudo, o efeito estrogénico sobre os peroxissomas postulado para os alquilfenóis parece ter sido exercido nestes animais, uma vez que algumas das enzimas estudadas (catalase e oxidases glicolato, D-aminoácidos e palmitoil-CoA) exibiram níveis de actividade intermédios entre os peixes do grupo de controlo e os expostos ao 17β -estradiol nas doses de 50 $\mu\text{g/L}$ e 100 $\mu\text{g/L}$. Acresce que não se detectaram diferenças significativas entre o grupo controlo e as trutas sujeitas a 1 $\mu\text{g/L}$ de 17β -estradiol.

Em suma, ficou demonstrado que o 17β -estradiol exerce uma forte acção reguladora do metabolismo peroxissomal. No que se refere aos alquilfenóis empregues, não foi possível ordená-los com base na magnitude do seu efeito sobre as actividades enzimáticas peroxissomais devido ao facto de cada alquilfenol actuar de modo diferente consoante a enzima. O mesmo já não aconteceu quanto à sua potência estrogénica para induzir a síntese de vitelogenina. Neste caso, chegou-se à seguinte ordenação: mistura de 4-nonilfenol com 4-tert-butilfenol > 4-nonilfenol = 4-tert-butilfenol. Os resultados obtidos confirmaram a hipótese anteriormente formulada de que o metabolismo e a morfologia dos peroxissomas da truta fário são influenciados por compostos com acção estrogénica, mas verificou-se que neste caso os seus efeitos só são significativos quando estes peixes estão sujeitos a doses elevadas destes compostos.

ABSTRACT

In the brown trout, (*Salmo trutta*), a correlation was previously found between the hepatic peroxisomes' seasonal morphologic variations and the gonads' maturation state. Those variations had a higher magnitude in the females. Hence, a new biological hypothesis was proposed, according to which the trout's hepatic peroxisomes would be regulated in a natural manner and following a particular pattern, by the same steroid hormones that control the maturation of the gonad - as is the case of the 17β -estradiol. It was further formulated that, if that was expected for the 17β -estradiol, then, certain xenobiotics with known estrogenic activity, such as the alkylphenols, (industrial chemical also pollutants of aquatic ecosystems), also could interfere on the structure and behavior of the peroxisomes. The present work gave a contribution to the knowledge of the effects of the 17β -estradiol, and several alkylphenols, on the ultrastructure and enzymatic activities of the brown trout's hepatic peroxisomes.

Immature trout, of approximately one year of age, were maintained for 30 days in closed-circuit tank systems, being exposed to the following experimental conditions: three different concentrations of 17β -estradiol (1 $\mu\text{g/L}$, 50 $\mu\text{g/L}$ and 100 $\mu\text{g/L}$); water contaminated with alkylphenols 4-tert-butylphenol (750 $\mu\text{g/L}$), 4-nonylphenol (750 $\mu\text{g/L}$), as well as with the mixture, in equal proportions, of these two pseudo-estrogens. Once the exposure period was over, the fish were anesthetized and blood samples and the liver were extracted. This organ was thereafter sectioned, one part of the sections being allocated to the quantification of peroxisomal enzymes' activities (catalase, D-amino acids oxidase, glycolate oxidase, urate oxidase and palmitoyl-CoA oxidase) and the other used for the study of the ultrastructural modifications of the peroxisomes. The latter were studied only for the trout under the effect of 17β -estradiol in the concentrations of 1 $\mu\text{g/L}$ e 100 $\mu\text{g/L}$, by using the catalase cytochemistry detection to highlight these organelles. Their stereological evaluation was carried out using transmission electron microscopy images.

The dosage of plasmatic levels of 17β -estradiol in the fish of the control group, as well as in the animals exposed to 17β -estradiol, was determined by "enzyme immunoassay" (EIA). On the other hand, in order to ascertain the estrogenic response in the fish due to exposure to 17β -estradiol and to the alkylphenols, the quantification of the plasmatic levels of vitellogenin was performed with "enzyme-linked immunosorbant assay" (ELISA).

No significant differences in the analyzed stereological peroxissomal parameters were observed between the trout in the control group and the animals treated with 1 $\mu\text{g/L}$ of

17 β -estradiol. On the other hand, the peroxisomes of the fish subject to the highest concentration of 17 β -estradiol (100 $\mu\text{g/L}$) exhibited a considerable decrease in size, in comparison with the control group and with the fish treated with 1 $\mu\text{g/L}$ of estradiol, although no alteration in the volumetric density (V_v) occurred. Moreover, among the trout exposed to 17 β -estradiol in the concentration of 100 $\mu\text{g/L}$ there was approximately a 200% increase in peroxisomal numerical density (N_v), both in comparison with the control group and with the fish treated with 17 β -estradiol in the concentration 1 $\mu\text{g/L}$. In what concerns surface density (S_v) and ratio surface/volume (S/V), the detected increase was of lesser magnitude, when compared to the control and 17 β -estradiol 1 $\mu\text{g/L}$ groups, being slightly lower than 1/3 and 1/4, respectively. In the case of the absolute variables studied, namely mean surface (\bar{s}_N), mean volume (\bar{v}_N) and mean diameter (\bar{d}_{Sphere}), there were decreases of about 40%, 50%, and 33%, respectively, for the animals exposed to 17 β -estradiol in the concentration 100 $\mu\text{g/L}$, comparatively to the groups exposed to 17 β -estradiol in the concentration 1 $\mu\text{g/L}$ and to the control group.

In what concerns peroxisomal enzymatic activities, it was observed that the 17 β -estradiol induced a repressive effect much greater than the one exerted by the alkylphenols. This was more relevant in the case of the urate oxidase for the fish under influence of the hormone in the concentration 100 $\mu\text{g/L}$, which disappeared. Nevertheless, the estrogenic effect foreseen for the alkylphenols seems to have been exerted in these animals, since some of the enzymes under study (catalase and glycolate oxidase, D-amino acids oxidase and palmitoyl-CoA oxidase) exhibited intermediate activity levels between the fish of the control group and those exposed to 17 β -estradiol in the concentrations of 50 $\mu\text{g/L}$ e 100 $\mu\text{g/L}$. Moreover, no great differences were found between the control group and the trout under the effect of 1 $\mu\text{g/L}$ of 17 β -estradiol.

In conclusion, the 17 β -estradiol has a strong repressing effect upon the enzymatic activities, in comparison with the alkylphenols. The degree of this effect depends on the administered dosage of 17 β -estradiol. In the case of the alkylphenols under study, it was not possible to rank them according to their power on the basis of the effect on enzymatic activity, due to the fact that each alkylphenol acts differently for each enzyme. Such was not the case with their estrogenic power according to the synthesis of vitellogenin. In this case the following order was obtained: mixture of 4-nonylphenol with 4-tert-butylphenol > 4-nonylphenol = 4-tert-butylphenol. Nevertheless, the results confirm the hypothesis that the metabolism and the morphology of the brown trout's peroxisomes are influenced by compounds with estrogenic action. Nevertheless, it was found that, in this case, the effects are only significant when these fishers are exposed to the influence of high doses of these compounds.

| ÍNDICE | |
|---|-----------|
| PREÂMBULO | 1 |
| I. INTRODUÇÃO | 3 |
| 1. DESCOBERTA DOS PEROXISSOMAS E SUA IMPORTÂNCIA | 3 |
| 2. DIVERSIDADE DOS PEROXISSOMAS NAS CÉLULAS ANIMAIS | 4 |
| 2.1. Aspectos gerais da morfologia dos peroxissomas | 4 |
| 2.2. Morfologia dos peroxissomas nos peixes | 7 |
| 3. FUNÇÕES METABÓLICAS DOS PEROXISSOMAS | 8 |
| 3.1. β -oxidação dos ácidos gordos | 8 |
| 3.2. Catabolismo das purinas | 10 |
| 3.3. Catabolismo dos aminoácidos e ácidos L- α -hidroxi | 11 |
| 3.4. Metabolismo de formas reactivas de oxigénio | 13 |
| 3.5. Outras funções dos peroxissomas | 14 |
| 3.6. Enzimas presentes nos peroxissomas dos peixes | 14 |
| 4. BIOGÉNESE DOS PEROXISSOMAS | 16 |
| 5. ALTERAÇÕES PEROXISSOMAS INDUZIDAS POR XENOBIÓTICOS | 20 |
| 5.1. Proliferação peroxissomal nos mamíferos | 20 |
| 5.2. Factores que influenciam as respostas aos proliferadores peroxissomais nos mamíferos | 22 |
| 5.3. Alterações peroxissomais nos peixes | 24 |
| 5.4. Mecanismos da proliferação peroxissomal | 26 |
| 6. OS ALQUILFENÓIS | 29 |
| 6.1. Os alquilfenóis como poluentes | 30 |
| 6.2. Bioacumulação dos alquilfenóis | 31 |
| 6.3. Mecanismos de acção fisiológica dos disruptores endócrinos - Os alquilfenóis | 32 |
| 6.4. Métodos de detecção da actividade estrogénica | 35 |
| II. MATERIAL E MÉTODOS | 39 |
| 1. MANUTENÇÃO DOS ANIMAIS DURANTE AS EXPERIÊNCIAS | 39 |
| 2. QUÍMICOS | 39 |
| 3. EXPOSIÇÃO AO 17 β -ESTRADIOL E ALQUILFENÓIS | 40 |
| 3.1. Exposição de trutas imaturas a 1 μ g/L de 17 β -estradiol | 40 |

| | |
|--|----|
| 3.2. Exposição de trutas imaturas a 50 µg/L e 100 µg/L de 17β-estradiol e a alquilfenóis | 40 |
| 4. PROCESSAMENTO DO FÍGADO | 41 |
| 4.1. Colheita e perfusão | 41 |
| 5. ESTUDO ULTRA-ESTRUTURAL | 43 |
| 5.1. Localização citoquímica da catalase | 43 |
| 5.2. Metodologia Estereológica | 44 |
| 6. ESTUDO BIOQUÍMICO | 46 |
| 6.1. Preparação das amostras | 46 |
| 6.2. Determinação da concentração proteica | 47 |
| 6.3. Medições das actividades enzimáticas | 48 |
| 6.3.1. Catalase | 48 |
| 6.3.2. Oxidases | 49 |
| 7. DOSEAMENTO DE VITELOGENINA E DE 17β-ESTRADIOL | 51 |
| 7.1. Doseamento de vitelogenina por ELISA (“enzyme-linked immunosorbant assay”) | 51 |
| 7.2. Doseamento de 17β-estradiol por EIA (“enzyme immunoassay”) | 52 |
| 8. ESTATÍSTICA | 53 |
| III. RESULTADOS | 55 |
| 1. PARÂMETROS CORPORAIS DOS ANIMAIS UTILIZADOS NOS ENSAIOS | 55 |
| 2. EFEITOS RESULTANTES DA EXPOSIÇÃO AO 17β-ESTRADIOL | 57 |
| 2.1 Aspectos morfológicos | 57 |
| 2.2 Alterações enzimáticas | 62 |
| 3. EXPOSIÇÃO A ALQUILFENÓIS - ALTERAÇÕES ENZIMÁTICAS | 66 |
| 4. ALTERAÇÕES NOS NÍVEIS PLASMÁTICOS DE VITELOGENINA e 17β-ESTRADIOL | 68 |
| IV. DISCUSSÃO | 71 |
| V. BIBLIOGRAFIA | 97 |

SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

| | |
|---|--|
| AFnEO | Alquilfenóis-etoxilados |
| ATP | Adenosina Trifosfato |
| BSA | Albumina de Soro Bovino |
| DAB | 3,3`diaminobenzidina |
| C₄H₄KNaO₆.4H₂O | Tartrato de Potássio-Sódio |
| CaCl₂ | Cloreto de Cálcio |
| CoA | coenzima A |
| CuSO₄H₂O | Sulfato de Cobre Hidratado |
| CV | Coefficiente de variação |
| DNA | Ácido desoxirribonucleico |
| D.O | Densidade Óptica |
| \bar{d}_{sphere} | Diâmetro esférico equivalente |
| E2 | 17 β -estradiol |
| EDTA | Ácido Etilenodiamino Tetracético |
| EIA | Enzyme immunoassay |
| ELISA | Enzyme-linked immunosorbant assay |
| ETAR | Estação de tratamento de águas residuais |
| FAD | Flavina-Adenina-Dinucleótideo |
| FRO | Formas Reactivas de Oxigénio |
| H₂O₂ | Peróxido de Hidrogénio |

| | |
|--|--|
| KCl | Cloreto de Potássio |
| MgCl₂ | Cloreto de Magnésio |
| MOPS | Ácido(3-[N-morfolino]propano sulfónico) |
| NaHCO₃ | Hidrogenocarbonato de Sódio |
| NaH₂PO₄·H₂O | Diidrogenofosfato de Sódio Hidratado |
| Na₂HPO₄·2H₂O | Hidrogenofosfato Bissódico Hidratado |
| Na₂CO₃ | Carbonato de Potássio |
| NaOH | Hidróxido de Sódio |
| N_v | Densidade Numérica Peroxissomal Relativa |
| Pex | Peroxina ou Proteína envolvida na biogénese dos peroxissomas |
| PPAR | Receptor Activado pelos Proliferadores Peroxissomais |
| PPER | Elemento de Resposta do Proliferador Peroxissomal |
| PMSF | Fenilmetilsulfonil floreto |
| PTS | Sequência-Sinal Peroxissomal |
| RE | Receptor estrogénico |
| RNA | Ácido ribonucleico |
| S_v | Densidade de Superfície Peroxissomal Relativa |
| \bar{s}_N | Superfície média peroxissomal |
| Tris | Tris (hidroximetil) aminometano |
| V_v | Densidade Volumétrica Peroxissomal Relativa |
| \bar{V}_N | Volume médio peroxissomal |

PREÂMBULO

O tema desta dissertação integra-se na linha de investigação sobre os peroxissomas de animais aquáticos iniciada há alguns anos pelo Prof. Doutor Alexandre Lobo da Cunha, no Laboratório de Biologia Celular do Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar (ICBAS).

Ao longo das últimas duas décadas, assistiu-se a uma considerável evolução dos conhecimentos referentes a diversos aspectos dos peroxissomas, nomeadamente da sua morfologia, composição enzimática, metabolismo, genética, biogénese e doenças originadas por deficiências funcionais deste organelo. Como tal, os peroxissomas são hoje considerados componentes intracelulares de grande importância, não só nos hepatócitos como na maioria das células eucarióticas, estando aí envolvidos em inúmeras funções vitais. De modo a desvendar as incógnitas que persistem à volta dos peroxissomas, torna-se imprescindível procurar esclarecer todos os aspectos sobre a sua regulação estrutural e funcional na célula, ao longo do ciclo de vida dos organismos.

Uma grande variedade e quantidade de disruptores endócrinos, entre os quais se incluem os pseudo-estrogénios, têm vindo a ser libertados no meio ambiente desde os anos 50. Sabe-se hoje que, relativamente à vida selvagem, os efeitos do uso de compostos que afectam o sistema endócrino incluem alterações ao nível do sistema reprodutor, nervoso e imunológico, as quais parecem afectar a dinâmica das populações. Contudo, para o estabelecimento de normas internacionais que regularizem, ou quiça proíbam a utilização dos disruptores endócrinos, é fundamental prosseguir com as investigações, de modo célere, procurando assim aferir os efeitos dos compostos mencionados nos seres vivos, inclusive no próprio homem.

Através de um estudo sazonal, realizado nos Laboratórios de Histologia e Embriologia e de Biologia Celular, do ICBAS, detectou-se uma redução acentuada nas dimensões dos peroxissomas no período vitelogénico do ciclo reprodutivo das fêmeas de truta fário. Posteriormente, verificou-se que essas alterações morfológicas são acompanhadas de uma redução nas actividades de algumas enzimas peroxissomais. Na sequência de questões originadas por todos estes trabalhos, tornou-se objectivo deste estudo investigar os efeitos de uma hormona sexual esteróide feminina (o 17 β -estradiol), bem como de pseudo-estrogénios (alquilfenóis) nos peroxissomas hepáticos da truta fário.

Graças à colaboração com a Divisão de Caça e Pesca nas Águas Interiores, da Direcção Regional de Agricultura de entre o Douro e Minho (DRAEDM), e apoiados financeiramente pela Fundação para a Ciência e Tecnologia, foi possível tornar viável o projecto de investigação

intitulado “Efeitos do 17β -estradiol e de Pseudo-estrogénios (Alquilfenóis) nos Peroxissomas Hepáticos da Truta Fário”. Tal situação muito me satisfez, pois tornou possível a realização da minha dissertação de mestrado, abrangendo a Biologia Celular e a Toxicologia, áreas da minha preferência.

A truta fário (*Salmo trutta*) pertence à família Salmonidae, conjuntamente com os salmões e as restantes trutas, os quais apresentam uma crescente importância económica. A utilização desta espécie como modelo de estudo resulta, certamente, de diversos factores, que vão desde a sua importância ecológica até às suas dimensões. Por ser uma espécie que se cultiva no Norte de Portugal, está acessível durante todo o ano. Além do mais, é de fácil manuseamento e manutenção, características que favorecem a realização de trabalhos experimentais. Sendo a truta fário nativa dos nossos rios, a sua potencialidade como bioindicador é de certo relevante, e por isso foi objecto da realização deste estudo sobre as alterações morfológicas e fisiológicas dos peroxissomas hepáticos, quer sob a acção de uma hormona sexual, quer sob o efeito de xenobióticos.

NOTA: Devido às inúmeras vezes que os nomes específicos da truta fário e da truta arco-íris, isto é *Salmo trutta* e *Onchorynchus mykiss*, respectivamente, são mencionados ao longo de todo o documento, daqui em diante, a sua referência será feita apenas pelo nome vulgar da espécie.

I. INTRODUÇÃO

1. DESCOBERTA DOS PEROXISSOMAS E SUA IMPORTÂNCIA

Rhodin, em 1954, usando o microscópio electrónico, observou e descreveu pela primeira vez os peroxissomas nas células dos túbulos proximais do rim de ratinho. Estes organelos, quando observados em secções ultrafinas do rim, apresentavam-se rodeados por uma membrana simples e com uma matriz densa aos electrões, sendo inicialmente designados por microcorpos. Em 1966, De Duve e Balduin, atribuíram-lhes o nome de “peroxissoma” devido à presença de pelo menos uma oxidase produtora de peróxido de hidrogénio e de catalase, enzima responsável pela degradação do peróxido de hidrogénio. Actualmente, designa-se por microcorpos uma família de organelos com funções oxidativas, sendo esta formada pelos peroxissomas, microperoxissomas, glioxissomas (das sementes de plantas oliaginosas), hidrogenossomas (presentes em alguns protozoários flagelados) e glicosomas (existentes nos protozoários flagelados pertencentes à ordem Kinetoplastida que inclui os tripanossomas). Apesar da sua diversidade, estes organelos manifestam certas similaridades morfológicas e funcionais que justificam a sua inclusão no grupo dos microcorpos (Masters e Crane, 1995; Magalhães, 1999).

Apesar da importância destes organelos nas plantas, fungos e protozoários ter sido reconhecida desde cedo, a atribuição de certas funções aos peroxissomas dos mamíferos e o reconhecimento da sua importância no metabolismo das células animais só foi divulgado após a descoberta de uma classe de doenças humanas hereditárias causadas por deficiências nos peroxissomas. Estas anomalias podem implicar graves consequências, quer no conteúdo enzimático, quer no processo de biogénese dos peroxissomas (Wanders et al., 1993).

Após a introdução e desenvolvimento das técnicas citoquímicas, nomeadamente a reacção com a 3,3'-diaminobenzidina (DAB) que evidencia os peroxissomas devido à actividade peroxidática da catalase, estes organelos foram encontrados no citoplasma da maioria das células eucarióticas (Bock et al., 1980), considerando-se estar implicados em inúmeras e importantes vias metabólicas (Hruban et al., 1972; Novikoff et al., 1973). Deste modo, os peroxissomas foram descritos e observados em diversos tipos de células de várias espécies de vertebrados (Beard e Novikoff, 1968; Hruban e Rechcigl, 1969; Kramar et al., 1974; De Craemer et al., 1991), em tecidos vegetais (Frederick et al., 1968) e em protozoários (Opperdoes e Borst, 1977; Hart e Opperdoes, 1984; Sanchez-Moreno et al., 1992; Lobo-da-Cunha e Azevedo, 1993). Contudo, verifica-se que grande parte dos estudos efectuados sobre estes organelos estão confinados às

leveduras e mamíferos, especialmente ao fígado e rim dos roedores, onde são particularmente abundantes.

Actualmente, os mares, rios e estuários são bombardeados por uma panóplia de poluentes das mais diversas origens, entre os quais se destacam os compostos capazes de provocar alterações dos peroxissomas. Como os peixes são um componente importante dos ecossistemas aquáticos, especial atenção deve ser dada às consequências da poluição química nestes animais, incluindo os efeitos nos seus peroxissomas. Por esta razão, as alterações morfológicas e enzimáticas dos peroxissomas hepáticos dos peixes têm merecido especial atenção por parte de alguns investigadores, tendo sido sugerida a sua utilização como biomarcadores de toxicidade (Latruffe, 1993). No entanto, este organelo, tem sido muito menos investigado nos peixes do que nos mamíferos. Nos invertebrados aquáticos, os estudos são ainda mais escassos, existindo apenas alguns trabalhos sobre aspectos ultra-estruturais e enzimáticos dos peroxissomas em moluscos e crustáceos (Owen, 1972; Cajaraville et al., 1992; Stewart et al., 1994; Fahimi e Cajaraville, 1995; Lobo-da-Cunha, 94, 95, 97; Cancio e Cajaraville, 1997).

2. DIVERSIDADE DOS PEROXISSOMAS NAS CÉLULAS ANIMAIS

2.1. Aspectos gerais da morfologia dos peroxissomas

Os peroxissomas são organelos diversificados, os quais, dependendo da espécie, do tecido, do estado de desenvolvimento e das condições fisiológicas, apresentam variações de tamanho, forma, composição e/ou actividade enzimática (Veldhoven e Mannaerts, 1985; Angermüller e Fahimi, 1988; Baumgart, 1997).

Na maioria das células, estes organelos apresentam uma forma aproximadamente esférica ou oval, tal como acontece no fígado dos roedores (Völkl et al., 1988). Contudo, podem também surgir peroxissomas de forma tubular alongada, como por exemplo em alguns gastrópodes (Dannen e Beard, 1977), certos peixes (Kramar et al., 1974) e leveduras (Osumi et al., 1974), ou ainda em forma de concha, nas glândulas prepuciais de ratinho (Gorgas, 1987). Peroxissomas com uma forma singular podem também ser observados no epitélio do duodeno humano, onde um grande número de microperoxissomas vermiformes ocupam 0,45-0,62 % do volume celular (Roels et al., 1991).

O diâmetro médio dos peroxissomas, na maior parte das células, varia entre 0,1 a 1,5 μm . Frize-se que tais medições não têm obedecido a regras estereológicas, referindo-se, normalmente, a meros diâmetros de perfis de peroxissomas cortados, pelo que devem ser encarados apenas

como dando uma ideia geral aproximada da dimensão real. Contudo, nos túbulos proximais do rim de rato, o seu diâmetro pode atingir 3 μm (Barret e Heidger, 1975). Noutros casos, como acontece nas células de Leydig (Nemali et al., 1988), os peroxissomas apresentam um diâmetro muito pequeno, entre 0,1 e 0,5 μm . Estes organelos foram também identificados em neurónios, onde o seu diâmetro varia de 0,1 a 0,2 μm (Lazo et al., 1991). Assim, verifica-se que as dimensões, o número e forma dos peroxissomas varia grandemente com o tipo de órgão estudado, sendo particularmente abundante nos tecidos com metabolismo lipídico mais activo, como acontece no fígado, nas glândulas sebáceas (Grogas, 1987) e nos oligodendrócitos produtores de mielina (Lazo et al., 1991).

Os peroxissomas ocupam uma percentagem significativa do volume celular: cerca de 1,5% em hepatócitos de rato (Beier e Fahimi, 1987) e 1,0 % em hepatócitos humanos (De Craemer et al., 1991). Estes organelos encontram-se, frequentemente, junto das mitocôndrias ou do retículo endoplasmático liso, sendo, por vezes, quase completamente envolvidos por uma cisterna deste organelo (Zaar e Grogas, 1985). É também frequente a associação entre os peroxissomas e as gotículas lipídicas (Fahimi et al., 1993a). Os peroxissomas aparecem muitas vezes interligados entre si, temporária ou permanentemente, originando uma estrutura semelhante a um retículo, designado retículo peroxissomal (Yamamoto e Fahimi, 1987). Estes organelos são limitados por uma só membrana, sendo preenchidos por uma matriz ligeiramente mais densa do que o citoplasma, que pode ser homogénea ou finamente granular. A membrana dos peroxissomas possui uma espessura compreendida entre os 6,5 a 7 nm (Zaar, 1992). Esta é mais fina do que a dos lisossomas e que a membrana citoplasmática, apresentando, no entanto, uma espessura comparável com a do retículo endoplasmático (Yamamoto e Fahimi, 1987). Uma importante característica das membranas dos peroxissomas reside no facto de apresentarem uma grande permeabilidade a pequenas moléculas hidrofílicas. Substratos enzimáticos, pesando menos do que 800 Daltons, facilmente passam através de poros não específicos existentes na membrana dos peroxissomas. Foram identificadas duas proteínas membranares (22 e 24 kDa), as quais parecem estar associadas à formação destes poros não selectivos (Van Veldhoven et al., 1987).

Em diversos casos, encontra-se na matriz do peroxissoma uma formação denominada nucleóide. É frequente encontrar nucleóides de diferentes tipos em tecidos distintos da mesma espécie, como, por exemplo, no fígado e no rim do musaranho. Contudo, dois tipos de nucleóides podem coexistir nos mesmos peroxissomas, tal como acontece nas células de fígado e rim de cavalo (Hruban e Rechcigl, 1969) e nas células digestivas do hepatopâncreas do molusco polioplacóforo *Acanthochiton crinita* (Lobo-da-Cunha, 1997). O nucleóide, no caso de possuir uma estrutura cristalina organizada, pode ser designado por cristalóide, sendo a sua unidade básica o

túbulo primário. No entanto, os cristalóides podem ser constituídos por túbulos primários agrupados em feixes, formando túbulos secundários. Um túbulo secundário pode ser formado por 6, 10 ou 12 túbulos primários dispostos em círculo. Esta disposição politubular serviu de base para a classificação dos cristalóides: os túbulos secundários com padrão 1:10 são largos e dão origem a cristalóides grosseiramente politubulares, como acontece, por exemplo, nos peroxissomas hepáticos do rato; os túbulos secundários com os padrões 1:6 e 1:12 têm diâmetro menor, originando cristalóides finamente politubulares, como por exemplo, nos hepatócitos do porquinho-da-índia (Hruban e Rechcigl, 1969). O cristalóide ocupa uma posição central ou excêntrica e apresenta, entre outros, contornos hexagonais ou em forma de diamante, os quais existem em alguns gastrópodes e poliplacóforos (Lobo-da-Cunha et al., 1994; Lobo-da-Cunha, 1997). Foram também observados cristalóides com arranjos tetragonais e romboidais no cavalo e no fígado de frango jovem, respectivamente (Hruban e Rechcigl, 1969; Essner, 1970).

Através de estudos de subfraccionamento de peroxissomas isolados (Hruban e Swift, 1964) e, posteriormente, por imunocitoquímica (Usuda et al., 1988), verificou-se que os nucleóides, em algumas espécies, continham urato oxidase, nomeadamente nos peroxissomas hepáticos dos roedores. Em concordância com estes resultados, verificou-se que em algumas espécies, os peroxissomas não apresentam nucleóide nem contêm urato oxidase, como acontece no fígado do homem (Goldfischer e Reddy, 1984). No entanto, existem excepções relevantes no que respeita ao surgimento simultâneo desta estrutura e da enzima referida. Assim, nos peroxissomas do rim de rato e de homem, por exemplo, apesar de haver nucleóide, a urato oxidase está ausente (Masters e Holmes, 1977). Outras enzimas, tais como a xantina oxidase, podem também estar presentes no nucleóide, nomeadamente nos peroxissomas do fígado dos roedores (Angermüller et al., 1987). A urato oxidase para além de se encontrar no nucleóide, pode também ocorrer na matriz dos peroxissomas (Noguchi et al., 1979).

A matriz dos peroxissomas pode ainda apresentar uma outra inclusão cristalina designada por placa marginal. Estas estruturas são electrodensas e possuem uma forma rectilínea ou ligeiramente curvada. Localizam-se junto à membrana do peroxissoma, encontrando-se afastada dela por um estreito espaço, que exhibe uma densidade menor do que a matriz envolvente. As placas marginais são características dos peroxissomas das células renais dos mamíferos, nomeadamente do cão e do coelho (van Breemen e Montgomery, 1960), assim como de macacos e do homem (Tisher et al., 1966, 1968), e de várias outras espécies (Hruban e Rechcigl, 1969), tendo-se verificado a ocorrência da isoenzima oxidase B dos ácidos L- α -hidroxi nestas estruturas (Zaar et al., 1991). Apesar das placas marginais não serem habitualmente encontradas nos hepatócitos, tal estrutura foi já observada, entre outros, em hepatócitos de bovinos (Shnitka,

1966b) e de gatos (Hruban e Rechcigl, 1969). Neste último caso, a placa marginal possui 8,5 nm de espessura, sendo plana ou ligeiramente curva e fortemente electronodensa. Para além disso, os peroxissomas dos gatos podem apresentar uma ou duas placas marginais.

2.2. Morfologia dos peroxissomas nos peixes

Nos peixes, os peroxissomas hepáticos têm sido estudados em espécies de água doce e salgada onde, geralmente, apresentam reacção positiva à técnica do DAB (diaminobenzidina) para visualização histo/citoquímica da catalase, uma técnica que também tem sido utilizada para a marcação dos peroxissomas em diversos estudos de isolamento e purificação destes organelos. (Kramar et al., 1974; Braunbeck et al., 1987).

Os peroxissomas hepáticos dos peixes, na sua grande maioria, não possuem nucleóide. Este, foi apenas observado em menos de 1% dos peroxissomas do fígado de carpa (*Cyprinus carpio*) (Kramar et al., 1974), nunca tendo sido observado nos hepatócitos de truta fário (Rocha et al., 1999). Nos peixes, a forma e as dimensões dos peroxissomas são bastante variáveis. Por exemplo, na enguia (*Anguilla anguilla*), o diâmetro dos peroxissomas varia entre 0,2 a 0,8 μm (Braunbeck e Volkl, 1991), em *Leuciscus idus melanotus* entre 0,4 a 1,2 (Braunbeck et al., 1987) e na tainha (*Mugil cephalus*) podem atingir 3 μm (Orbea et al., 1999). Contudo, mediante a influência de certas condições, como por exemplo a temperatura da água, salinidade, sexo, estação do ano e hábitos alimentares, podem ocorrer alterações morfológicas e enzimáticas nos peroxissomas contribuindo, assim, para uma maior diversidade (Braunbeck et al., 1987; Fahimi e Cajaraville, 1995). Durante a aclimação ao frio em *Leuciscus idus melanotus*, verifica-se o aparecimento de uma nova subpopulação de pequenos peroxissomas com diâmetro variando entre 0,1 e 0,2 μm , acompanhado de um aumento da actividade da catalase (Braunbeck et al., 1987). Através de um estudo estereológico efectuado ao longo de um ano em truta fário, foi demonstrada a influência do sexo e estação do ano na morfologia dos peroxissomas (Rocha et al., 1999). Estudos posteriores permitiram a detecção de alterações nas actividades enzimáticas peroxissomais, associadas às alterações morfológicas atrás mencionadas (Rocha et al., 2000).

Contudo, o estudo morfológico e funcional dos peroxissomas não se confina ao fígado. Este organelo tem sido analisado noutros órgãos, nomeadamente, nos rins, no intestino, nos testículos e no cérebro procurando-se, deste modo, compreender cada vez melhor o papel dos peroxissomas no organismo (Connock, 1973; Veenhuis e Bonga, 1977; Pakdel et al., 1990; Smith e Thomas, 1990; Campbell et al., 1994).

3. FUNÇÕES METABÓLICAS DOS PEROXISSOMAS

Os peroxissomas possuem um conteúdo enzimático que apresenta algumas variações consoante o tipo de célula, o que lhes permite desempenhar funções próprias em cada tecido e espécie (fig. 1) (Fahimi et al., 1993a; Masters e Crane, 1995). Nos peroxissomas das células de mamíferos, foram já identificadas mais de 60 enzimas, muitas delas envolvidas no metabolismo lipídico (Masters e Crane, 1995; Sinhg, 1997). Entre as diversas funções metabólicas deste organelo, são mencionadas algumas entre as mais importantes e que envolvem as enzimas estudadas no fígado de truta fário.

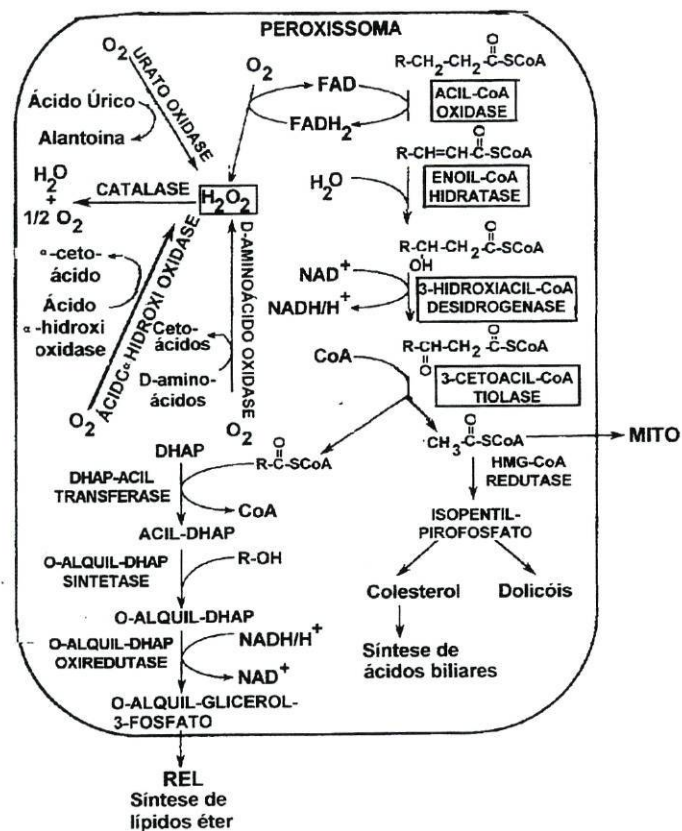


Fig. 1) Resumo das principais vias metabólicas compartimentadas no interior dos peroxissomas dos hepatócitos de mamíferos. As enzimas colocadas dentro dos rectângulos pertencem à via da β-oxidação peroxissomal, sendo induzidas pelos proliferadores peroxissomais. Os produtos resultantes da β-oxidação peroxissomal podem ser utilizados como substratos na biossíntese de glicolípidos éter, colesterol e dolicois. Os ácidos gordos, parcialmente oxidados no peroxissoma, podem sair deste, completando a sua degradação na mitocôndria. Mito - Mitocôndria; REL - Retículo Endoplasmático Liso. (Adaptado de Fahimi et al., 1993a).

3.1. β-oxidação dos ácidos gordos

A ocorrência de β-oxidação nos microcorpos foi inicialmente observada em glioxissomas por Cooper e Beevers (1969), e só alguns anos depois foi demonstrada em peroxissomas de fígado de rato (Lazarow e De Duve, 1976). Contrariamente ao sistema de β-oxidação mitocondrial, que ocorre apenas no reino animal, o sistema de β-oxidação presente nos peroxissomas encontra-se largamente distribuído na natureza, não só em animais como também em plantas e em microorganismos eucariotas (Schulz, 1991).

Um aspecto importante reside no facto dos peroxissomas realizarem, preferencialmente, a β -oxidação dos ácidos gordos de cadeia muito longa ($>C_{20}$), enquanto que nas mitocôndrias ocorre principalmente a β -oxidação dos ácidos gordos com cadeia inferior a 18 átomos de carbono (Mannaerts e Van Veldhoven, 1993; Reddy e Mannaerst, 1994). Assim, verificou-se que os peroxissomas contribuem para cerca de 5 a 20% da oxidação dos ácidos gordos de cadeia longa (Singh, 1997). No entanto, no fígado, cérebro e em culturas celulares de fibroblastos da pele, os passos iniciais da oxidação dos ácidos gordos de cadeia muito longa são, possivelmente, da inteira responsabilidade dos peroxissomas (Mannaerts e Van Veldhoven, 1993; Singh, 1997).

Apesar dos mecanismos de β -oxidação apresentarem semelhanças entre peroxissomas e mitocôndrias, existem diferenças significativas entre os dois sistemas, particularmente no que diz respeito às enzimas intervenientes (Mannaerts e Van Veldhoven, 1993). A primeira reacção da β -oxidação peroxissomal é catalisada pela acil-CoA oxidase, contendo FAD como grupo prostético, tal como as desidrogenases mitocondriais. No entanto, nas mitocôndrias, o $FADH_2$ transfere os electrões indirectamente para a ubiquinona através de proteínas transportadoras de electrões, dando origem à produção de ATP. No entanto, nos peroxissomas, a reoxidação do $FADH_2$ ocorre através da redução directa de O_2 a H_2O_2 (Osumi et al., 1980). Acresce que no referente ao transporte dos derivados gordos de acil-CoA, ao contrário do que acontece nas mitocôndrias, nos peroxissomas aquele é independente da presença da carnitina aciltransferase. Contudo, este mecanismo de importação peroxissomal não está ainda totalmente esclarecido (Master e Crane, 1995).

A β -oxidação pode ser dirigida a ácidos gordos saturados ou insaturados (Lazarow e De Duve, 1976). Contudo, antes de poderem ser submetidos ao processo da β -oxidação, quer seja peroxissomal, quer seja mitocondrial, os ácidos gordos têm que ser activados, através da transformação nos seus respectivos ésteres de CoA. Esta reacção de activação é realizada por diferentes acil-CoA sintetases ou ligases, requerendo ATP. Várias ligases com diferentes especificidades para o comprimento da cadeia de carbono foram identificadas nos peroxissomas, mitocôndrias e microssomas (Singh, 1997).

Cada ciclo da β -oxidação peroxissomal dos ésteres saturados de CoA compreende quatro reacções, as quais são catalisadas por três enzimas diferentes (Hashimoto, 1987). A primeira reacção é catalisada pela acil-CoA oxidase, sendo esta a enzima limitante desta via metabólica (Mannaerts e Van Veldhoven, 1993). As duas reacções seguintes são da responsabilidade de uma outra enzima, a enzima multifuncional que, para além de se comportar como uma hidratase e desidrogenase, pode também funcionar como uma Δ^3 -*cis*- Δ^2 -*trans*-enoíl-CoA isomerase,

permitindo, assim, o catabolismo dos ácidos gordos insaturados (Palosaari e Hiltunen 1990; Mannaerts e Van Veldhoven, 1993). Finalmente, a última reacção, é da responsabilidade da enzima 3-cetoacil-CoA tiolase, dando origem a uma molécula de acetil-CoA e de acil-CoA, esta última mais curta que a inicial em dois átomos de carbono, pronta para reentrar na espiral da β -oxidação. Apesar destes ciclos se repetirem várias vezes, a β -oxidação peroxissomal nos mamíferos, ao contrário da mitocondrial, não é completa, actuando apenas como um sistema de encurtamento das cadeias, sendo reduzidas a um tamanho de 6 a 12 átomos de carbono (Singh, 1997). Estes produtos finais da β -oxidação peroxissomal podem sofrer completa oxidação nas mitocôndrias ou então seguir por outras vias metabólicas (Masters e Crane, 1995).

Aos peroxissomas atribui-se a exclusiva responsabilidade pela β -oxidação dos intermediários dos ácidos biliares com cadeias laterais acil (Kase et al., 1986; Pedersen, 1993), nomeadamente dos ácidos di- e trihidroxiprostânico (resultantes da clivagem da cadeia lateral do colesterol). Contudo, os peroxissomas estão também envolvidos em processos de β -oxidação de muitos outros compostos: ácidos mono e dicarboxílicos de cadeia média e longa, ácidos gordos ramificados metilados, xenobióticos que possuem cadeias alifáticas com diversos substituintes na posição ω , ácidos pristânico, piperólico e glutárico, prostaglandinas e outros eicosanóides (Mannaert e Van Veldhoven, 1993; Singh, 1997).

3.2. Catabolismo das purinas

Da degradação completa das bases púricas (adenina e guanina) origina-se CO_2 e NH_3 , devido à intervenção das enzimas indicadas na Fig. 2. A primeira etapa da degradação das purinas ocorre no citosol e conduz à formação de hipoxantina ou xantina, sendo estes os produtos finais desta via apenas em sanguessugas, mexilhões de água doce e aranhas (Usuda et al., 1994).

Embora a formação de ácido úrico possa ocorrer essencialmente no citosol, foi referida a localização de xantina oxidase, uma das enzimas envolvidas neste processo, nos nucleóides dos peroxissomas de fígado de rato (Angermüller et al., 1987), assim como nos peroxissomas do fígado e rim de aves e anfíbios (Scott et al., 1969). Por sua vez, a oxidação do ácido úrico ocorre sempre nos peroxissomas, tendo a urato oxidase sido inúmeras vezes descrita como constituinte dos nucleóides peroxissomais (Völkl et al., 1988).

Contudo, durante o processo evolutivo, muitas espécies perderam parte das enzimas desta via metabólica pelo que, os produtos finais do catabolismo das purinas variam consoante os grupos de animais (Fig. 2). Assim, e a título de exemplo, sabe-se ter ocorrido a perda da totalidade das enzimas responsáveis pela degradação do ácido úrico (urato oxidase, allantoinase,

alantoicase, ureidoglicolatolase e urease) em certas espécies de insectos, alguns gastrópodes, numa grande variedade de répteis, nas aves e em alguns primatas, incluindo homem, o que leva à excreção do ácido úrico como produto final do catabolismo das purinas (Yeldandi et al., 1990; Fujiwama e Noguchi, 1995). No homem e certos primatas, a perda da actividade da urato oxidase ficou-se a dever à ocorrência de duas mutações no respectivo gene (Yeldandi et al., 1990).

No ratinho, e em muitos outros mamíferos, devido à ausência das enzimas alantoinase e alantoicase, a última etapa desta via metabólica consiste na oxidação do ácido úrico em alantoína, numa reacção catalisada pela urato oxidase (Usuda et al., 1988). Os anfíbios possuem ainda no citosol dos seus hepátócitos a alantoinase, que transforma a alantoína em ácido alantóico, a alantoicase, que degrada o ácido alantóico em ureia e ureidoglicolato e finalmente, a ureidoglicolatolase, enzima que transforma aquele último metabolito em ureia e glioxilato. Assim, enquanto que nestes organismos a ureia é o metabolito de excreção final, em diversos invertebrados, a enzima urease converte aquele último composto em dióxido de carbono e amónia (Scott et al., 1969).

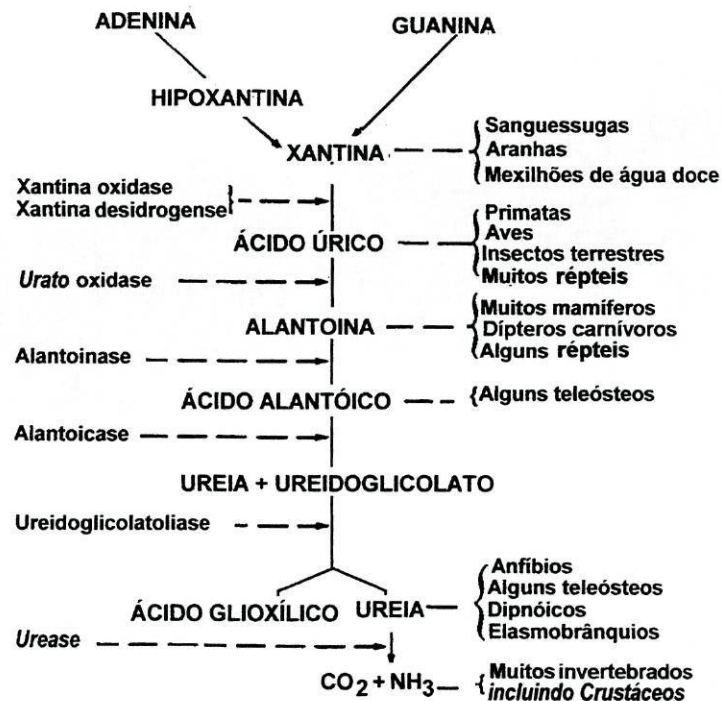


Fig. 2) Via de degradação das purinas nos animais, indicando-se as enzimas intervenientes (coluna da esquerda) e os respectivos metabolitos finais em diferentes grupos de animais (coluna da direita). (Adaptado de Lazarow, 1994.)

3.3. Catabolismo dos aminoácidos e ácidos L- α -hidroxi

Várias enzimas relacionadas com o catabolismo dos aminoácidos, pertencentes à classe das oxirredutases flavínicas, foram encontradas nos peroxissomas, nomeadamente a D-aminoácidos

oxidase, a D-aspartato oxidase e a ácido L- α -hidroxi oxidase (tipo A e B) (Mannaerts e Van Veldhoven, 1993).

Nos mamíferos, a oxidase A dos ácidos L- α -hidroxi, também conhecida por glicolato oxidase encontra-se localizada no fígado e, em certas espécies pode, simultaneamente, ser detectada nos peroxissomas do rim. A isoenzima tipo B, cuja função metabólica permanece ainda pouco clara, localiza-se nos peroxissomas renais onde forma as placas marginais (Zaar et al., 1991). A isoenzima tipo A oxida, preferencialmente, os ácidos L- α -hidroxi alifáticos de cadeia curta, como o glicolato, nos seus correspondentes α -cetoácidos e H₂O₂. O mesmo acontece com os substratos degradados pela isoenzima tipo B, nomeadamente os ácidos L- α -hidroxi alifáticos de cadeia longa, ácidos L- α -hidroxi aromáticos e os L-aminoácidos (Zaar et al., 1991; Mannaerts e Van Veldhoven, 1993). Contudo, quando os aminoácidos são os substratos a oxidar, para além dos produtos já mencionados, origina-se também NH₃ (Master e Crane, 1995). Os esqueletos carbónicos resultantes das reacções acima mencionadas podem ser utilizados na síntese de glucose (gluconeogénese), um processo que ocorre no fígado e no córtex renal. No entanto, é ainda controverso o significado real destas enzimas peroxissomais na gluconeogénese (Mannaerts e Van Veldhoven, 1993).

A D-aminoácidos oxidase, que oxida os D-isómeros de aminoácidos neutros e básicos, foi uma das primeiras enzimas a ser detectada nos peroxissomas (De Duve e Baudhuin, 1966), enquanto que a D-asparto oxidase, presente também neste organelo, é a responsável pela oxidação dos D-isómeros de aminoácidos acídicos (Zaar et al., 1989). Destas reacções resultam, como produtos finais, os respectivos α -cetoácidos, amoníaco e peróxido de hidrogénio.

Pouco se sabe sobre a função fisiológica das enzimas D-aminoácidos oxidase e D-asparto oxidase. Os D-aminoácidos estão presentes nos peptidoglicanos das paredes celulares bacterianas e não têm significado metabólico nos mamíferos, embora alguns resultados apontem para a possibilidade destas enzimas interferirem no catabolismo dos D-aminoácidos provenientes da flora microbiana intestinal (Mannaerts e Van Veldhoven, 1993). Recentemente, alguns D-aminoácidos foram encontrados no tecido nervoso de certos roedores, anfíbios e, principalmente, moluscos, onde parecem desempenhar importantes funções neuromodificadoras, tanto na sua forma livre como fazendo parte de neuropeptídeos (Fujisawa et al., 1992; D'Aniello et al., 1993; Mannaerts e Van Veldhoven, 1993; Yasuda-Kamatani et al., 1995), pelo que poderão constituir substratos naturais para estas enzimas.

As dúvidas existentes sobre o significado fisiológico destas enzimas, levaram Hamilton e seus colaboradores (1987) a sugerir que as D-aminoácidos oxidase, D-aspartato oxidase e oxidase dos ácidos L- α -hidroxi catalisam reacções envolvendo substratos diferentes dos anteriormente

mencionados. Assim, os substratos fisiológicos poderiam ser os oxalil-tiolesteres, substâncias resultantes de reacções não enzimáticas entre o glioxilato e tióis ou aminotióis (tais como a L-cisteína, L-cisteinilglicina ou a cisteamina). Sabe-se hoje, que estes compostos são muito importantes para o controlo metabólico, tendo-se verificado que alguns deles estão possivelmente integrados em sistemas mensageiros intracelulares de várias hormonas, entre as quais a insulina (Hamilton, 1987).

3.4. Metabolismo de formas reactivas de oxigénio

O oxigénio é consumido através de várias reacções metabólicas que ocorrem nos diferentes componentes celulares, nomeadamente no citosol, nas mitocôndrias, no retículo endoplasmático e nos peroxissomas (Sinhg, 1997). No fígado, os peroxissomas consomem entre 10-30% do oxigénio gasto pela célula (Sinhg, 1997). Eles possuem diversas oxirredutases (Van Den Bosch et al., 1992) as quais, usando o oxigénio como aceitador de electrões, levam à formação de um substrato oxidado, conjuntamente com uma forma reactiva de oxigénio (FRO), o peróxido de hidrogénio (H_2O_2) (Livingstone et al., 1990). Para além do H_2O_2 , outras FRO são originadas nos peroxissomas, nomeadamente os aniões superóxido (O_2^-), por exemplo através da xantina oxidase e citocromos P-450 (Sinhg, 1997). Uma deficiente eliminação do H_2O_2 e dos aniões superóxido na presença de metais de transição leva à formação de radicais hidróxilo (OH^\cdot) os quais, sendo extremamente tóxicos, são capazes de atacar proteínas, ácidos nucleicos e lípidos, provocando importantes danos na estrutura e funcionamento celular, da qual devem ser rapidamente eliminados (Sinhg, 1997).

A catalase tem sido considerada como umas das enzimas mais abundantes na matriz dos peroxissomas (Van den Bosch et al., 1992; Mannaerts e Van Veldhoven, 1993). Esta enzima decompõe o H_2O_2 por duas vias diferentes (De Duve e Baudhuin, 1966):

- reacção entre duas moléculas de H_2O_2 ($2 H_2O_2 \rightarrow 2 H_2O + O_2$) - via catalítica;
- reacção entre uma molécula de H_2O_2 e outro substrato, que poderá ser o etanol, o metanol, o formaldeído, iões nitrito, entre outros ($RH_2 + H_2O_2 \rightarrow R + 2H_2O$) - via peroxidática.

In vivo, a actividade peroxidática da catalase é, provavelmente, a predominante. Além disso, uma outra enzima localizada na membrana e matriz peroxissomal, a glutathione peroxidase, é também responsável pela eliminação do H_2O_2 (Singh, 1997). Por outro lado, as enzimas Cu,Zn-superóxido dismutase e a Mn-superóxido dismutase, presentes respectivamente, na matriz e na

membrana dos peroxissomas, permitem uma desintoxicação muito eficiente dos aniões superóxido (Livingstone et al., 1990; Masters e Crane, 1995; Singh, 1997). Os epóxidos, outro tipo de FRO que resultam, quer da biotransformação de xenobióticos, quer do metabolismo de compostos endógenos, são desactivados pela epóxido hidrolase, enzima também presente nos peroxissomas (Singh, 1997). Assim, é de vital importância que as enzimas antioxidantes se situem próximo dos locais de origem das FROs, de modo a eliminá-las da célula, o mais rapidamente possível, antes de poderem induzir qualquer dano significativo.

3.5. Outras funções dos peroxissomas

Outras actividades em que as enzimas peroxissomais estão envolvidas incluem a biossíntese do colesterol, ácidos biliares, dolícolis e plasmalogenos (fosfolípidos com função éter presentes na membrana citoplasmática), a produção de hexose monofosfato, catabolismo do glioxilato, das poliaminas, e a α -oxidação do ácido fitânico (Osmundsen et al., 1991; Van den Bosch et al., 1992; Mannaerts e Van Veldhoven, 1993; Singh, 1997).

3.6. Enzimas presentes nos peroxissomas dos peixes

Nos peixes, tem sido dada especial atenção às enzimas relacionadas com a β -oxidação de ácidos gordos e ao catabolismo das purinas. A acil-CoA oxidase, a enzima multifuncional e a carnitina acetiltransferase têm sido identificadas em diferentes espécies de peixes. As enzimas responsáveis pelas três primeiras reacções da β -oxidação peroxissomal, a acil-CoA oxidase e a enzima multifuncional, foram localizadas na truta arco-íris (*Onchorynchus mykiss*) (Yang et al., 1990), em medaca japonesa (*Oryzias latipes*), no peixe gato (*Ictalurus punctatus*) e na dourada (*Sparus aurata*) (Gallagher e Di Giulio, 1991; Scarano et al., 1994; Pedrajas et al., 1996). A carnitina acetiltransferase, enzima essencial no transporte dos ácidos gordos encurtados provenientes da β -oxidação peroxissomal para o interior da mitocôndria, está presente no peixe dourado (*Carassius auratus*) e numa raia (*Raja erinacea*) (Connock, 1973; Stewart et al., 1994).

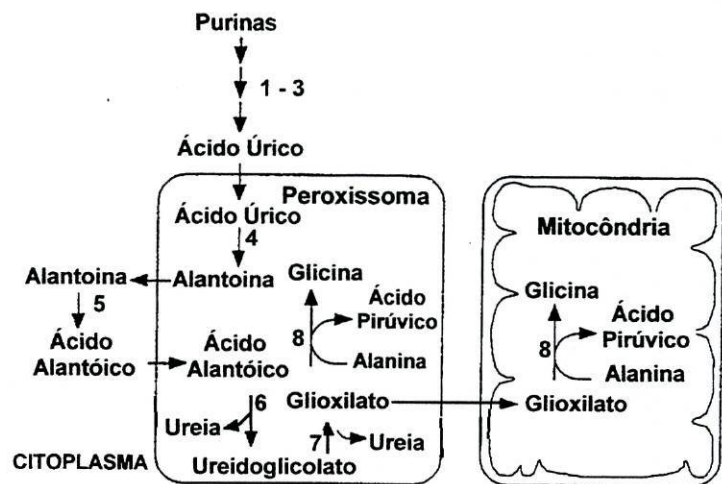
Nas células animais, os peroxissomas são capazes de oxidar uma grande variedade de ácidos gordos, nomeadamente certos ácidos gordos mono e polinsaturados de cadeia longa e muito longa, os quais são mais dificilmente oxidados nas mitocôndrias (Singh, 1997). Contudo, surgiram resultados contraditórios quando Henderson e Sargent (1985) verificaram que as mitocôndrias hepáticas da truta arco-íris são as principais responsáveis pelo oxidação dos ácidos gordos mencionados anteriormente. Refira-se que os peixes utilizam os lípidos como a sua

principal fonte de energia, contrariamente ao que acontece nos mamíferos que mobilizam mais os hidratos de carbono.

As enzimas responsáveis pela degradação do ácido úrico encontram-se também nos peroxissomas hepáticos dos peixes. Em muitas espécies, da degradação do ácido úrico resulta ureia e glioxilato. Nos peixes, enquanto que a ureia não é mais metabolizada, o glioxilato é convertido em glicina por acção da enzima alanina:glioxilato aminotransferase, sendo assim possível a reutilização dos átomos de carbono provenientes das purinas (Sakuraba et al., 1996). A urato oxidase, a alantoinase, a alantoicase, a ureidoglicolatolise e a alanina:glioxilato aminotransferase foram já identificadas nos peroxissomas do fígado dos peixes (Fig. 3).

Fig. 3) Esquema representativo da localização das enzimas intervenientes na via de degradação das purinas e de reutilização dos respectivos átomos de carbono, nos peixes de água doce.

Enzimas: 1) Adenase; 2) Guanase; 3) Xantina oxidase; 4) Urato oxidase; 5) Alantoinase; 6) Alantoicase; 7) Ureidoglicolatolise; 8) Alanina:glioxilato aminotransferase. (Adaptado de Sakuraba et al., 1996.)



Verificou-se que, em certos peixes de água doce, a alantoinase se situa apenas no citosol (Fujiwara, 1989), ocorrendo, simultaneamente, na matriz dos peroxissomas e no citosol em alguns peixes marinhos (Hayashi et al., 1989; Sakuraba et al., 1996). Dependendo das espécies, a urato oxidase e a alantoicase podem localizar-se na matriz ou na membrana peroxissomal (Goldenberg et al., 1978; Noguchi et al., 1979; Hayashi et al., 1989). Constatou-se que, ao longo da evolução, a alantoicase e a alantoinase sofreram uma mudança na sua localização (Fig. 4). Assim, na passagem dos peixes para os anfíbios ocorreu a associação daquelas duas enzimas, dando origem a um complexo citosólico existente nos anfíbios, o qual se perdeu em etapas posteriores da evolução (Hayashi et al., 1989). A ureidoglicolatolise foi encontrada nos peroxissomas hepáticos de cavala (*Pneumatophorus japonicus*) e em *Sardinapus melanosticta* (Takada e Noguchi, 1986). A enzima alanina:glioxilato aminotransferase foi também descrita no fígado de algumas espécies de peixes de água doce, tais como a carpa prussiana (*Carassius carassius*) e o

peixe-sol (*Lepomis macrochirus*), como uma enzima simultaneamente peroxissomal e mitocondrial (Sakuraba et al., 1996).

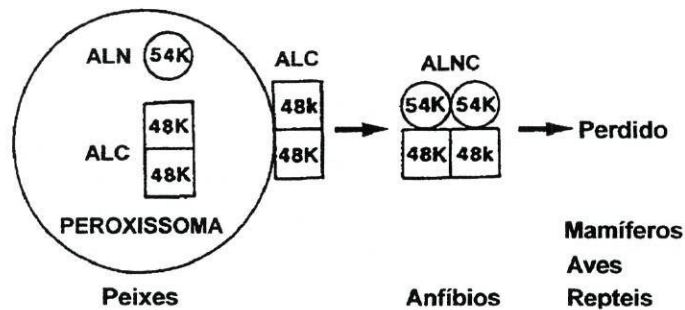


Fig. 4) Esquema representativo das mudanças intracelulares na localização e estrutura molecular das enzimas alantoinase e da alantoicase durante a evolução animal. ALN – Alantoinase; ALC – Alantoicase; ALNC – Complexo Alantoinase-Alantoicase. (Adaptado de Hayashi et al., 1989.)

Outras enzimas encontradas nos peroxissomas do fígado de carpa (*Cyprinus carpio*) são a D-aminoácido oxidase e a ácido L- α -hidroxi oxidase (Kramar et al., 1974; Goldenberg et al., 1978). A D-aminoácido oxidase foi também descrita nos rins de esgana-gata (*Gasterosteus aculeatus trachurus*) (Veenhuis e Bonga, 1977). A glicolato oxidase foi identificada nos peroxissomas hepáticos de carpa (*Cyprinus carpio*), cavala (*Pneumatophorus japonicus*) e carapau (*Trachurus trachurus*) (Goldenberg et al., 1978; Noguchi et al., 1979).

Finalmente, os peroxissomas hepáticos dos peixes parecem ter também um papel fundamental no metabolismo das formas reativas de oxigênio pois, para além da presença da catalase, uma outra enzima antioxidante, a Cu,Zn-superóxido dismutase foi localizada em peroxissomas isolados a partir do fígado de dourada (*Sparus aurata*) (Pedrajas et al., 1996). Mais recentemente, esta mesma enzima, conjuntamente com a glutathiona peroxidase, foram encontradas na matriz dos peroxissomas hepáticos de tainha (*Mugil cephalus*) (Orbea et al., 1999).

Em suma, todos estes dados confirmam o envolvimento dos peroxissomas do fígado dos peixes numa variedade de funções metabólicas importantes, apesar de os estudos serem ainda limitados a um número relativamente reduzido de espécies.

4. BIOGÉNESE DOS PEROXISSOMAS

O peroxissoma é um organelo de duração limitada, sendo o seu tempo médio de vida estimado em um ou dois dias. Existe assim, na célula, um processo constante de formação de novos peroxissomas. Nos anos 60 e 70, estudos morfológicos dos hepatócitos de rato levaram os investigadores a admitir que o retículo endoplasmático era responsável pela biogénese dos

peroxissomas devido à suposta existência de continuidades entre estes dois organelos (Novikoff e Shin, 1964). Contudo, estudos posteriores negaram tal hipótese ao demonstrarem, através da análise de cortes ultrafinos seriados, a não existência de tais continuidades entre os organelos referidos (Gorgas, 1984, 1985). Além do mais, foi também verificado que as membranas dos peroxissomas e do retículo endoplasmático diferiam no que respeita à sua composição proteica e lipídica (Lazaro e Fujiki, 1985). Todos estes e outros resultados vieram provar que os peroxissomas se formam por fissão de peroxissomas pré-existentes, tal como acontece com as mitocôndrias e os cloroplastos (Lazaro e Fujiki, 1985; Fahimi et al., 1993b).

Segundo Fahimi e seus colaboradores (1993b), a incorporação das proteínas membranares precede a das proteínas da matriz, sugerindo que a biogénese peroxissomal se inicia pelo crescimento da membrana, dando origem a formações semelhantes a uma bainha de mielina. Estas estruturas incorporam, progressivamente, lípidos e proteínas membranares sintetizadas em ribossomas livres. Nesse momento, a membrana começa a adquirir a capacidade de importar proteínas da matriz recém sintetizadas no citosol e expande-se gradualmente, formando saliências que se podem destacar, dando origem a pequenos peroxissomas. Estes podem permanecer temporariamente ligados aos peroxissomas iniciais, altura em que se observa o retículo peroxissomal já mencionado. Isto implica que todas as células têm de receber pelo menos um peroxissoma da célula-mãe quando ocorre uma divisão celular. Mais recentemente, esta hipótese foi posta em causa devido a estudos efectuados com mutantes de leveduras, os quais sugerem que os peroxissomas nem sempre derivam de outros pré-existentes. Estes resultados levaram os investigadores a considerar a existência de um processo alternativo de biogénese peroxissomal envolvendo vesículas do retículo endoplasmático, como adiante será referido (Waterham, 1993).

Uma vez que os peroxissomas não contêm DNA, todas as suas proteínas (membrana, nucleóide e matriz) são codificadas por genes nucleares e sintetizadas no citosol em polissomas livres (Lazaro e Fujiki, 1985). Com excepção de casos pontuais, a grande maioria das proteínas são sintetizadas no seu tamanho definitivo e forma final, não sofrendo modificações proteolíticas, glicosilação, fosforilação ou ligação covalente com lípidos durante ou após o seu transporte para o interior dos peroxissomas (Subramani, 1993).

O estudo das proteínas peroxissomais revelou a existência de sequências de aminoácidos responsáveis pelo seu reconhecimento e direccionamento para o interior dos peroxissomas, tendo sido denominadas de PTS (“peroxisomal targeting signals” = sequência-sinal peroxissomal). Actualmente, conhecem-se dois tipos principais de PTS, designados de PTS1 e PTS2. Neste organelo, a maioria das proteínas da matriz apresenta a sequência PTS1 como sinal para a importação peroxissomal (Waterham e Cregg, 1997). Esta, consiste numa sequência

conservativa tripeptídica na extremidade carboxílica formada pelos aminoácidos Serina-Lisina-Leucina (SKL) podendo, no entanto, apresentar certas variantes sem afectar a sua função (S/A/C)(K/R/H)(L). Tal sequência-sinal significa que: na primeira posição pode ocorrer um aminoácido pequeno como a Alanina (A) ou a Cisteína (C); na segunda posição, o aminoácido Lisina (K) pode, eventualmente, ser substituído por aminoácidos básicos, como seja a Arginina (R) ou Histidina (H); finalmente, admite-se não poder ocorrer qualquer substituição no último aminoácido (Miura et al., 1992; Subramani, 1993, 1996a, 1996b). Nos peroxissomas, a sequência PTS1 não é clivada após importação, ao contrário do que acontece com as sequências-sinal presentes nas proteínas destinadas à maioria de outros organelos (Waterham e Cregg, 1997).

Apenas uma restrita variedade das proteínas da matriz dos peroxissomas apresenta a sequência sinal PTS2 (Gietl, 1996), a qual se localiza próximo da extremidade amino, mas não na sua porção terminal, sendo constituída por um nonapeptídeo conservativo (R/K)(L/V/I)(X_s)(H/Q)(L/A) (Subramani, 1996a, 1996b). A tiolase dos mamíferos possui a sequência PTS2 que é clivada durante a incorporação no organelo (Swinkles et al., 1991). Contudo, a clivagem desta sequência nem sempre é obrigatória (por exemplo na tiolase das leveduras) (Waterham e Cregg, 1997). A ausência das sequências PTS1 e PTS2, em várias proteínas peroxissomais, sugere a existência de outros sinais topogénicos desconhecidos, responsáveis pela sua importação. A acil-CoA oxidase e a catalase de *Candida tropicalis* e *Saccharomyces cerevisiae*, respectivamente, demonstraram possuir uma sequência PTS na região interna responsável pela sua importação peroxissomal, a qual, apesar de ainda não completamente definida não parece apresentar similaridades com as sequências PTS1 e PTS2 (Small et al., 1988; Waterham e Cregg, 1997).

Relativamente às proteínas da membrana dos peroxissomas (PMPs), admite-se serem também sintetizadas nos ribossomas livres, tal como foi demonstrado para as PMP-22, PMP-26, PMP-69/70. Estas, são importadas e inseridas na membrana dos peroxissomas, sem sofrerem qualquer tipo de processamento (Fujiki et al., 1984; Suzuki et al., 1987; Diestelkötter e Just, 1993; Imanaka et al., 1996). Subramani (1996b) admite a possibilidade da existência de um subgrupo de PMPs (como é o caso da PMP-50 nos mamíferos) provenientes do retículo endoplasmático. Algumas das PMPs seriam inseridas à medida que vão sendo sintetizadas ou apenas após a sua síntese em locais especializados do retículo endoplasmático, do qual se destacariam pequenas vesículas que se fundiriam com os peroxissomas pré-existentes (Erdmann et al., 1997). Pouco se conhece também sobre os mecanismos responsáveis pelo direccionamento destas proteínas para a membrana peroxissomal. Contudo, estudos efectuados propõem a existência de um mecanismo

independente das sequências PTS1 e PTS2 como sendo o determinante pela inserção das PMPs na membrana dos peroxissomas (Albertini et al., 1997).

Através de estudos efectuados em linhas celulares mutantes de leveduras, as quais foram recentemente designadas de mutantes Pex, foi possível identificar uma série de genes PEX, cujos produtos, proteínas Pex ou peroxinas, são essenciais para a biogénese dos peroxissomas. Mais de 30 genes PEX foram já clonados em diferentes espécies de leveduras e várias das proteínas codificadas são proteínas das membranas dos peroxissomas (Waterham e Cregg, 1997). Algumas destas peroxinas parecem funcionar como receptores (PTS receptor) que reconhecem e se ligam às proteínas possuidoras das sequências sinal PTS1 e PTS2, permitindo a sua correcta importação nos peroxissomas. As peroxinas são proteínas móveis que, dependendo da espécie, podem localizar-se no citosol, associadas à membrana ou na matriz peroxissomal (Erdmann et al., 1997). Estudos recentes, têm contribuído para um conhecimento cada vez maior dos componentes e mecanismos envolvidos na maquinaria de importação das proteínas da matriz dos peroxissomas. Assim, tem sido proposta uma multiplicidade de tais mecanismos, sendo, no entanto, completamente diferentes daqueles descritos para outros organelos (Waterham e Cregg, 1997).

Os principais componentes lipídicos da membrana peroxissomal são a fosfatidil colina e a fosfatidil etanolamina (Subramani, 1993). Estes são, na sua maioria, sintetizados no retículo endoplasmático, de onde devem ser recrutados. Foram sugeridos diferentes mecanismos na tentativa de explicar este transporte de lípidos para o peroxissoma. Admite-se que o transporte possa ser feito através de proteínas transportadoras de lípidos. Por exemplo, a proteína transportadora de esteróides (Sterol carrier protein-2) está envolvida no transporte de fosfatidil colina (Wouters et al., 1995). Por outro lado, devido ao facto de ao longo de vários anos se ter vindo a observar uma estreita relação espacial entre os peroxissomas e o retículo endoplasmático, Fahimi e seus colaboradores (1993b) propuseram um modelo, segundo o qual, numa fase inicial do processo, os peroxissomas estabelecem contactos membranares com as cisternas do retículo endoplasmático, de modo a assimilar os fosfolípidos sintetizados na face citoplasmática da membrana deste organelo. Alternativamente, e como já foi referido, poderão formar-se vesículas de transporte pré-peroxissomais (contendo lípidos e um subconjunto de proteínas da membrana do peroxissoma como sejam algumas peroxinas) oriundas do retículo endoplasmático, as quais se podem fundir homotipicamente, de modo a originar novos peroxissomas, ou heterotipicamente, com aqueles já existentes (Erdmann et al., 1997). Se tal acontecer, não será obrigatória a presença de qualquer peroxissoma em cada célula filha após a divisão celular, indo ao encontro dos resultados obtidos por Waterham e seus colaboradores (1993) em mutantes de leveduras.

Assim, de acordo com tudo aquilo que foi dito, torna-se necessário reavaliar a intervenção do retículo endoplasmático na biogénese dos peroxissomas, assunto ainda muito controverso (Erdmann et al., 1997).

5. ALTERAÇÕES PEROXISSOMAS INDUZIDAS POR XENOBIÓTICOS

5.1. Proliferação peroxissomal nos mamíferos

Um dos aspectos mais interessantes dos peroxissomas consiste na sua capacidade de proliferação, acompanhada pela indução de algumas das suas actividades enzimáticas, quando certas espécies são sujeitas a substâncias denominadas de proliferadores peroxissomais. Simultaneamente, ocorre o aumento de tamanho das mitocôndrias e a proliferação do retículo endoplasmático liso com concomitante hepatomegalia e hipertrofia celular (Grasso, 1993). A proliferação peroxissomal foi pela primeira vez observada em 1965, por Hess e seus colaboradores, no fígado de ratos expostos ao clofibrato, uma droga hipolipidémica. Análises subsequentes demonstraram que o volume peroxissomal, que em condições normais é inferior a 2% do volume celular, pode atingir, ao fim de alguns dias, cerca de 10% ou mais nos animais tratados com a droga referida (Master e Crane, 1995).

As drogas hipolipidémicas têm uso terapêutico, sendo administradas em caso de arteriosclerose e hipercolesterolemia. Estes compostos podem, basicamente, ser divididos em dois grupos: o primeiro constituído pelo clofibrato e substâncias com estrutura análoga, como sejam, por exemplo, o fenofibrato, o bezafibrato e o ciprofibrato; o segundo formado por compostos estruturalmente não relacionáveis como o clofibrato, entre os quais se incluem o Wy-14,643 e o BM 15766 (Reddy e Mannaerts, 1994). O estabelecimento de uma correlação entre a proliferação peroxissomal e o desenvolvimento de carcinomas hepáticos em roedores, devido à utilização das drogas hipolipidémicas, tornou este tema objecto de numerosas pesquisas (Master e Crane, 1995).

Nas últimas décadas, as actividades industriais desenvolvidas têm vindo a impregnar o meio ambiente com grande quantidade de compostos potencialmente tóxicos, alguns deles capazes de induzir a proliferação peroxissomal. Entre estes químicos contam-se os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, herbicidas, insecticidas, lubrificantes, os plastificantes, particularmente os ésteres de ftalato e outros xenobióticos (Beier e Fahimi, 1991; Bentley et al., 1993; Fahimi e Cajaraville, 1995). Assim, a variedade de compostos capazes de induzir a proliferação peroxissomal é enorme. Contudo, não são observadas similaridades estruturais entre eles, excepto

na existência de uma função acídica que, em muitos casos, é representada por um grupo carboxílico, o qual pode estar presente, quer no composto parental, quer em qualquer dos compostos resultantes do seu metabolismo (Bentley et al., 1993; Lake, 1995). Estímulos naturais e patologias, tais como o tipo de alimentação, variações climáticas, deficiência em vitamina E, diabetes, assim como a acção da deidroepiandrosterona, um precursor das hormonas sexuais, entre outras causas, podem também conduzir à proliferação dos peroxissomas nos roedores (Bentley et al., 1993).

As alterações morfológicas observadas nos hepatócitos dos mamíferos, principalmente em roedores expostos a drogas hipolipidémicas e outros proliferadores peroxissomais, estão associadas a modificações no metabolismo lipídico resultantes, principalmente, do aumento da actividade da β -oxidação peroxissomal e do sistema de ω -oxidação microsomal (Reddy e Mannaerts, 1994). Verifica-se, assim, que as três enzimas da β -oxidação peroxissomal são induzidas de igual modo, quer ao nível proteico, quer ao nível dos respectivos mRNA, ocorrendo um aumento coordenado da sua actividade, as quais, dependendo, por exemplo, da potência da droga hipolipidémica e da espécie, podem atingir valores 20 a 30 vezes superiores aos normais (Nemali et al., 1989; Osumi et al., 1993). Outras enzimas peroxissomais que sofrem um aumento acentuado da sua actividade são a carnitina acetiltransferase e a carnitina octanoiltransferase. Contudo, tomando todo este processo ainda mais complexo, nem todas as enzimas peroxissomais são afectadas de igual modo, quando expostas a estes indutores de proliferação. Deste modo, a catalase, a urato oxidase e a D-aminoácido oxidase são pouco ou nada afectadas (Osumi et al., 1993).

O fenómeno da proliferação peroxissomal é também acompanhado pela indução de várias enzimas das mitocôndrias, do retículo endoplasmático e do citosol. Entre estas, destaca-se o citocromos P450 IVA (IVA1, IVA2 e IVA3) pertencente ao retículo endoplasmático, envolvido na ω -oxidação dos ácidos gordos, a epóxido hidrolase, uma enzima citosólica e a carnitina acetiltransferase, uma enzima também mitocondrial (Beier e Fahimi, 1991; Bell et al., 1992; Reddy e Mannaerts, 1993).

Quando o composto indutor da proliferação peroxissómica é retirado do meio ou suspensa a sua administração, o número de peroxissomas e as respectivas actividades enzimáticas retomam rapidamente os valores normais. Isto é conseguido, principalmente, através de um mecanismo autofágico que elimina os peroxissomas excedentários (Yokota, 1993)

Sabe-se que a administração crónica aos roedores de muitos dos proliferadores peroxissomais induz o aparecimento de tumores malignos no fígado, cujo grau de incidência depende, por exemplo, da dose e da potência do agente utilizado (Rao e Reddy, 1989; Lake,

1995). Como os proliferadores até hoje conhecidos não se ligam directamente ao DNA são classificados como agentes carcinogénicos não-mutagénicos e não-genotóxicos (Rao e Reddy, 1989; Lake, 1995). Uma vez que o efeito carcinogénico destes agentes indutores da proliferação peroxissomal nos roedores não foi ainda completamente esclarecido, vários têm sido os mecanismos propostos na tentativa de o explicar, nomeadamente: indução do stress oxidativo (James e Roberts, 1995); aumento da multiplicação celular ou mitogénese (Bentley et al., 1987); promoção de lesões hepáticas (Kraupp-Grasl et al., 1991); e supressão da apoptose (James e Roberts, 1995; Roberts et al., 1995).

5.2. Factores que influenciam as respostas aos proliferadores peroxissomais nos mamíferos

O elevado número de estudos dedicados a este fenómeno permite concluir que o efeito dos proliferadores peroxissomais varia consoante a espécie e composto usado. Os diferentes níveis de respostas aos proliferadores peroxissomais exibidos pelas diversas espécies podem ser devidos a factores tais como: taxas de absorção, de metabolismo e de excreção do proliferador; dose, potência e via de administração; disponibilidade do composto em estudo; sexo, idade e níveis hormonais do organismo. No entanto, estudos recentes mostram que as diferenças genéticas são a principal causa da maior ou menor sensibilidade das espécies aos proliferadores de peroxissomas (Fahimi e Cajaraville, 1995; Lake, 1995; Holden e Tugwood, 1999; Roberts, 1999; Hasmall et al., 2000).

Nos mamíferos, é nos peroxissomas hepáticos que os efeitos dos proliferadores são mais evidentes. A acção destes químicos nos tecidos extra-hepáticos resultam, quer dos seus próprios efeitos nesses tecidos, quer das consequências da acção exercida no fígado (Hinton e Price, 1993). Para além do fígado, o rim é o órgão que apresenta a população de peroxissomas mais abundante, principalmente no córtex, onde os peroxissomas são grandes e possuem um sistema de β -oxidação muito activo (Zaar, 1992). Os proliferadores peroxissomais, ao actuarem nos túbulos proximais, também provocam a proliferação dos peroxissomas (Hinton e Price, 1993). Contudo, o grau de estimulação das actividades enzimáticas e da síntese de mRNA não é tão elevado como no fígado, não sendo também tão vasto o espectro das enzimas induzidas (Bell et al., 1992; Hinton e Price, 1993). Assim, por exemplo, enquanto que nos peroxissomas hepáticos dos ratinhos tratados com clofibrato a palmitoil-CoA oxidase sofre um aumento na sua actividade de cerca de 28 vezes, no rim do mesmo animal esse aumento é de apenas 9 vezes (Bell et al., 1992).

Uma resposta peroxissomal mais restrita pode ser observada noutros tecidos e órgãos dos roedores, tais como o intestino, testículos, tecido adiposo, pulmões, músculo cardíaco e esquelético. Aumento no número de peroxissomas e das enzimas da β -oxidação peroxissomal

pode ser observado nas células epiteliais intestinais nos roedores expostos ao clofibrato, no miocárdio dos animais expostos ao ciprofibrato e no tecido adiposo durante a aclimação ao frio (Nemali et al., 1988; Yokota e Asayama, 1990; Hinton e Price, 1993). Contudo, existem outros tecidos e órgãos onde a proliferação peroxissomal não é significativa, podendo mesmo não serem observadas alterações funcionais. Estas estruturas incluem a tiróide, o pâncreas e as células neuroendócrinas gástricas. Mas, apesar de nestes casos os proliferadores peroxissomais não exercerem os seus efeitos sobre os peroxissomas, induzem a proliferação celular e neoplasias (Hinton e Price, 1993).

Quando na presença de compostos indutores da proliferação peroxissomal, diferentes espécies de mamíferos reagiram de modo distinto. Assim, enquanto que o rato e o ratinho são muito sensíveis a estes compostos, o porquinho-da-índia, o coelho e o cão, praticamente não manifestam qualquer tipo de resposta (Fahimi et al., 1993a; Bently et al., 1993). Deste modo, sob a influência do bezafibrato, um potente proliferador peroxissomal, observou-se que no fígado do rato, a percentagem do volume celular ocupado pelos peroxissomas pode aumentar cerca de 3,5 vezes, não se tendo verificado qualquer alteração nos peroxissomas do porquinho-da-índia (Fahimi et al., 1993a). Constatou-se também não ter ocorrido qualquer alteração na actividade da catalase nos peroxissomas hepáticos dos ratos, enquanto que uma diminuição da actividade da referida enzima foi observada nos peroxissomas do porquinho-da-índia quando expostos ao bezafibrato (Fahimi et al., 1993a). Além do mais, os proliferadores apresentaram comportamento distinto, sendo tal facto posto em evidência pela droga BM 15766, a qual induziu significativa proliferação peroxissomal, não ocorrendo qualquer alteração nas enzimas da β -oxidação peroxissomal (Baumgart et al., 1990). Tais observações exigem a aplicação simultânea de metodologias bioquímicas e morfológicas para o estudo dos efeitos resultantes dos proliferadores peroxissomais.

No que diz respeito aos primatas, os macacos do novo e do velho mundo comportaram-se numa forma muito moderada e apenas quando sujeitos a doses muito elevadas de proliferadores. Relativamente ao homem, não foi observada proliferação peroxissomal em consequência de tratamentos com drogas hipolipidémicas ou outro tipo de proliferadores (Bentley et al., 1993). Assim, por exemplo, enquanto se constatou um aumento significativo da β -oxidação peroxissomal, síntese de DNA e supressão da apoptose nos hepatócitos de rato, quando sujeitos ao DEHP (Dietilexilftalato), nenhum destes efeitos foram observados nos hepatócitos humanos (Hasmall et al., 2000). Deste modo, podemos afirmar ser impossível generalizar os resultados obtidos acerca da proliferação peroxissomal a partir de uma dada espécie.

Observou-se que os ratos mais idosos possuíam uma capacidade de resposta proliferadora menor do que os ratos mais jovens, da mesma espécie, quando sujeitos ao clofibrato (Yamoto et al., 1995). Fêmeas de ratinho expostas aos fracos proliferadores peroxissomais clofibrato e di-(2-etilexil) ftalato revelaram uma sensibilidade reduzida, comparativamente com os machos da mesma espécie. Contudo, quando proliferadores mais potentes que os anteriormente referidos são empregues, estas diferenças entre sexos deixaram de existir (Rao et al., 1994).

5.3. Alterações peroxissomais nos peixes

Alguns investigadores estudaram as modificações morfológicas e bioquímicas dos peroxissomas dos peixes resultantes da acção dos proliferados peroxissomais típicos dos mamíferos. Verificou-se que a droga hipolipidémica genfibrozil, provoca um ligeiro aumento na actividade das enzimas acil-CoA oxidase e multifuncional na truta arco-íris e em medaca japonesa (*Oryzias latipes*), sendo tal acréscimo apenas significativo no caso da enzima multifuncional para o último dos peixes referidos (1,4x) (Scarano et al., 1994). Por outro lado, o ciprofibrato injectado intraperitonealmente na truta arco-íris provocou um aumento da actividade das enzimas peroxissomais acil-CoA oxidase (1,8x), enzima multifuncional (1,5x) e catalase (3,5x), ocorrendo também um aumento de 2,3 vezes na densidade volumétrica peroxissomal dos seus hepatócitos, não tendo sido observada qualquer alteração na densidade numérica (Yang et al., 1990). Não foi detectada a indução das enzimas pertencentes ao sistema de β -oxidação peroxissomal nos hepatócitos isolados de truta arco-íris expostos ao genfibrozil. No entanto, nas células referidas, o clofibrato e o ciprofibrato provocaram um forte aumento da actividade das enzimas acil-CoA e multifuncional (Donohue et al., 1993).

Para além das drogas hipolipidémicas, o estudo dos efeitos de outros xenobióticos orgânicos sobre as enzimas da β -oxidação peroxissomal tem sido escasso. Assim, enquanto que os herbicidas picloram e o ácido 2,4 – diclorofenoxiacético não alteraram a actividade da enzima acil-CoA oxidase num peixe gato (*Ictalurus punctatus*) (Gallagher e Di Giulio, 1991), o efluente proveniente de uma fábrica de branqueamento de papel induziu um aumento na oxidação do lauroil-CoA oxidase e da palmitoil-CoA de 3 e 7 vezes, respectivamente (Mather-Mihaich e Di Giulio, 1991). Por sua vez, a injeção de dieldrina em dourada (*Sparus aurata*) aumentou a actividade da enzima acil-CoA oxidase 9,3 vezes (Pedrajas et al., 1996).

Um grande interesse tem merecido o comportamento da catalase e de outras enzimas antioxidantes nos peixes expostos a uma grande variedade de xenobióticos. A indução da actividade da catalase foi observada nos hepatócitos de enguia (*Anguilla anguilla*) (1,4x) após exposição ao pesticida dinitro-o-cresol (Braunbeck e Völkl, 1991), no fígado de um peixe gato

(*Ictalurus punctatus*) (2 a 3x) sujeito ao efluente oriundo da indústria de branqueamento de papel (Mather-Mihaich e Di Giulio, 1991) e em dourada (*Sparus aurata*) (2,7x) injectada com dieldrina (Pedrajas et al., 1996). Contudo, verificou-se uma redução da actividade da catalase nos juvenis da truta arco-íris exposta a 4-cloroanilina (Braunbeck, 1993). Por outro lado, neste mesmo peixe e num góbio (*Cottus gobio*), ambos sujeitos a contaminantes dos ecossistemas aquáticos, tais como os insecticidas “endosulfan” e “disulfoton” e os herbicidas picloram e o ácido 2,4 – diclorofenoxiacético, não provocaram qualquer indução na actividade da catalase (Gallagher e Di Giulio, 1991; Bucher et al., 1993; Arnold et al., 1995). No que se refere à enzima peroxissomal Cu,Zn-superóxido dismutase, observou-se um aumento de 2,8 vezes na sua actividade no fígado de dourada (*Sparus aurata*) após injeção com dieldrina (Pedrajas et al., 1996).

A indução das enzimas relacionadas com o catabolismo das purinas foi observada, quer para a urato oxidase (2x), quer para a alantoicase (1,8x) em enguia (*Anguilla anguilla*) sujeita ao pesticida dinitro-o-cresol (Braunbeck e Völkl, 1991). O mesmo aconteceu na truta arco-íris exposta aos insecticidas “endosulfan” e “disulfoton” no caso da urato oxidase (1,6x) (Arnold et al., 1995). Nestes dois últimos casos, a par da indução enzimática referida, ocorreu também a proliferação dos peroxissomas. Relativamente ao exemplo da truta arco-íris, registou-se no fígado um aumento do volume peroxissomal absoluto (μm^3 /por célula), atingindo um valor cerca de 2,7 vezes superior ao normal (Arnold et al., 1995). Pelo contrário, observou-se uma redução no número de peroxissomas, bem como na actividade da catalase nos juvenis da truta arco-íris exposta à 4-cloroanilina (Braunbeck, 1993). No entanto, quando os hepatócitos isolados da espécie atrás referida foram sujeitos à 4-cloroanilina, verificou-se uma persistente proliferação peroxissomal dependente da dose administrada, a formação de agrupamentos de peroxissomas e uma maior heterogeneidade morfológica dos mesmos (Braunbeck, 1993). Deste modo, nos peixes, a resposta peroxissomal é provavelmente mais moderada quando comparada àquela observada nos roedores, assemelhando-se mais com a resposta dos primatas superiores.

A comparação da actividade da catalase e outras enzimas antioxidantes analisadas em peixes provenientes de locais com diferentes concentrações de poluentes (estudos *in situ*), têm conduzido a resultados contraditórios. Assim, em *Zosterisessor ophiocephalus* e em tainha (*Mugil cephalus*) capturados em diferentes zonas contaminadas simultaneamente com metais, PCBs, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos e pesticidas, verificou-se uma forte indução da actividade da catalase no fígado destes peixes (Rodriguez-Ariza et al., 1993a, 1993b; Livingstone et al., 1995). Opostamente, no que se refere à enzima atrás mencionada, ela pode permanecer inalterada ou mesmo ocorrer uma redução na sua actividade em sardinhas (*Sardina pilchardus*) originárias do porto de Bilbao, fortemente contaminado com PCBs (Peters et al., 1994).

5.4. Mecanismos da proliferação peroxissomal

Nos mamíferos, a indução da proliferação peroxissomal é mediada por receptores denominados receptores activados pelos proliferadores peroxissomais (“peroxisome proliferator activated receptor” – PPAR) que actuam como factor de transcrição (Issemann e Green, 1990). Os PPARs constituem uma subfamília identificada como membro da superfamília dos receptores hormonais nucleares, que também inclui os receptores de hormonas esteróides, da hormona tiroideia, da vitamina D3 e do ácido retinóico (Master e Crane, 1995). Três subtipos diferentes de PPARs denominados de α , β (também chamado de δ , NUC-I ou FAAR) e γ , foram já descritos em diferentes espécies de vertebrados. Assim, os subtipos de PPARs, α e γ foram encontrados no *Xenopus laevis*, no rato, no ratinho e no homem, tendo aquele último PPAR sido já também descrito no hamster. Do mesmo modo, o PPAR β foi não só identificado no sapo *Xenopus laevis*, mas também nas restantes espécies anteriormente mencionadas, sendo denominado por PPAR δ , FAAR e NUC-I, no rato, no ratinho e no homem, respectivamente (Keller e Wahli, 1993; Schoonjans et al., 1996; Sørensen et al., 1998). Mais recentemente, verificou-se que no ratinho e no homem, o PPAR γ ocorre sob as isoformas PPAR γ 1 e PPAR γ 2 (Zhu et al., 1995). Cada subtipo de PPAR, de natureza fosfoproteica, é codificado por um gene diferente, parecendo, no entanto, ter derivado de um gene ancestral comum (Motojima, 1993).

O estudo sobre a distribuição e abundância dos diferentes tipos de PPARs nos vários tecidos, leva-nos a uma melhor compreensão das suas funções fisiológicas. Assim, verificamos que nos mamíferos, o PPAR α é predominantemente expresso nos tecidos com elevadas taxas de oxidação lipídica peroxissomal, tal como acontece no fígado e nos rins. Nos roedores, como estes órgãos são tidos como alvos preferenciais para a actuação dos proliferadores peroxissomais, o PPAR α está directamente envolvido no fenómeno da proliferação. Além do mais, este PPAR localiza-se também nos músculos esqueléticos, no coração, no estômago, no duodeno, no tecido adiposo castanho e na glândula supra-renal (Mukherjee et al., 1994; Braissant et al., 1996; Holden e Tugwood, 1999).

Relativamente ao PPAR δ , uma vez que é expresso na maioria dos tecidos do rato adulto, permanece ainda por esclarecer a sua função específica no organismo. Este PPAR, conjuntamente com o subtipo α , foram detectados em níveis muito elevados nos embriões dos ratos e dos ratinhos. Esta situação sugere-nos que ambos os PPARs δ e α desempenham um papel preponderante no desenvolvimento e diferenciação celular do organismo (Braissant et al., 1996; Sørensen et al., 1998).

No que respeita ao PPAR γ , sabe-se que a sua expressão é altamente dependente do tecido, sendo predominantemente expresso no tecido adiposo, na glândula supra-renal e nos tecidos hematopoiéticos (Keller e Wahli, 1993; Braissant et al., 1996). Embora não tendo ainda sido completamente caracterizada a distribuição tecidual das isoformas PPAR γ 1 e PPAR γ 2, os dados actuais sugerem que esta última é predominantemente expressa nos tecidos adiposos, enquanto que a primeira parece ser a única forma presente nas células hematopoiéticas humanas (Tontonoz et al., 1994; Greene et al., 1995).

Em suma, os vários subtipos de PPARs são simultaneamente expressos nos diferentes tecidos em quantidades que variam com o tipo de célula. Depois de activados, os PPARs ligam-se a uma sequência específica de DNA, denominada elemento de resposta do proliferador peroxissomal (“peroxisome proliferator response element” – PPRE), a qual consiste numa sequência directamente repetida de dois hexanucleotídeos separados por um nucleotídeo (elemento DR-1) que se localiza, geralmente, a montante dos genes alvo (Tugwood et al., 1992; Keller e Wahli, 1993; Jude-Aubry et al., 1997). Para se poderem ligar aos PPREs, os PPARs têm de formar heterodímeros com o receptor do ácido 9-cis retinóico, uma vez que não se ligam, quer sob a forma de monómeros, quer mesmo na forma de homodímeros (Master e Crane, 1995). Verificou-se que estes heterodímeros, (e em certos casos conjuntamente com co-activadores), após ligação aos PPREs, alteravam a transcrição dos genes alvo, estimulando ou inibindo a sua expressão (Fig. 5) (Holden e Tugwood, 1999). Assim, e a título de exemplo, o heterodímero PPAR α /RXR activa o gene LPL, possuidor da sequência PPER (Schoonjans et al., 1996a). Já o contrário acontece com o gene responsável pela apolipoproteína C-III (Hertz et al., 1995).

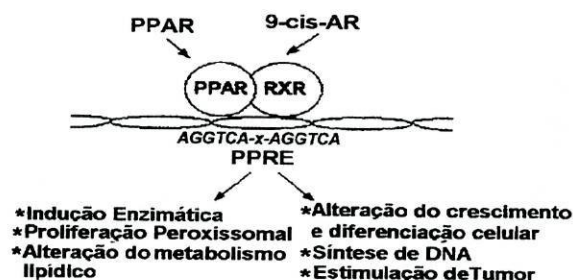


Fig. 5) Mecanismo básico de acção dos PPARs. PPAR: Receptor activado pelos proliferadores peroxissomais; RXR: Receptor do Ácido Retinóico; 9-cis-AR: Ácido Retinóico; PPRE: sequência directa repetida de duas cópias de bases, tal como AGGTCA, separadas por um único nucleotídeo. (Adaptado de Tugwood et al., 1992.)

São já conhecidos vários ligandos capazes de induzir a actividade dos PPARs. Em estudos realizados com o PPAR α do sapo *Xenopus leavis*, no que se refere, quer ao eicosanóide natural, o

leucotrieno B₄ (LTB₄), quer aos ácidos gordos, e ainda mais particularmente aos ácidos gordos polinsaturados, verificou-se que ambos os compostos referidos eram mais eficazes na indução de tal PPAR do que o mais potente activador sintético de PPARs, a droga hipolipidémica Wy 14643 (Keller et al., 1993; Devchand et al., 1996). Relativamente às hormonas, e a título de exemplo, refiram-se a insulina e os glucocorticóides, as quais regulam a expressão hepática do PPAR α . Sabe-se que a insulina reduz o nível do RNAm do PPAR α , enquanto que os glucocorticóides têm um efeito oposto (Shalev et al., 1996; Schoonjans et al., 1997). É também do nosso conhecimento o papel preponderante da insulina na lipogénese, favorecendo, assim, a acumulação de gordura no tecido adiposo (Shalev et al., 1996). No que respeita aos glucocorticóides, estes são libertados na corrente sanguínea, quando o organismo se encontra sob stress. Por sua vez, este tipo de hormona estimula a síntese do PPAR α , o que resulta na mobilização de energia durante tais situações, uma vez que o PPAR em causa regula a transcrição de vários genes envolvidos na β -oxidação dos ácidos gordos (Holden e Tugwood, 1999).

Por outro lado, o PPAR γ apresenta também como ligandos compostos que não têm qualquer efeito no PPAR α e β do homem. Estes activadores denominados tiazolidinedionas, como por exemplo a pioglitazona e o BRL49653, pertencem à classe das drogas antidiabéticas adipogénicas. Tal grupo de químicos é estruturalmente semelhante à insulina (Lehman et al., 1995) e análogo das prostaglandinas, tendo sido os primeiros compostos descritos como ligandos para os PPARs (Forman et al., 1995).

Estudos mais recentes revelaram que os três subtipos de PPARs são activados por diferentes ácidos gordos, diversos eicosanóides e algumas drogas hipolipidémicas revelando, contudo, afinidades diferentes para os diversos ligandos (Krey et al., 1997).

Sabe-se hoje que apesar do elemento DR-1 ser fundamental para a ligação ao PPAR, outras regiões que ladeiam o PPER podem desempenhar um papel relevante ao conferirem afinidades diferentes para os diversos activadores (Juge-Aubry et al., 1977). Por outro lado, os três subtipos de PPARs analisados em várias espécies apresentam um maior número de diferenças no domínio de ligação ao ligando do que aquelas existentes entre o receptor da hormona tiróide e o receptor do ácido retinóico (Motojima, 1993). Portanto, os PPARs ao revelarem especificidades divergentes com os vários ligandos fisiológicos, conjuntamente com a sua expressão tecidual diferencial, faz com que estes possam desempenhar funções distintas durante o desenvolvimento do organismo, bem como no estado adulto (Desvergne et al., 1998). Para além disso, devido ao facto de certos proliferadores peroxissomais serem estruturalmente semelhantes a várias substâncias endógenas, a resposta desencadeada no receptor será o resultado da soma dos efeitos devidos aos compostos exógenos e dos níveis dos metabolitos endógenos (Master e Crane, 1995).

É já conhecida a presença da sequência PPER em certos genes, entre os quais se incluem as enzimas peroxissomais acil-CoA oxidase e enzima bifuncional, assim como a da CYP4A6 e citocromos P450 ω -hidrolase microsossomais (Schoonjans et al., 1996). Portanto, como o produto daqueles genes estão envolvidos em certos aspectos do metabolismo dos lípidos, parece que os PPARs desempenham um papel importante na regulação do metabolismo lipídico, principalmente os subtipos α e β . Para além disso, é suposto o PPAR α e γ estarem envolvidos no metabolismo da glucose, na resposta inflamatória, na diferenciação dos adipócitos e no mecanismo de homeostasia energética (Schoonjans et al., 1997). Assim, enquanto o PPAR α parece exercer os seus diversos efeitos especialmente através da estimulação da oxidação dos lípidos, o PPAR γ é o elemento chave para o armazenamento de gorduras (Schoonjans et al., 1997). Ainda mais, os resultados obtidos através de experiências realizadas em ratinhos transgênicos, aos quais foi abolida a expressão do PPAR α , levou os investigadores a admitir o envolvimento daquele PPAR na formação de tumores hepáticos (Lee et al., 1995).

No que se refere aos peixes, verificou-se no salmão do Atlântico (*Salmo salar*) que as drogas hipolipidémicas estimulam a transcrição do mRNA do PPAR γ (Ruyter et al., 1997). Recentemente, Leaver e seus colaboradores (1997), constatarem que numa solha (*Pleuronectes platessa*), os genes promotores da enzima glutatona S-transferase, a qual está envolvida nos mecanismos de desintoxicação, contém uma sequência idêntica ao PPER dos mamíferos. Estes mesmos investigadores (1998), ao procederem ao isolamento do gene responsável pela codificação de um PPAR na solha, admitem que a proliferação peroxissomal nos peixes possa ocorrer através de um mecanismo semelhante ao descrito para os mamíferos.

6. OS ALQUILFENÓIS

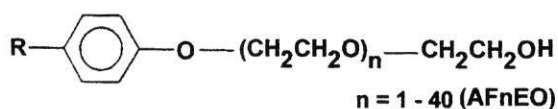
Os alquilfenóis-etoxilados (AFnEO) são químicos industriais resultantes da condensação de unidades de óxido de etileno ($n=1-40$) com um alquilfenol (AF). Estes produtos, introduzidos no mercado nos anos 40 (White et al., 1994), constituem um dos grupos de surfactantes não-iónicos com maior volume de produção comercial (Routledge e Sumpter, 1997), sendo fabricadas mais de 300 mil toneladas, anualmente, a nível mundial. (Chemical Manufactures Association, 1994).

Na industria, os AFnEO são principalmente utilizados no fabrico de plásticos e elastómeros, detergentes (bem como outros produtos de limpeza industriais ou domésticos), químicos agrícolas (pesticidas e herbicidas), têxteis e papel. Adicionalmente, podem fazer parte da

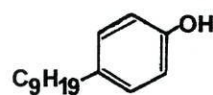
composição de tintas e fixadores para o cabelo, bem como de contraceptivos (Routledge e Sumpter, 1997). Entre os AFnEO, os nonilfenol-etoxilados (NFnEO) são os compostos mais abundantes; estes correspondem a cerca de 80% da produção total de AFnEO (White et al., 1994; Lee e Lee, 1996).

6.1. Os alquilfenóis como poluentes

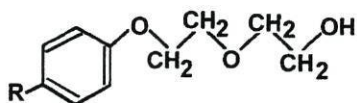
Nas estações de tratamento de águas residuais, quer sob condições aérobicas ou anaeróbicas, os alquilfenóis-etoxilados são degradados por microorganismos (Nimrod e Benson, 1996). Embora os mecanismos deste processo sejam complexos e ainda não estejam totalmente esclarecidos, sabe-se que a degradação inicial dos compostos parentais (AFnEO) consiste na redução da cadeia etoxilada por hidrólise enzimática, passo relativamente rápido, originando, principalmente, três grupos de metabolitos primários: alquilfenóis (isto é AFnEO sem cadeia etoxilada); alquilfenóis-etoxilados de cadeia curta e os correspondentes éteres carboxilados (Ahel et al., 1994a; Potter et al., 1999) (Fig. 6).



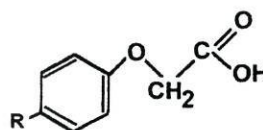
a) Alquilfenol polietoxilado



b) 4-nonilfenol *para* isómero



c) Alquilfenol polietoxilado de cadeia curta ($n = 2$)



d) Alquilfenol etoxilado carboxilado ($n = 1$)

Fig. 6) Estrutura de compostos alquilfenólicos. O número de unidades de óxido de etileno é indicado por n (1–40) O radical R (C_9H_{19} no caso do nonilfenol, por exemplo) consiste numa cadeia alquil ramificada, geralmente, com uma conformação terciária. Fig.a) Adaptada de Ahel et al., 1994a; Fig.b, c e d) Adaptada de White et al., 1994.

À medida que a cadeia etoxilada hidrofílica dos alquilfenóis-etoxilados reduz o seu tamanho, os metabolitos resultantes tornam-se não só cada vez mais lipofílicos e tóxicos, como

também mais resistentes à biodegradação final, donde resulta H₂O e CO₂ (Nimrod e Benson, 1996). Estima-se que 65% dos alquilfenóis-etoxilados produzidos atinge os ecossistemas aquáticos, sob a forma de metabolitos primários, através das descargas provenientes das estações de tratamento de águas residuais domésticas e industriais (Kvestak e Ahel, 1995). Apesar de escassos, os estudos efectuados sobre a biodegradação total dos alquilfenóis-etoxilados e seus metabolitos nos ambientes aquáticos, nomeadamente nos estuários, rios e oceanos, indicam-nos que a eliminação destes compostos está dependente das condições abióticas e bióticas do local (Ekelund et al., 1993; Kvestak e Ahel, 1995).

Em virtude da lenta biodegradação dos metabolitos resultantes dos alquilfenóis-etoxilados, são despejados quantidades consideráveis daqueles compostos nos ecossistemas aquáticos provenientes dos efluentes líquidos e sólidos (lamas) das estações de tratamento de águas domésticas e industriais. As concentrações destes metabolitos (em particular do nonilfenol) estão razoavelmente bem documentadas, principalmente nos efluentes provenientes das estações de tratamento de águas residuais, rios e estuários da Europa e Estados Unidos (Jobling e Sumpter 1993). Assim, as concentrações encontradas são extremamente variáveis, estando compreendidas entre os ng/L e as centenas de mg/L (Naylor et al., 1992). Devido às suas características lipofílicas, os alquilfenóis tendem a acumular-se nas lamas e sedimentos, enquanto que os compostos mais hidrofílicos, tais como os alquilfenóis etoxilados e os alquilfenóis etoxilados carboxilados, predominam na fracção líquida do efluente (Sumdram e Szeto, 1981; Giger et al., 1984; Ahel et al., 1994 a, 1994b).

Assim, preocupados com os possíveis efeitos ambientais resultantes dos alquilfenóis-etoxilados e seus derivados, os governos Suíço e Alemão optaram pela sua eliminação nos produtos de limpeza, entrando o seu uso, também em declínio, noutros países europeus (Naylor, 1992).

6.2. Bioacumulação dos alquilfenóis

Vários estudos demonstraram que a fauna e flora aquática, nomeadamente algas, crustáceos, moluscos e peixes, podem comportar-se como reservatórios dos alquilfenóis devido ao seu elevado grau lipofílico e de toxicidade, bem como à sua grande resistência à biodegradação final (Mcleese et al., 1981; Eklund et al., 1990; Ahel et al., 1993, 1994a; Lewis e Lech, 1996). Vários factores de bioacumulação foram já determinados em certos peixes, os quais variam entre 13 e 1300 (Mcleese et al., 1981; Eklund et al., 1990; Ahel et al., 1993). Aliás, no tecido adiposo de carpas expostas a efluentes provenientes de uma ETAR industrial foram encontrados 40 µg/g de p-tert-pentilfenol (Shiraishi et al., 1989). No mexilhão (*Mytilus edulis*) (Ekelund et al., 1990) e na

alga macrófita *Cladophora glomerata* (Ahel et al., 1993), o factor de bioacumulação atingiu o valor de 3400 e 10000, respectivamente. Estes valores elevados podem ser causados pela dificuldade que algumas espécies aquáticas têm em metabolizar os alquilfenóis, campo onde ainda existe uma grande falta de conhecimentos (Thibaut et al., 1998).

No que concerne aos Salmonídeos, foi detectada em truta arco-íris uma significativa bioacumulação de nonilfenol em diversos tecidos e órgãos, nomeadamente, no tecido adiposo, músculo, fígado e rins, com factores de bioacumulação que variaram entre 24 a 100, nos animais expostos a este alquilfenol a partir da água (Lewis e Lech, 1996). Assim, tem sido sugerido que devido ao facto de os peixes utilizarem os lípidos como principal fonte de energia, é provável que os alquilfenóis armazenados no tecido adiposo possam ser mobilizados e transportados pelo sangue por todo o organismos quando as gorduras são metabolizadas (Jobling e Sumpter, 1993). Por outro lado, a exposição crónica em águas poluídas pode facilitar também a acumulação dos alquilfenóis nos musculos esqueléticos, dando origem a uma substancial reserva destes compostos uma vez que os tecidos em causa representam a maioria da massa corporal (Goldham et al., 1998). Deste modo, torna-se possível a transmissão dos compostos atrás referidos ao longo da cadeia alimentar, no topo da qual vamos encontrar, entre outros, o homem. Por outro lado, foi demonstrado que neste peixe ocorreu uma significativa biotransformação dos alquilfenóis, acumulando-se os metabolitos resultantes principalmente na bília, nos tecidos intestinais e fezes, sendo tal facto indicativo de uma eficiente via de excreção biliar/fecal (Thibaut et al., 1998; Goldham et al., 1998).

Nos estudos efectuados em truta arco-íris e em salmão do Atlântico (*Salmo salar*), a maioria dos metabolitos resultantes da biotransformação dos alquilfenóis presentes na bília foram encontrados sob a forma de conjugados do ácido glucorónico, parecendo ser este um dos mecanismos de desintoxicação geral dos compostos fenólicos nos peixes (Arukwe et al., 2000; Thibaut et al., 1998). Contudo, são ainda muito escassos os estudos realizados sobre a biodisponibilidade, metabolismo, bioacumulação e excreção dos compostos referidos, ficando em aberto as suas possíveis implicações biológicas.

6.3. Mecanismos de acção fisiológica dos disruptores endócrinos - Os alquilfenóis

Nos peixes, como em todos os vertebrados, o funcionamento e desenvolvimento do sistema reprodutor, principalmente durante os períodos de diferenciação e de maturação sexual, bem como a manifestação de características sexuais secundárias, estão dependentes das hormonas esteróides sexuais endógenas (Bohemem e Lambert, 1981; Scott, 1987; Yeoh et al., 1996). Enquanto que nos machos tais funções são principalmente reguladas pelos androgénios, como

por exemplo a 11-cetotestosterona e a testosterona, nas fêmeas essas funções competem, fundamentalmente, ao estrogénio 17 β -estradiol (Scott, 1987).

Os estrogénios, como por exemplo o 17 β -estradiol, exercem os seus múltiplos efeitos na fisiologia celular através da sua ligação a uma proteína citoplasmática, o receptor estrogénico (RE) (Nimrod e Benson, 1996; Zacharewski, 1997). Em seguida, no núcleo, o complexo hormona-receptor liga-se ao elemento de resposta estrogénico (ERE) do DNA, estimulando as actividades da DNA e RNA polimerase, responsáveis, respectivamente, pela indução da proliferação celular e da síntese de RNAm de diversas proteínas, entre elas do próprio RE (Beato, 1991; Pakdel et al., 1991; Nimrod e Benson, 1996). Em certas espécies de teleósteos, nomeadamente em Salmonídeos, o receptor estrogénico foi já identificado e caracterizado nos testículos, cérebro e no fígado, encontrando-se em maior concentração neste último órgão (Pakdel et al., 1990; Smith e Thomas, 1990; Campbell et al., 1994).

Nos peixes teleósteos ovíparos, o 17 β -estradiol actua sobre o fígado estimulando a síntese e secreção, entre outras, da vitelogenina, uma glicolipofosfoproteína, e das proteínas da zona radiata dos ovócitos, através do processo mediado pelo RE, já anteriormente referido (Mommsen e Walsh, 1988; Hyllner et al., 1991; Arukwe et al., 1997a). Verificou-se também na truta arco-íris que a indução da síntese de vitelogenina é quantitativamente dependente dos níveis do receptor estrogénico nos hepatócitos (Flouiriout et al., 1997). Consequentemente, a sua expressão é essencial para a resposta estrogénica celular (Yadete et al., 1999). Aliás, e contrariamente ao que acontece nos mamíferos (Borrás et al., 1994), nos hepatócitos dos teleósteos, quando expostos a estrogénios, ocorre a síntese adicional do receptor estrogénico (Lazier e MacKay, 1993; Nimrod e Benson, 1997).

Um dos temas ecológicos mais controversos e que nos últimos anos tem recebido especial atenção por parte da comunidade científica, comunicação social e dos governos diz respeito aos potenciais efeitos adversos infligidos aos seres vivos devido à exposição ambiental aos disruptores endócrinos, mais particularmente aos pseudo-estrogénios, os quais englobam certos compostos resultantes da degradação dos alquilfenóis etoxilados, nomeadamente os alquilfenóis. Entre estes riscos potenciais incluem-se o declínio na produção de espermatozóides humanos ao longo dos últimos 50 anos, o aumento de casos de cancro da mama e o maior índice de hermafroditismo nos peixes (Sharpe e Skakkebaek, 1993; Wolff et al., 1993).

O termo disruptor endócrino (ou hormonal) refere-se, geralmente, a qualquer substância que interfere com o normal funcionamento do sistema endócrino, incluindo compostos com propriedades estrogénicas e anti-estrogénicas (imitando ou bloqueando a acção do 17 β -estradiol),

bem como androgénicas e anti-androgénicas (imitando ou bloqueando a acção das hormonas sexuais masculinas, os androgénios) (Gimeno, 1997).

Apesar de se conhecerem diversos mecanismos de acção, a maioria dos disruptores endócrinos identificados são conhecidos por interferirem com a hormona sexual mais abundante nas fêmeas da generalidade dos vertebrados, o 17β -estradiol. São frequentemente denominados por xeno-estrogénios, pseudo-estrogénios ou ainda estrogénios ambientais aqueles químicos que competem ou simulam a acção do 17β -estradiol (Nimrod e Benson, 1996).

Os ambientes aquáticos, principalmente os rios e os estuários, comportam-se como reservatórios de enormes quantidades de efluentes provenientes directamente da rede de esgotos, bem como daqueles oriundos das ETARs (Estações de Tratamento de Águas Residuais) domésticas e industriais contendo, em enormes quantidades, uma complexa mistura de substâncias estrogénicas naturais e sintéticas. Assim, estes ecossistemas representam um meio ideal para o estudo dos efeitos causados pelos pseudo-estrogénios na fauna e flora aí existentes. Aliás, os peixes, constituem um dos grupos mais intensamente estudados, nomeadamente no que se refere às consequências daqueles químicos no desenvolvimento e funcionamento do sistema reprodutor.

Os disruptores endócrinos não danificam o material genético mas, particularmente os pseudo-estrogénios, afectam a expressão de genes específicos através da interacção com o respectivo receptor hormonal (Mueller e Kim, 1978). Tal situação pode ocorrer através de dois mecanismos: ligação ao receptor, o que leva à sua activação (efeito agonista); ocupação do local de ligação à hormona, bloqueando, deste modo, as suas acções (efeito antagonista) (Nimrod e Benson, 1996). Experiências realizadas em culturas de hepatócitos de truta arco-íris, permitiram concluir que os principais produtos resultantes da degradação dos alquilfenóis-etoxilados, nomeadamente o octilfenol, nonilfenol e o nonilfenol carboxilado possuindo apenas uma unidade de óxido de etileno, comportam-se como agonistas uma vez que competem com o 17β -estradiol (ligando natural) pela ligação e activação do receptor estrogénico, sendo assim capazes de imitar os efeitos desta hormona, como seja a indução da produção de vitelogenina (White et al., 1994).

Contudo, não são ainda conhecidos todos os mecanismos de acção dos pseudo-estrogénios ao nível do genoma (Yadete et al., 1999). Assim, admite-se que aqueles possam também exercer os seus efeitos por meio de uma complexa via de sinalização e modos de acção, os quais são independentes da ligação ao receptor da hormona esteróide (Steinmetz et al., 1996; Shen e Novak, 1997; Gillesby et al., 1998). A título de exemplo, certos pseudo-estrogénios exercem a sua acção através da ligação a outros receptores nucleares que, posteriormente, interagem com o elemento sensível ao estrogénio alterando, quer a sua síntese, quer a sua eliminação e,

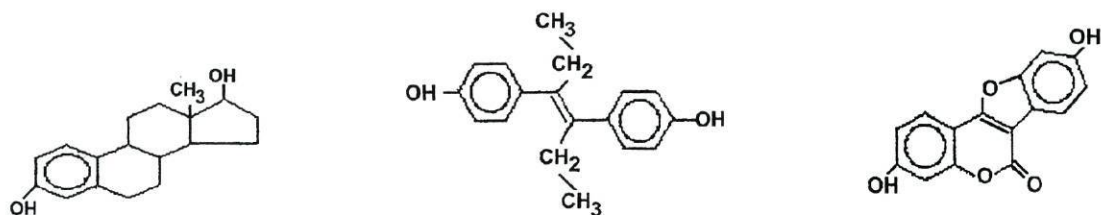
consequentemente, o seu modo de acção. No entanto, apesar dos possíveis mecanismos de acção, os efeitos mais estudados são os resultantes da directa interacção com o receptor estrogénico (Gillesby et al., 1998).

Assim, não será de admirar que um desequilíbrio endócrino, devido à presença de pseudo-estrogénios ou a um excesso de estrogénios endógenos e/ou à deficiência de androgénios, possa afectar particularmente o sistema reprodutor masculino. Sabe-se, já há várias décadas, que os estrogénios são capazes de induzir o aparecimento de características morfológicas femininas em peixes machos tratados com aquelas hormonas durante o período inicial da diferenciação sexual (Yamamoto, 1969). Além disso, quando nos peixes machos os estrogénios ou pseudo-estrogénios, como os alquilfenóis, se encontram presentes em níveis anormalmente elevados, inibem a espermatogénese e provocam atrofia testicular (Jobling et al., 1996), levam ao desenvolvimento de gónadas intersexuais (Gimeno et al., 1996; Gray e Metcalfe, 1997), chegando mesmo a verificar-se uma reversão de sexo (ou completa feminização) (Gimeno et al., 1996, 1998). Estes compostos induzem ainda a produção de elevados níveis de vitelogenina (Jobling et al., 1996; Christensen et al., 1999), bem como das proteínas da zona radiata do ovócito (Arukwe et al., 1997a), conduzem à redução da taxa de eclosão dos ovos (Gray et al., 1999) e provocam alterações do comportamento sexual (Bayley et al., 1999).

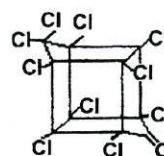
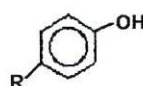
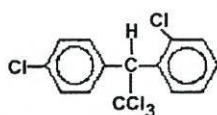
As consequências mencionadas podem ter graves implicações na dinâmica e sobrevivência das espécies afectadas. Contudo, e tomando esta área de investigação ainda mais polémica, alguns estudos foram incapazes de demonstrar as consequências nocivas dos alquilfenóis sobre os peixes. Tal é o caso do trabalho realizado em medaca japonesa (*Oryzias latipes*) exposta a concentrações relativamente baixas de nonilfenol a partir de um mês de idade até à fase adulta (Nimrod e Benson, 1998).

6.4. Métodos de detecção da actividade estrogénica

Para além dos produtos já referidos, resultantes da degradação dos alquilfenóis-etoxilados, particularmente os alquilfenóis, torna-se cada vez mais evidente que muitos químicos, quer naturais, quer sintéticos exibem actividade estrogénica (McLachlan, 1995). Entre estes incluem-se os fitoestrogénios (Pelissero et al., 1993), a hormona sintética etinilestradiol, vários pesticidas e herbicidas (por exemplo o DDT e seus metabolitos), alguns hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, certos ftalatos e diversos PCBs (Fig. 7) (White et al., 1994; Nimrod e Benson, 1996).



- a) 17β-estradiol. Hormona natural. b) Dietiltilbesterol (DES). Estrogénio sintético c) Coumesterol. Fitoestrogénio



- d) o,p`-DDT. Pesticida sintético. e) Alquilfenol. R – radical (geralmente um nonil, octil ou dodecilfenol). f) Cepona. Pesticida sintético.

Fig. 7) Estrutura química de alguns estrogénios ambientais. (Adaptado de Nimrod e Benson, 1996.)

Contudo, não é possível prever a capacidade estrogénica de um composto tendo por base apenas o conhecimento da sua estrutura química uma vez que esta, na maioria das substâncias é não só consideravelmente diferente da estrutura do estrogénio natural, sendo também muito diversa a conformação química entre eles, o mesmo acontecendo com os proliferadores peroxissomais (White et al., 1994). Por esta razão, a capacidade de um químico em se comportar como um estrogénio é usualmente descoberta por mero acaso. Aliás, a actividade estrogénica dos alquilfenóis foi também descoberta acidentalmente, mediante a realização de estudos com culturas de células da glândula mamária, mantidas em placas de petri produzidas com poliestireno e que libertavam p-nonilfenol, o qual afectava estas células muito sensíveis a estrogénios (Soto et al., 1991).

É já conhecido o facto de certos factores, tais como a espécie, o órgão, o estágio de desenvolvimento, as diferenças intraindividuais, o tempo e a dose de exposição aos compostos estrogénicos, poderem influenciar o comportamento destes químicos e, conseqüentemente, o tipo e gravidade dos problemas de saúde a que os indivíduos se encontram sujeitos (Bern, 1992; Guillette, 1995; Steinmetz et al., 1996; Shen e Novak, 1997; Gimeno et al., 1998; Liber et al., 1999; Spearow et al., 1999).

Foi realizado um esforço global pela comunidade científica de modo a desenvolver testes específicos que permitiram identificar e avaliar a actividade estrogénica de um composto, comparativamente ao 17 β -estradiol. Actualmente, baseados na relação rapidez-eficiência-custo, os testes *in vitro* mais utilizados são (Harries et al., 1997): medição do efeito proliferativo em culturas celulares da glândula mamária (geralmente MCF7) (White et al., 1994); produção de vitelogenina em culturas celulares de hepatócitos de truta arco-íris macho (Jobling e Sumpter, 1993; White et al., 1994); uso de culturas celulares de estirpes recombinantes de leveduras (*Shaccharomyces cerevisiae*) possuindo o gene humano do receptor do estrogénio (Routledge e Sumpter, 1996, 1997).

Mediante a utilização do último tipo de teste referido, Routledge e Sumpter (1997), constataram que a capacidade estrogénica dos alquilfenóis é altamente dependente da sua estrutura química individual, como sejam o tamanho e grau de ramificação do grupo alquil, bem como a posição relativa do grupo hidroxil no anel fenólico. Contudo, foi demonstrado que os alquilfenóis (como a maioria dos pseudo-estrogénios) possuem fraca actividade estrogénica uma vez que desencadeiam uma resposta similar ao 17 β -estradiol quando presentes em concentrações 1.000 a 1.500.000 vezes superiores. Assim, comparativamente ao 17 β -estradiol, o efeito daqueles químicos é, geralmente, de muito menor magnitude (Nimrod e Benson, 1996). Factores tais como a capacidade de ligação do xeno-estrogénio à proteína transportadora plasmática e ao receptor estrogénico (Vom Saal et al., 1992), a mistura com outras substâncias do mesmo tipo (Arnold et al., 1996c) e as suas transformações metabólicas, poderão influenciar a concentração a que estes compostos desencadeiam os seus efeitos adversos no organismo.

No entanto, a detecção da actividade estrogénica de uma substância *in vitro* apenas nos indica que esta é um potencial xeno-estrogénio (Ashby et al., 1997). Toma-se deste modo necessária a indução de efeitos ao nível do organismo, incluindo o seu sistema reprodutor, para que o composto seja classificado como um xeno-estrogénio. Com este objectivo, um dos testes *in vivo* empregues nos peixes baseia-se nas respostas bioquímicas dos indivíduos quando expostos ao suspeito xeno-estrogénio no plasma (Gimeno, 1997).

Uma das respostas mais utilizadas como biomarcador da actividade estrogénica consiste na produção de vitelogenina em peixes imaturos e machos dos teleosteos ovíparos, tão diversos como a carpa (*Cyprinus carpio*), a truta arco-íris, o peixe-rocha (*Rutilus rutilus*) e a solha (*Platichthys flesus*) (Gimeno et al., 1996; Jobling e Sumpter, 1996; Routledge et al., 1998; Christensen et al., 1999). Aliás, este biomarcador permitiu demonstrar que os efluentes provenientes das estações de tratamento de águas residuais possuíam compostos estrogénicos (Purdom et al., 1994) e que os

seus efeitos poderam persistir nos rios a uma distância de vários quilômetros (1,5 km a 15 km) a jusante do seu ponto de entrada naquele ecossistema (Harries et al., 1996, 1997).

II. MATERIAL E MÉTODOS

1. MANUTENÇÃO DOS ANIMAIS DURANTE AS EXPERIÊNCIAS

Neste trabalho utilizaram-se exemplares imaturos de truta fário (*Salmo trutta fario* Linnaeus, 1758) com cerca de 1 ano de idade, provenientes do posto Aquícola do Tomo (Amarante), da Divisão de Caça e Pesca nas Águas Interiores, da Direcção Regional de Agricultura de entre o Douro e Minho (DRAEDM).

Antes do início das experiências, os peixes foram sujeito a um período de aclimação de 7 dias. Nos 30 dias seguintes, os mesmos foram expostos aos diferentes compostos, em tanques contendo água descolorada, em circuito fechado e com um pH entre 6-7. Por sua vez, os tanques eram constantemente arejados por meio de bombas ligadas a difusores. No início das experiências, cada tanque continha apenas 7 trutas. Este número foi estabelecido de modo a reduzir ao mínimo a competição pela comida e espaço, bem como a possível agressividade entre elas.

Os peixes foram alimentados duas vezes por dia com ração comercial (adquirida à Alpis-A. Coelho e Castro Lda., Póvoa do Varzim). A comida era espalhada sobre a superfície dos tanques e os peixes alimentavam-se até estarem saciados.

Em qualquer das experiências toxicológicas utilizaram-se compostos que, devido à sua natureza hidrofóbica, foram previamente dissolvidos em etanol salino a 50%, sendo estas soluções preparadas no próprio dia da sua utilização. Nos tanques de controlo foi adicionado à água apenas etanol salino. A solução de etanol salino a 50% foi obtida adicionando, em partes iguais, uma solução de NaCl (0,9%) e etanol absoluto.

Os químicos eram administrados cada 48 horas, concomitantemente à prévia mudança do volume total da água. Durante esta operação, os tanques eram cuidadosamente lavados com água descolorada (mantendo o sistema em circuito aberto durante o processo) e limpos dos restos de comida e outros detritos. Antes de serem sacrificadas, as trutas foram sujeitas a um período de jejum de 24 horas.

2. QUÍMICOS

Os alquilfenóis utilizados neste trabalho, nomeadamente o 4-tert-butilfenol (com pureza de 99%) e o 4-nonilfenol (contendo 90% de isómeros *para* deste alquilfenol, com 3,4% de

dinonilfenol e 0,2% de fenol livre), bem como a hormona sexual feminina, o 17β -estradiol (com pureza de 98%), foram fornecidos pela Sigma-Chemical Co. (Poole, Dorset, U.K.). Os cofactores, os substratos necessários aos ensaios enzimáticos e a albumina bovina (BSA) foram também adquiridos à citada empresa. Todos os outros químicos utilizados neste trabalho foram fornecidos pela empresa Merck (Darmstadt, Alemanha).

3. EXPOSIÇÃO AO 17β -ESTRADIOL E ALQUILFENÓIS

3.1. Exposição de trutas imaturas a $1\ \mu\text{g/L}$ de 17β -estradiol

Os juvenis de truta fário foram mantidos, durante 30 dias, em quatro tanques de fibra de vidro (7 animais por tanque), a uma temperatura de 17°C , tendo cada um deles uma capacidade de 233 L.

Em dois tanques foi distribuído, manualmente, sobre a sua superfície, uma solução de 17β -estradiol de modo a ser obtida uma concentração nominal de $1\ \mu\text{g/L}$. Esta solução foi preparada a partir de uma solução mãe de 17β -estradiol a 1,75% em etanol absoluto, da qual se retirou 26,6 μl que foram dissolvidos em 10 ml de etanol salino a 50%, tendo sido adicionados 5 ml em cada um dos tanques.

Os animais dos dois tanques restantes funcionaram como grupo controlo, tendo sido adicionado à água 5 ml de etanol salino a 50% (concentração final de etanol na água 0,001%).

3.2. Exposição de trutas imaturas a $50\ \mu\text{g/L}$ e $100\ \mu\text{g/L}$ de 17β -estradiol e a alquilfenóis

Os exemplares imaturos de truta fário foram sujeitos, durante 30 dias, aos seguintes compostos: 17β -estradiol (nas concentrações de $50\ \mu\text{g/L}$ e $100\ \mu\text{g/L}$), 4-tert-butilfenol (BF) ($750\ \mu\text{g/L}$), 4-nonilphenol (NF) ($750\ \mu\text{g/L}$), e mistura de 4-nonilfenol com o 4-tert-butilfenol ($375\ \mu\text{g/L}$ de cada). Nestas experiências, os tanques empregues tinham uma capacidade para 319 L, sendo feitos de tijolo com revestimento interno a azulejo. Para além do mais, a temperatura média da água durante a experiência foi de 13°C . As concentrações nominais indicadas foram obtidas, adicionando aos tanques as soluções preparadas de acordo com a tabela 1.

Tabela 1 – Concentrações nominais dos químicos utilizados neste trabalho experimental.

| Concentrações nominais | Solução mãe de 17 β -estradiol | 4-tert-butilfenol | 4-nonilfenol | Etanol salino a 50% | Número de tanques | Volume da solução final (por tanque) |
|--|--------------------------------------|-------------------|---------------|---------------------|-------------------|--------------------------------------|
| 17 β -estradiol 50 μ g/L | 1192,5 μ l | ---- | ---- | 30 ml | 2 | 15 ml |
| 17 β -estradiol 100 μ g/L | 3825 μ l | ---- | ---- | 30 ml | 2 | 15 ml |
| 4-tert-butilfenol 750 μ g/L | ---- | 478,1 mg | ---- | 30 ml | 2 | 15 ml |
| 4-nonilfenol 750 μ g/L | ---- | ---- | 510,3 μ l | 30 ml | 2 | 15 ml |
| 4-tert-butilfenol + 4-nonilfenol | ---- | 239,1 mg | 255,1 μ l | 30 ml | 2 | 15 ml |
| Controlo | ---- | ---- | ---- | 30 ml | 2 | 15 ml |

4. PROCESSAMENTO DO FÍGADO

4.1. Colheita e perfusão

Findo o período de exposição, todos os peixes sobreviventes foram anestesiados por imersão numa solução aquosa de etilenoglicolmonofeniléter (0,5ml/litro), tendo sido então pesados e medidos, dados posteriormente utilizados na determinação do factor de condição (F.C.) dos animais, ou seja:

$$F.C. = (\text{Peso do corpo (g)} \times 100) \div \text{comprimento}^3 \text{ (cm)}$$

Em seguida, efectuou-se a recolha de sangue, a qual teve como objectivo o doseamento da vitelogenina e do 17 β -estradiol no plasma (ver detalhes no ponto 7). Terminada esta tarefa, procedeu-se à abertura da cavidade abdominal para a extracção do fígado e das gónadas. Estas últimas foram pesadas com vista á determinação do índice gónado-somático (I.G.S.). Este foi calculado segundo a expressão:

$$I.G.S. = (\text{peso das gónadas} \times 100) \div \text{peso do corpo}$$

Durante o processamento acima descrito, as brânquias foram sendo banhadas com a solução anestésica. Imediatamente após a extracção do fígado, foi inserida uma cânula flexível 24G (Abbocath-T) sem agulha pertencente a um sistema de injeção endovenosa na veia supra-hepática e, com o auxílio de uma bomba peristáltica (Minipuls 3-Gilson), perfundi-se este órgão com uma solução isosmótica para salmonídeos (Rocha et al., 1994) (Tabela 2), contendo 0,1% de heparina, à temperatura de 4°C, até o fígado ficar exangue. O fluxo foi controlado de modo a não ultrapassar os 5,2 ml/minuto/Kg de peso (Hampton et al., 1985).

Tabela 2 – Composição da solução isosmótica para salmonídeos (pH 7,4)

| Composição | % (mg/100 ml) |
|---|------------------|
| NaCl | 0,7363 |
| KCl | 0,0359 |
| CaCl ₂ | 0,0166 |
| MgCl ₂ | 0,1480 |
| NaHCO ₃ | 0,0302 |
| NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O | 0,0455 |
| Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O | 0,1584 |

Finalizada a perfusão, pesou-se o fígado para posterior determinação do índice hepatossomático (I.H.S.), calculado mediante a expressão:

$$\text{I.H.S.} = (\text{peso do fígado} \times 100) \div \text{peso do corpo}$$

De seguida, o órgão foi cortado em fatias de 4 mm de espessura, aproximadamente. Estas foram sujeitas a sucessivas cascatas de amostragens sistemáticas. Parte das peças amostradas foi destinada à realização de análises bioquímicas e parte foi processada para microscopia electrónica de transmissão.

5. ESTUDO ULTRA-ESTRUTURAL

5.1 Localização citoquímica da catalase

As fatias de fígado destinadas ao estudo ultra-estrutural foram, o mais rapidamente possível, finda a amostragem, colocadas em glutaraldeído a 2,5% em tampão fosfato 0,1M (pH 7,4). Estas peças foram re-seccionadas, também segundo uma amostragem sistemática, até à obtenção de fragmentos com tamanho adequado à execução deste tipo de estudo citoquímico ($< 0,5 \text{ mm}^3$). Por isso, a última etapa de corte foi executada sob um lupa binocular. Os fragmentos foram fixados durante 2 horas e a 4°C, com o fixador atrás referido. Terminada a fixação e continuando a fazer uso do mesmo tampão, procedeu-se à lavagem dos fragmentos, durante cerca de 2 horas e a 4°C, efectuando-se mudanças do tampão de hora a hora.

Posteriormente, o material biológico foi lavado em tampão Tris-HCl 0,1 M (pH 8,5), durante 30 minutos e a 4°C. Realizou-se, em seguida, uma incubação no escuro a 35°C, durante 2 horas, em meio preparado segundo as indicações de Veenhuis e Wendelaar Bonga (1979), contendo 0,12% de H_2O_2 e 2 mg/ml de DAB em tampão Tris-HCl 0,1 M (pH 8,5). O pH do meio de incubação foi corrigido com NaOH para 8,5, antes de ser utilizado. Após a incubação, os fragmentos foram de novo lavados em tampão Tris-HCl 0,1 M (pH 8,5) a 4°C, durante 30 minutos. Subsequentemente, e também a 4°C, realizou-se mais uma lavagem com tampão fosfato 0,1 M (pH 7,4), durante 30 minutos. Nos controlos, a incubação foi realizada em meio completo ao qual se adicionou 0,05 M de aminotriazol de modo a inibir a actividade da catalase.

Os fragmentos foram pós-fixados numa mistura de tetróxido de ósmio a 1% e de ferrocianeto de potássio a 1,5% em tampão fosfato 0,1 M (pH 7,4), durante 2 horas e à temperatura ambiente. Seguiu-se um processo de desidratação efectuado através de uma série ascendente de álcool, com passagens de 30 minutos por soluções de etanol a 50%, 70%, 90% e 95%, seguidas de duas passagens, também de 30 minutos cada, em etanol absoluto. De seguida, efectuou-se uma passagem de 15 minutos em óxido de propileno. Todos estes passos foram sempre realizados à temperatura ambiente. Os fragmentos foram impregnados com uma mistura de óxido de propileno com resina tipo Epon nas proporções de 3:1, 1:1 e 1:3 e, finalmente, apenas na resina, 1 hora em cada e sempre à temperatura ambiente. A inclusão das peças, sem uma orientação particular no espaço, foi efectuada em moldes de borracha que, depois de terem sido cheios com a referida resina, foram colocados na estufa a 60°C, durante 2 dias, para polimerização desta resina.

Os cortes semifinos de 2 μm de espessura obtiveram-se com facas de vidro num ultramicrotomo LKB, para observação ao microscópio óptico (Nikon). A realização destes cortes

teve apenas como objectivo avaliar o estado geral de conservação do tecido. Os cortes ultrafinos foram obtidos com uma faca de diamante, no ultramicrotomo já referido, e recolhidos em grelhas de cobre com 300 “mesh”, tendo sempre sido observadas sem contrastação. A observação foi feita num microscópio electrónico de transmissão JEOL 100CXII, a 60 KV.

5.2. Metodologia Estereológica

Elaborou-se um procedimento algo complexo com vista à determinação dos parâmetros relativos e absolutos dos peroxissomas hepáticos. Para isso, utilizaram-se 15 animais divididos em grupos de 5, provenientes dos seguintes grupos de tratamento: controlo, 17 β -estradiol na concentração de 1 μ g/l e de 100 μ g/l. Por cada animal, foram observados ao microscópio electrónico de transmissão cinco blocos de tecido, os quais foram obtidos segundo a metodologia descrita no ponto 5.1. Assim, por cada bloco a analisar, foi realizada uma grelha à qual se tiraram 8 fotografias, segundo um procedimento sistemático, com vista à cobertura das zonas do corte com hepatócitos e exclusão das áreas constituídas, fundamentalmente, por sinusóides e/ou ductos biliares. Assim, por animal, foram fotografados um total de 40 campos com uma ampliação primária de 5.300 \times ; um total de 600 EM campos foram analisados neste estudo. As microfotografias obtidas em película Kodak Electron foram reveladas e impressas em papel Ilford (ampliação final de 11.000 \times) com vista à realização da análise quantitativa. Assim, foi sobreposta em cada imagem uma grelha estereológica (reproduzida em acetato) adaptada aos parâmetros a calcular.

Os primeiros parâmetros estereológicos a serem estimados foram as densidades volumétrica, de superfície e a numérica dos peroxissomas, considerando o hepatócito como o espaço de referência, isto é, as razões entre o volume total, a superfície e o número de peroxissomas e o volume do hepatócito. Estes quocientes são designados, respectivamente por V_v , S_v e N_v (peroxissoma, hepatócito).

As densidades volumétricas foram calculadas através da utilização de uma técnica estereológica manual clássica, baseada na contagem de pontos e na seguinte formulação (Weibel, 1979) :

$$V_v \text{ (estrutura, espaço de referência)} = [\Sigma P(s) \times 100] \div [k \times \Sigma P(r)]$$

em que $\Sigma P(s)$ é o número total de pontos que atingem a estrutura em todos os campos amostrados; $\Sigma P(r)$ é o número total de pontos da grelha que caem sobre o espaço de referência

(hepatócitos) naqueles campos; k é a razão entre o número de pontos da grelha que atingiram a estrutura de interesse e o espaço de referência. Assim, foi utilizada uma grelha tipo “multiuso” possuindo 2 conjuntos de pontos, na qual $k = 16$ para a V_v dos peroxissomas.

A densidade de superfície foi estimada recorrendo também a uma técnica estereológica manual clássica, baseada na contagem de pontos e de intersecções (Baddeley et al., 1986):

$$S_v \text{ (estrutura, espaço de referência)} = 2 \times (p \div l) \times [\Sigma I(s) \div \Sigma P(r)]$$

em que $(p \div l)$ representa o quociente entre o número total de pontos teste e o comprimento total das linhas teste para uma grelha particular; $\Sigma I(s)$ é o número total de intersecções dos perfis das partículas (isto é, dos peroxissomas) com os segmentos de recta teste da grelha, em todos os campos amostrados; $\Sigma P(r)$ é o número total de pontos que ficam sobre o espaço de referência (ou seja, o hepatócito) naqueles mesmos campos. A mesma fórmula foi usada na estimação directa da razão superfície/volume (com notação S/V) dos peroxissomas. Contudo, agora $\Sigma P(r)$ refere-se ao número total de pontos que caem sobre os próprios peroxissomas.

A densidade numérica dos peroxissomas foi calculada através da análise dos mesmos campos amostrados usados na contagem de pontos e intersecções aplicando a técnica de Weibel e Gomez (Weibel, 1979):

$$N_v \text{ (estrutura, espaço de referência)} = (N_A^{3/2} \div V_v^{1/2}) \times (K \div \beta)$$

onde N_A representa o número de partículas (peroxissomas) por unidade de área do espaço de referência (hepatócito) contadas com uma grelha morfométrica rectangular (impressa em acetato), portadora de linhas proibidas para evitar o enviesamento devido ao “efeito de fronteira” (Gundersen, 1977); V_v é a densidade volumétrica dos peroxissomas dentro do hepatócito; β é uma constante (coeficiente da forma) que depende da forma das partículas, sendo, por exemplo, igual a 1,382 para as partículas esféricas; K é também uma constante dependente da distribuição das dimensões dos objectos. Para a maior parte das situações práticas, a constante K pode ser abolida ou substituída por um número arbitrário compreendido entre 1,02 e 1,1 (Weibel, 1979). Neste trabalho, o valor de K adoptado foi de 1,1, segundo o previamente determinado por Rocha et al. (1999).

Na computação do volume (\bar{V}_N) e superfície (\bar{S}_N) médio do peroxissoma numa distribuição ponderada pelo número (Gundersen, 1986), alguns parâmetros relativos foram combinados do seguinte modo:

$$\bar{V}_N \text{ (peroxissoma)} = V_v(\text{peroxissoma, hepatócito}) \div N_v \text{ (peroxissoma, hepatócito)}$$

$$\bar{S}_N \text{ (peroxissoma)} = S_v \text{ (peroxissoma, hepatócito)} \div N_v \text{ (peroxissoma, hepatócito)}$$

O valor do diâmetro esférico equivalente (\bar{d}_{Sphere}) peroxissomal foi computado segundo a formulação:

$$\bar{d}_{Sphere} = \bar{V}_N \times 6 \div \pi$$

onde π é uma constante igual a 3,14 e \bar{V}_N é o volume médio do peroxissoma, segundo formulação anteriormente citada.

6. ESTUDO BIOQUÍMICO

6.1. Preparação das amostras

As porções de fígado destinadas às análises bioquímicas foram pesadas e colocadas em meio de homogeneização (aproximadamente 4 ml por cada grama de fígado) (Tabela 3), a 4°C, tendo sido fragmentadas com a ajuda de uma pinça e bisturi, antes de serem processadas a 1000 rpm num homogeneizador Potter–Elvehjem (mantido no gelo).

Tabela 3 – Meio de homogeneização do fígado.

| Químicos | Quantidade | Concentração |
|-----------------------------------|------------|--------------|
| Para 500 ml de solução | | |
| MOPS pH 7.4 | 50 ml | 5mM |
| EDTA | 0,185 g | 1 mM |
| PMSF (solução saturada em etanol) | 500 µl | 1 mM PMSF |
| Sacarose | 42,75 g | 250 mM |
| Triton X 100 | 25 ml | 0,5% |

Nota: O PMSF foi adicionado no momento da utilização da solução de homogeneização para se evitar a sua degradação em meio aquoso. Procedeu-se de igual para a sacarose de modo a evitar a contaminação por fungos.

Os homogeneizados foram filtrados por uma rede de “nylon” com malha de 204 µm e o seu volume final foi medido antes de se proceder a uma centrifugação a 5000 g, durante 10 minutos, a 4°C, numa centrífuga (2K15-Sigma) com rotor de ângulo fixo. Cada sobrenadante foi

cuidadosamente retirado com a ajuda de uma pipeta Pasteur e distribuído por 6 tubos “eppendorff”, contendo cada um deles cerca de 300 μ l. Finalmente, os tubos “eppendorff” foram colocados numa arca congeladora a -80°C onde ficaram armazenados até posterior determinação da concentração proteica e das actividades enzimáticas.

6.2. Determinação da concentração proteica

Este procedimento foi realizado segundo Lowry et al (1951). Efectuou-se primariamente uma recta de calibração, utilizando 6 padrões de BSA como indicado na Tabela 4. Para tal, foi preparada uma solução de BSA a 1 mg/ml, tendo-se ajustado a concentração desta, de modo a que a sua absorvância a 280 nm fosse de 0,58.

Tabela 4 – Obtenção da recta de calibração.

| Tubos | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|-------------------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| Padrão de BSA (1 mg/ml) | 0 | 10 μ l | 20 μ l | 30 μ l | 40 μ l | 50 μ l | 60 μ l |
| H ₂ O destilada | 200 μ l | 190 μ l | 180 μ l | 170 μ l | 160 μ l | 150 μ l | 140 μ l |
| Solução C (ver tabela 5) | 1,00 μ l | 1,00 μ l | 1,00 μ l | 1,00 μ l | 1,00 μ l | 1,00 μ l | 1,00 μ l |
| Reagente de Folin-Ciocalteu (2,0 N) | 50 μ l | 50 μ l | 50 μ l | 50 μ l | 50 μ l | 50 μ l | 50 μ l |

Tabela 5 – Composição da solução C.

| Solução (volume) | Composição | Quantidade | Concentração |
|-------------------------|---|-------------------|---------------------|
| A (100 ml) | Na ₂ CO ₃ NaOH | 2 g 0,4 g | 2% 0,1 N |
| B1 (50 ml) | CuSO ₄ · H ₂ O | 0,5 g | 1% |
| B2 (50 ml) | C ₄ H ₄ KNaO ₆ · 4H ₂ O | 1 g | 2% |
| C | 100 partes de A 1 parte de B1 1 parte de B2 | | |

Antes de se proceder à determinação das proteínas nas amostras, estas foram diluídas 6 vezes em tampão fosfato (pH 7,4), de modo a que a concentração das proteínas não ultrapassa-se o valor mais elevado da recta de calibração (Tabela 6) .

Tabela 6 –Medição de proteínas das amostras.

| Tubos | Branco | Amostra |
|---|---------------|----------------|
| Amostra diluída 6 × | 0 | 20 µl |
| H ₂ O | 200 µl | 180 µl |
| Solução C | 1,00 ml | 1,00 ml |
| Reagente de Folin- Ciocalteu (2,0 N) | 50 µl | 50 µl |

Os tubos foram agitados no “vortex” e conservados no escuro, durante 30 minutos, à temperatura ambiente. No final deste período, procedeu-se à leitura, em duplicado, da sua absorvância a 750 nm num espectrofotómetro UV/VIS GBC-918. Os resultados foram expressos em mg ml⁻¹.

6.3. Medições das actividades enzimáticas

As actividades enzimáticas foram determinadas nos homogeneizados de fígado. As leituras foram levadas a cabo num espectrofotómetro (UV/VIS GBC-918) equipado com banho-maria, para estabilização da temperatura durante a reacção. Todos os ensaios foram efectuados em condições de linearidade no tempo e de proporcionalidade entre as actividades enzimáticas e a quantidade de proteína presente nas amostras diluídas. Para cada amostra, foram efectuadas pelo menos 2 réplicas.

6.3.1. Catalase

A avaliação da actividade enzimática da catalase baseou-se na metodologia descrita por Aebi (1984). O meio de incubação foi preparado adicionando 0,13 ml de H₂O₂ a 30% em 100 ml de tampão fosfato de sódio e potássio 50 mM (pH 7,0), de modo a obter uma concentração de H₂O₂ de aproximadamente 10 mM. A densidade óptica (D.O.) a 240 nm foi acertada para valores compreendidos entre 0,520 e 0,550.

Antes da leitura, as amostras foram previamente diluídas 33,33 vezes (30 ml de amostra + 970 ml de tampão fosfato) e 66,66 vezes (30 ml de amostra + 1970 ml de tampão fosfato). Adicionaram-se 2950 µl de meio de incubação a 50 µl de amostra diluída e efectuou-se a leitura

das amostras em cuvetes de quartzo, tendo-se registado a diminuição da D.O. a 240 nm durante os primeiros 30 segundos, a 20°C. A actividade da catalase foi calculada pela fórmula:

$$k = \frac{\ln(c_1/c_2)}{\Delta t} \times \text{diluição}$$

em que k corresponde à constante de velocidade da reacção de primeira ordem (s^{-1}); $\Delta t = 30s$; c_1 e c_2 correspondem às D.O. em $t = 0$ e $t = 30$ segundos, respectivamente. A actividade desta enzima foi expressa por grama de fígado ou por miligrama de proteína.

6.3.2. Oxidases

A medição das actividades das oxidases peroxissomais baseou-se na produção de H_2O_2 e seguiu a metodologia de Cablé (1993). Para o efeito foi preparado um meio cuja composição se indica na Tabela 7.

Tabela 7 – Composição do meio sem substrato para a determinação da actividade das oxidases peroxissomais.

| Químicos | Quantidade | Concentração final |
|----------------------------------|------------|--------------------|
| Tampão fosfato de sódio (pH 8,0) | 100 ml | 50 mM |
| 4-amino-antipirina | 2 mg | 0,082 mM |
| Fenol | 10 mg | 1,06 mM |
| Peroxidase | 1 mg | 2 U/ml |
| Azida | 65 mg | 10 mM |
| BSA | 60 mg | 0,06% |

Nota: foi adicionada azida de modo a inibir a acção da catalase (Leupold et al., 1985).

Para os ensaios das oxidases dos D-aminoácidos, ácido úrico e palmitoil CoA foram adicionados ao meio referido na Tabela 7 flavina adenina dinucleotídeo na concentração de $10\mu M$ (0,8 mg/100 ml). Por sua vez, para a determinação da actividade da glicolato oxidase, foi adicionado flavina mononucleotídeo na concentração de $10\mu M$ (0,5 mg/100 ml). Os substratos apropriados foram adicionados nas seguintes concentrações: D-alanina 20 mM (36 mg/20 ml); ácido úrico 1 mM (3,4 mg/20 ml); sal de lítio de palmitoil-CoA 0,1 mM (2 mg/20 ml); glicolato de sódio 20 mM (32 mg/20 ml).

Para a medição da actividade das oxidases, as amostras foram diluídas em tampão fosfato de potássio e sódio 50 mM (pH 8,0) como indicado na Tabela 8. Em seguida, a 25 μl de amostra diluída adicionaram-se 650 μl de meio de incubação previamente aquecido a 37°C. Efectuou-se a leitura em microcuvetes de vidro, registando-se a variação da absorvância a 500 nm, durante 10 minutos, a 37°C. Contrariamente às restantes enzimas, para a urato oxidase foi necessário subtrair

ao valor obtido a variação da D. O. registada num controlo sem amostra (cerca de $0,2 \times 10^{-3}$ /min).

Tabela 8 – Diluição das amostra para medição da actividade das oxidases.

| Oxidase | Diluição inicial da amostra | | Diluição na microcuvete |
|---------------|-----------------------------|-----|-------------------------|
| D-alanina | 4x | 8x | × 27 |
| Ácido úrico | 16x | 32x | × 27 |
| Palmitoil CoA | 4x | 8x | × 27 |
| Glicolato | 2x | 4x | × 27 |

A quantidade de H_2O_2 (em μM) produzida pelas oxidases peroxissomais foi calculada a partir de uma recta de calibração (Fig. 8), a qual obedece à expressão matemática

$$[H_2O_2] = 185.07 \times \text{Absorvância.}$$

Para a construção desta recta de calibração (Rocha et al., 2000b) foram adicionados ao meio de incubação várias soluções padrão de H_2O_2 e a absorvância do produto da reacção foi lida a 500 nm. O cálculo da concentração do H_2O_2 nos padrões baseou-se no coeficiente de extinção deste composto a 240nm, $\epsilon = 39,4M^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Nelson e Kiesow, 1972).

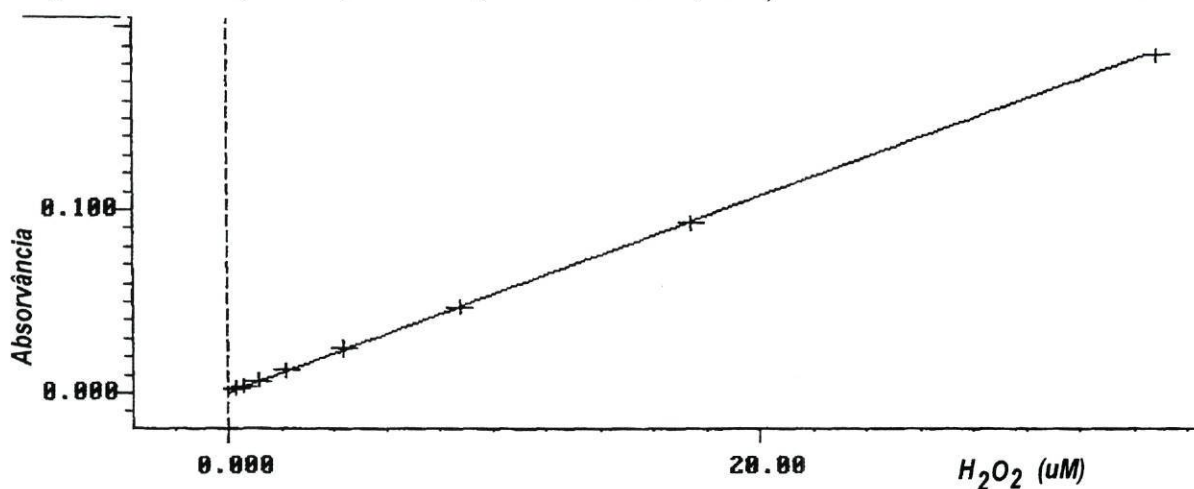


Fig. 8) Recta de calibração para determinação da produção de H_2O_2

Deste modo, a actividade (A) das oxidases por ml de amostra pode ser dada pela seguinte fórmula:

$$A(\text{nmol. min}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1}) = \frac{\Delta [H_2O_2]}{\Delta t} \times \text{diluição da amostra;}$$

$$\text{onde } \Delta [H_2O_2] = \Delta D.O. \times 185.07.$$

Para as oxidases peroxissomais, os resultados são apresentados em mUg^{-1} de fígado e mUg^{-1} de proteína, onde 1mU corresponde a 1 nmol de produto formado por minuto.

7. DOSEAMENTO DE VITELOGENINA E DE 17 β -ESTRADIOL

Utilizando uma seringa de 3 ml de capacidade e uma agulha com 25 G, ambas heparinizadas, realizou-se a recolha de sangue, extraíndo-se aproximadamente 1 ml por animal. O sangue foi introduzido num tubo heparinizado de 5 ml, ao qual foi adicionado 10 μ l de uma solução de PMFS saturada em etanol. Os tubos foram centrifugados a 1500 g, durante 10 minutos, a 4°C, numa centrífuga (2K15-Sigma) com rotor de ângulos fixos. Em seguida, o plasma resultante da centrifugação foi equitativamente distribuído por 2 tubos “ependorffs”, com vista ao doseamento da vitelogenina e do 17 β -estradiol. De imediato, os tubos “ependorffs” foram armazenados numa arca congeladora a -80°C.

7.1. Doseamento de vitelogenina por ELISA (“enzyme-linked immunosorbant assay”)

Os níveis plasmáticos de vitelogenina foram determinados utilizando um “kit” de ELISA, de acordo com as instruções do seu fornecedor (Laboratórios Biosense, Bergen, Noruega). Este “kit” baseia-se na utilização de anticorpos monoclonais de ratinho desenvolvidos contra a vitelogenina do salmão do Atlântico (*Salmo salar*), exibindo, também, uma grande reactividade cruzada para outros salmonídeos (Nilsen et al., 1998). No que respeita ao limite de sensibilidade deste “kit”, este é de 40 ng/ml (vitelogenina / plasma). De forma a assegurar que a concentração desta glicolipofosfoproteína durante a leitura se situá-se no intervalo de linearidade da recta de calibração, as amostras foram diluídas como indicado na Tabela 9.

Tabela 9 – Diluição do plasma dos grupos controlo e tratamento para o doseamento da vitelogenina.

| Grupos | Diluições | | | |
|--|-----------|------|-------|--------|
| Controlo (1 ^o fase) | 1:1 | --- | --- | --- |
| Controlo (2 ^a fase) | 1:1 | --- | --- | --- |
| 4-nonilfenol (750 μ g/L) | --- | 1:10 | 1:300 | 1:9000 |
| 4-tert-butilfenol (BP) (750 μ g/L) | 1:1 | 1:10 | 1:300 | 1:9000 |
| 4-nonilfenol (375 μ g/L) + 4-tert-butilfenol (375 μ g/L) | --- | 1:10 | 1:300 | 1:9000 |
| 17 β -estradiol (1 μ g/L) | --- | 1:10 | 1:300 | 1:9000 |
| 17 β -estradiol (50 μ g/ L) | --- | 1:10 | 1:300 | 1:9000 |
| 17 β -estradiol (100 μ g/L) | | 1:10 | 1:300 | 1:9000 |

Finalmente, a leitura das absorvâncias foi realizada a 492 nm, usando um leitor de microplacas, Multiskan Ex da Labsystem.

Os valores de vitelogenina foram calculados através da seguinte fórmula:

$$\ln\left(\frac{Bs}{B0 - Bs}\right)$$

onde Bs = absorvância média do padrão s (ou seja, padrão standart); B0 = absorvância média do padrão 0 ng vitelogenina/ml (ligação máxima – quantidade máxima de anticorpo monoclonal de ratinho que se liga à vitelogenina de salmão do Atlântico (*Salmo salar*) que reveste os poços da microplaca quando não há competidor, que neste caso consiste nas moléculas de vitelogenina existentes na nossa amostra).

A recta padrão foi então obtida numa escala logarítmica, determinando as coordenadas de cada $\ln\left(\frac{Bs}{B0 - Bs}\right)$ relativamente à respectiva concentração de vitelogenina. Relativamente aos padrões, estes consistiram em soluções de vitelogenina que se prepararam a partir da proteína vitelogenina purificada e liofilizada de truta arco-íris.

Após a realização de uma regressão linear, os valores de vitelogenina nas amostras foram calculados por meio da equação da recta:

$$f(x) = a \times \ln(x) + b$$

onde: $f(x) = \ln\left(\frac{Bs}{B0 - Bs}\right)$; x = concentração de vitelogenina nas amostras/padrão; a = declive da recta; b = ordenada na origem.

7.2. Doseamento de 17 β -estradiol por EIA (“enzyme immunoassay”)

O doseamento dos níveis plasmáticos de 17 β -estradiol foi realizado por meio de um “kit” de E.I.A. mediante as informações do fornecedor (Cayman Chemical, USA), sendo de 9 pg/ml o seu limite de detecção mínima. Este ensaio baseia-se na competição entre as moléculas de 17 β -estradiol livre (das amostras e padrões) e de 17 β -estradiol marcado (isto é, ligado a uma molécula de acetilcolinesterase), pela ligação ao anticorpo de coelho específico para a hormona em causa. Por sua vez, este complexo anticorpo de coelho-estradiol (livre ou marcado) liga-se aos anticorpos monoclonais de ratinho anti-coelho, com os quais se encontram revestidos os poços da microplaca de leitura. Passado o período de incubação (1 hora), a microplaca foi lavada de modo a remover qualquer substância livre, sendo, de imediato, adicionado o reagente de Ellman (este contém o substrato para a acetilcolinesterase). Após nova incubação com duração de 60 a

90 minutos, as absorvâncias foram lidas a 412 nm, utilizando o leitor de microplacas referido no ponto 7.1. O valor da absorvância é directamente proporcional à quantidade de 17β -estradiol marcado presente nos poços, sendo, inversamente proporcional à quantidade de 17β -estradiol presente nas amostras/padrões durante o período de incubação.

A concentração de 17β -estradiol presente nas amostras foi quantificada de acordo com os cálculos expressos no ponto 7.1, com a excepção de neste caso B_0 = absorvância média do padrão 0 ng 17β -estradiol/ml (ligação máxima – quantidade máxima do complexo anticorpo de coelho- 17β -estradiol marcado que se liga ao anticorpo monoclonal de ratinho anti-coelho que reveste a microplaca). Segundo as instruções do seu fornecedor, neste “kit” a especificidade de ligação ao anticorpo é de 100%.

8. ESTATÍSTICA

A análise estatística dos dados foi efectuada através do programa Statistica (versão 4.0) para Windows. A análise de variância (ANOVA “one way”) foi utilizada para determinar o efeito dos diferentes tratamentos (à excepção dos indivíduos expostos ao 17β -estradiol na concentração de $1\mu\text{g/L}$) na concentração de vitelogenina e nas actividades enzimáticas (catalase e as oxidases palmitoil CoA, urato, D-aminoácidos e glicolato), quer por miligrama de proteína, quer por grama de fígado. No que se refere ao estudo morfométrico, a ANOVA foi igualmente empregue de modo a discriminar as diferenças entre os resultados obtidos nos vários tratamentos comparativamente com o grupo controlo. Em ambos os casos, testaram-se previamente as premissas de homogeneidade de variância (teste de Levine) e da normalidade (teste de Shapiro-Wilk) dos dados. Perante ANOVA significativa ($p < 0.05$), efectuaram-se testes “pos-hoc”, recorrendo ao teste de Duncan, para se poderem identificar as diferenças particulares entre as diferentes técnicas. Nos peixes tratados com 17β -estradiol na dose de $1\mu\text{g/L}$ tais diferenças foram analisadas utilizando o Test-t de Student.

III. RESULTADOS

1. PARÂMETROS CORPORAIS DOS ANIMAIS UTILIZADOS NOS ENSAIOS

De acordo com os resultados, as trutas tratadas durante 30 dias com o 17 β -estradiol na concentração de 1 $\mu\text{g/L}$ e com os alquilfenóis, não diferiram estatisticamente dos respectivos controlos no que respeita a qualquer dos parâmetros corporais analisados, ou seja, peso e comprimento do corpo, factor de condição, peso do fígado e índices hepato-somático e gónado-somático (Tabela 1). Situação semelhante aconteceu nos peixes expostos ao 17 β -estradiol nas doses de 50 $\mu\text{g/L}$ e 100 $\mu\text{g/L}$, exceptuando o que se refere ao peso do fígado (ANOVA: $p < 0,01$) nos animais expostos ao 17 β -estradiol na concentração de 50 $\mu\text{g/L}$, bem como para o índice hepato-somático (ANOVA: $p < 0,001$) nos indivíduos tratados com 17 β -estradiol a 50 $\mu\text{g/L}$ e 100 $\mu\text{g/L}$, os quais foram superiores ao respectivo controlo.

Tabela 1 - Dados corporais sobre os espécimes de truta fário usados nos ensaios com 17 β -estradiol e alquilfenóis. São indicados os valores médios e os respectivos coeficientes de variação (CV) (CV = desvio padrão \div média).

| Grupos | Parâmetros* | | | | | |
|--|---------------|---------------------|---|--------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
| | Peso (g) | Comprimento (cm) | Factor de condição (g/cm ³) | Peso do fígado (g) | Índice hepato- somático (%) | Índice gónado- somático (%) |
| Controlo (1 ^o experiência) | 104,41 (0,16) | 21,63 (0,03) | 1,05 (0,09) | 1,60 (0,21) | 1,51 (0,33) | 0,17 (0,31) |
| Controlo (2 ^a experiência) | 40,76 (0,24) | 16,07 (0,06) | 0,97 (0,09) | 0,59 (0,27) ^A | 1,45 (0,01) ^A | 0,13 (0,46) |
| 4-tert-Butilfenol (375 $\mu\text{g/L}$) | | | | | | |
| + | 48,69 (0,23) | 16,92 (0,06) | 0,99 (0,06) | 0,69 (0,30) | 1,41 (0,18) | 0,14 (0,60) |
| 4-nonilfenol (375 $\mu\text{g/L}$) | | | | | | |
| 4-nonilfenol (750 $\mu\text{g/L}$) | 48,87 (0,22) | 17,25 (0,06) | 0,94 (0,14) | 0,80 (0,21) | 1,67 (0,18) | 0,11 (0,55) |
| 4-tert-butilfenol (750 $\mu\text{g/L}$) | 45,24 (0,27) | 16,75 (0,09) | 0,95 (0,08) | 0,66 (0,27) | 1,47 (0,12) | 0,14 (0,60) |
| 17 β -estradiol (1 $\mu\text{g/L}$) | 107,58 (0,13) | 21,42 (0,03) | 1,09 (0,08) | 1,89 (0,24) | 1,73 (0,18) | 0,17 (0,19) |
| 17 β -estradiol (50 $\mu\text{g/L}$) | 48,27 (0,31) | 17,07 (0,08) | 0,94 (0,01) | 1,08 (0,39) ^C | 2,21 (0,39) ^B | 0,12 (0,63) |
| 17 β -estradiol (100 $\mu\text{g/L}$) | 40,74 (0,39) | 15,28 (0,11) | 0,89 (0,06) | 0,82 (0,33) | 2,53 (0,17) ^B | 0,15 (0,51) |

* As letras minúsculas representam diferenças significativas entre os grupos; (teste de Duncan, $p < 0,001$ para **A** vs **B**; $p < 0,01$ para **A** vs **C**).

Ao analisar independentemente as experiências (Tabela 1), verificamos que qualquer dos parâmetros corporais dos peixes utilizados como controlo na 1ª experiência são superiores aos dos empregues na 2ª experiência, mais particularmente os que se referem ao peso do corpo ($2,7\times$) e ao peso do fígado ($2,5\times$) sendo, no entanto, muito próximos os valores respeitantes aos índices hepato e gónado-somático. No que respeita ao factor de condição, todas as trutas utilizadas neste estudo revelaram estar em boas condições, uma vez que o valor é muito próximo de 1, não havendo variações significativas entre os animais tratados e os controlos. Contudo, em relação ao grupo controlo, nota-se uma ligeira tendência para a diminuição deste parâmetro à medida que a dose de 17β -estradiol a que as trutas foram expostas aumenta, bem como nas tratadas com o 4-tert-butilfenol e 4-nonilfenol. No que respeita ao peso do fígado, verificaram-se valores mais elevados nos animais tratados com as diferentes concentrações de 17β -estradiol, sendo este, no entanto, apenas significativamente diferente do grupo controlo nos indivíduos sob a acção da hormona na concentração de $50\ \mu\text{g/L}$ (Tabela 1). Quando efectuámos a análise do índice hepato-somático constatámos haver um aumento deste parâmetro nos peixes expostos a doses progressivamente mais elevadas de 17β -estradiol. Assim, no que se refere às trutas controlo, os animais expostos a $50\ \mu\text{g E2/L}$ e $100\ \mu\text{g E2/L}$ revelaram diferenças altamente significativas, sendo o índice hepato-somático superior no último grupo de animais referido (Tabela 1).

Relativamente ao índice hepato-somático, refira-se ainda que os peixes tratados com o 17β -estradiol exibem valores sempre superiores àqueles determinados nos peixes sob a acção dos alquilfenóis.

Quando procedemos à comparação dos coeficientes de variação, verificámos que os respeitantes ao comprimento do corpo, factor de condição e índice hepato-somático revelaram quase sempre uma variação interindividual inferior àquela relativa ao peso do corpo e do fígado, e particularmente, ao índice gónado-somático.

Nas experiências efectuadas, a taxa de mortalidade nos grupos de controlo e nos animais expostos, quer ao 17β -estradiol, nas concentrações de $1\ \mu\text{g/L}$ e $50\ \mu\text{g/L}$, quer aos alquilfenóis não excedeu o 1%, sendo esta devida à fuga de peixes do sistema. Já nas trutas sujeitas à concentração mais elevada de 17β -estradiol, a mortalidade ocorrida foi bastante elevada. Verificou-se que 10 dias após o início da experiência, alguns dos peixes expostos a $100\ \mu\text{g/L}$ de 17β -estradiol começaram a revelar sinais de debilidade física, que se manifestavam por uma diminuição do apetite e no grau de mobilidade, acabando por morrer. Além disso, diversos animais foram atingidos por uma infecção fúngica. Como nenhum medicamento foi aplicado,

neste grupo registou-se uma taxa de sobrevivência de apenas 29%. Note-se que embora o factor de condição deste grupo de tratamento não seja significativamente diferente dos restantes, é aquele que apresenta o valor menos favorável.

2. EFEITOS RESULTANTES DA EXPOSIÇÃO AO 17 β -ESTRADIOL

2.1 Aspectos morfológicos

Quando observados ao microscópio electrónico, os peroxissomas presentes nos hepatócitos de truta fário apresentavam uma forma aproximadamente esférica, sendo preenchidos por uma matriz finamente granular com densidade electrónica mediana, um pouco mais densa que a do hialoplasma, nunca tendo sido detectados nucleóides ou outras inclusões naqueles. Os peroxissomas encontravam-se dispersos no citoplasma, frequentemente próximos de mitocôndrias e habitualmente rodeados por elementos tubulares do retículo endoplasmático liso (Figs. 9 e 10). Uma vez efectuada a localização citoquímica da catalase, os peroxissomas apresentaram-se fortemente marcados pelo produto electronodenso da reacção com diaminobenzidina (Fig. 10). Nos respectivos controlos, incubados em meio contendo aminotriazol para inibir a actividade da catalase, estes organelos encontravam-se sempre livres de depósitos electronodensos.

Para além do estudo dos peroxissomas, não foi objecto deste trabalho quantificar outras modificações surgidas após 30 dias de exposição *in vivo* ao 17 β -estradiol. Contudo, depois de uma observação atenta das microfotografias dos hepatócitos daqueles animais, são consideráveis, e portanto dignas de relato, certas alterações qualitativas que apresentavam relativamente aos grupos de controlo.

Nos hepatócitos dos animais controlo, os grânulos de glicogénio, existentes em quantidades elevadas, distribuíam-se aleatoriamente por todo o hialoplasma ou então acumulavam-se, originando manchas extensas. As cisternas do retículo endoplasmático rugoso disponham-se paralelamente, sendo ladeadas por escassos e pequenos corpos densos, bem como por mitocôndrias, as quais apresentavam perfil oval ou alongado (Fig. 10). No fígado das trutas tratadas com 17 β -estradiol na concentração de 1 μ g/L, observaram-se alterações citológicas em alguns hepatócitos, enquanto que outros se apresentavam idênticos aos dos peixes de controlo (Fig. 11). Ocorreu, portanto, um aumento de heterogeneidade entre estas células. Assim, hepatócitos com pouco ou sem glicogénio, com mitocôndrias e cisternas do retículo endoplasmático rugoso dilatadas, podiam ser observados próximo de outros semelhantes aos do controlo.

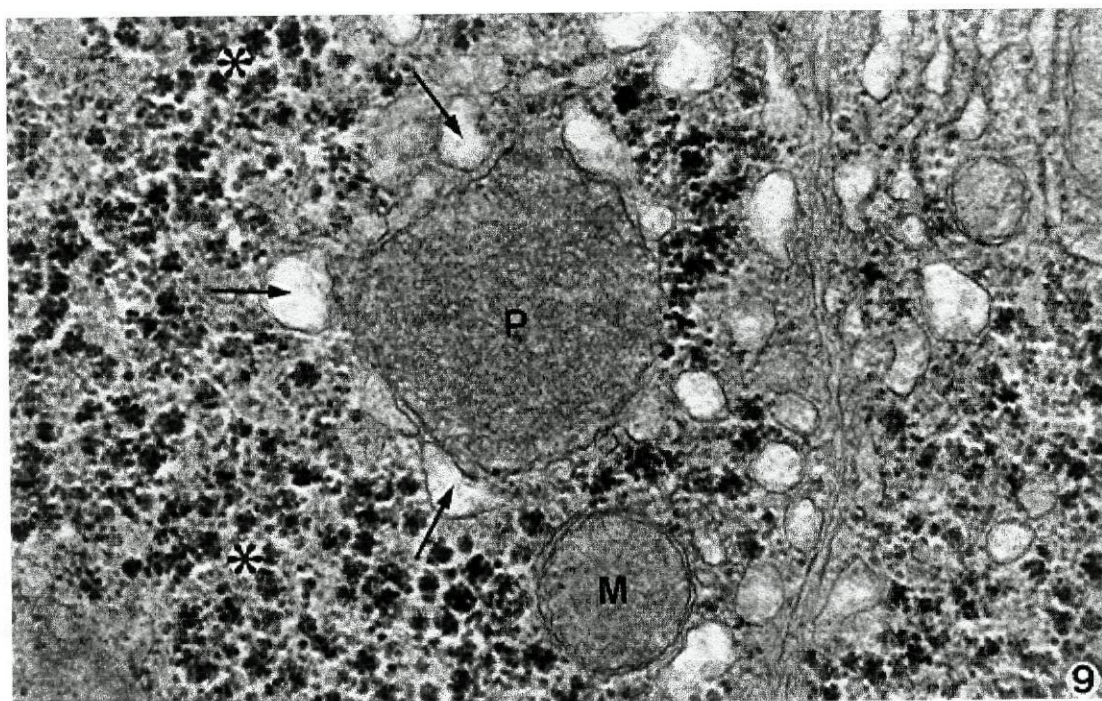


Fig. 9 – Peroxissoma (P) típico de truta fário (*Salmo trutta*), mostrando a matrix finamente granular e sem nucleóide, encontrando-se rodeado por elementos do retículo endoplasmático liso (setas). Observa-se ainda uma mitocôndria (M) e uma quantidade apreciável de grânulos de glicogénio (asterisco). x 42.000.

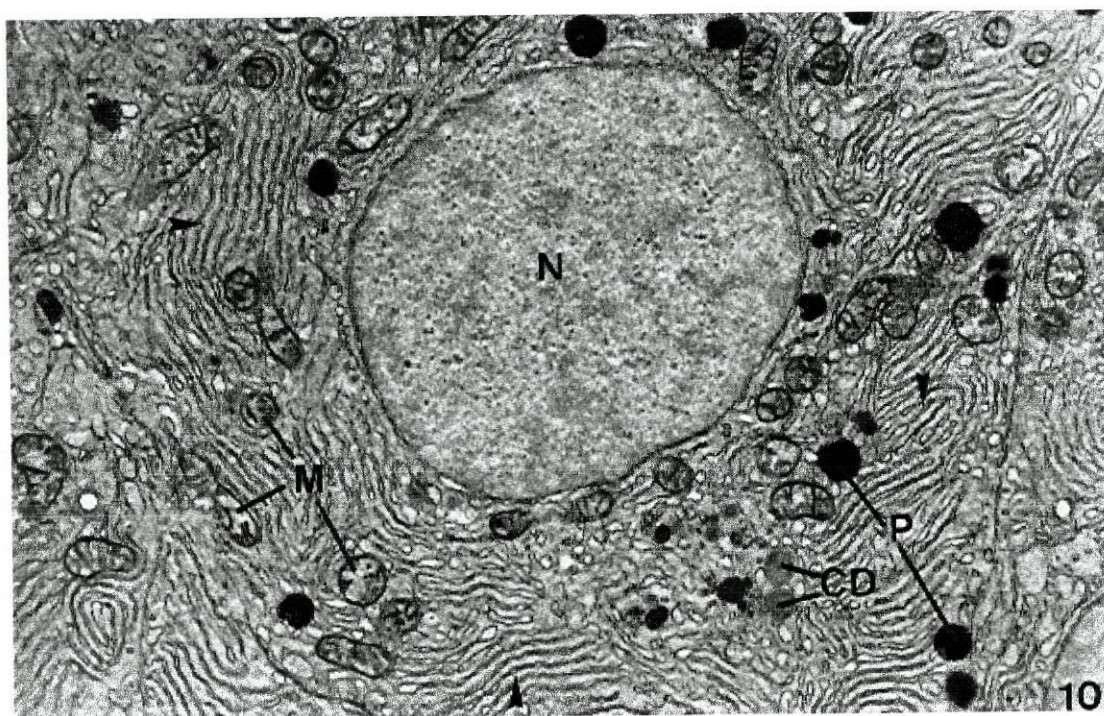


Fig. 10 – Aspecto geral de um hepatócito de truta fário pertencente ao grupo controlo, mostrando diversos peroxissomas (P) marcados pela reacção com DAB. Observam-se ainda mitocôndrias (M), numerosas cisternas do retículo endoplasmático rugoso (ponta de seta) e escassos corpos densos (CD) de pequenas dimensões. N: núcleo. x 11.000.

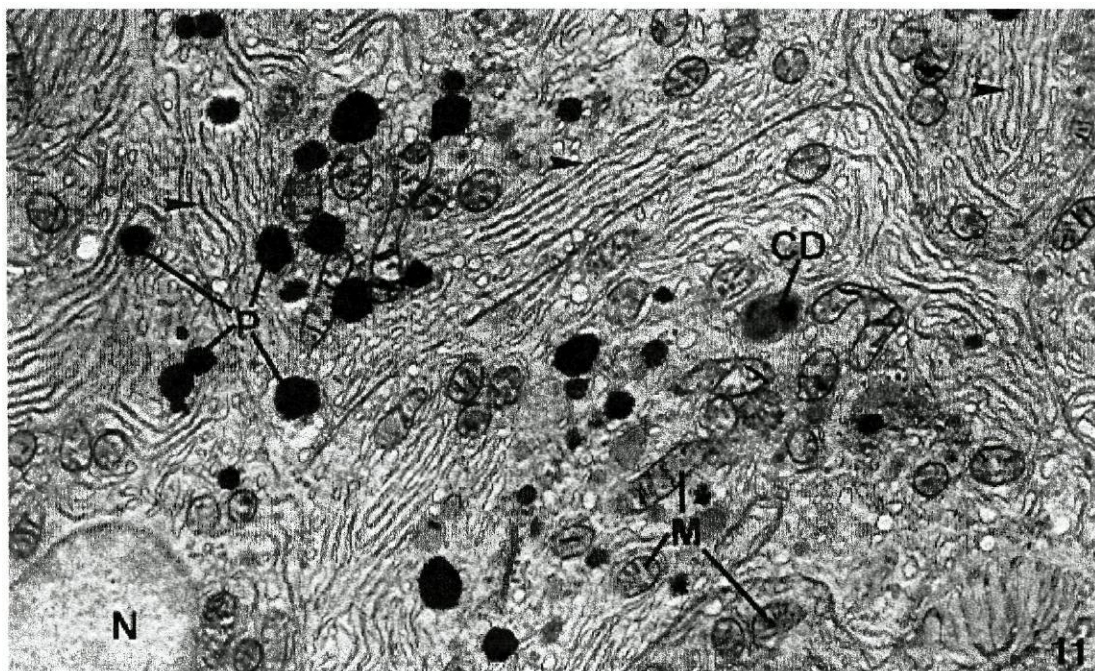


Fig. 11 –Fotografia em microscopia electrónica de hepatócitos de truta fário ao fim de 30 dias de tratamento com 1 µg/L de 17β-estradiol. A matrix dos peroxissomas (P) apresenta-se fortemente corada devido à reacção com DAB. N: núcleo; M: mitocôndria. CD: corpos densos; ponta de seta: retículo endoplasmático rugoso. x 11.000.

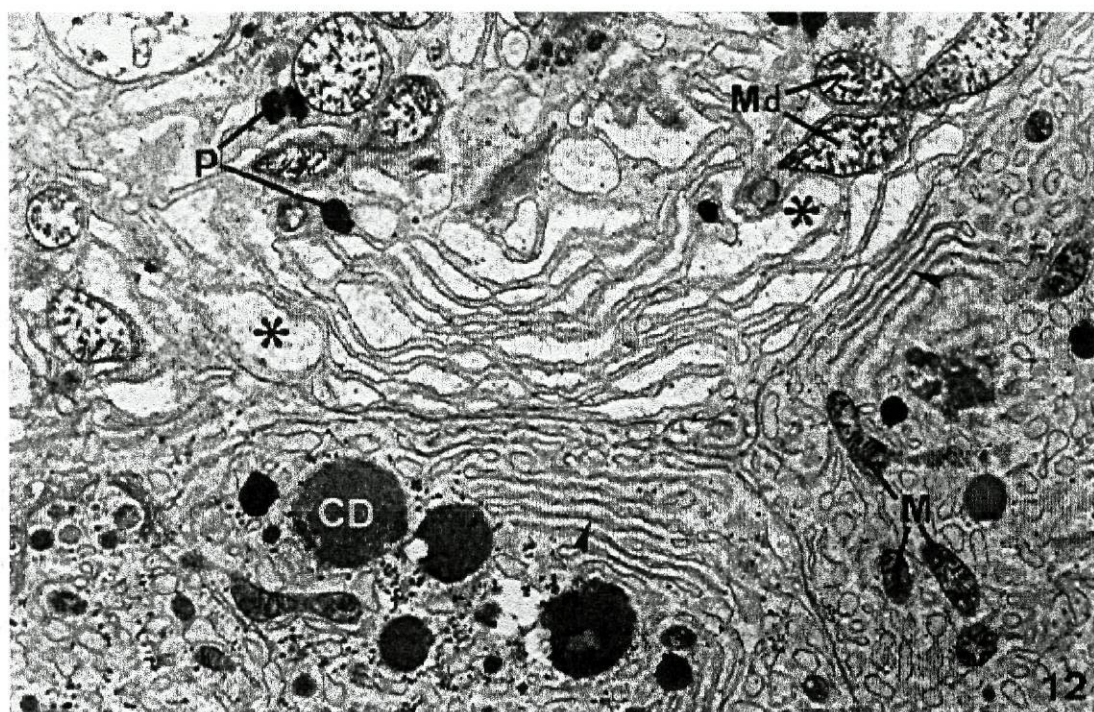


Fig. 12 - Aspecto geral dos hepatócitos de truta fário ao fim de 30 dias de tratamento com 100 µg/L de 17β-estradiol. Os peroxissomas (P) são evidenciados pela reacção com DAB. Observa-se um hepatócito com mitocôndrias (Md) e cisternas do retículo endoplasmático rugoso (asterisco) muito dilatadas ladeado por outros onde tais alterações não ocorrem. Notam-se corpos densos (CD) de grandes dimensões. x 11.000.

Em comparação com os indivíduos anteriormente referidos, nas trutas sujeitas ao 17β -estradiol na concentração de $100 \mu\text{g/L}$, as alterações citológicas foram ainda mais proeminentes, salientando-se uma completa depleção do glicogénio dos hepatócitos. Além disso, o retículo endoplasmático rugoso foi fortemente afectado, apresentando-se as suas cisternas muito dilatadas (Fig. 12). Por outro lado, as mitocôndrias também surgiam, na maioria das vezes, dilatadas. Relativamente aos corpos densos, estes pareciam possuir um tamanho superior do que o exibido nos animais de controlo (Fig. 12). Aspecto curioso reside no facto de, por vezes, e à excepção do glicogénio, todas as outras alterações citológicas mencionadas afectarem apenas uma parte dos hepatócitos, permanecendo os restantes idênticos ao controlo (Fig. 12). Quanto aos peroxissomas, para além da análise quantitativa de diversos parâmetros morfológicos relativos e absolutos (Tabela 2 e 3), a observação das microfotografias já sugeria uma redução nas dimensões destes organelos nos peixes tratados com $100 \mu\text{g E}_2/\text{L}$, em comparação com as trutas controlo (Figs. 10 e 12).

Através da ANOVA efectuada entre os animais controlo e os tratados com 17β -estradiol na concentração de $1\mu\text{g/L}$ (Tabela 2 e 3), não foram detectadas diferenças significativas no que se refere, quer aos parâmetros estereológicos relativos, nomeadamente no que respeita à razão superfície-volume, densidade de superfície, densidade volumétrica e densidade numérica, quer aos parâmetros absolutos, como sejam a superfície média, volume médio e diâmetro esférico equivalente médio dos peroxissomas. Excepção feita para a V_V (peroxissoma, célula) e V_V (peroxissoma, citoplasma), o oposto aconteceu entre os as trutas de controlo e os animais expostos ao 17β -estradiol na dose de $100 \mu\text{g/L}$ (Tabela 2 e 3). Assim, estes peixes exibiram um aumento altamente significativo no que respeita à sua densidade numérica peroxissomal (ANOVA: $p < 0,001$), relativamente ao controlo e aos peixes sujeitos à acção do 17β -estradiol na concentração de $1 \mu\text{g/L}$, sendo tal aumento para ambos os casos próximo do dobro (Tabela 2). Relativamente ao parâmetro densidade de superfície, apesar da diferença encontrada entre estes dois últimos grupos (controlo e $100 \text{E}_2 \mu\text{g/L}$) ser significativa, esta apresentou um valor próximo do seu limiar de significância (ANOVA: $p < 0,0491$), sendo o aumento detectado inferior a $1/3$. No que respeita à razão superfície/volume (S/V), apesar do aumento significativo detectado entre os grupos em causa ser de significância muito próxima ao referido anteriormente (ANOVA: $p < 0,05$), este foi de menor magnitude (cerca de $1/4$), não tendo ocorrido qualquer diferença significativa entre os grupos em questão.

Tabela 2 - Parâmetros estereológicos relativos dos peroxissomas de truta fário (cinco animais por cada grupo). São indicados os valores médios e os respectivos coeficientes de variação.

| Parâmetros * | V_v | V_v | S/V | S_v | N_v |
|---|-----------------------|------------------|-------------------------------|-------------------------------|--------------------------|
| | (Peroxi.,Citoplasma.) | (Peroxi.,Célula) | (Peroxi.) | (Peroxi.,Célula) | (Peroxi.,Célula.) |
| | % | % | $\mu\text{m}^2/\mu\text{m}^3$ | $\mu\text{m}^2/\mu\text{m}^3$ | no./ μm^3 |
| Controlo | 0,74 (0,15) | 0,67 (0,14) | 10,14 (0,06) ^A | 0,07 (0,17) ^A | 0,07 (0,18) ^A |
| 17 β -estradiol (1 $\mu\text{g/L}$) | 0,69 (0,19) | 0,62 (0,19) | 10,92 (0,06) | 0,07 (0,19) ^A | 0,07 (0,21) ^A |
| 17 β -estradiol (100 $\mu\text{g/L}$) | 0,80 (0,14) | 0,75 (0,16) | 11,88 (0,10) ^D | 0,09 (0,16) ^D | 0,15 (0,26) ^B |

*As letras representam diferenças entre os grupos (teste de Duncan, $p < 0,001$ para **A** vs **B**; $p < 0,05$ **A** vs **D**). V_v : Densidade volumétrica; S/V : Razão superfície/volume; S_v : Densidade de superfície, N_v : Densidade numérica; Peroxi: Peroxissoma.

Tabela 3 - Parâmetros estereológicos absolutos individuais dos peroxissomas de truta fário (cinco animais por grupo). São indicados os valores médios e os respectivos coeficientes de variação.

| Parâmetros * | (\bar{S}_N) | \bar{V}_N | \bar{d}_{Sphere} |
|--|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| | (μm^2) | (μm^3) | (μm) |
| Controlo | 1,05 (0,07) ^A | 0,10 (0,11) ^A | 0,58 (0,04) ^A |
| 17 β -estradiol (1 $\mu\text{g/L}$) | 0,98 (0,18) ^A | 0,09 (0,17) ^A | 0,55 (0,06) ^A |
| 17 β -estradiol (100 $\mu\text{g/L}$) | 0,59 (0,18) ^B | 0,05 (0,18) ^B | 0,46 (0,06) ^B |

*As letras representam diferenças entre os grupos (Teste de Duncan, $p < 0,001$ para **A** vs **B**). \bar{S}_N : Superfície média; \bar{V}_N : Volume médio; \bar{d}_{Sphere} : Diâmetro esférico equivalente.

Em relação aos parâmetros estereológicos absolutos, ou seja, diâmetro esférico equivalente, superfície e volume médios do peroxissoma, verificámos que estes decresceram em ambos os grupos de animais expostos à acção do 17 β -estradiol, comparativamente com os animais controlo. No entanto, tal diminuição só é significativa nos indivíduos sujeitos ao 17 β -estradiol na concentração mais elevada (Tabela 3). Assim, constatámos ocorrer uma redução muito significativa em todos os parâmetros absolutos (ANOVA: $p < 0,001$), nos peixes tratados com 17 β -estradiol na concentração de 100 $\mu\text{g/L}$, comparativamente aos grupos 1 $\mu\text{g E2/L}$ e controlo. Particularizando, os animais expostos ao 17 β -estradiol na concentração mais elevada,

relativamente aos grupos 1 µg E2/L e controlo, apresentaram uma diminuição na superfície dos seus peroxissomas de cerca de 40%. No que se refere ao volume peroxissomal individual, uma diminuição próxima de 50% foi observada no grupo 100 µg E2/L, em comparação com o grupo controlo. Finalmente, constatou-se uma redução do diâmetro esférico equivalente médio dos peroxissomas próxima de 33% nas trutas expostas a 100 µg/L de 17β-estradiol, relativamente aos grupos controlo e 1 µg E2/L (Tabela 3).

Ao analisar os coeficientes de variação (Tabela 2 e 3) verificámos que, independentemente das condições experimentais a que os peixes foram sujeitos, estes apresentaram variabilidades similares em todos os parâmetros estudados, sendo os parâmetros referentes à densidade numérica e ao diâmetro individual aqueles que revelaram diferenças interindividuais mais elevadas e mais pequenas, respectivamente.

2.2 Alterações enzimáticas

As actividades enzimáticas medidas a partir dos homogeneizados totais foram expressas por grama de fígado assim como por miligrama de proteína, nos indivíduos expostos às diferentes concentrações de 17β-estradiol e grupos controlo (Tabelas 4 e 5).

Comparativamente com o grupos controlo, e feita excepção para a actividade da D-aminoácidos oxidase quando determinada por grama de fígado nos peixes sob influência de 50 µg E2/L, nota-se uma diminuição dependente da dose de 17β-estradiol administrado das actividades enzimáticas quando doseadas, quer por miligrama de proteína, quer por grama de fígado (Tabelas 4 e 5). Após aplicação do Teste-t de Student verificamos que, em relação ao grupo controlo, tais reduções nas trutas tratadas com 1 µg E2/L não são estatisticamente diferentes. Contudo, a actividade da catalase (ANOVA: $p < 0,06$) e urato oxidase (ANOVA: $p < 0,09$), quando determinadas por miligrama de proteína, situam-se próximo do seu limiar de significância. Por sua vez, após a aplicação do teste estatístico ANOVA, as trutas expostas ao 50 µg E2/L e 100 µg E2/L, em comparação ao respectivo controlo, exibiram um comportamento contrário ao anteriormente referido. Assim, pela ANOVA constatou-se que à excepção da actividade da D-aminoácidos oxidases, quer por miligrama de proteína, quer por grama de fígado, onde $p < 0,01$, para todas as actividades das restantes enzimas analisadas $p < 0,001$.

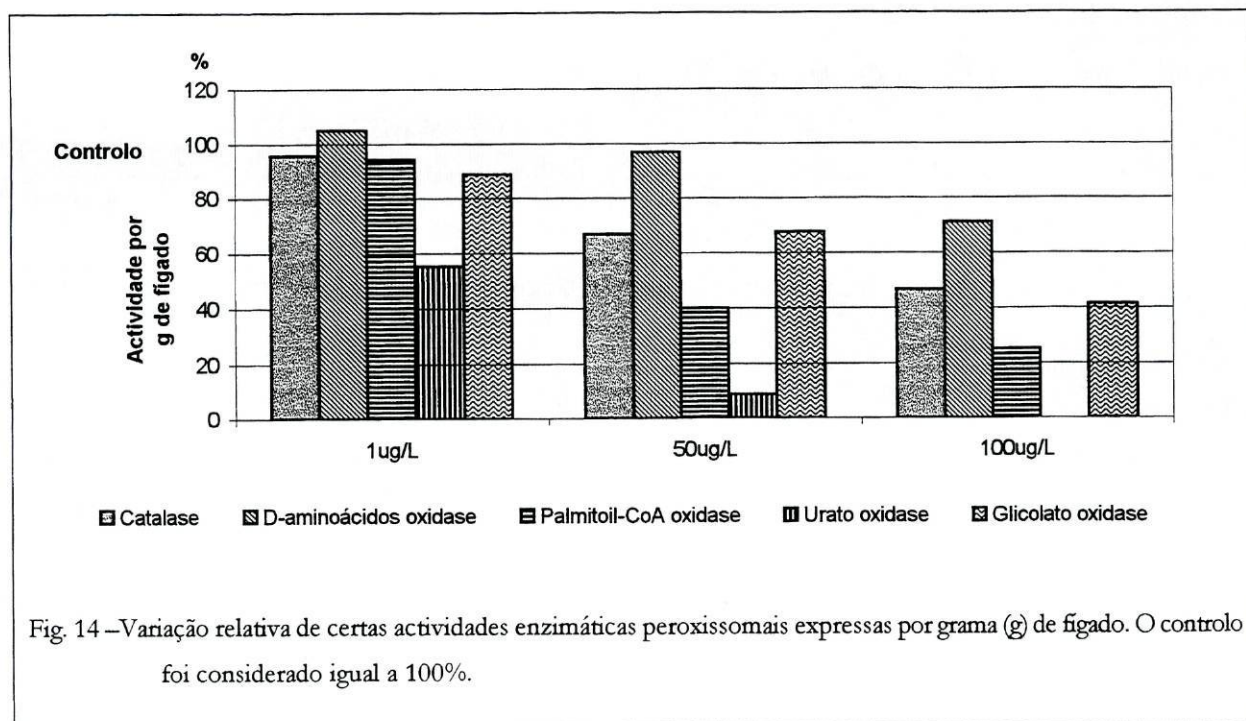
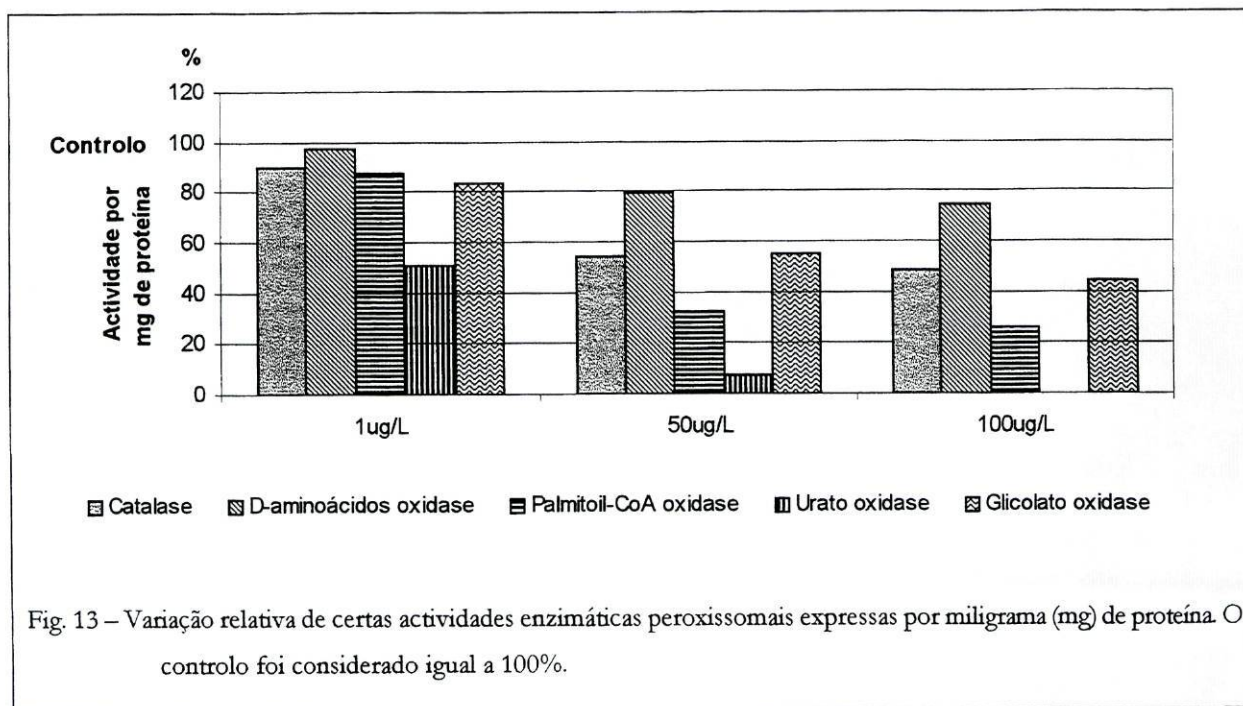
Ainda no que respeita aos dados da Tabela 5 constatou-se que, em relação ao grupo controlo, nos indivíduos tratados com 17β -estradiol nas concentrações de 50 $\mu\text{g/L}$ e 100 $\mu\text{g/L}$, as actividades da catalase e das oxidades da palmitoil-CoA e da urato sofreram diminuições substanciais, sendo estas mais relevantes no caso da urato oxidase e nos peixes sob influência da hormona na dose de 100 $\mu\text{g E2/L}$, onde se registou o seu desaparecimento. Tal comportamento pode ser também observado através da análise das Figuras 13 e 14.

Ainda em comparação com o grupo controlo, uma acentuada diminuição foi observada para a actividade da enzima glicolato oxidase, quer por miligrama de proteína, quer por grama de fígado, embora para este último caso tal decréscimo tenha ocorrido apenas entre os peixes controlo e os tratados com 17β -estradiol na dose máxima (Figs. 13 e 14).

Para além disso, verificamos (Tabela 5) que em relação ao grupo controlo, nos peixes sujeitos a 50 $\mu\text{g E2/L}$ e 100 $\mu\text{g E2/L}$, a actividade por miligrama de proteína bem como por grama de fígado (neste caso apenas para o grupo 100 $\mu\text{g E2/L}$) da D-aminoácidos oxidase, sofreu uma diminuição considerável ($p < 0,01$). Tal comportamento é também exibido entre os animais de controlo e as trutas 50 $\mu\text{g E2/L}$, para a actividade por grama de fígado da glicolato oxidase.

Quando procedemos à análise das variações das actividades enzimáticas entre os grupos expostos às diferentes concentrações de 17β -estradiol, verificámos a ocorrência de um decréscimo significativo, de diferentes magnitudes, somente na actividade por grama de fígado das enzimas D-aminoácidos oxidase e glicolato oxidase (Tabela 5).

Analisando os coeficientes de variação, contactamos que as actividades enzimáticas (por grama de fígado e por miligrama de proteína) da catalase e glicolato oxidase revelam uma variação interindividual inferior do que as exibidas pela restantes enzimas estudadas, sendo esta particularmente elevada para a urato oxidase.



3. EXPOSIÇÃO A ALQUILFENÓIS - ALTERAÇÕES ENZIMÁTICAS

Na Tabela 6 estão registadas as actividades enzimáticas, por miligrama de proteína e por grama de fígado presentes nos animais controlo, bem como naqueles sujeitos aos alquilfenóis.

Pela ANOVA constatou-se a presença de diferenças apenas para as actividades da palmitoil-CoA oxidase, quer por grama fígado ($p < 0,05$), quer por miligrama de proteína ($p < 0,001$) bem como para a D-aminoácidos oxidase ($p < 0,01$), neste caso apenas por miligrama de proteína.

Verificou-se que, comparativamente com o grupo controlo, nos indivíduos sob a acção do 4-nonilfenol e 4-tert-butilfenol, a actividade por grama de fígado da palmitoil-CoA oxidase sofreu uma diminuição considerável, sendo esta ligeiramente mais pronunciada no 1º grupo de tratamento referido (Tabela 6). Ainda em comparação com os animais controlo, registou-se também uma diminuição do valor da actividade por grama de fígado daquela enzima nos peixes expostos à mistura dos dois alquilfenóis; esta redução foi de igual magnitude à anteriormente referida para grupo de peixes expostos ao 4-nonilfenol. Não foi detectada qualquer diferença significativa para a actividade por grama de fígado da palmitoil-CoA oxidase nos grupos de tratamento analisados (4-tert-butilfenol, 4-nonilfenol e mistura).

Comportamento semelhante ao anteriormente descrito, foi aquele observado para a actividade por miligrama de proteína da enzima palmitoil-CoA oxidase nos ensaios com os alquilfenóis (Tabela 6). Assim, os indivíduos sujeitos ao 4-nonilfenol revelaram uma diminuição altamente significativa na actividade da enzima em causa. Nos peixes expostos à mistura dos alquilfenóis e ao 4-tert-butilfenol, foi observada uma diminuição não tão substancial de tal actividade. Tal como para a actividade por grama de fígado da palmitoil-CoA oxidase, também para a sua actividade por miligrama proteína não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos de tratamento mencionados.

No que respeita à actividade por miligrama de proteína da D-aminoácidos oxidase, constatámos que esta exibiu um comportamento diferente daquele descrito para a palmitoil-CoA oxidase. Deste modo, os peixes sujeitos ao 4-tert-butilfenol possuíam o valor mais elevado para a actividade por miligrama de proteína desta enzima, sendo ligeiramente superior ao do grupo controlo (Tabela 6). No entanto, não foi detectada nenhuma diferença significativa entre eles. O mesmo aconteceu no grupo das trutas sob a acção combinada dos alquilfenóis embora, neste caso, o valor da actividade em causa seja inferior ao do grupo sujeito ao 4-tert-butilfenol.

Tabela 6 - Actividades (A) de diversas enzimas peroxissomais nas trutas de controlo e tratadas com os alquilfenóis 4-tert-butilfenol, 4-nonilfenol e mistura resultante da junção dos químicos referidos. São indicados os valores médios e os respectivos coeficientes de variação. As actividades são expressas como indicado na Tabela 4.

| Grupos | Enzimas * | | | | | | | | | | | |
|---|-----------------------------|--------------------------|-----------------------------|--------------------------|-----------------------------|----------------------------|-----------------------------|--------------------------|-----------------------------|--------------------------|--|--|
| | Catalase | | D-aminoácidos oxidase | | Palmitoil-CoA oxidase | | Urato oxidase | | Glicolato oxidase | | | |
| | A mg ⁻¹ proteína | A g ⁻¹ fígado | A mg ⁻¹ proteína | A g ⁻¹ fígado | A mg ⁻¹ proteína | A g ⁻¹ fígado | A mg ⁻¹ proteína | A g ⁻¹ fígado | A mg ⁻¹ proteína | A g ⁻¹ fígado | | |
| Controlo | 0,96 (0,10) | 103,09 (0,13) | 7,73 (0,13) ^A | 828,47 (0,17) | 2,41 (0,18) ^A | 258,26 (0,21) ^A | 3,56 (0,40) | 378,25 (0,38) | 1,12 (0,28) | 120,89 (0,27) | | |
| 4-tert- butilfenol + 4-nonilfenol (375 µg/L) | 1,06 (0,12) | 115,43 (0,15) | 7,93 (0,16) ^E | 865,23 (0,19) | 1,72 (0,34) ^C | 185,56 (0,33) ^C | 2,89 (0,49) | 313,07 (0,50) | 1,34 (0,28) | 146,54 (0,30) | | |
| 4-nonilfenol (750 µg/L) | 0,95 (0,17) | 125,93 (0,43) | 6,49 (0,19) ^D | 857,73 (0,41) | 1,31 (0,34) ^B | 172,29 (0,44) ^C | 3,22 (0,47) | 446,50 (0,69) | 1,24 (0,28) | 164,06 (0,44) | | |
| 4-tert-butilfenol (750 µg/L) | 0,93 (0,15) | 98,55 (0,15) | 8,85 (0,14) ^F | 967,68 (0,13) | 1,69 (0,23) ^C | 184,49 (0,23) ^D | 2,86 (0,39) | 310,10 (0,38) | 1,02 (0,18) | 113,84 (0,27) | | |

* As letras maiúsculas representam diferenças entre os grupos de tratamento e respectivo grupo controlo; as letras minúsculas representam diferenças entre os respectivos grupos de tratamento (teste de Duncan, p<0,001 para **A vs B** e **D vs F**; P<0,01 para **A vs C**; p<0,05 para **A vs D** e **D vs E**).

Assim, e ainda relativamente ao grupo controlo, apenas os indivíduos expostos ao 4-nonilfenol sofreram uma diminuição significativa na actividade por miligrama de proteína da D-aminoácidos oxidase. Uma diferença de igual significância à anteriormente referida, foi a observada entre os grupos toxicológicos sujeitos à mistura dos alquilfenóis e ao 4-nonilfenol. Por outro lado, nos animais expostos a este último grupo referido, a actividade enzimática da D-aminoácidos oxidase, revelou ser ainda muito inferior àquela exibida pelos peixes sob a acção do 4-tert-butilfenol (Tabela 6).

Analisando os coeficientes de variação, conclui-se que as actividades enzimáticas (por grama de fígado e miligrama de proteína) da catalase e palmitoil-CoA oxidase revelam uma variação interindividual inferior do que as exibidas pelas restantes enzimas estudadas.

4. ALTERAÇÕES NOS NÍVEIS PLASMÁTICOS DE VITELOGENINA e 17 β -ESTRADIOL

Nos peixes empregues na 2^o fase experimental, ou seja, nos animais controlo bem como naqueles sujeitos aos ensaios toxicológicos 50 μ g E2/L e 100 μ g E2/L, procedeu-se à quantificação dos níveis plasmáticos de 17 β -estradiol (Tabela 7). Não foram encontradas quaisquer diferenças significativas entre os grupos mencionados.

Tabela 7 - Níveis plasmáticos de 17 β -estradiol nas trutas controlo e naquelas expostas às diferentes doses de 17 β -estradiol dissolvido na água. São indicados os valores médios e os respectivos coeficientes de variação.

| Grupos | 17 β -estradiol (pg/ml) |
|--------------------------------------|-------------------------------|
| Controlo (2 ^a fase) | 69,14 (0,23) |
| 17 β -estradiol (50 μ g/L) | 50,81 (0,65) |
| 17 β -estradiol (100 μ g/) | 92,97 (0,87) |

Os doseamentos de vitelogenina efectuados por ELISA mostraram (Fig. 15) que os níveis plasmáticos desta proteína eram quase iguais nos dois grupos de animais controlo. Foi ainda demonstrado que a exposição da truta fário ao 17 β -estradiol induz, em qualquer das doses aplicadas, uma resposta vitelogénica de significância elevada (ANOVA: $p < 0,001$). Assim, os níveis de vitelogenina no plasma dos peixes tratados com 17 β -estradiol na concentração de 1 μ g/ml ($p < 0,05$) foi cerca de 52000 vezes superior (15214 μ g/ml) do que aquele doseado nos

respectivos animais controlo (Média=0,29 $\mu\text{g/ml}$; CV=0,58). Uma resposta substancialmente mais pronunciada foi encontrada nas trutas expostas à referida hormona na concentração de 50 $\mu\text{g/L}$ ($p<0,001$), onde esta glicolipofosfoproteína atingiu níveis de 67424 $\mu\text{g/ml}$, sendo 0,6 vezes superior em relação aos indivíduos tratados com o 17β -estradiol na concentração de 100 $\mu\text{g/L}$ (40431 $\mu\text{g/ml}$) ($p<0,05$). Ou seja, comparativamente com as trutas controlo utilizadas na 2ª fase experimental, nas quais foi quantificada uma concentração média de vitelogenina plasmática igual a 0,22 $\mu\text{g/ml}$ (CV=1,03), a síntese desta foi cerca de 300.000 e 180.000 vezes superior nos animais sujeitos ao 17β -estradiol na concentração de 50 $\mu\text{g/L}$ e 100 $\mu\text{g/L}$, respectivamente ($p<0,001$).

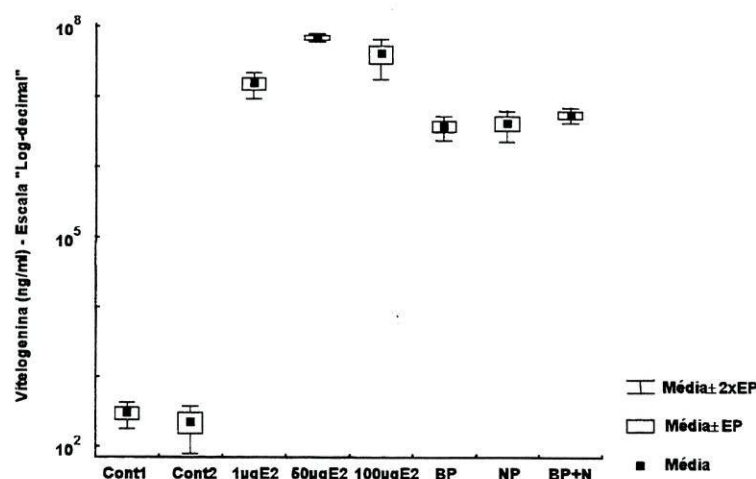


Fig 15 – Concentração de vitelogenina no plasma da truta fário quando exposta a diferentes doses de 17β -estradiol e alquilfenóis.

Pela ANOVA, e tal como aconteceu para o 17β -estradiol, verificámos que os alquilfenóis a que as trutas se sujeitaram induziram uma resposta vitelogénica de substancial significância ($p<0,001$). Assim (Fig. 15), constatou-se que os níveis vitelogénicos plasmáticos dos peixes sujeitos à mistura dos alquilfenóis 4-tert-butilfenol com o 4-nonilfenol, foram os mais elevados (5501 $\mu\text{g/ml}$), ou seja, cerca de 25.000 vezes mais do que nos animais controlo (Média=0,22 $\mu\text{g/ml}$; CV=1,03) ($p<0,001$). No que respeita aos animais expostos ao 4-nonilfenol, estes apresentaram um valor de vitelogenina significativamente inferior (2740 $\mu\text{g/ml}$) ao induzido pela mistura referida ($p<0,01$). Por outras palavras, os animais tratados com 4-nonilfenol exibiram uma produção de vitelogenina 2 vezes inferior aqueles sujeitos à solução resultante da junção do

4-nonilfenol e 4 tert-butilfenol, mas 12450 vezes superior às trutas controlo. Finalmente, valores intermédios de vitelogenina relativamente aos acima mencionados foram doseados nas trutas sujeitas ao 4-tert-butilfenol (3752 µg/ml), não tendo no entanto sido verificada qualquer diferença estatisticamente significativa entre este e os grupos tratados com a mistura e com 4-nonilfenol. Nos peixes sujeitos ao 4-tert-butilfenol, houve uma produção considerável da proteína, sendo o valor 17000 superior ao controlo ($p < 0,001$).

IV. DISCUSSÃO

O conhecimento actual sobre a anatomia microscópica do fígado dos vertebrados, cujo o estudo se iniciou no século XIX, baseia-se, principalmente, nos trabalhos realizados em mamíferos, particularmente nos roedores e no homem (Hinton e Laurén, 1990; Rocha et al., 1994). O facto de patologias diversas afectarem o fígado, têm estimulado a investigação sobre este órgão, contribuindo para o conhecimento da sua estrutura normal.

Nos peixes, o fígado tem sido menos estudado. Note-se que os primeiros trabalhos incluindo aspectos ultra-estruturais do fígado de peixes surgiram apenas nos anos 60 (Yamamoto, 1962, 1965). Contudo, o fígado destes animais revela-se de grande interesse, podendo ser considerado um ponto de partida com vista a estudos filogenéticos e comparativos entre vertebrados.

Devido ao facto de existirem mais de 20 000 espécies conhecidas de peixes, a descrição histológica do fígado de uma espécie em particular só muito dificilmente pode ser usada como modelo geral para este grupo de vertebrados, uma vez que nos peixes, o fígado revela uma grande variabilidade interespecífica. Além disso, diversos factores endógenos (idade, sexo) e exógenos (temperatura, alimentação) afectam este órgão, contribuindo para um aumento de diversidade. A título de exemplo citamos as mudanças fisiológicas (idade) que ocorrem nos hepatócitos da medaca (*Oryzias latipes*) com o envelhecimento e no salmão do Pacífico (*Oncorhynchus* spp.) após a desova, as quais consistem, respectivamente, na acumulação de grânulos tipo lipofuscina e na degeneração de tais hepatócitos (Bruslé e Anadon, 1996). Os hepatócitos também apresentam dimorfismo sexual, mas este só se torna evidente durante o período de maturação das gónadas. Por exemplo, nas fêmeas dos salmonídeos, esta fase caracteriza-se, entre outros aspectos, pela diminuição das reservas lipídicas e de glicogénio, as quais atingem níveis inferiores aos registados nos machos, num período designado de “vitelogénese exógena” (Van Bohmen et al., 1981; Bruslé e Anadon, 1996). Por outro lado, foram já observadas nos Ciprinídeos *Cyprinus carpio* e *Lenciscus idus* modificações morfológicas na organização dos hepatócitos comprovando a existência de alterações no metabolismo dos lípidos e hidratos de carbono relacionadas com a temperatura (Storch et al., 1984; Braunbeck et al., 1987).

Apesar de haver diferenças interespecíficas, o fígado dos peixes apresenta características morfológicas básicas comuns detectáveis entre as suas diversas ordens, como sejam uma vasta rede de capilares (de tipo sinusoidal), células não-hepatocíticas de natureza variada, vasos arteriais e venosos aferentes, veias eferentes e passagens biliares (Rocha, 2000).

Uma observação geral do fígado de muitas espécies de peixes, incluindo o da truta fário, permite verificar que este órgão não é lobado ou, quando muito, poderá apresentar uma divisão em 2 lobos ou no máximo 3 (Bruslé e Anadon, 1996). Tal facto é suficiente para comprovar que a lobulação tradicional existente no fígado dos mamíferos – geralmente associada a sulcos profundos que partem da superfície do órgão, sendo paradigmático os 4 lobos da espécie humana (Williams e Warwick, 1980) – não aparece na generalidade dos peixes.

No que se refere ao modo como os hepatócitos se dispõem tridimensionalmente e se relacionam com a rede capilar e biliar que lhes estão intimamente associadas, é defendido que para a maioria dos peixes cartilágneos e ósseos, tal como acontece na truta fário, a citoarquitettura consiste em túbulos de hepatócitos ramificados e anastomosados, tendo como eixo uma passagem biliar (Hinton e Laurén, 1990; Rocha et al., 1994).

Relativamente a uma eventual zonação morfofuncional do parênquima hepático, o conhecimento actual referente aos peixes é o resultado de observações e conclusões contraditórias (Rocha e Monteiro, 1999). Opostamente ao que acontece nos mamíferos, nos peixes parece estar ausente uma co-distribuição entre os canais biliares, os vasos portais (aferentes) e vasos venosos eferentes, os quais coletam sangue da rede capilar e o encaminham para a veia supra-hepática (Hinton e Laurén, 1990).

O fígado dos peixes, tal como o de outros vertebrados, desempenha um papel proeminente na fisiologia destes animais, sendo não só responsável pela ocorrência de múltiplas reacções vitais, nomeadamente de anabolismo, como sejam a síntese e armazenamento de lípidos e hidratos de carbono, produção de proteína do vitelo e do invólucro ovocitário, bem com outras de catabolismo, entre elas dos compostos azotados e glicogénio (Bruslé e Anadon, 1996).

Nos peixes, em caso de agressão ambiental, quer por alterações físico-químicas, quer por alterações bióticas do meio, os órgãos mais afectados são o fígado, a pele, as brânquias, e os rins (Hinton et al., 1987). Para além das funções já mencionadas, nos teleósteos, o fígado ocupa uma posição central no metabolismo dos xenobióticos, sendo particularmente vulnerável à acção de certos agentes químicos, os quais causam, entre outras, lesões de índole neoplásica ou associadas a desequilíbrios hormonais (Hinton et al., 1987; Hinton e Laurén, 1990; Marlasca et al., 1998). Aliás, este órgão tem vindo a tornar-se um alvo importante em estudos científicos, tendo em vista a sua utilização em ecotoxicologia.

Contudo, para uma correcta avaliação das alterações anatomopatológicas, torna-se fundamental o conhecimento prévio, qualitativo e quantitativo, da estrutura citológica e histológica normal do fígado (Rocha et al., 1997). Se tal não acontecer, alterações morfológicas e fisiológicas relacionadas com a idade, sexo, estação do ano ou estado nutricional poderão ser

confundidas com lesões induzidas pelos tóxicos (Hinton e Laurén, 1990; Segner e Braunbeck, 1990; Rocha et al, 1999). Ainda mais, tendo em mente tal objectivo, convém salientar as duas características fisiológicas que vários investigadores propõem serem as que mais poderão influenciar a estrutura hepática normal nos peixes (Bruslé e Anadon, 1996): 1) sendo os peixes vertebrados poiquilotérmicos, as diferentes temperaturas a que os animais estão sujeitos ao longo do ano faz com que hajam variações metabólicas; tais alterações refletir-se-ão, com certeza, no fígado; 2) os peixes, na sua maioria, produzem ovos telolecíticos ricos em vitelo sintetizado a partir de precursores (por exemplo, vitelogenina) produzidos no fígado (hepatócito). Consequentemente, conforme se trate de machos ou fêmeas, de animais maduros ou imaturos, poderão existir diferenças na estrutura do fígado.

Tendo por intuito objectivar impressões qualitativas e correlacionar estatisticamente estrutura e função, foi crescente, a partir dos anos oitenta, o uso de técnicas morfológicas quantitativas. A estereologia tem sido, assim, fundamental para uma rigorosa quantificação das alterações morfológicas dos peroxissomas associadas a patologias (como o cancro e esteatose) ou em condições experimentais (por exemplo ligadas ao consumo de álcool/xenobióticos ou nefrectomia). Apesar dos estudos existentes serem maioritariamente efectuados em mamíferos, na década de 90 assistiu-se a um aumento considerável no número de trabalhos publicados versando tal assunto nos peixes (Veranic e Pipan, 1992; Arnold et al., 1995, 1996; Braunbeck e Appelbaum, 1999). É importante realçar o facto dos peroxissomas e outros organelos, sendo estruturas tridimensionais, não serem correctamente caracterizadas em termos lineares ou bidimensionais (Mayhew e Reith, 1988). Os métodos estereológicos tornam-se particularmente vantajosos quanto pretendemos efectuar análises interespecíficas para as quais certos parâmetros fundamentais, como o diâmetro peroxissomal (\bar{d}_{Sphere}), estão disponíveis (Rocha et al., 1999).

Assim, no presente estudo, os peroxissomas foram analisados (o seu número e dimensões) recorrendo ao uso de técnicas estereológicas clássicas, as quais requerem pressupostos de forma, raramente verificáveis na realidade. No que se refere à forma das partículas, a aplicação da metodologia referida tornou-se possível porque os peroxissomas possuem uma forma muito próxima da esfera. A utilização de métodos estereológicos mais recentes, como é o caso do “disector físico”, permite ultrapassar algumas das limitações dos métodos clássicos, pois não estão dependentes da dimensão e forma das partículas, eliminando também, quer o erro inerente às partículas perdidas, quer o causado pelo “efeito de Holmes” (Sterio, 1984) No entanto, mediante a realização de um estudo piloto em peroxissomas hepáticos de truta fário (Rocha et al., 1999), onde ambas as técnicas estereológicas referidas foram empregues (clássica vs contemporânea), constatou-se serem semelhantes os resultados produzidos. Assim, devido à

maior morosidade e complexidade requerida pela técnica do “disector físico” em microscopia electrónica de transmissão, comparativamente às técnicas estereológicas clássicas baseadas na forma das partículas, e sendo ambas capazes de originar resultados válidos, a escolha recaiu sobre estas últimas.

Devido às dificuldades na localização dos peroxissomas, sem o recurso a uma marcação específica, a identificação de todos estes organelos numa secção ultrafina seria muito morosa e incerta, tornando-se muito difícil garantir a validade dos dados estereológicos. Contudo, quando a reacção da detecção da catalase é empregue, tal dificuldade deixa de existir, devido ao considerável aumento da electronodensidade da matriz peroxissomal, que assim se destaca das restantes estruturas citoplasmáticas. Ao analisar os artigos publicados sobre peroxissomas de peixes utilizando métodos estereológicos, verificamos requerer muito cuidado a comparação dos resultados obtidos devido à diversidade de protocolos aplicados, incluindo no que respeita ao uso, ou não, de marcação específica. Para além disso, sendo os peroxissomas organelos dinâmicos, morfológicamente adaptáveis de acordo com as condições, mesmo utilizando protocolos experimentais idênticos, factores tais como o período de aclimação e estação do ano podem conduzir a resultados estereológicos diferentes mediante a utilização da mesma espécie em condições normais. Assim, utilizando a truta arco-íris, uma equipa de investigadores chegou a resultados diferentes para os parâmetros peroxissomais densidade volumétrica (0,6% e 1,5%), diâmetro médio (0,4 μm e 0,8 μm), volume médio (7,7 μm^3 e 28,3 μm^3) e número total (94 e 609) por célula (Arnold et al., 1995, 1996a). Torna-se assim fundamental dar atenção às variáveis estereológicas relativas e absolutas para não serem tiradas conclusões erradas neste tipo de estudos.

Nos peixes, os poucos dados estereológicos disponíveis sobre os peroxissomas advêm, fundamentalmente, de situações experimentais a que espécies tais como a truta arco-íris e o peixe zebra (*Brachydanio rerio*) foram sujeitas (Veranic e Pipan, 1992; Arnold et al., 1995, 1996a, 1996b; Zahn et al., 1995, 1996). Utilizando a truta fário num estudo estereológico sazonal, que procurou investigar a influência do sexo e ciclo reprodutivo nos peroxissomas hepáticos, verificou-se, nas fêmeas, uma diminuição significativa no tamanho destes organelos durante o período vitelogénico, altura em que o 17 β -estradiol atinge os seus níveis máximos (Rocha et al., 1999). Mais recentemente, constatou-se que tais modificações morfológicas são acompanhadas de uma diminuição das actividades de certas enzimas peroxissomais, nomeadamente da catalase e das oxidases urato, glicolato e palmitoil-CoA (Rocha et al., 2000a). Os resultados obtidos nos trabalhos referidos estiveram na base da formulação da hipótese segundo a qual a morfologia e as funções dos peroxissomas hepáticos da truta poderiam ser regulados de forma natural e segundo

um determinado padrão, pelas mesmas hormonas esteróides que governam a maturação das gónadas. Do mesmo modo pseudo-estrogénios, poluentes do meio aquático, poderiam também interferir no funcionamento dos peroxissomas. Ou seja, foi a verificação experimental das hipóteses mencionadas que serviu de tema a esta tese.

Considerando os dados estereológicos publicados, verificámos que a densidade volumétrica dos peroxissomas foi estimada nos hepatócitos em algumas espécies de peixes, constatando-se, assim, que estes organelos ocupavam, em média, menos de 2,5% do volume dos hepatócitos. Aliás, baseados nos valores encontrados para este parâmetro, nos indivíduos analisados, pode-se inferir a existência de diferenças interespecíficas. Deste modo, enquanto que a truta arco-íris apresentou uma densidade volumétrica igual a 1,5% (Arnold et al., 1996a, 1996b), no peixe zebra atingiu 10,3% (Veranic e Pipan, 1992), valor excepcionalmente elevado para este parâmetro. Na truta fário, em Fevereiro (período pós-postura) esta variável foi igual a 0,96% e a 1,12% nas fêmeas e machos, respectivamente (Rocha et al., 1999). Relativamente aos parâmetros superfície e volume médio, apesar da grande falta de informação existente, estes foram determinados nos peroxissomas de hepatócitos de truta fário adulta ao longo de 3 diferentes fases do seu ciclo reprodutivo pelos mesmos autores. Assim, verificou-se que tais parâmetros em Fevereiro, conjuntamente com a densidade de superfície e o diâmetro médio foram idênticos aos obtidos nos animais controlo empregues neste trabalho. Por sua vez, constatou-se que aqueles referentes à densidade volumétrica (0,96% nas fêmeas e 1,12% nos machos) e numérica (0,11 no./ μm^3 para fêmeas e machos) são ligeiramente superiores. Nestes dois estudos (presente trabalho e aquele efectuado por Rocha et al., 1999), apesar de ter sido utilizada a mesma metodologia e espécie, as pequenas variações encontradas entre alguns dos parâmetros analisadas podem ter sido devidas ao facto dos animais possuírem idades diferentes, tendo-se no presente caso usado trutas imaturas.

Os estudos existentes sobre a regulação da morfologia e função dos peroxissomas centram-se, fundamentalmente, na influência de xenobióticos classificados como proliferadores peroxissomais, tais como as drogas hipolipidémicas, certos pesticidas, insecticidas e plastificantes (Braunbeck e Völkl, 1991; Fahimi et al., 1993a; Scarano et al., 1994; Arnold et al., 1995). Deste modo, neste organelo, as alterações provocadas por hormonas sexuais constitui matéria pouco investigada. Consequentemente, neste trabalho, de modo a avaliar o impacto de compostos com actividade estrogénica (de origem natural e antropogénica) sobre a regulação peroxissomal em peixes, as trutas fário foram sujeitas, por imersão, à acção de um estrogénio natural, o 17β -estradiol, e de dois pseudo-estrogénios, os alquilfenóis 4-tert-butilfenol e o 4-nonilfenol, sendo este dois últimos testados, quer isoladamente, quer em mistura.

Contudo, uma via de exposição vulgarmente utilizada em estudos realizados sob a acção do 17 β -estradiol nos peixes consiste na injeccção intraperitoneal (Idler e Campbell, 1980; Van Bohemen et al., 1982; Haux e Norberg, 1985; Purdom et al., 1994; Nimrod e Benson, 1996). Esta via de exposição é vantajosa devido à rapidez do seu efeito e às pequenas doses que são empregues, pois as perdas são muito diminutas (Ankley et al., 1998). No entanto, um ensaio preliminar com injeccção de 17 β -estradiol (5 mg/Kg) revelou-se inadequado, uma vez que os peixes reagiram mal ao tratamento, tendo morrido ou ficado gravemente doentes ao fim de poucos dias, o que tornou pouco recomendável a aplicação deste método em truta fário. As contaminações, os traumatismos e o stresse provocado pelo manuseamento e injeccção, podem ter estado na origem da debilidade física das trutas e consequente mortalidade. Além disso, este resultado pode ser igualmente devido à existência de diferenças interespecíficas nos peixes relativas à sensibilidade ao estradiol (Routledge et al., 1998). Assim, em certos estudos utilizando, por exemplo, a truta arco-íris, apesar desta ter sido injectada com doses de 17 β -estradiol iguais ou mesmo superiores àquelas por nós administradas, tal facto nada alterou a sua taxa de sobrevivência (Idler e Campbell, 1980; Haux e Norberg, 1985). Face a esta situação, optou-se pela exposição dos peixes aos químicos através da água, até porque esta é uma via de exposição relevante e até mais realista em estudos ambientais.

No entanto, esta via de exposição ao 17 β -estradiol e alquilfenóis pode igualmente envolver outros problemas tais como: a diminuição da absorção por parte dos peixes destes compostos altamente lipofílicos devido, quer à sua incompleta dissolução na água, quer à sua adesão às paredes do tanque e restos de comida; a sua degradação microbiana e pela luz ou, simplesmente, devido à sua volatilização (Ekelund et al., 1993; Ankley et al., 1998). Como consequência, a concentração nominal de exposição escolhida, pode sofrer uma diminuição ao longo da duração da experiência, o que faz com que a concentração real do químico seja diferente da pretendida (Gray e Metcalfe, 1997; Routledge et al., 1998; Pedersen et al., 1999). Para minimizar os inconvenientes decorrentes de tal situação que poderiam interferir com os resultados, procedeu-se a uma renovação da água dos tanques e respectivos compostos de 48 em 48 horas, procurando, deste modo, garantir a manutenção da dosagem durante os 30 dias de exposição.

No que respeita o 17 β -estradiol, não foi preocupação fundamental deste trabalho reproduzir condições de poluição verificadas no meio aquático, mas sim uma situação fisiológica. Por isso foram empregues concentrações nominais do esteroide (50 μ g/L e 100 μ g/L) que procuraram reproduzir o estímulo estrogénico existente nas trutas fário durante o período vitelogénico. A este respeito, a concentração reduzida utilizada no primeiro ensaio (1 μ g/L)

revelou não ter efeitos significativos sobre os peroxissomas, que se mantiveram idênticos aos dos animais controlo.

Aliás, constatou-se que os níveis nominais de 17 β -estradiol utilizadas neste trabalho foram superiores às concentrações encontradas no meio ambiente. Por exemplo, em Israel, foram detectados níveis de 17 β -estradiol variando entre 0,0048 a 0,151 $\mu\text{g/L}$ e entre 0,0027 a 0,048 $\mu\text{g/L}$ em certos esgotos e efluentes oriundos de estações de tratamento de águas residuais, respectivamente (Shore et al., 1993). Em Inglaterra, na análise de possíveis compostos estrogénicos presentes nos efluentes de algumas estações de tratamento de águas residuais domésticas, constatou-se que o estrogénio em causa se encontrava numa concentração compreendida entre 0,001 a 0,05 $\mu\text{g/L}$ (Desbrow, 1998).

Neste estudo, no que concerne à concentração dos alquilfenóis (750 $\mu\text{g/L}$), ela foi calculada com base na sua fraca actividade estrogénica em comparação com o 17 β -estradiol, tendo sido já aplicados em doses idênticas ou mesmo superiores por outros autores em estudos utilizando machos de carpa (*Cyprinus carpio*) sujeitos ao 4-tert-pentilfenol (Gimeno et al, 1996, 1998). Num destes trabalhos (Gimeno et al, 1996), comprovou-se que tais machos, após a exposição ao alquilfenol mencionado durante o período de diferenciação dos testículos, apresentavam características femininas, incluindo o desenvolvimento de ovo-testis.

Relativamente aos alquilfenóis, e mais particularmente ao 4-nonilfenol, as concentrações aqui empregues, apesar de terem já sido detectadas em certos afluentes e efluentes das estações de tratamento de águas residuais, são mais elevadas do que aquelas encontradas na maioria dos ecossistemas aquático poluídos (Naylor, 1992). Assim, e ao contrário do que acontece com o butilfenol, os níveis de nonilfenol, particularmente nos efluentes provenientes das estações de tratamento de águas residuais, nos rios e estuários, estão razoavelmente bem documentadas. Foram detectadas quantidades de nonilfenol compreendidas entre 23 $\mu\text{g/L}$ a 1 mg/L nos efluentes provenientes de uma estação de tratamento pertencente a uma indústria química (Naylor, 1992), enquanto que naqueles provenientes de uma estação de tratamento de águas municipais encontraram-se níveis do composto referido situados entre 0,8 a 15,1 $\mu\text{g/L}$ (Lee e Peart, 1995). Similarmente, nos efluentes resultantes de certas estações de tratamento no Canadá, registaram-se níveis de nonilfenol que variaram entre < 0,02 a 13 $\mu\text{g/L}$. Contudo, nos esgotos sem tratamento prévio que afluíam a essas estações, verificou-se que a concentração deste composto rondava os 8,4 a 850 $\mu\text{g/L}$ (Bennie et al., 1998).

Na generalidade dos rios, o nonilfenol raramente excede os 10 $\mu\text{g/L}$, embora exista uma grande variação nas concentrações relatadas, principalmente naqueles que recebem enormes

quantidades de efluentes industriais (Naylor et al., 1992). Assim, níveis de nonilfenol tão elevados como 180 µg/L, foram detectados em alguns rios do Reino Unido (Blackburn e Waldoock, 1995), 60 µg/L em certos rios da Suíça (Ahel et al., 1994b) e 17µg/L num estuário, na Croácia (Kvestak e Ahel, 1994). Nos estuários do Reino Unido, as concentrações de nonilfenol são, geralmente, mais baixas do que aquelas encontradas nos rios (Blackburn e Waldoock, 1995). Relativamente a certas fontes de água potável, foram também detectados níveis de nonilfenol iguais a 1 µg/L (Clark et al., 1992).

Devido à elevada hidrofobicidade e relativa persistência à degradação microbiana causada pela presença da cadeia ramificada alquil e do anel aromático, os alquilfenóis, têm uma grande apetência para serem adsorvidos pelos sedimentos e matéria orgânica (White et al., 1993; Corti et al., 1995; Heinis et al., 1999; Tanghe et al., 1999). Deste modo, registaram-se nas lamas resultantes dos esgotos tratados anaerobicamente nas estações de tratamento de águas residuais, quantidades de nonilfenol compreendidas entre 0,45 a 2,53 g/Kg, (Giger et al., 1984), enquanto que concentrações do mesmo químico iguais a 13,1 g/Kg foram encontradas nos sedimentos do rio Glatt, na Suíça (Ahel et al., 1994b).

No presente estudo, a análise estereológica dos peroxissomas hepáticos em exemplares imaturos de truta fário revelou-nos que apenas naqueles pertencentes aos peixes expostos ao 17β-estradiol na concentração de 100 µg/L, as alterações morfológicas foram evidentes comparativamente com o controlo. Tais modificações traduziram-se por uma redução no tamanho, volume e superfície média dos peroxissomas, sendo estas acompanhadas por um aumento da sua densidade numérica e de superfície (isto é, a área total da membrana expressa por unidade de volume celular). Assim, a redução de tamanho parece ter sido compensada pelo aumento do número, de modo que a densidade volumétrica do compartimento peroxissomal não fosse alterada relativamente ao citoplasma ou ao volume total da célula.

Neste trabalho experimental, os resultados obtidos nas trutas expostas ao 17β-estradiol na dose mais elevada são comparáveis àqueles exibidos pelos peixes zebra machos sob acção do 17β-estradiol dissolvido na água na concentração de 1 µg/L (cuja exposição ao 17β-estradiol se assumiu ter induzido a síntese de vitelogenina), embora tal não fosse comprovado analiticamente (Veranic e Pipan, 1992). Assim, os peroxissomas do peixe zebra sofreram, igualmente, uma redução do diâmetro acompanhada por um aumento, quer da densidade de superfície, quer da densidade numérica, mas não da densidade volumétrica. Em virtude de tais resultados, parece-nos de admitir que os peroxissomas da truta fário sejam menos sensíveis aos efeitos do 17β-estradiol do que os do peixe zebra. É assim novamente possível inferir a existência de

diferenças interespecíficas relativamente à acção desta hormona sobre os peroxissomas destes animais.

Em comparação com os resultados obtidos num estudo sazonal efectuado com a mesma espécie, mas em indivíduos com cerca de 3 anos de idade (Rocha et al., 1999), verificou-se pois que, a única semelhança encontrada entre as variáveis estereológicas determinadas no presente estudo consistiu no facto de os peroxissomas, durante o ciclo reprodutivo natural, no período vitelogénico (Setembro a Dezembro), época que que o 17 β -estradiol no plasma atinge os seus níveis máximos, sofrerem, simultaneamente, uma diminuição relevante no seu diâmetro, superfície e volume médio peroxissomal, bem como um aumento na razão superfície/volume. Por outro lado, os parâmetros relativos densidade volumétrica e densidade de superfície (peroxissoma/célula), registaram um decréscimo significativo nas fêmeas em vitelogénese, não se tendo observado qualquer alteração na densidade numérica, alterações apenas parcialmente sobreponíveis às ocorridas neste trabalho experimental no grupo tratado com 100 μ g /L de 17 β -estradiol.

A variação em sentido oposto do diâmetro médio e da densidade numérica dos peroxissomas hepáticos de truta fário após exposição ao esteróide na dose de 100 μ g/L foi também observada noutros trabalhos. Por exemplo, num estudo efectuado em pacientes com esteatose, constatou-se ocorrer uma diminuição significativa no diâmetro médio peroxissomal (cerca de 87%), sendo este acompanhado por uma elevação da sua densidade numérica (para 133%), relativamente ao grupo de indivíduos controlo (De Craemer et al., 1995). O mesmo aconteceu, embora de modo menos pronunciado, naqueles pacientes sofrendo de colestasia (De Craemer et al., 1998).

As modificações sofridas no tamanho e número de peroxissomas observadas neste estudo provocou um ligeiro aumento, apesar de significativo, na sua densidade de superfície e na razão superfície-volume. Acresce que nos mamíferos, a indução de peroxissomas mais pequenos e abundante em comparação com os dos animais controlo, foi também já observada em indivíduos alimentados com dietas ricas em gorduras e em certos casos de cancro (Christiansen et al., 1981, De Craemer et al., 1993). Como sabemos, os processos metabólicos nos peroxissomas são determinados pela quantidade de enzimas presentes, pela capacidade de importar substratos e exportar os produtos das reacções e pelo transporte, através da sua membrana, de moléculas recém sintetizadas ou obsoletas (importação e exportação, respectivamente), tornando assim possível os mecanismos de “turnover” dos constituintes peroxissomais (De Craemer et al., 1993, 1995). Devido ao facto dos peroxissomas mais pequenos possuírem uma razão superfície-volume mais elevada relativamente aos maiores, foi já sugerido que a redução do tamanho dos

peroxissomas acompanhada pelo aumento do seu número facilita a troca de substratos e produtos de reacção através da membrana peroxissomal, especialmente quando a densidade volumétrica não sofre redução (De Craemer et al., 1993, 1995). Deste modo, tais modificações peroxissomais do fígado das truta fário sujeitas à dose mais elevada de 17β -estradiol, poderão reflectir a resposta destes organelos contra a diminuição substancial das actividades enzimáticas. Contudo, nas fêmeas de truta fário, durante o período vitelogénico, a diminuição ocorrida nas dimensões dos peroxissomas não foi compensada pelo aumento do seu número (Rocha et al., 1999). Por outro lado, o transporte através das membranas peroxissomais pode depender de outros factores. Para ser possível aumentar a capacidade de importação de enzimas peroxissomais, por exemplo, não basta ocorrer um aumento da sua superfície, mas terá também de se verificar um incremento em todos os componentes integrantes da maquinaria de importação, entre os quais se incluem os receptores dos PTS, que se encontram na membrana peroxissomal. Estes mecanismos de transporte de proteínas têm sido mais estudados no caso das leveduras, embora permaneçam algumas dúvidas (Erdman et al., 1997).

Situação igualmente interessante, indicadora de uma regulação dos peroxissomas pelo 17β -estradiol, foi aquela observada nas glândulas uropigiais de patos fêmeas na época do acasalamento. Nestas, bem como nos machos injectados com 17β -estradiol, observou-se a produção da feromona feminina (diésteres de ácidos gordos 3-hidroxi) naquelas glândulas. Os estudos de microscopia electrónica sugeriram o envolvimento dos peroxissomas na síntese desta feromona ao demonstrarem a indução de peroxissomas de maiores dimensões, bem como em grande número, na glândula uropigial das fêmeas, durante o período de acasalamento, e nos machos injectados com 17β -estradiol (Bohnet et al., 1991). Assim, neste caso, o 17β -estradiol comportou-se como um proliferador peroxissomal, papel contrário ao que exerceu sobre os peroxissomas hepáticos de truta fário em condições naturais (Rocha et al., 1999). Já no presente estudo, nas trutas sob acção do 17β -estradiol na concentração de $100 \mu\text{g/L}$, este, parece ter exercido um efeito parcialmente semelhante ao ocorrido na glândula uropigial dos patos pois, de igual modo, observou-se um aumento da densidade numérica dos peroxissomas hepáticos. Contudo, não houve na truta fário um aumento da dimensão dos organelos, mas, pelo contrário, uma redução.

Convém realçar o facto de no actual trabalho não se ter procedido à determinação do volume médio dos hepatócito. Por isso, o aumento relativo do número de peroxissomas nos animais tratados com $100 \mu\text{g/L}$ de 17β -estradiol, poderá não corresponder a um acréscimo do número total de peroxissomas por célula. Portanto, três situações podem ter ocorrido: 1) uma diminuição do volume dos hepatócitos que poderá ter levado a um aumento da densidade

numérica peroxissomal, mas não necessariamente do seu número efectivo por célula; 2) um aumento da densidade numérica peroxissomal bem como do seu número efectivo por célula, apesar da diminuição do volume absoluto do hepatócito; 3) embora não ocorrendo modificações do volume dos hepatócitos, pode existir um aumento da densidade numérica peroxissomal e do seu número efectivo por célula. Contudo, como à medida que o nível do 17 β -estradiol é mais elevado parece haver, quer uma ligeira diminuição do volume dos hepatócitos, quer um aumento do número destas células por fígado (Rocha, 2000), o mais provável no presente estudo foi não ter ocorrido um acréscimo real do número absoluto de peroxissomas por célula.

No meio aquático, um excelente biomarcador para a determinação da actividade estrogénica de um xenobiótico nos vertebrados ovíparos, principalmente, nos peixes machos, consiste na medição do precursor do vitelo, a vitelogenina (Sumpter e Jobling, 1995; Ankley et al., 1998; Kime et al., 1999). O 17 β -estradiol é o principal estrogénio vitelogénico em fêmeas de teleósteos, (Chester-Jones et al., 1987), apesar de os testículos de alguns peixes, como acontece com os machos da truta arco-íris e da carpa, poderem também produzir pequenas quantidades de estradiol (Fostier et al., 1983). Além do mais, os peixes machos, assim como os juvenis imaturos possuem, igualmente, o gene da vitelogenina. Tudo isto faz com que estes, tal como nas fêmeas, quando na presença do 17 β -estradiol, sejam capazes de sintetizar a referida proteína (Idler e Campbell, 1980; Maitre et al., 1985; Kime et al., 1999). Contudo, nos peixes imaturos e nos machos em condições normais, os níveis desta glicolipofosfoproteína são muito baixos, não sendo correlacionáveis com o estado de maturidade sexual, contrariamente ao que acontece nas fêmeas (Copeland et al., 1986).

São ainda limitados os estudos baseados na indução da vitelogenina usando espécies de água doce ou salgada. Para além disso, a comparação dos resultados entre as diferentes espécies e a amplitude das suas respostas são dificultadas pelos vários métodos de exposição empregues (por dissolução na água ou por injeção intraperitoneal) e uso de diversos compostos estrogénicos (Allen et al., 1999). No entanto, os nossos resultados claramente demonstram que a truta fário imatura é extremamente sensível ao 17 β -estradiol nas concentrações testadas e respondem produzindo níveis elevados de vitelogenina; em relação ao grupo controlo, foram observados aumentos de cerca de 52.000, 300.000 e 180.000 vezes da concentração desta proteína no plasma após 30 dias de exposição ao estrogénio nas concentrações de 1 μ g/L, 50 μ g/L e 100 μ g/L, respectivamente. Contudo, uma resposta de igual significância (teste de Duncan: $p < 0,001$) foi observada entre os grupos controlo e de tratamento anteriormente referidos.

Aliás, com base no doseamento plasmático de 17 β -estradiol por EIA, parece não haver uma relação entre os valores de vitelogenina induzidos por esta hormona e as diferentes doses de

17 β -estradiol plasmático quantificadas nos grupos de trutas controlo e nos sujeitos ao esteróide a 50 $\mu\text{g/L}$ e a 100 $\mu\text{g/L}$. Neste trabalho, constatou-se não terem ocorrido quaisquer diferenças significativas nos níveis plasmáticos de 17 β -estradiol entre os grupos de peixes atrás mencionados. No entanto, apesar do valor de 17 β -estradiol plasmático doseado nos animais expostos a esta hormona na dose de 50 $\mu\text{g/L}$ ser inferior aquele quantificado nos peixes controlo, os níveis vitelogénicos foram muito superiores naquele grupo de animais. Assim, uma aparente falta de correlação positiva parece ocorrer entre os níveis plasmáticos de vitelogenina e de 17 β -estradiol doseados nos grupos de animais referidos. Esta situação talvez se deva ao facto dos estrogénios naturais, ao contrário do que sucede com as hormonas estrogénicas sintéticas (como por exemplo acontece com o 17 α -etinilestradiol e o mestranol) serem, tal como ocorre no homem, destruídas no fígado num curto período de tempo, após a sua absorção gastrointestinal para a circulação porta (Guyton e Hall, 1996). Deste modo, quando se procedeu à quantificação do 17 β -estradiol plasmático nas trutas expostas à concentração de 50 $\mu\text{g/L}$, o nível real desta hormona já era muito baixo devido a sua rápida degradação hepática.

Como nos indivíduos tratados com 17 β -estradiol na dose de 100 $\mu\text{g/L}$ se registou uma taxa de mortalidade considerável (71%) bem como uma menor dose plasmática nos níveis de vitelogenina comparativamente aos obtidos pelos peixes expostos ao 17 β -estradiol na concentração de 50 $\mu\text{g/L}$, tais factos poderão ser devidos à toxicidade do estrogénio quando aplicado em doses tão elevadas, tal como descrito para *Xenopus leavis*, na truta arco-íris e na solha de Verão (*Paralichthys dentatus*) (Hamilton, 1977; Herman e Kincaid, 1988; Folmar et al., 2001). Alíás, a medaca japonesa parece ser ainda mais sensível aos efeitos resultantes do estrogénio do que a truta fário, pois na exposição daquela ao 17 β -estradiol nas concentrações de 0,1 $\mu\text{g/L}$, 1 $\mu\text{g/L}$ e 10 $\mu\text{g/L}$, observou-se uma taxa de mortalidade de 21%, 33% e 69%, respectivamente (Nimrod e Benson, 1998)

O 17 β -estradiol é conhecido por estimular a síntese da vitelogenina no decorrer da vitelogénese, a qual será captada pelo ovócito em desenvolvimento (Yoshikuni e Nagahama, 1991). A esta etapa deve-se cerca de 95% do peso final do ovo (Tyler, 1991). Nos teleósteos, a vitelogénese é promovida por um mecanismo em dois passos, no qual as gonadotrofinas aumentam a secreção de 17 β -estradiol pelo ovário, que por sua vez estimula a síntese hepática e induz a transcrição do gene da vitelogenina (Chester-Jones et al., 1987). Ou seja, o gene da vitelogenina é sensível ao 17 β -estradiol, estando a expressão daquela glicolipofosfoproteína dependente da interacção do estrogénio com o respectivo receptor (Chen, 1983). Uma vez

segregada dos hepatócitos para o sangue, a vitelogenina chega ao ovário, atravessa as camadas foliculares em volta do ovócito em crescimento, liga-se a um receptor altamente selectivo na superfície daquele e é então captada por um processo de endocitose mediada por receptores. Na truta, a sequestração da vitelogenina é extremamente rápida, sendo a sua taxa superior nos foliculos maiores (Chester-Jones et al., 1987; Evans, 1998)

Contudo, quando as gonadotrofinas que estimulam a deposição da vitelogenina nos ovócitos não estão presentes, ou quando as gónadas não contêm ovócitos (óvarios imaturos ou testículos) de modo a permitir a sua sequestração da corrente sanguínea, esta proteína vai acumular-se fora das gónadas (Herman e Kincaid, 1988; Folmar et al., 2001). São necessários cerca de cinco meses para os peixes machos eliminarem a vitelogenina do sangue, mesmo após a retirada do estímulo estrogénico (Elliot et al., 1979). Para além da vitelogenina, proteínas ditas coriogénicas, são também induzidas pelo 17β -estradiol (Hyllner et al., 1991; Aruke et al., 1997; Yadetie et al., 1999). Do mesmo modo que a vitelogenina, as restantes proteínas referidas são também denominadas proteínas “órfãs” nos peixes machos ou fêmeas imaturas, devido à ausência do local próprio (ovário maduro) para a sua deposição (Folmar et al., 2001). Assim, devido às elevadas concentrações de proteínas no plasma, as vias normais para a sua eliminação ficam subcarregadas, acabando por se acumular em certos órgãos tais como no intestino, fígado, rins e até nos próprios testículos (particularmente dentro dos ductos seminíferos e tecidos intersticiais), o que pode originar hemorragias locais, conduzindo, em casos extremos à morte (Herman e Kincaid, 1988; Folmar et al., 2001). Por outro lado, a síntese contínua de vitelogenina pode conduzir a um elevado consumo de aminoácidos e lípidos vitais, bem com à perda de cálcio das escamas e esqueleto dos peixes o que, provavelmente, debilitará o seu sistema imunológico, tornando os indivíduos mais susceptíveis às doenças (Carragher e Sumpter, 1991).

Um aumento altamente significativo de vitelogenina, embora sendo de menor magnitude comparativamente com as observadas nos peixes expostos a qualquer uma das doses de 17β -estradiol, ocorreu também nos peixes sujeitos aos alquilfenóis, quer isoladamente, quer em simultâneo, o que demonstra o efeito estrogénico dos químicos mencionados. Aliás se níveis baixos de vitelogenina no plasma, na ordem dos $0,22 \mu\text{g/ml}$, foram doseados nos peixes controlo, sendo portanto superiores àqueles quantificados em peixes imaturos de outras espécies (Van Bohemen et al., 1982; Copeland et al., 1986) então, nos peixes sob a acção conjunta dos alquilfenóis, um aumento para $5502 \mu\text{g/ml}$, representou uma indução de aproximadamente 25.000 vezes. Para além disso, nos animais tratados com 4-tert-butilfenol foi encontrada uma concentração plasmática de $3752 \mu\text{g/ml}$ de vitelogenina, o que correspondeu um aumento de 17.000 vezes. No que se refere às trutas expostas ao 4-nonilfenol, o aumento para $2740 \mu\text{g/ml}$

desta proteína equivaleu a um acréscimo de cerca de 12.500 vezes. Contudo, apesar dos resultados obtidos, verificou-se a ausência de qualquer diferença significativa entre os grupos expostos ao 4-nonilfenol e ao 4-tert-butilfenol. Assim, podemos ordenar estes alquilfenóis por ordem de potência estrogénica de acordo com a magnitude da resposta obtida na truta fário: 4-tert-butilfenol + 4-nonilfenol > 4-nonilfenol = 4-tert-butilfenol.

Se por um lado é consistente a informação disponível sobre a potência estrogénica *in vivo* e *in vitro* dos alquilfenóis relativamente ao 17 β -estradiol, o mesmo já não acontece quando se procede à comparação de tal actividade entre os diferentes alquilfenóis. Concordantes com os nossos resultados, relativamente à acção isolada do 4-nonilfenol e 4-tert-butilfenol, foram os obtidos por Soto et al. (1992) com culturas de células cancerígenas da glândula mamária (MCF-7). Por sua vez, ensaios *in vitro* usando estirpes recombinantes de leveduras, constataram que uma única dose de 4-nonilfenol era mais potente do que a de 4-tert-butilfenol (Routledge e Sumpter, 1997). Já o bioensaio efectuado com culturas de hepatócidos da truta arco-íris obteve resultados contrários a este último relatado (Jobling e Sumpter, 1993).

Quando comparamos entre si a potência relativa dos alquilfenóis, nos diversos sistemas de ensaios, a disparidade de resultados observados pode ser devida a diferentes factores, tais como os relacionados com as características do produto utilizado e seu modo de administração, bem como os inerentes à própria espécie (Beresford et al., 2000; Hasmlal et al., 2000). É presentemente conhecido o facto de características químicas particulares serem necessárias para a actividade estrogénica. Verificou-se que apenas os alquilfenóis com um grupo alquil possuindo 3 carbonos, no mínimo, apresentam a referida actividade, sendo esta óptima naqueles com um grupo alquil com ramificação terciária (Routledge e Sumpter, 1997).

Os alquilfenóis disponíveis comercialmente consistem numa mistura complexa de homólogos, isómeros e oligómeros. Isto sugere que pode haver apenas um composto com uma forma estrogénica estruturalmente activa. A separação destas misturas em isómeros e oligómeros é necessária para responder a esta questão (Routledge e Sumpter, 1996). Ora, segundo a informação do distribuidor, o nosso composto 4-nonilfenol continha 90% de isómeros *para* deste alquilfenol. No entanto, nenhuma informação nos foi facultada à cerca da composição da solução 4-tert-butilfenol. Assim, diferenças existentes na constituição dos dois compostos alquilfenólicos mencionados relativamente à quantidade presente de isómeros *para* lineares, com ramificação secundária ou terciária, bem como a respectiva concentração molar de cada um deles, podem ter influenciado os resultados obtidos.

Outro aspecto importante a considerar quando se avalia a potência dos alquilfenóis ou outros compostos estrogénicos diz respeito aos factores inerentes ao próprio organismo, tais

como: o sexo e seu estado de desenvolvimento; a quantidade de receptores estrogénicos existentes no fígado e sua afinidade de ligação, seja para o químico, seja para a proteína transportadora (globulina de ligação das hormonas sexuais), as quais normalmente actuam como mecanismos de armazenamento das hormonas esteróides; a capacidade dos alquilfenóis para serem bioacumulados, metabolizados e conseqüentemente excretados (Pottinger, 1986; Pakdel et al., 1991; Smith and Thomas, 1991; Campbell et al., 1994; Thomas, 1997; Spearow et al., 1999).

Os avanços da civilização, inevitavelmente interligados com o aumento da população, fazem com que volumes de água cada vez maiores sejam utilizados, originando, assim, quantidades crescentes de esgotos, quer industriais, quer domésticos e, no melhor dos casos, de efluentes oriundos das estações de tratamento de águas residuais, acabando, em ambos os casos, por serem despejados nos rios, mares e lagos. Deste modo, os peixes e restantes organismos próprios destes habitats ficam expostos, provavelmente, não apenas a um químico estrogénico, mas sim a uma complexa mistura de compostos de natureza estrogénica natural ou antropogénica, devido à sua parcial ou completa resistência à biodegradação, mesmo durante os processos de tratamento (Desbrow et al., 1998). Embora estes compostos possuam, na sua maioria, um baixo grau de actividade estrogénica, quando combinados podem originar a ocorrência de possíveis efeitos aditivos ou sinérgicos entre eles.

De modo a estudar estes prováveis efeitos, foi incluído neste estudo um grupo de trutas já mencionado, sujeito a ambos os pseudo-estrogénios 4-nonilfenol e 4-tert-butilfenol. Assim, neste grupo, constatou-se ter ocorrido um efeito estrogénico superior em comparação com aquele tratado com o 4-nonilfenol ($p < 0,01$), não havendo diferenças significativas relativamente aos peixes sujeitos ao 4-tert-butilfenol. Portanto, a exposição das trutas ao 4-nonilfenol simultaneamente com o 4-tert-butilfenol estimulou significativamente mais a expressão do gene da vitelogenina do que aquela induzida pelo 4-nonilfenol isoladamente. Portanto, os nossos resultados sugerem-nos que a potência estrogénica de certos pseudo-estrogénios, quando testada isoladamente, corre o risco de ser subestimada. Com base nesta informação preliminar, podemos afirmar que o efeito observado nesta experiência, embora não sendo sinérgico ou aditivo, foi certamente acrescido. Por outro lado, os resultados relatados por Arnold et al. (1996) evidenciaram os efeitos sinérgicos resultantes da junção de 2 compostos, também com conhecido efeito estrogénico. Contudo, presentemente, gerou-se uma controvérsia à volta deste resultados iniciais, admitindo-se ser tal efeito meramente aditivo (Gillesby et al., 1998). Estes resultados estão de acordo com a ideia de que a interacção de múltiplos químicos com o receptor estrogénico implica a existência de complexas vias de comunicação entre os sistemas biológicos e os agentes ambientais (Arnold et al., 1996).

Foi preocupação deste trabalho estudar quantitativamente, com base em métodos estereológicos clássicos, as alterações morfológicas induzidas pelo 17 β -estradiol, aos peroxissomas dos hepatócitos. Contudo, devido à magnitude das modificações citológicas observadas nestas células, nomeadamente no que respeita ao glicogénio, retículo endoplasmático rugoso, mitocôndrias e corpos densos, estas foram dignas de breves considerações baseadas numa análise atenta, apenas em termos qualitativos. O grau das alterações ultra-estruturais verificadas nos hepatócitos de truta fário, que parecem ter afectado os organelos atrás mencionados, supõe-se estar dependente da dose de 17 β -estradiol a que os peixes foram submetidos (1 μ g/L e 100 μ g/L), sendo, portanto, mais pronunciado nos peixes tratados com o estrogénio na concentração mais elevada.

Deste modo, relativamente aos animais controlo, notou-se uma diminuição na quantidade de glicogénio existente nos hepatócitos, parecendo tal decréscimo ser superior nos animais tratados com 100 μ g/L onde, aliás, se constatou o seu desaparecimento no final do período de exposição. Este efeito é concordante com o de outros estudos bioquímicos e histológicos previamente descritos em várias espécies de teleósteos, os quais demonstram também ocorrer uma depleção do glicogénio após exposição ao 17 β -estradiol, assim como durante o período vitelogénico (Haux e Norberg, 1985; Veranic e Pipan, 1992; Rocha, 2000). O decréscimo dos níveis de glicogénio na vitelogenese é um dado a favor da teoria que sustenta que existe uma progressiva exaustão das reservas hepáticas de glicogénio durante todo o período vitelogénico natural, o qual será devido aos crescentes níveis de esteróides femininos (Bohemen et al., 1982; Rocha, 2000).

Comparativamente com os animais controlo, ocorreu também uma dilatação das cisternas do retículo endoplasmático rugoso, sendo este efeito observado nalguns dos hepatócitos dos peixes tratados com 17 β -estradiol na dose de 1 μ g/L mas, principalmente, na maioria daqueles pertencentes aos indivíduos sob acção do 17 β -estradiol na concentração de 100 μ g/L. Nestes animais, o retículo aparece, por vezes, fragmentado. A dilatação do retículo endoplasmático rugoso foi também observada no peixe Zebra exposto durante 30 dias a 1 μ g/L de 17 β -estradiol (Veranic e Pipan, 1992). Tal alteração ultra-estrutural pensa-se ser atribuída a um aumento da síntese proteica, associada a uma reduzida actividade secretora daquela (Folmar et al., 2001; Arnold et al., 1995).

Relativamente às mitocôndrias, verificámos que à medida que o nível de 17 β -estradiol a que as trutas foram sujeitas aumenta, o número de mitocôndrias que surgem dilatadas, parece também aumentar. Admite-se que estas alterações sejam o reflexo do stresse metabólico a que

estes organelos se encontram sujeitos devido à anormal e activa síntese de vitelogenina (Bohemen et al., 1981).

O aparecimento de corpos densos mais volumosos e em maior número parece ter acontecido nos hepatócitos dos peixes sujeitos à concentração superior de 17β -estradiol, em comparação com o controlo. Em trabalhos realizados anteriormente com a truta fário verificou-se que estes organelos apresentam variações sazonais (Rocha, 2000). No período vitelogénico, tanto o volume por célula como por fígado aumentaram, tendo sido estimado um maior volume total de corpos densos nos hepatócitos das fêmeas. Já na época pós-reprodutiva, e para ambos os sexos, constatou-se uma regressão das referidas estruturas. Deste modo, foi proposto que a quantidade de lisossomas seja também regulada pelos níveis plasmáticos de esteróides femininos (Rocha, 2000). Por outro lado, é também possível que a formação dos corpos densos esteja relacionada com a secreção de proteínas (vitelogenina e outras) (Bohemen et al., 1981; Folmar et al., 2001).

No presente trabalho, as alterações já descritas para os níveis de vitelogenina e índice hepato-somático, levam-nos a supor ter-se desencadeado nas trutas sob influência do 17β -estradiol na dose de $50 \mu\text{g/L}$ um processo idêntico àquele que ocorre durante o período vitelogénico. Tal hipótese é apoiada em estudos efectuados com trutas fário adultas, pois em fêmeas em fase vitelogénica constatou-se não só uma redução semelhante nas actividades enzimáticas por nós analisadas (Rocha et al., 2000a), como também o tipo de modificações celulares já mencionadas, para além de um aumento no índice referido (Rocha, 2000). Este acréscimo supõe-se ser devido ao aumento do número de hepatócitos (hiperplasia) em contraposição ao dogma vigente de que variações sazonais no peso do fígado (nomeadamente na época pré-reprodutiva) são devidas a modificações (hipertrofia) no volume de cada hepatócito. Tais trabalhos demonstraram também que o volume de certos organelos por célula, como por exemplo do retículo endoplasmático rugoso e do aparelho de Golgi, os quais proliferaram, não se alteraram ao longo do ciclo reprodutivo, sendo contudo maior o seu volume total hepático nas fêmeas em vitelogénese (Rocha, 2000).

Por outro lado, a concentração mais elevada de 17β -estradiol parece causar sobre os hepatócitos dos peixes consequências prejudiciais. Assim, os efeitos decorrentes de uma elevada síntese de vitelogenina, os quais parecem ter conduzido a uma exaustão metabólica da célula, aliada, provavelmente, ao do efeito tóxico do 17β -estradiol, parecem traduzir-se por um aumento das cisternas fragmentadas do retículo endoplasmático rugoso e de mitocôndrias dilatadas. Acresce que, neste grupo de peixes, o aumento do número de peroxissomas por unidade de volume de hepatócito e, uma vez que tal situação não ocorre nas fêmeas maduras durante o

período vitelogénico (Setembro-Dezembro) (Rocha et al., 1999), tal alteração morfológica poderá ser também indicadora do efeito toxicológico resultante do 17β -estradiol quando presente em quantidades tão elevadas. Esta situação manifestou-se nestas trutas por uma perda do seu apetite e diminuição da sua mobilidade. A confirmação deste estado é nos dada pelo factor de condição destes trutas, pois embora não sendo significativamente diferente dos restantes grupos de animais tratados com o 17β -estradiol, apresenta o valor menos favorável, bem como a taxa de mortalidade superior. Para além disso, constatamos ter ocorrido nestes animais uma queda abrupta da actividade, quer por grama de fígado, quer por miligrama de proteína das enzimas estudadas.

Se por um lado, na truta fário, ao longo do seu ciclo reprodutor, e mais particularmente durante o mês de Setembro (período vitelogénico), a redução observada nas actividades enzimáticas dos peroxissomas hepáticos (catalase e oxidases do urato, glicolato e palmitoil-CoA), conjuntamente com a manutenção do seu número absoluto, parece estar relacionada com a diminuição do volume absoluto dos peroxissomas por hepatócito (Rocha et al., 1999; Rocha et al., 2000a), é provável o mesmo não acontecer na actual situação experimental. Isto porque, apesar de nos peixes sujeitos à dose máxima de 17β -estradiol ($100 \mu\text{g/L}$) ter igualmente ocorrido uma diminuição no volume médio dos peroxissomas hepáticos, esta, ao contrário do que sucedeu na situação natural acima descrita, ao ser acompanhada por um aumento na densidade numérica destes organelos, fez com que a sua densidade volumétrica não fosse significativamente diferente do grupo de trutas controlo.

Este trabalho, como já havia mencionado, para além de pretender investigar as alterações morfológicas dos peroxissomas causadas pelo 17β -estradiol, teve também como objectivo estudar as variações de certas actividades enzimáticas pertencentes àquele organelo induzidas por tal hormona, procurando, deste modo, relacioná-las com as modificações estruturais referidas. Para além disso, foram igualmente analisadas as variações enzimáticas causados por alquilfenóis.

Os ensaios realizados decorreram em duas fases distintas. Estas diferiram entre si no que reapeita à idade dos peixes empregues e, também, a certas condições da sua manutenção. Assim, na 1ª fase, as trutas de 1 ano e 3 meses de idade foram mantidas em tanques com a capacidade de 233 L, e temperatura da água de 17°C . Já na 2ª fase experimental, não só os peixes eram um pouco mais novos (1 ano), como também foi inferior a temperatura da água a que os organismos foram expostos, sendo esta de 13°C , possuindo os tanques a capacidade de 319 L.

Sendo a truta fário um peixe de águas frias, é provável que a temperatura relativamente elevada a que foram sujeitas durante o 1º ensaio tenha provocado alterações nas actividades enzimáticas peroxissomais no sentido da sua diminuição por mecanismos ainda desconhecidos,

comparativamente com aquelas exibidas pelas trutas controlo da 2ª fase. Por outro lado, tendo o tanque empregue na 1ª fase menor capacidade do que o da 2ª fase, tal facto, pode ter contribuído para um maior grau de stresse nos peixes controlo primeiramente utilizados devido também à maior probabilidade de confronto entre eles. Esta situação, conjuntamente com o factor temperatura, pode estar na origem das diferentes actividades enzimáticas observadas entre os dois grupos controlo. As diferenças de peso e comprimento verificadas entre tais grupos, maiores para ambos os parâmetros físicos no 1º, devem-se ao facto destes indivíduos serem três meses mais velhos do que os da 2ª fase. No entanto, esta diferença de idade parece não ser um factor importante, uma vez que não foram encontradas diferenças entre as actividades enzimáticas do grupo controlo empregue na 2ª fase e aquelas quantificadas em trutas fãrio com 2 anos de idade na período compreendido entre Fevereiro e Maio, época em que as gónadas estão menos desenvolvidas, e em que há níveis de hormonas circulantes mais reduzidos (Rocha et al., 2000a)

Assim, dependente da dose de 17β-estradiol a que os peixes foram sujeitos, observámos ter ocorrido uma diminuição nas actividades das enzimas peroxissomais analisadas. Contudo tal decréscimo só foi significativamente diferente quando se procedeu à comparação das trutas controlo com os indivíduos sujeitos ao 17β-estradiol nas doses de 50 µg/L e 100 µg/L. Apenas se verifica uma excepção na actividade por grama de fígado da D-aminoácidos oxidase entre os peixes controlo e aqueles tratados com 50 µg/L de 17β-estradiol onde não foi detectada qualquer diferença significativa. Quando se efectuou a comparação das actividades enzimáticas entre os grupos de tratamento sujeitos ao 17β-estradiol, verificámos a ocorrência de uma diminuição significativa com diferentes amplitudes somente no caso da actividade por grama de fígado das oxidases glicolato e D-aminoácidos entre os animais tratados com 50 µg/L e 100 µg/L. Tal facto leva-nos a admitir que, em relação ao grupo controlo, não obstante o maior decréscimo das actividades enzimáticas observado nestas trutas ter sido provocado pelo 17β-estradiol na concentração máxima, este não é estatisticamente diferente para a maioria daqueles registados nos indivíduos tratados com 17β-estradiol na dose de 50 µg/L.

Por outro lado, nos peixes controlo expostos aos alquilfenóis utilizados (4-tert-butilfenol e 4-nonilfenol) e da sua mistura, apenas a actividade da palmitoil-CoA é afectada significativamente relativamente ao controlo, observando-se uma diminuição de maior amplitude nos animais sujeitos ao 4-nonilfenol. Já a actividade por miligrama de proteína da D-aminoácidos oxidase registou também um decréscimo significativo, mas apenas entre o grupo controlo e as trutas tratadas com nonilfenol. Para além do mais, nos peixes tratados com os alquilfenóis, verificou-se que a redução ocorrida nas actividades da catalase e das oxidase glicolato, D-aminoácidos e palmitoil-CoA (nestas duas últimas enzimas apenas quando expressas por miligrama de proteína)

situa-se em níveis intermédios entre os peixes controlo e os animais expostos à água contendo 17 β -estradiol.

Assim, o efeito sobre os peroxissomas teoricamente previsto foi induzido nos animais expostos aos alquilfenóis, pois estes apresentaram, em geral, actividades significativamente mais baixas das enzimas estudadas, como acontece com a palmitoil-CoA oxidase, em comparação com o controlo. Nos animais tratados com os alquilfenóis, assim como naqueles sob a acção do 17 β -estradiol na dose mínima, não foram detectadas, em relação ao respectivo grupo controlo, diferenças significativas entre os parâmetros físicos dos animais. Relativamente às alterações que tais compostos exercem sobre as actividades enzimáticas peroxissomais dos peixes, verificámos que os alquilfenóis reduzem a actividade de certas enzimas, sendo esta significativa apenas para os casos da palmitoil-CoA oxidase, e da D-aminoácidos oxidase (mg de proteína; afectada apenas pelo 4-nonilfenol). O 17 β -estradiol na concentração de 1 μ g/L, embora não tenha provocado a diminuição significativa da actividade de nenhuma das enzimas estudadas, esta situou-se muito próximo do seu limiar de significância para as enzimas catalase e urato oxidase, quando determinadas por miligrama de proteína.

Localizada na matriz dos peroxissomas, a catalase é, muitas vezes, a enzima mais abundante deste organelo. Apesar de muitas vezes ser usada como marcador específico para a identificação dos peroxissomas, é também encontrada noutros compartimentos celulares das células eucarióticas, tal como acontece no retículo endoplasmático, mitocôndrias e citosol (Xian Yu et al., 1997). Esta enzima comporta-se como uma importante barreira antioxidante contra formas reactivas de oxigénio produzidas pela actividade das oxidases flavínicas peroxissomais e outros processos celulares (Shing, 1997). Contrariamente ao que sucede com as enzimas da β -oxidação e certas proteínas da membrana peroxissomal, a transcrição da catalase não pode ser induzida directamente pelos receptores activados dos proliferadores peroxissomais (PPAR) por não possuir o elemento resposta dos proliferadores peroxissomais (PPER). Todavia, nos peixes, bem como noutros animais, foi proposta a indução da catalase mediante condições propícias à criação de formas reactivas de oxigénio (Livingstone et al., 1990; Mihaich e Di Giulio, 1991; Solé et al., 1995; Pedrajas et al., 1996). Pelo contrário, como no presente estudo se verificou uma redução das actividades das enzimas flavínicas analisadas, principalmente nos peixes sujeitos ao 17 β -estradiol nas dose de 50 μ g/L e 100 μ g/L, é provável ter ocorrido um decréscimo na quantidade de formas reactivas de oxigénio produzidas por tais enzimas e, conseqüentemente, ter havido uma menor necessidade para a estimulação da catalase. Aliás, constata-se que a diferença encontrada para a actividade desta enzima entre os peixes controlo e aqueles expostos ao 17 β -estradiol nas concentrações atrás referidas são de grande significância. O mesmo acontece

entre aquelas trutas sujeitas ao 17β -estradiol nas doses de 50 $\mu\text{g/L}$ e 100 $\mu\text{g/L}$. Uma redução na actividade da catalase (próxima dos 40%) foi também observada nos peroxissomas dos ratos expostos ao xenobiótico PCB126, comparativamente ao controlo (Ariyoshi et al., 1998).

Tal como para a catalase, as oxidases D-aminoácidos e glicolato (também conhecida por L- α -hidroxi oxidase A) também não são induzidas por meio de um processo regulado pelo PPAR. Contudo, a função da enzima D-aminoácidos oxidase permanece obscura e portanto, a diminuição da sua actividade encontrada neste trabalho é difícil de interpretar. No entanto, *in vivo*, a D-aminoácidos oxidase parece ter um papel muito importante na desintoxicação dos D-aminoácidos de origem endógena ou exógena (D'Aniello et al., 1993). Muito interessante tem sido a constatação da presença de vários D-aminoácidos em certos peptídeos, os quais se comportam como neurotransmissores nos roedores, anfíbios e, principalmente, nos moluscos (D'Aniello et al., 1993; Yasuda-Kamalani et al., 1995). Tem também sido sugerido que o glioxilato e algumas aminas podem formar *in vivo* aductos, os quais se comportam como excelentes substratos para as oxidases dos D-aminoácidos e glicolato (Zaar, 1992).

Neste trabalho, a diferença encontrada para a actividade da D-aminoácidos oxidase entre as trutas tratadas com a hormona nas doses de 50 $\mu\text{g/L}$ e 100 $\mu\text{g/L}$, em comparação com os peixes controlo, é (tal como acontece para a actividade por grama de fígado da glicolato oxidase nos peixes tratados com 50 $\mu\text{g/L}$ de 17β -estradiol) de menor amplitude relativamente às restantes enzimas. Contudo, um completo desaparecimento desta enzima foi observado nas zonas pericentral e periportal do fígado de ratos quando sujeitos aos conhecidos proliferadores peroxissomais clofibrato e *bis*(2-etilexil)ftalato (van der Munckhof et al., 1998). Por outro lado, um desaparecimento quase total na actividade desta enzima, por grama de fígado, ocorreu também no fígado dos ratos quando sujeitos ao proliferador peroxissomal Su-1437 (Leighton et al., 1975).

Sob a acção do 17β -estradiol, a actividade por miligrama de proteína da glicolato oxidase foi grandemente reduzida nos peixes expostos à hormona na concentração de 50 $\mu\text{g/L}$ e 100 $\mu\text{g/L}$. Quando analisada a actividade desta mesma enzima por grama de fígado, verificamos que o seu decréscimo nos animais tratados com 17β -estradiol na dose de 50 $\mu\text{g/L}$ foi de menor significância ao anteriormente referido, tendo sido detectada uma diferença significativa entre os animais expostos à hormona nas doses de 50 $\mu\text{g/L}$ e 100 $\mu\text{g/L}$. Já nos animais sob a influência dos alquilfenóis não foi observada qualquer diferença significativa entre os grupos de tratamento e controlo. Assim, uma vez mais fica patente o maior efeito repressor do 17β -estradiol sobre as actividades enzimáticas comparativamente com os alquilfenóis. A diminuição desta enzima

peroxissomal ocorreu também no fígado de rato sob a acção de proliferadores peroxissomais, nomeadamente o clofibrato e o *bis*(2-etilexil)ftalato, sendo tal efeito mais pronunciado na zona pericentral, bem como com o Su-13437, onde um decréscimo (por grama de fígado) próximo dos 70% foi observado (Leighton et al., 1975; van der Munckhof et al., 1998).

Purificada pela primeira vez por Mahler e sua equipa (1955) a partir do fígado do porco, a urato oxidase, também denominada uricase, pertence ao grupo das cupro-proteínas. Esta, tem sido sempre observada como uma enzima peroxissomal (Hruban e Swiff, 1964; Veenhuis e Bonga, 1979), localizando-se exclusivamente no nucleóide deste organelo. Estudos recentes levaram também à detecção da actividade da urato oxidase na matriz dos peroxissomas dos hepatócitos de rato (van der Munckhof et al., 1998). O mesmo acontece nos peixes, anfíbios e crustáceos (Hruban e Swiff, 1969; Usada et al., 1988; Noguchi et al., 1979; Hayashi et al., 1989). Tal como acontece com a catalase e as oxidases D-aminoácidos e glicolato, também a urato oxidase não é induzida por meio de um processo regulado pelo PPAR. A perda da actividade desta enzima no homem torna-o susceptível à acumulação de ácido úrico, o que leva ao surgimento de uma doença denominada “gota”. Contudo, o desaparecimento da urato oxidase parece não trazer apenas desvantagens, uma vez que o ácido úrico se comporta como um potente antioxidante, protegendo o organismo humano contra os efeitos do cancro e outros distúrbios, incluindo o envelhecimento causado por radicais livres (Ames et al., 1981).

Tal como acontece para as restantes enzimas analisadas, não são conhecidos os mecanismos que levam a uma diminuição da actividade da urato oxidase nos peixes sob acção de certos alquilfenóis e do 17 β -estradiol, bem como à sua completa inibição nos animais tratados com este último composto referido na dose mais elevada. É possível que estes químicos ao afectarem a estabilidade ou inibirem a síntese da referida enzima levem, tal como no homem, à acumulação de ácido úrico. Este, ao comportar-se como um antioxidante, poderá compensar a diminuição da actividade da catalase, contribuindo assim para a neutralização das formas reactivas de oxigénio que danificam a célula. Portanto, para apoiar esta hipótese toma-se agora necessário um estudo com vista à medição do nível de ácido úrico nos peixes sujeitos a inibição estrogénica.

Foi também já observada uma redução na actividade da urato oxidase nos peroxissomas dos hepatócitos de ratos sujeitos aos proliferadores peroxissomais clofibrato e benzafibrato, sendo esta aproximadamente igual a 52% e 79%, respectivamente (Goldenberg et al., 1976; Fahimi et al., 1993a). Uma diminuição na actividade desta mesma enzima, quando analisada por grama de fígado, aconteceu nos ratos sujeitos a jejum (sensivelmente igual a 44%) e naqueles tratados com o xenobiótico PCB126 (próximo dos 56%). Tais diferenças constataram-se apenas quando cada um dos grupos mencionados foi comparado com o grupo controlo e aquele exposto

a jejum, respectivamente (Ariyoshi et al., 1998). Também nestes animais tratados com o proliferador peroxissomal Su-13437 foi registada um decréscimo de 50% na actividade, por grama de fígado, da urato oxidase. Por outro lado, nos ratos sujeitos ao bis(2-etilexil)ftalato ocorreu, igualmente, uma diminuição, embora baixa, da actividade da urato oxidase, mas somente nas regiões pericentrais do fígado (van der Munckhof et al., 1998).

Nos peixes, os peroxissomas desempenham um papel importante no consumo de ácidos gordos com vista à produção de energia. Em certas espécies, cerca de 30 a 50% da β -oxidação hepática total é iniciada por meio dos peroxissomas (Crockett e Sidell, 1993). Sabe-se que estes organelos são capazes de oxidar uma grande variedade de ácidos gordos, incluindo ácidos gordos polinsaturados de cadeia longa e, principalmente, de cadeia muito longa, os quais são mais dificilmente metabolizados através da β -oxidação mitocondrial (Master e Crane, 1995). Refira-se que a palmitoil-CoA oxidase é a enzima limitante do sistema da β -oxidação peroxissomal. Nos roedores, a actividade desta enzima é grandemente induzida pelos proliferadores peroxissomais através da acção de um receptor nuclear (PPAR), o qual actua como um factor de transcrição específico (Reddy e Mannaerts, 1994; Lemberger et al., 1996). Recorde-se que a catalase, as oxidases D-aminoácidos, glicolato e urato, não possuem nos respectivos genes o PPAR, não podendo assim serem induzidas pelos PPARs. Pelo acima exposto, é evidente que as alterações nas capacidades de β -oxidação peroxissomal afectarão, especialmente, o metabolismo dos ácidos gordos de cadeia longo e muito longa. Nas fêmeas da truta arco-íris, os lípidos são utilizados, preferencialmente, como fonte de energia durante o período pré-vitelogénico e vitelogénico dito “tipo I” (Junho-Agosto), enquanto que durante a vitelogénese “tipo II” (Setembro-Novembro) os lípidos mobilizados são fundamentalmente usados na produção de vitelogenina (Nassour e Leger, 1989; Bon et al., 1997).

A composição lípídica da vitelogenina tem sido extensivamente examinada nos teleósteos, particularmente nos salmonídeos. Assim, sabe-se que na truta fário, o conteúdo lípídico daquela proteína corresponde a 19% do seu peso molecular, e que os fosfolípidos representam aproximadamente 70% daquele total lípídico (Norberg e Haux, 1985). Num estudo efectuado com quatro espécies de teleósteos, verificou-se que os ácidos gordos polinsaturados de cadeia longa, especialmente do tipo 20:5 (n-3) e 22:6 (n-3) correspondiam a 50% do total de ácidos gordos do vitelo (Silversand e Haux, 1995). Nos teleósteos, a vitelogenina é um precursor importante do vitelo, estando a sua composição em ácidos gordos possivelmente relacionada com as exigências nutricionais necessárias para o desenvolvimento do embrião e da larva (Silversand e Haux, 1995).

Portanto, a redução da β -oxidação peroxissomal que se verifica na presença dos compostos estrogénicos nonilfenol, butilfenol e mais particularmente do 17β -estradiol, com destaque para as doses mais elevadas, poderá ser favorável à síntese de vitelogenina, uma vez que tal redução conduzirá a uma diminuição na taxa de consumo dos ácidos gordos insaturados de cadeia longa e muito longa, preferencialmente metabolizados pelos peroxissomas, os quais, volte-se a referir, fazem parte da constituição daquela glicolipofosfoproteína. Estudos efectuados em peroxissomas hepáticos de rato, demonstraram que o 17β -estradiol não exerce um efeito directo na expressão do gene da acil-CoA oxidase, ao contrário do que sucede com os proliferadores peroxissomais (Latruffe, 1993). Assim, tudo indica que o efeito do 17β -estradiol na β -oxidação peroxissomal é específico do fígado dos teleósteos. Deste modo, será interessante estudar este mecanismo num maior número de espécies de peixes, bem como expandi-lo a outros vertebrados ovíparos.

Embora um número elevado de proliferadores peroxissomais capazes de induzir as enzimas dos peroxissomas sejam já conhecidos, pouco se sabe sobre os compostos que provocam uma diminuição na actividade das enzimas mencionadas. Por outro lado, não é de excluir a possibilidade do 17β -estradiol poder, simultaneamente, actuar com um proliferador peroxissomal, pois conduz a um aumento na densidade numérica dos peroxissomas, bem como um repressor, uma vez que provoca um decréscimo nas dimensões deste organelo e nas actividade das enzimas estudadas. Refira-se o facto de certos proliferadores peroxissomais estudados em mamíferos, nomeadamente o clofibrato, benzafibrato, Su-13437 e o bis(2-etilhexil)ftalato, serem também capazes de diminuir a actividade de algumas enzimas peroxissomais (Goldenberg et al., 1976; Fahimi et al., 1993a; van der Munckhof et al., 1998). Os alquilfenóis comportaram-se, igualmente, como potenciais repressores para algumas das actividades das enzimas analisadas.

Uma vez que são desconhecidos os mecanismos responsáveis pela redução das actividades peroxissomais estudadas devido aos químicos empregues, várias hipóteses são aqui colocadas. Assim, para além destes poderem exercer a sua acção, quer através da inibição da síntese das enzimas, quer através do aumento da sua taxa de degradação, tais compostos podem também afectar os receptores e transportadores da membrana peroxissomal, o que dará origem a alterações na sua permeabilidade, provavelmente afectando a importação das enzimas (Tsukamoto et al., 1991; de Craemer et al., 1993). É assim, por um lado, necessário equacionar uma série de aproximações experimentais para a verificação de cada uma das citadas hipóteses. Por outro lado, torna-se imperativo o prolongamento do actual estudo de modo a medir o volume absoluto do hepatócito de trutas imaturas com vista à determinação do número de

peroxissomas por célula, procurando assim evidenciar o real efeito sobre o número de peroxissomas resultante da acção do estrogénio em causa. A pertinência deste estudo é reforçada pelo facto das alterações detectadas na maioria das actividades enzimáticas dos peixes tratados com 17β -estradiol na dose de $50 \mu\text{g/L}$ terem sido semelhantes, em termos de significância, às induzidas nos indivíduos expostos à referida hormona na concentração mais elevada. Do mesmo modo, tendo por objectivo encontrar a dose mínima de 17β -estradiol capaz de provocar tais alterações morfológicas e enzimáticas peroxissomais, será muito útil a realização de um estudo futuro utilizando uma gama de concentrações nominais do referido estrogénio compreendida entre os valores empregues neste trabalho. Aspecto interessante, também a ser investigado, consiste no estudo da influência sobre os peroxissomas de compostos pseudo-estrogénios possuidores de uma potência estrogénica (em termos da estimulação do gene da vitelogenina) superior à do 17β -estradiol, como acontece com o 17α -etinilestradiol (Purdom et al., 1994; Bowman et al., 2000). Quanto a aspectos moleculares, como o PPAR γ foi encontrado no fígado do salmão do Atlântico (*Salmo salar*) (Ruyter et al., 1997), espera-se também existirem na truta fário os genes correspondentes aos diferentes sub tipos de PPARs conhecidos. A quantificação da sua expressão pode vir assim a fornecer importantes informações sobre o modo como os peroxissomas são controlados pelas hormonas sexuais e outros compostos estrogénicos, os quais poderão influenciar a síntese destes receptores, reguladores do metabolismo lipídico.

Como é já do nosso conhecimento, o 17α -etinilestradiol, é o principal composto estrogénico sintético presente em certos contraceptivos orais. Trabalhos laboratoriais indicam que este estrogénio sintético é altamente estável e persistente nas lamas activadas, pois nem mesmo ao fim de 120 horas de tratamento foi detectada a sua degradação. Ora, tendo este químico sido encontrado nos efluentes provenientes das estações de tratamento de águas residuais, ao ser introduzido nos ecossistemas aquáticos pode interferir no metabolismo dos peixes não só ao nível da síntese de vitelogenina (Desbrow et al., 1998), mas eventualmente nos mecanismos peroxissomais, entre outros, pondo assim em causa a sua integridade física e consequente viabilidade.

Por outro lado, podemos afirmar que a vitelogenina é um melhor biomarcador para a determinação da actividade estrogénica dos xenobióticos, comparativamente às alterações peroxissomais. Ordenando os compostos utilizados neste trabalho por ordem de potência estrogénica o 17β -estradiol > 4-tertbutilfenol + 4-nonilfenol > 4-Nonilfenol = Butilfenol. As alterações morfológicas e enzimáticas causados por tais compostos estrogénicos nos peroxissomas são muito menos sensíveis, tendo apenas surgido sob influência de concentrações muito elevadas de 17β -estradiol. Devido à reduzida variação causada pelos alquilfenóis nas

actividades enzimáticas, também não esperamos que as modificações morfológicas sejam muito significativas. Contudo, será importante a realização de trabalhos futuros que visem o estudo de possíveis alterações morfológicas nos peroxissomas, as quais poderão ser associadas às modificações enzimáticas ocorridas, e, a existirem, permitirão melhor formular o modo como as alquilfenóis perturbam o metabolismo peroxissomal; o que é agora um facto, descoberto pela 1ª vez no âmbito desta tese.

Em suma, face aos resultados obtidos neste estudo, podemos afirmar que a hipótese por nós equacionada, de existir uma diminuição no tamanho e na actividade enzimática dos peroxissomas devido à acção do 17β -estradiol, estava correcta. Os alquilfenóis têm também um efeito repressor sobre algumas das actividades enzimáticas, mas em menor grau e de forma não idêntica para todas as enzimas, o que é compreensível devido ao seu menor efeito estrogénico de base.

V. BIBLIOGRAFIA

- Aebi, H. (1984) Catalase in vitro. *Method. Enzymol.* **105**: 121-126.
- Ahel, M., Gier, W., Koch, M. (1994a) Behaviour of alkylphenol polyethoxylate surfactants in aquatic environment-I. Occurrence and transformation in sewage treatment. *Water Resear.* **28**:1131-1142.
- Ahel, M., Gier, W., Schaffner, C. (1994b). Behaviour of alkylphenol polyethoxylate surfactants in aquatic environment-II. Occurrence and transformation in rivers. *Water Resear.* **28**: 1143-1152.
- Ahel, M., McEvoy, J., Giger, W. (1993) Bioaccumulation of the lipophilic metabolites of nonionic surfactants in freshwater organisms. *Environ. Pollut.* **79**: 243- 248.
- Albertini, M., Rehling, P., Erdmann, R., Girzalsky, W., Kiel, J., Veenhuis, M., Kunau, W. (1997) Pex 14p, a peroxisomal membrane protein binding both receptors of the two PTS-dependent import pathways. *Cell* **89**: 83-92.
- Allen, Y., Scott, A., Matthiessen, P., Haworth, S., Thain, J., Feist, S. (1999) Survey of estrogenic activity in United Kingdom estuarine and coastal waters and its effects on gonadal development of the flounder *Platichthys flesus*. *Environ. Toxicol. Chem.* **18**: 1791-1800.
- Angermüller, S., Bruder, G., Völkl, A., Wesch, H., Fahimi, D. (1987) Localization of xanthine oxidase in crystalline cores of peroxisomes. A cytochemical and biochemical study. *Eur. J. Cell Biol.* **45**: 137-144.
- Angermüller, S., Fahimi, D. (1988) Heterogenous staining of D-amino acid oxidase in peroxisomes of rat liver and kidney. A light and electron microscopic study. *Histochemistry* **88**: 277-285.
- Ankley, G., Mihaich, E., Stahl, R., Tillitt, D., Colborn, T., McMaster, S., Miller, R., Bantle, J., Campbell, P., Denslow, N., Dickerson, R., Folmar, L., Fry, M., Giesy, J., Earl, L., Guiney, P., Hutchinson, T., Kennedy, S., Kramer, V., LeBlanc, G., Mayes, M., Nimrod, A., Patino, R., Peterson, R., Purdy, R., Ringer, R., Thomas, P., Touart, L., Van Der Kraak, G., Zacharewshi. (1998) Overview of a workshop on screening methods for detecting potential (anti-) estrogenic/androgenic chemicals in wildlife. *Environ. Toxicol. Chem.* **17**: 68-87.
- Ariyoshi, N., Iwasaki, M., Ichiki, H. (1998) Highly toxic coplanar PCB126 α activitie. *Environ. Toxicol. Phar.* **219-225**.

- Arnold, S., Klottz, D., Collins, B., Vonier, P., Guillette, L., McLachlan, J. (1996c) Synergistic activation of estrogen receptor with combinations of environmental chemicals. *Science* **272**: 1489-1491.
- Arnold, H., Pluta, H., Braunbeck, T. (1995) Simultaneous exposure of fish to endosulfan and disulfoton in vivo: ultrastructural, stereological and biochemical reactions in hepatocytes of male rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquat. Toxicol.* **33**: 17-43.
- Arnold, H., Pluta, H., Braunbeck, T. (1996a) Cytological alterations in the liver of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* after prolonged exposure to low concentrations of waterborne endosulfan. *Dis. Aquat. Org.* **25**: 39-52.
- Arnold, H., Pluta, H., Braunbeck, T. (1996b) Sublethal effects of prolonged exposure to disulfoton in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): cytological alterations in the liver by a potent acetylcholine esterase inhibitor. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **34**: 43-55.
- Arukwe, A., Förlin, L., Goksøyr, A. (1997) Xenobiotic and steroid biotransformation enzymes in atlantic salmon (*Salmo salar*) liver treated with an estrogenic compound, 4-nonylphenol. *Environ. Toxicol. Chemistry* **16**: 2576-2583.
- Arukwe, A., Knudsen, F., Goksøyr (1997a) Fish zona radiata (eggshell) protein: a sensitive biomarker for environmental estrogens. *Environ. Health Perspect.* **105**: 418-422.
- Arukwe, A., Thibaut, R., Ingebrigtsen, K., Celius, T., Goksøyr, A., Cravedi, J-P. (2000) In vivo and in vitro metabolism and organ distribution of nonylphenol in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquat. Toxicol.* **49**: 289-304.
- Ashby, J., Houthoff, E., Kennedy, S., Stevens, J., Bars, R., Jekat, F., Campbell, P., Van Miller, J., Carpanini, F., Randall, G. (1997) The challenge posed by endocrine disruption chemicals. *Environ. Health Persp.* **105**: 164-169.
- Baddeley, A., Gundersen, H., Cruz-Orive, L. (1986) Estimation of surface area from vertical sections. *J. Microsc.* **142**: 259-276.
- Barret, M., Heidger, P. (1975) Microbodies of the renal proximal tubule: ultrastructural and cytochemical investigations. *Cell Tissue Res.* **157**: 283-305.

- Baumgart, E. (1997) Application of in situ hybridization, cytochemical and immunocytochemical techniques for the investigation of peroxisomes. A review including novel data. *Histochem. Cell Biol.* **108**: 185-210.
- Baumgart, E., Völkl, A., Pill, J., Fahimi, H. (1990) Proliferation of peroxisomes without simultaneous induction of the peroxisomal fatty acid β -oxidation. *FEBS Lett.* **264**: 5-9.
- Bayley, M., Nielsen, J., Baatrup, E. (1999) Guppy sexual behavior as an effect biomarker of estrogen mimics. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **43**: 68-73.
- Beard, M., Novikoff, A. (1969) Distribution of microbodies in the nephron of the rat: a cytochemical study. *J. Cell Biol.* **42**: 501-518.
- Beato, M. (1991) Transcriptional control by nuclear receptors. *FASEB J.* **7**: 2044-2051.
- Beier, K., Fahimi, H. (1987) Application of automatic image analysis for morphometric studies of peroxisomes stained cytochemically for catalase. II. Light-microscopic application. *Cell Tissue Res.* **247**: 179-185.
- Beier, K., Fahimi, H. (1991) Environmental pollution by common chemicals and peroxisome proliferation: efficient detection by cytochemical and automatic image analysis. *Progress Histochem. Cytochem.* **23**: 150-163.
- Bell, D., Bars, R., Elcombe, C. (1992) Differential tissue-specific expression and induction of cytochrome P450IVAI and acyl-CoA oxidase. *Eur. J. Biochem.* **206**: 979-986.
- Bennie, D., Sullivan, C., Lee, H., Maguire, R. (1998) Alkylphenol polyethoxylate metabolites in canadian sewage treatment plant waste streams. *Water Quality J. Canada* **33**: 231-252.
- Bentley, P., Bieri, F., Mitchell, F., Walchter, F., Stäubli, W. (1987) Investigation on the mechanism of liver tumour induction by peroxisome proliferator. Mouse liver tumours. *Arch. Toxicol.* **10**: 157-161.
- Bentley, P., Calder, I., Elcombe, C., Grasso, P., Stringer, D., Wiegand, H. (1993) Hepatic peroxisome proliferation in rodents and its significance for humans. *Food Chem. Toxicol.* **31**: 857-907.
- Beresford, N., Routledge, E., Harris, C., Sumpter, J. (2000) Issues arising when results from an *in vitro* assay for estrogenic activity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **162**: 22-33.

- Bern, H. (1992) The fragile fetus. In: *Chemically-induced alterations in sexual and functional development. The Wildlife/Human Connection*. (Colborn, T and Clement C., eds), Princeton Scientific Publishing, Princeton, Vol 21, pp. 9-15.
- Blackburn, M., Waldock, M. (1995) Concentrations of alkylphenols in rivers and estuaries in England and Wales. *Water Res.* **29**: 1623-1629.
- Böck, P., Kramar, R., Pavelka, M. (1980) Peroxisomes and Related Particles in Animal Tissues, Springer-Verlag, Wien, New York, pp. 230.
- Bohemen, C., Lambert, J. (1981) Annual changes in plasma and liver in relation to vitellogenesis in the female rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **45**: 94-107.
- Bohemen, C., Lambert, J., Goos, H., Van Oordt, P. (1982) Estrone and 17 β -estradiol participation during exogenous vitellogenesis in the female rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **46**: 81-92.
- Bohnet, S., Rogers, L., Sasaki, G., Kolattukudy, P. (1991) 17 β -estradiol induces proliferation of peroxisome-like microbodies and the production of 3-hydroxy fatty acid diesters, the female pheromones in uropygial glands of male and female mallards. *J. Biol. Chem.* **266**: 9795-9804.
- Bon, E., Corraze, G., Kauhik, S., Menn, F. (1997) Effects of accelerated photoperiod regimes on the reproductive cycle of the female rainbow trout: I – seasonal variation of plasma lipids correlated with vitellogenesis. *Comp. Biochem. Physiol.* **118A**: 183-190.
- Borrás, M., Hardy, L., Lempereur, F., El Khissiin, A., Legros, N., Gol-Winkler, R., Leclercq, G. (1994) 17 β -estradiol-induced down-regulation of estrogen receptor. Effect of various modulators of proteins synthesis and expression. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **48**: 325-336.
- Bowman, C., Kroll, K., Hemmer, M., Folmar, L., Denslow, N. (2000) Estrogen-induced vitellogenin mRNA and Protein in sheepshead minnow (*Cyprinodon variegatus*). *Gen. Comp. Endocrinol.* **120**: 300-313.
- Braissant, O., Foufelle, F., Scotto, C., Dauça, M., Wahli, W. (1996) Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR- α , β and γ in the adult rat. *Endocrinology* **137**: 354-366.
- Braunbeck, T. (1993) Cytological alterations in isolated hepatocytes from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed *in vitro* to 4-chloroaniline. *Aquat. Toxicol.* **25**: 83-110.

- Braunbeck, T., Appelbaum, S. (1999) Ultrastructural alterations in the liver and intestine of carp *Cyprinus carpio* induced orally ultra-low doses of endosulfan. *Dis. Aquat. Organism.* **36**: 183-200.
- Braunbeck, T., Gorgas, K., Storch, V., Völkl, A. (1987) Ultrastructure of hepatocytes in golden ice (*Leuciscus idus melanotus* L.; Cyprinidae: Teleostei) during thermal adaptation. *Anat. Embryol.* **175**: 303-313.
- Braunbeck, T., Völkl, A. (1991) Induction of biotransformation in the liver of eel (*Anguilla anguilla* L.) by sublethal exposure to dinitro-o-kresol: an ultrastructural and biochemical study. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **21**: 109-127.
- Bruslé, J., Anadon, G. (1996) The structure and function of fish liver. In: *Fish Morphology*. (Munshi, J. and Dutta, H. eds), Oxford & IBH publishing, Co. Pvt. Ltd., New Delhi, Calcutta, India, pp. 77-93.
- Bucher, F., Hofer, R., Krumschnabel, G., Doblender, C. (1993) Disturbances in the prooxidant-antioxidant balance in the liver of bulhead (*Cottus gobio* L.) exposed to treated paper mill effluents. *Chemosphere* **27**: 1329-1338.
- Cablé, S., Kedinger, M., Fahimi, H. (1993) Peroxisomes and peroxisomal enzymes along the crypt-villus axis of the rat intestine. *Differentiation* **54**: 99-108.
- Cajaraville, M., Völkl, A., Fahimi, H., (1992) Peroxisomes in the digestive gland cells of the mussel *Mytilus galloprovincialis* LMK. Biochemical, ultrastructural and immuno-cytochemical characterization. *Eur. J. Cell Biol.* **59**: 255-264.
- Campbell, P., Pottinger, T., Sumpter, J. (1994) Changes in the affinity of estrogen and androgen receptors accompany changes in receptor abundance in brown and rainbow trout. *Gen. Comp. Endocrinol.* **94**: 329-340.
- Cancio, I., Cajaraville, M. (1997) Histochemistry of oxidases in several tissues of bivalve molluscs. *Cell Biol. International.* **21**: 575-584.
- Carragher, J., Sumpter, J. (1991) The mobilization of calcium from calcified tissues of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) induced to synthesize vitellogenin. *Comp. Biochem. Physiol.* **99A**: 169-172.
- Chemical Manufactures Association (1994) Alkylphenol ethoxylates in the environment. Alkylphenol and Ethoxylates Panel, Washington.

- Chen, T. (1983) Identification and characterisation of estrogen-responsive gene products in the liver of rainbow trout. *Can. J. Biochem. Cell Biol.* **61**: 802-810.
- Christiansen, E., Flatmark, T., Kryvi, H. (1981) Effects of marine oil diet on peroxisomes and mitochondria of rat liver. A combined biochemical and morphometric study. *Eur. J. Cell Biol.* **26**: 11-20.
- Clark, L., Rosen, R., Hartman, T., Louis, J., Suffet, I., Lippincott, R., Rosen, J. (1992) Determination of alkylphenol ethoxylates and their acetic acid derivatives in drinking water by particle beam liquid chromatography/mass spectrometry. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* **47**: 167-180.
- Connock, M. (1973) Intestinal peroxisomes in the goldfish (*Carassius auratus*). *Comp. Biochem. Physiol.* **45A**: 945-951.
- Copeland, P., Sumpter, T., Croft, M. (1986) Vitellogenin levels in male and female rainbow trout (*Salmo gairdneri*, Richardson) at various stages of the reproductive cycle. *Comp. Biochem. Physiol.* **83B**: 487-493.
- Cooper, T., Beevers, H. (1969) Oxidation in glyoxysomes from castor bean endosperm. *J. Biol. Chem.* **244**: 3514-3520.
- Corti, A., Frassinetti, S., Vallini, G., D'Antone, Fichi, C., Solaro, R. (1994) Biodegradation of nonionic surfactants. I. Biotransformation of 4-(1-nonyl)phenol by a *Candida maltosa* isolate. *Environ. Pollut.* **90**: 83-87.
- Christensen, L., Korsgaard, B., Bjerregaard, P. (1999) The effect of 4-nonyphenol on the synthesis of vitellogenin in the flounder *Platichthys flesus*. *Aquatic Toxicol.* **46**: 211-219.
- Crockett, E., Sidell, B. (1993) peroxisomal β -oxidation is a significant pathway for catabolism of fatty acids in a marine teleost. *Amer. J. Physiol.* **264**: R1004-R1009.
- D'Aniello, A., Vetere, A., Petrucelli, L. (1993) Further study on the specificity of D-amino acid oxidase and D-aspartate oxidase and time course for complete oxidation of D-amino acids. *Comp. Biochem. Physiol.* **105B**: 731-734.
- D'Aniello, A., D'Onofrio, G., Pischetola, M., D'Aniello, G., Vetere, A., Petrucelli, L., Fischer, G. (1993) Biological role of D-amino acid oxidase and D-aspartate oxidase. *J. Biol. Chem.* **268**: 26941-26949.

- Dannen, E., Beard, M. (1977) Peroxisomes in pulmonate gastropods. *J. Histochem. Cytochem.* **25**: 319-328.
- De Craemer, D., Kerckaert, I., Roels, F. (1991) Hepatocellular peroxisomes in human alcoholic and drug-induced hepatitis: a quantitative study. *Hepatology* **14**: 811-817.
- De Craemer, D., Pauwels, M., Hautekeete M., Roels, F. (1993) Alterations of hepatocellular peroxisomes in patients with cancer. *Cancer* **71**: 3851-3858.
- De Craemer, D., Pauwels, M., Van Den Branden, C. (1995) Alterations of peroxisomes in steatosis of the human liver: a quantitative study. *Hepatology* **22**: 744-752.
- De Craemer, D., Pauwels, M., Van Den Branden, C. (1996) Morphometric characteristics of human hepatocellular peroxisome in alcoholic liver disease. *Alcohol Clin. Exp. Res.* **20**: 908-913.
- De Craemer, D., Vamecq, J., Roels, F., Vallée, L., Pauwels, M., Van Den Branden, C. (1994) Peroxisomes in liver, heart, and kidney of mice fed a commercial fish oil preparation: original data and review on peroxisomal changes induced high-fat diets. *J. Lipid Res.* **35**: 1241-1250.
- De Craemer, D., Verbeelen, D., Van Den Branden, C. (1997) Morphometric characteristics of peroxisomes in rats with chronic renal failure induced by five-sixth nephrectomy. *APMIS* **105**: 631-636.
- De Duve, C., Baudhuin, P. (1996) Peroxisomes (microbodies and related particles). *Physiol. Rev.* **46**: 323-357.
- Desbrow, C., Routledge, E., Brighty, G., Sumpter, J., Waldock, M. (1998) Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. I. Chemical fractionation and in vitro biological screening. *Environ. Scien. Technol.* **32**: 1549-1558.
- Desvergne, B., Ijpenberg, A., Devchand, P., Wahli, W. (1998) The peroxisome proliferator-activated receptors at the cross-road of diet and hormonal signalling. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* **65**: 65-74.
- Devchand, P., Keller, H., Peters, J., Vasquez, M., Gonzalez, F., Wahli, W. (1996) The PPAR α -leukotriene B4 pathway to inflammation control. *Nature* **384**: 39-43.
- Diestelkötter, P., Just, W. (1993) *In vitro* insertion of the 22-kD peroxisomal membrane protein into isolated rat liver peroxisomes. *J. Cell Biol.* **123**: 1717-1725.

- Donohue, M., Baldwin, L., Leonard, D., Kostecki, P. (1993) Effect of hypolipidemic drugs gemfibrozil ciprofibrate and clofibrac acid on peroxisomal beta-oxidation in primary cultures of rainbow trout hepatocytes. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **26**: 127-132.
- Elliot, J., Bromage, N., Whitehead, C. (1979) Effects of 17 β -estradiol on serum calcium and vitellogenin levels in rainbow trout. *J. Endocrinol.* **83**: 54-55.
- Ekelund, R., Bergman, A., Granmo, A., Berggren, M. (1990) Bioaccumulation of 4-nonylphenol in marine animals – a re-evaluation. *Environ. Pollut.* **64**: 107- 120.
- Ekelund, R., Granmo, Å., Magnusson, K., Berggren, M. (1993) Biodegradation of 4-nonylphenol in seawater and sediment. *Environ. pollut.* **79**: 59-61.
- Erdmann, R., Veenhuis, M., Kunau, W. H. (1997) Peroxisomes: organelles at the crossroads. *Trends Cell Biol.* **7**: 400-407.
- Essner, E. (1970) Observations on hepatic and renal peroxisomes (microbodies) in the developing chick. *J. Histochem. Cytochem.* **18**: 80-92.
- Fahimi, H., Baumgart, E., Beier, K., Pill, J., Hartig, F., Völkl, A. (1993a) Ultrastructural and biochemical aspects of peroxisomes proliferation and biogenesis in different mammalian species. In: *Biology and Importance in Toxicology and Medicine* (Gibson, G. and Lake, B., eds), Taylor and Francis, London, **pp.** 395-424.
- Fahimi, H., Baumgart, E., Völkl, A. (1993b) Ultrastructural aspects of the biogenesis of peroxisomes in rat liver. *Biochimie* **75**: 201-208.
- Fahimi, H., Cajaraville, M. (1995) Induction of peroxisome proliferation by some environmental pollutants and chemicals in animal tissues. In: *Cell Biology in Environmental Toxicology*. (Cajaraville, M. P., ed.). University of the Basque Country Press Service, Bilbo, **pp.** 221-255.
- Flouriot, G., Pakdel, F., Ducouret, B., LeDrean, Y., Valotaire, Y. (1997) Differential regulation of two genes implicated in fish reproduction: vitellogenin and estrogen receptor genes. *Mol. Reprod. Dev.* **48**: 317-332.

- Folmar, L., Gardner, G., Schreibman, M., Magliuli-Cepriano, L., Mills, L., Zaroogian, G., Gurjahr-Gobell, R., Haebler, R., Horowitz, D., Denslow, N. (2001) Vitellogenin-induced pathology in male summer flounder (*Paralichthys dentatus*). *Aquat. Toxicol.* **51**: 431-441.
- Forman, B., Goode, E., Chen, J., Oro, A., Bradley, D., Perman, T., Noonan, D., Burka, L., McMorris, T., Lamph, W., Evans, R., Weinberger, C. (1995) Identification of a nuclear receptor that is activated by farnesol metabolites. *Cell* **81**: 687-693.
- Fostier, A., Jalabert, B., Billard, R., Breton, B., Zohar, Y. (1983) The gonadal steroids. In: *Fish Physiology, Reproduction, Endocrine Tissues and hormones*. (Hoar, W., Randall, D., Donaldson E., eds), Academic Press, vol IXA, pp. 277-372.
- Frederick, S., Newcome, E., Vigil, E., Wergin, W. (1968) Fine structural characterization of plant microbodies. *Planta (Berl)* **81**: 229-252.
- Fujiki, Y., Rachubinski, R., Lazarow, P. (1984) Synthesis of a major integral membrane polypeptide of rat liver peroxisomes on free polysomes *Proc. Natl. Acad. Sci.* **81**: 7127-7131.
- Fujisawa, Y., Ikeda, T., Nomoto, K., Yasuda-Kamatani, Y., Minakata, H., Kenny, P., Kubota, I., Muneoka, Y. (1992) The FMRFamide-related decapeptide of *Mytilus* contains a D-amino acid residue. *Comp. Biochem. Physiol.* **102C**: 91-95.
- Fujiwara, S., Hayashi, S., Noguchi, T., Hanada, N., Takehara, T. (1989) Subcellular distribution of hepatic allantoinase varies among fishes. *Comp. Biochem. Physiol.* **93B**: 213-215.
- Fujiwara, S., Noguchi, T. (1995) Degradation of purines: ureidoglycollate lyase out of four allantoin-degrading enzymes is present in mammals. *Biochem. J.* **312**: 315-318.
- Gallagher, E., Di Giulio, R. (1991) Effects of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and picloram on biotransformation, peroxisomal and serum enzyme activities in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Toxicol. Lett.* **57**: 65-72.
- Gietl, C. (1996) Protein targeting and import into plant peroxisomes. *Physiol. Plant* **97**: 599-608.
- Giger, W., Brunner, P., Schaffner, C. (1984) 4-Nonylphenol in sewage sludge: accumulation of toxic metabolites from nonionic surfactants. *Science* **225**: 623-625.

- Gillesby, B., Zacharewski, T. (1998) Exoestrogens: mechanisms of action and strategies for identification and assessment. *Environ. Toxicol. Chem.* **17**: 3-14.
- Gimeno, S. (1997) The estrogenicity of alkylphenols in the aquatic environment. An approach for risk assessment using various life stages of all male carp populations. *PhD Thesis*, Utrecht University.
- Gimeno, S., Gerritsen, A., Bowmer, T., Komen, H. (1996) Feminization of male carp. *Nature* **384**: 221-222.
- Gimeno, S., Komen, H., Gerritsen, A., Bowmer, T. (1998) Feminization of young males of the common carp, *Cyprinus carpio*, exposed to 4-tert-pentylphenol during sexual differentiation. *Aquatic Toxicol.* **43**: 77-92.
- Goldfischer, S., Reddy, J. (1984). Peroxisomes (microbodies) in cell pathology. *Int. Rev. Exp. Pathol.* **26**: 45-84.
- Goldenberg, H., Hüttinger, M., Kamfer, P., Kramar, R. (1978) Preparation of peroxisomes from carp liver by zonal rotor density gradient centrifugation. *Histochem. J.* **10**: 103-113.
- Goldenberg, H., Hüttinger, M., Kampfer, P., Kramar, R., Pavelka, M. (1976) Effect of clofibrate application on morphology and enzyme content of liver peroxisomes. *Histochemistry* **46**: 189-196.
- Goldham, N., Sivapathasundaram, S., Dave, M., Ashfield, L.A., Pottinger, T. G., Gooldall, C., Sauer, M. J. (1998) Biotransformation, tissue, distribution, and persistence of 4-nonylphenol residues in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Drug Met. Disp.* **26**: 347-354.
- Gorgas, K. (1984) Peroxisomes in sebaceous glands. V. Complex peroxisomes in the mouse prepuccial gland: serial sectioning and three-dimensional reconstruction studies. *Anat. Embryol.* **169**: 261-270.
- Gorgas, K. (1985) Serial section analysis of mouse hepatic peroxisomes. *Anat. Embryol.* **172**: 21-32.
- Gorgas, K. (1987) Morphogenesis of peroxisomes in lipid-synthesizing epithelia. In: *Peroxisomes Biology and Medicine* (Fahimi, H. D. and Sies, H., eds), Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp. 3-17.
- Grasso, P. (1993) Hepatic changes associated with peroxisomes proliferation. In: *Peroxisomes: Biology and Importance in Toxicology and Medicine*. (Gibson, G & Lake, B. eds.), Taylor & Francis, London, pp. 639-652.

- Gray, M. and Metcalfe, C. (1997) Induction of testis-ova in japanese medaka (*Oryzias latipes*) exposed to p-nonylphenol. *Environ. Toxicol. Chem.* **16**: 1082-1086.
- Gray, M., Teather, K., Metcalfe, C. (1999) Reproductive success and behavior of japanese medaka (*Oryzias latipes*) exposed to 4-tert-octylphenol. *Environ. Toxicol. Chem.* **18**: 2587-2594.
- Greene, M., Blumberg, B., McBride, O., Yi, H., Kronquist, K., Kwan, K., Hsieh, L., Greene, G., Nimer, S. (1995) Isolation of the human peroxisome proliferator-activated receptor gamma cDNA: Expression in hematopoietic cells and chromosomal mapping. *Gene Expression.* **4**: 281-299.
- Guillette, L. (1995) Endocrine disrupting environmental contaminants and developmental abnormalities in embryos. *Human and Ecolog. Risk Assessm.* **1**: 25-36.
- Gundersen, H. (1977) Notes on the estimation of the numerical density of arbitrary profiles: the edge effect. *J. Microsc.* **111**: 219-223.
- Gundersen, H. (1986) Stereology of arbitrary particles. A review of unbiased number and size estimators and the presentation of some new ones, in memory of William R. Thompson. *J. Microsc.* **143**: 3-45.
- Guyton, A., Hall, J. (1996) Female Physiology Before Pregnancy, and the Female Hormones. In: *Textbook of Medical Physiology*. WB Saunders Company, Philadelphia (USA), pp. 1017-1032.
- Hamilton, G., Afeefy, H., Al-Arab, M., Brush, E., Buckthal, D., Burns, R. (1987) Peroxisomal oxidases and their probable role in controlling animal metabolism. In: *Peroxisomes in Biology and Medicine*. (Fahimi, H. D. and Sies, H., eds.), Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp. 223-233.
- Hampton, J., McCuskey, P., McCuskey, R., Hinton, D. (1985) Functional units in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) liver: I. Arrangement and histochemical properties of hepatocytes. *Anat. Rec.* **213**: 166-175.
- Harries, J., Sheahan, D., Jobling, S., Matthiessen, P., Neal, P., Routledge, E., Rycroft, R., Sumpter, J., Tylor, T. (1996) A survey of estrogenic activity in United Kingdom inland waters. *Environ. Toxicol. Chem.* **15**: 1993-2002.
- Harries, J., Sheahan, D., Jobling, S., Matthiessen, P., Neal, P., Sumpter, J., Tylor, T., Zaman, N. (1997) Estrogenic activity in five United Kingdom rivers detected by measurement of vitellogenesis in caged male trout. *Environ. Toxicol. Chem.* **16**: 534-542.

- Hart, D., Opperdoes, F. (1984) The occurrence of glycosomes (microbodies) in the promastigote stage of four major *Leishmania* species. *Mol. Biochem. Parasitol.* **13**: 159-172.
- Hashimoto, T. (1987) Comparison of enzymes of lipid β -oxidation in peroxisomes and mitochondria. In: *Peroxisomes in Biology and Medicine*. (Fahimi, H.D and Sies, H., eds), Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp. 97-104.
- Hasmall, S., James, N., Macdonald, N., Soames, A., Roberts, R. (2000) Species differences in response to diethylhexylphthalate: suppression of apoptosis, induction of DNA synthesis and peroxisome proliferator activated receptor alpha-mediated gene expression. *Arch. Toxicol.* **74**: 85-91.
- Haux, C., Norbert, B. The influence of estradiol-17 β on the liver content of protein, lipids, glycogen and nucleic acids in juvenile rainbow trout, *Salmo gairdnerii*. *Comp. Biochem. Physiol.* **81B**: 275-279.
- Hayashi, S., Fujiwara, S., Noguchi, T. (1989) Degradation of uric acid in fish liver peroxisomes. Intraperoxisomal localization of hepatic allantoinase and purification of its peroxisomal membrane-bound form. *J. Biol. Chem.* **25**: 3211-3215.
- Heinis, L., Knuth, M., Liber, K., Sheedy, B., Tunel, R., Ankley, G. (1999) Persistence and distribution of 4-nonylphenol following repeated application to littoral enclosures. *Environ. Toxicol. Chem.* **18**: 363-375.
- Henderson, R., Sargent, J. (1985) Chain-length specificities of mitochondrial and peroxisomal β -oxidation of fatty acids in livers of rainbow trout (*Salmo Gairdneri*). *Comp. biochem. Physiol.* **82B**: 79-85.
- Herman, R., Kincaid (1988) Pathological effects of orally administered 17 β -estradiol to rainbow trout. *Aquaculture* **72**: 165-172.
- Hertz, R., Bishara-Shieban, J., Bar-Tana, J. (1995) Mode of action of peroxisome proliferators as hypolipidemic drugs. *J. Biol. Chem.* **270**: 13470-13475.
- Hess, R., Stäubli, W., Reis, W. (1965) Nature of hepatomegalic effect produced ethyl-chlorophenoxyisobutyrate in the rat. *Nature* **208**: 856-859.
- Hinton, D., Lantz, R., Hampton, J., McCuskey, P., McCuskey, R. (1987) Normal versus abnormal structure: considerations in morphologic responses of teleosts to pollutants. *Environ. Health Persp.* **71**: 139-146.

- Hinton, D., Laurén, D. (1990) Liver structural alterations accompanying chronic toxicity in fishes: potential biomarkers of exposure. In: *Biomarkers of Environmental Contamination*. (McCarthy, J. F. and Shugart, L. R., eds.), Lewis Publishers, Florida, pp. 17-57.
- Hinton, R., Price, S. (1993) Extrahepatic peroxisomes proliferation and the extrahepatic effects of peroxisome proliferators. In: *Peroxisomes: Biology and Importance in Toxicology and Medicine*. (Gibson, G. and Lake, B. eds.), Taylor & Francis, London, pp. 487-511.
- Holden, P., Tugwood, J. (1999) Peroxisome proliferator-activated receptor alpha: role in rodent liver cancer and species differences. *J. Molec. Endocrinol.* **22**: 1-8.
- Hruban, Z., Rechcigl, M. Jr. (1969) Microbodies and related particles. Morphology, biochemistry and physiology. *Intern. Rev. Cytol., Suppl.* **1**: 20-72.
- Hruban, Z., Swift, H. (1964) Uricase: localization in hepatic microbodies. *Science* **146**: 1316-1318.
- Hruban, Z., Vigil, E., Slesers, A., Hopkins, E. (1972) Microbodies. Constituent organelles of animal cells. *Lab. Invest.* **27**: 184-191.
- Hyllner, S., Oppen-Berntsen, D., Helvik, J., Walther, B., Haux, C. (1991) Estradiol-17 β induces the major vitelline envelope proteins in both sexes in teleosts. *J. Endocrinol.* **131**: 229-236.
- Idler, D., Campbell, C. (1980) Gonadotropin stimulation of estrogen and yolk precursor synthesis in juvenile rainbow trout. *Gen. Comp. Endocrin.* **41**: 384-391.
- Imanaka, T., Shiina, Y., Takano, T., Hashimoto, T., Osumi, T. (1996) Insertion of the 70-KDa peroxisomal membrane protein into peroxisomal membranes *in vivo* and *in vitro*. *J. Biol. Chem.* **271**: 3706-3713.
- Issemann, I., Green, S. (1990) Activation of a member of the steroid receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature* **347**: 645-650.
- James, N., Roberts, R. (1995) Species differences in the clonal expansion of hepatocytes in response to the coaction of epidermal growth factor and nafenopin, a rodent hepatocarcinogenic peroxisome proliferator. *Fundam. Appl. Toxicol.* **26**: 143-149.

- Jobling, S., Sheahan, D., Julia, A., Matthiessen, P., Neal, P., Sumpter, J. (1996) Inhibition of testicular growth in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to estrogenic alkylphenolic chemicals. *Environ. Toxicol. Chem.* **15**: 194-202.
- Jobling, S., Sumpter, J. (1993) Detergent components in sewage effluent are weakly oestrogenic to fish: An in vitro study using rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes. *Aquatic Toxicol.* **27**: 361-372.
- Juge-Aubry, C., Pernin, A., Favez, T., Burger, A., Wahli, W., Meier, C., Desvergne, B. (1997) DNA binding properties of peroxisome proliferator-activated receptor subtypes on various natural peroxisome proliferator response elements: importance of the 5'-flanking region. *J. Biol. Chem.* **272**: 40-51.
- Kase, B., Prydz, K., Björkhem, I., Pedersen, J. (1986) *In vitro* formation of bile acids from di- and trihydroxy-5 β -cholestanoic acid in human liver peroxisomes. *Biochim. Biophys. Acta* **877**: 37-42.
- Keller, H., Dreyer, C., Medin, J., Mahfoudi, A., Ozato, K., Wahli, W. (1993) Fatty acids and retinoids control lipid metabolism through activation of peroxisome proliferator-activated receptor-retinoid x receptor heterodimers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 2160-2164.
- Keller, H., Wahli W. (1993) Peroxisome proliferator-activated receptors. A link between endocrinology and nutrition? *Trends Endocrinol. Metab.* **4**: 291-296.
- Kime, D., Nash, J., Scott, A. (1999) Vitellogenesis as a biomarker of reproductive disruption by xenobiotics. *Aquaculture* **177**: 345-352.
- Kraak, G., Chang, J., Janz, D. (1998) Reproduction. *In: The Physiology of Fishes.* (Evans, D., eds), CRC Press, New York, pp. 465-488.
- Kramar, R., Goldenberg, H., Böch, P., Klobucar, N. (1974) Peroxisomes in the liver of the carp (*Cyprinus carpio* L.) Electron microscopic cytochemical and biochemical studies. *Histochemistry* **40**: 137-154.
- Kraupp-Grasl, B., Huber, W., Taper, H., Schulte-Hermann, R. (1991) Increased susceptibility of aged rat to hepatocarcinogenesis by the peroxisome proliferator nafenopin and the possible involvement of altered liver foci occurring spontaneously. *Cancer Res.* **51**. 666-671.
- Krey, G., Braissant, O., L'Horsset, F., Kalkhoven, E., Perroud, M., Parker, M., Wahli, W. (1997) Fatty acids, eicosanoids and hypolipidemic agents identified as ligands of peroxisome proliferator-activated receptors by CARLA. *Mol. Endocrinol.* **11**: 779-791.

-
- Kvestak, R., Ahel, M. (1994) Toxic metabolites from nonionic surfactants in the Krka river estuary. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **28**: 25-35.
- Kvestak, R., Ahel, M. (1995) Biotransformation of nonylphenol polyethoxylate surfactants by estuarine mixed bacterial cultures. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **29**: 551-556.
- Lake, B. (1995) Mechanisms of hepatocarcinogenicity of peroxisome-proliferating drugs and chemicals. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **35**: 483-507.
- Latruffe, N. (1993) Les peroxysomes, marqueurs de toxicité. *Biofutur* **126**: 36-40.
- Lazarow, P. (1994) Peroxisomes. In: *The Liver: Biology and Pathobiology* (Arias, I., Boyer, J., Fausto, N., Jakoby, W., Schachter, D., Shafritz, D., eds), Raven Press, New York, pp. 293-307.
- Lazarow, P., De Duve, C. (1976) A fatty acyl-CoA oxidizing system in rat liver peroxisomes; enhancement by clofibrate, a hypolipidemic drug. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **73**: 2043-2046.
- Lazarow, P., Fujiki, Y. (1985) Biogenesis of peroxisomes. *Annu. Rev. Cell Biol.* **1**: 489-530.
- Lazier, C. and MacKay, M. (1993) Vitellogenin gene expression in teleost fish. In: *Biochemistry and Molecular Biology of Fish*. (Hochachka P. and Mommsen T., eds.), Elsevier Science, New York, vol. 2, pp. 391-405.
- Lazo, O., Singh, A., Singh, I. (1991) Postnatal development and isolation of peroxisomes from brain. *J. Neurochem.* **56**: 1343-1353.
- Leaver, M., Wright, J., George, S. (1997) Structure and expression of a cluster of glutathione s-transferase genes from a marine fish, the plaice (*Pleuronectes platessa*). *Biochem. J.* **321**: 405-412.
- Leaver, M., Wright, J., George, S. (1998) A peroxisomal proliferator-activated receptor gene from the marine flatfish, the plaice (*Pleuronectes platessa*). *Mar. Environ. Res.* **46**: 75-79.
- Lee, P. C., Lee, W. (1996) In vivo estrogenic action of nonylphenol in immature female rats. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **57**: 341-348.
-

- Lee, H., Peart, T. (1955) Determination of 4-NP in effluent and sludge from sewage treatment plants. *Anal. Chem.* **67**: 1967-1980.
- Lee, Ss-T., Pineau, T., Drago, J., Lee, E., Owens, J., Kroetz, D., Fernandez-Salguero, P., Westphal, H., Gonzalez, F. (1995) Targeted disruption of Alpha isoform of the peroxisome proliferator-activated receptor gene in mice results in abolishment of the pleiotropic effects of peroxisome proliferators. *Mol. Cell Biol.* **15**: 3012-3022.
- Lehman, J., Moore, L., Smith-Oliver, T., Wilkinson, W., Willson, T., Kliewer, S. (1995) An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ). *J. Biol. Chem.* **270**: 12953-12956.
- Leighton, F., Coloma, L., Koenig, C. (1975) Structure, composition, physical properties, and turnover of proliferated peroxisomes. *J. Cell Biol.* **67**: 281-309.
- Lemberger, T., Desvergne, B., Wahli, W. (1996) Peroxisome proliferator-activated receptors: a nuclear receptor signalling pathway in lipid physiology. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* **12**: 335-363.
- Leupold, C., Völkl, A., Fahimi, H. (1985) Luminometric determination of oxidase activity in peroxisomal fractions of rat liver: Glycolate oxidase. *Anal. Biochem.* **151**: 63-69.
- Lewis, S., Lech, J. (1996) Uptake, disposition, and persistence of nonylphenol from water in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Xenobiotica* **26**: 813-819.
- Liber, K., Knuth, M., Stay, F. (1999) An integrated evaluation of the persistence and effects of 4-nonylphenol in a experimental littoral ecosystem. *Environ. Toxicol. Chem.* **18** (3): 357-362.
- Livingstone, D., García-Martínez, P., Michel, X., Narbonne, J., O'hara, S., Ribera, D., Winston, G. (1990) Oxyradical production as a pollution-mediated mechanism of toxicity in the common mussel *Mytilus edulis* L. and other molluscs. *Funct. Ecol.* **4**: 415-424.
- Livingstone, D., Lemaire, P., Matthews, A., Peters, L., Porte, C., Fitzpatrick, P., Förlin, L., Nasci, C., Fossato, V., Wootton, N., Goldfarb, P. (1995) Assessment of the impact of organic pollutants on Goby (*Zosterisessor ophiocephalus*) and mussel (*Mytilus galloprovincialis*) from the Venice Lagoon, Italy: biochemical studies. *Mar. Environ. Res.* **39**: 235-240.

-
- Lobo-da-Cunha, A (1995) The peroxisomes of the hepatopancreas in the crab *Carcinus maenas*. *J Submicrosc. Cytol. Pathol.* **27**: 427-433.
- Lobo-da-Cunha, A. (1997) The peroxisomes of the hepatopancreas in two species of chitons. *Cell Tissue Res.* **290**: 655-664.
- Lobo-da-Cunha, A. and Azevedo, C. (1993) Ultrastructural and cytochemical identification of peroxisomes in the ciliate *Ichthyophthirius multifiliis*. *J. Euk. Microbiol.* **40**: 169-171.
- Lobo-da-Cunha, A., Batista, C., Oliveira, E. (1994) The peroxisomes of the hepatopancreas in marine gastropods. *Biol. Cell* **82**: 67-74.
- Lowry, O., Rosebrough, N., Farr, A., Randall, R. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.
- Magalhães, M. (1999) Peroxissomas, Glicossomas e Hidrogenossomas. In: *Biologia Celular e Molecular*. (Azevedo, C. eds) LIDEL-Edições Técnicas, Lisboa, pp. 269-273.
- Mahler, H., Hubscher, G., Baum, H. (1955) Studies on uricase. I. Preparation, purification and properties of a cuproproteine. *J. Biol. Chem.* **216**: 625-641.
- Maitre, J., Mercier, L., Dole, L., Valotaire, Y. (1985) Characterization of 17 β -estradiol specific receptors and induction of vitellogenin mRNA in the rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Biochemie* **67**:215-225.
- Mannaerts, G., Van Veldhoven, P.(1993) Metabolic pathways in mammalian peroxisomes. *Biochemie* **75**: 147-158.
- Marlasca, M., Sanpera, C., Riva, M. C, Sala, R., Crespo, S. (1998) Hepatic alterations and induction of micronuclei in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to a textile industry effluent. *Histol. Histopathol.* **13**: 703-712.
- Master, C., Crane, D. (1995). *The Peroxisomes: a vital organelle*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Masters, C. J., Holmes, R (1977) Peroxisomes: new aspects of cell physiology and biochemistry. *Physiol. Rev.* **57**: 816-882.
-

- Mather-Mihaich, E., Di Giulio, R. (1991) Oxidant, mixed-function oxidase and peroxisomal responses in channel catfish exposed to a bleached kraft mill effluent. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **20**: 391-397.
- Mayhew, T., Reith, A. (1988) Introducing basic principles and methods of stereology and morphometry. In: *Stereology and Morphometry in Electron Microscopy – Problems and Solution (An Ultrastructural Pathology Publication Series)*. (Reith, A and Mayhew T. eds), Hemisphere Publishing Corporation, New York, pp. 1-12.
- McLachlan, J., Korach, K. (1995) Estrogen in the environment, III: Global health implications. *Environ. Health Persp.* **103** (suppl. 7): 3-171.
- Mcleese, D., Zitko, V., Sergeant, D., Burrige, L., Metcalfe, C. (1981) Lethality and accumulation of alkylphenols in aquatic fauna. *Chemosphere* **10**: 723-730.
- Miura, S, Kasuya, A., Mori, H., Miyazawa, S., Osumi, T., Hashimoto, T., Fujiki, Y. (1992) Carboxyl-terminal consensus Ser-Lys-Leu-related tripeptid of peroxisomaç proteins functions in vitro as a minimal peroxisome targetint signal. *J. Biol. Chem.* **267**: 14405-14411.
- Mommsen, T., Walsh, P. (1988) Vitellogenesis and oocyte assembly. In: *Fish Physiology*. (Hoar, W. S and Randall, D. J. eds), Academic Press, vol XIA, pp. 135-142.
- Motojima, K. (1993) Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR): structure, mechanisms of activation and diverse functions. *Cell Struc. Func.* **18**: 267-277.
- Mueller, G., Kim, U. (1978) Displacement of 17 β -estradiol from estrogen receptors by simple alkylphenols. *Endocrinology* **102**: 1429-1435.0
- Mukherjee, R., Jow, L., Noonan, D., MsDonnel, D. (1994) Human and rat peroxisome proliferator activated receptors (PPARs) demonstrate similar tissue distribution but different responsiveness to PPAR activators. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **51**: 157-166.
- Nassour, I., Léger, C. (1989) Deposition and mobilisation of body fat during sexual maturation in female trout (*Salmo gairdneri* Richardson). *Aquat. Living Res.* **2**: 153-159.
- Naylor, G. (1992) Environmental fate of alkylphenol ethoxylates. *Soap Cosmet. Chem. Spec.* **68**: 27-32.

-
- Naylor, G., Mierure, J., Weeks, J., Castaldi, F., Romano, R. (1992) Alkylphenol ethoxylates in the environment. *J. Am. Oil Chemists Soc.* **69**: 695-703.
- Nelson, D., Kiesow, L. (1972) Enthalpy of decomposition of hydrogen peroxide by catalase at 25°C (with molar extinction coefficients of H₂O₂ solutions in the UV). *Anal. Biochem.* **49**: 472-478.
- Nemali, M., Reddy, M., Usuda, N., Reddy, P., Comeau, L., Rao, M., Reddy, J. (1989) Differential induction and regulation of peroxisomal enzymes: predictive value of peroxisome proliferation in identifying certain nonmutagenic carcinogens. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **97**: 72-87.
- Nemali, M., Usuda, N., Reddy, M., Oyaso, K., Hashimoto, T., Osumi, T., Rao, M., Reddy, J. (1988) Comparison of constitutive and inducible levels of expression of peroxisomal β -oxidation and catalase genes in liver and extrahepatic tissue of rat. *Cancer Res.* **48**: 5316-5324.
- Nimrod, A., Benson, W. (1996) Environmental estrogenic effects of alkylphenol ethoxylates. *Critical Reviews Toxicol.* **26**: 335-364.
- Nimrod, A., Benson, W. (1997) Xenobiotic Interaction with and alteration of channel catfish estrogen receptor. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **147**: 381-390.
- Nimrod, A., Benson, W. (1998) Reproduction and development of Japanese medaka following an early life exposure to xenoestrogens. *Aquatic Toxicol.* **44**: 141-156.
- Noguchi, T., Takada, Y., Fujiwara, S. (1979) Degradation of uric acid to urea and glyoxylate in peroxisomes. *J. Biol. Chem.* **254**: 5272-5275
- Norberg, B., Haux, C. (1985) induction, isolation and a characterization of lipid content of plasma vitellogenin from two *Salmo* species: rainbow trout (*Salmo gairdneri*) and sea trout (*Salmo trutta*). *Comp. Biochem. Physiol.* **81B**: 869-876.
- Novikoff, A., Shin, W. (1964) The endoplasmic reticulum in the Golgi zone and its relations to microbodies, Golgi apparatus and autophagic vacuoles in rat liver cells. *J. Microsc.* **3**: 187-206.
- Novikoff, P., Novikoff, A., Guintana, N., Davis, C. (1973) Studies on microperoxisomes. II. Observations on human and rat hepatocytes. *J. Histochem. Cytochem.* **21**: 540-558.

- Opperdoes, F., Borst, P. (1977) Localization of nine glycolytic enzymes in a microbody-like organelle in *Trypanosoma brucei*: the glycosome. *FEBS Lett.* **80**: 360-364.
- Orbea, A., Beier, K., Völkl, A., Fahimi, H., Cajaraville, M. (1999) Ultrastructural, immunocytochemical and morphometric characterization of liver peroxisomes in gray mullet, *Mugil cephalus*. *Cell Tissue Res.* **297**: 493-502.
- Osmundsen, H., Bremer, J., Pedersen, J. (1991) Metabolic aspects of β -oxidation. *Biochim. Biophys.* **1085**: 141-158.
- Osumi, T., Hashimoto, T., Ui, N. (1980) Purification and properties of acyl-CoA oxidase from rat liver. *J. Biochem.* **87**: 1735-1746.
- Osumi, M., Miwa, N., Teranishi, Y., Tanaka, A., Fukui, S. (1974) Ultrastructure of *Candida* yeasts grown on n-alkanes. Appearance of microbodies and its relationship to high catalase activity. *Arch. Microbiol.* **99**: 181-201.
- Osumi, T., Wen, J., Taketani, S., Hashimoto, T. (1993) Molecular mechanisms involved in induction of peroxisomal β -oxidation enzymes by hypolipidemic agents. In: *Peroxisomes: Biology and importance in Toxicology and Medicine*. (Gibson, G & Lake, B. eds.), Taylor & Francis, London, pp. 149-172.
- Owen, G. (1972) Peroxisomes in the digestive diverticula of the bivalve mollusc *Nucula sulcata*. *Z. Zellforsch.* **132**: 15-24.
- Pakdel, F., Feon, s., Le Gac, F., Le Menn, F., Valotaire, Y. (1991) In vivo estrogen induction of hepatic estrogen receptor mRNA and correlation with vitellogenin mRNA in rainbow trout. *Mol. Cell Endocrinol.* **75**: 205-212.
- Pakdel, F., Le Gac, F., Le Goff, P., Valotaire, Y. (1990) Full-length sequence and *in vitro* expression of rainbow trout estrogen receptor cDNA. *Mol. Cell Endocrinol.* **71**: 195-204.
- Paloaasi, P., Hiltunen, J. (1990) Peroxisomal bifunctional protein from rat liver is a trifunctional enzyme possessing 2-enoyl-CoA hydratase, 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase and Δ^3 , Δ^2 -enoyl-CoA isomerase activities. *J. Biol. Chem.* **265**: 2446-2449.
- Pedersen, J. (1993) Peroxisomal oxidation of the steroids side chain in bile acid formation. *Biochemie* **75**: 159-165.

- Pedersen, S., Christiansen, L., Pedersen, K., Korsgaard, B., Bjerregaard, P. (1999) In vivo estrogenic activity of branched and linear alkylphenols in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Scien. Total Environ.* **233**: 89-96.
- Pedrajas, J., López-Barea, J., Peinado, J. (1996) Dieldrin induces peroxisomal enzymes in fish (*Sparus aurata*) liver. *Comp. Biochem. Physiol.* **115C**: 125-131.
- Pelissero, C., Flouriot, G., Foucher, J., Bennetau, B., Dunogues, J., Le Gac, F., Sumpter, J. (1993) Vitellogenin synthesis in cultured hepatocytes: an *in vitro* test for the estrogenic potency of chemicals. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **44**: 263-272.
- Peters, L., Porte, C., Albaigés, J., Livingstone, D. (1994) 7-Ethoxyresorufin o-deethylase (EROD) and antioxidant enzyme activities in larvae of sardine (*Sardina pilchardus*) from the North Coast of Spain. *Mar. Poll.Bull.* **28**: 299-304.
- Pottinger, T. (1986) Estrogen-binding sites in the liver of sexually mature male and female brown trout, *Salmo trutta*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **61**: 120-126.
- Potter, T., Simmons, K., Wu, J., Sanchez-Olvera, M., Calabrese, E. (1999) Static die-away of nonylphenol ethoxylate surfactant in estuarine water samples. *Environ. Sci. Technol.* **33**: 113-118.
- Purdom, C., Hardiman, P., Bye, V., Eno, N., Tyler, C., Sumpter, J. (1994) Estrogenic effects of effluents from sewage treatment works. *Chem. Ecol.* **8**: 275-285.
- Rao, M., Reddy, J. (1989) The relevance of peroxisome proliferation and cell proliferation in peroxisome proliferator-induced hepatocarcinogenesis. *Drug. Metabol. Rev.* **21**: 103-110.
- Rao, M., Reid, B., Ide, H., Subbarao, V., Reddy, J. (1994) Dehydroepiandrosterone-induced peroxisome proliferation in the rat: evaluation of sex differences. *P.S.E.B.M.* **207** 186-190.
- Reddy, J., Mannaerts, G. (1994) Peroxisomal lipid metabolism. *Annu. Rev. Nutr.* **14**: 343-370.
- Rhodin, J. (1954) Correlation of ultrastructural organization in normal and experimentally changed proximal convoluted tubule cells of the mouse kidney, *PhD Thesis*, Karolinska Inst., Stockholm, Aktiebolaget Godvill.

- Roberts, R. (1999) Peroxisome proliferators: mechanisms of adverse effects in rodents and molecular basis for species differences. *Arch. Toxicol.* **73**: 413-418.
- Roberts, R., Soames, A. R., Gill, J. H., James, N. H., Wheeldon, E. B. (1995) Non-genotoxic hepatocarcinogens stimulate DNA synthesis and their withdrawal induces apoptosis, but in different hepatocyte populations. *Carcinogenesis* **16**: 1693-1698.
- Rocha, E. (2000) Morfologia Microscópica do Fígado da Truta Fário: Estudo Qualitativo e Quantitativo. *Tese de Doutoramento*, Porto, Instituto Ciências Biomédicas Abel Salazar, Universidade do Porto.
- Rocha, E., Lobo-da-Cunha, A., Monteiro, R. Silva, M., Oliveira, M. (1999). A Stereological study along the year on the hepatocytic peroxisomes of brown trout (*Salmo trutta*). *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.* **31**: 91-105.
- Rocha, E., Monteiro, R., Pereira, C. (1994) The liver of the brown trout, *Salmo trutta*: a light and electron microscope study. *J. Anat.* **185**: 241-249.
- Rocha, E., Mouteiro, R. (1999) Histology and cytology of fis liver: A review. In: *Ichthyology: recent Research Advances*. (Saksena, D., eds). Oxford & IBH publishing Co. Pvt. Ltd., New Deli, India, and Science Publishers, Inc., Enfield, New hampshire, USA, pp. 321-344.
- Rocha, E., Mouteiro, R., Pereira, C. (1997) Liver of the brown trout, *Salmo trutta*, (Teleostei, Salmonidae): a stereological study at light and electron microscopic levels. *Anat. Rec.* **247**: 317-328.
- Rocha, M., Rocha, E., Resende, A., Lobo-da-Cunha, A. (2000a) Variação sazonal de enzimas peroxissomais no fígado de truta fário com a maturação gonadal. *Bra. J. Morphol. Sci.* **17**: 67.
- Rocha, M., Rocha, E., Resende, A., Lobo-da-Cunha, A. (2000b) A spectrophotometric study on some peroxisomal enzymes from the liver of brown trout (*Salmo trutta*). *Fish Physiol. Biochem.* (submitted)
- Rodriguez-Ariza, A., Martínez-Lara, E., Pascual, P., Pedrajas, J., Abril, N., Dorado, G., Toribio, F., Bárcena, J., Peinado, J., Pueyo, C., López-Barea, J. (1993a) Biochemical and genetic indices of marine pollution in Spanish littoral. *Sci. Total. Environ.* **11**: 116-119.
- Rodriguez-Ariza, A., Peinado, J., Pueyo, C., López-Barea, J. (1993b) Biochemical indicators of oxidative stress in fish from polluted littoral areas. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **50**: 2568-2573.
- Roels, F., Espeel, M., Pauwels, M., De Cramer, D., Egberts, A., Van der Spek, P. (1991). Different types of peroxisome in human duodenal epithelium. *Gut* **32**: 858-865.

- Routledge, E., Sheahan, D., Desbrow, C., Brighty, G., Waldock, M., Sumpter, J. (1998) Identification of chemicals in SWT effluent. 2. In vivo responses in trout and roach. *Environ. Sci. Technol.* **32**: 1559-1565.
- Routledge, E., Sumpter, J. (1996) Estrogenic activity of surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen. *Environ. Toxicol. Chem.* **15**: 241-148.
- Routledge, E., Sumpter, J. (1997) Structural features of alkylphenolic chemicals associated with estrogenic activity. *J. Biol. Chem.* **272**: 3280-3288.
- Ruyter, B., Andersen, Ø., Dehli, A., Farrants, A., Gjoen, T., Thomassen, M. (1997) Peroxisome proliferator activated receptors in Atlantic Salmon (*Salmo salar*) : effects on PPAR transcription and acyl- CoA oxidase activity in hepatocytes by peroxisom proliferators and fatty acids. *Biochim. Biophys. Acta* **1348**: 331-338.
- Sakuraba, H., Fujiwara, S., Noguchi, T. (1996) Metabolim of glyoxylate, the end product of purin degradation in liver peroxisomes of fresh water fish. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **229**: 603-606.
- Sanchez-Moreno, M., Lasztity, D., Coppens, I., Opperdoes, F.R. (1992) Characterization of carbohydrate metabolisme and demonstration of glucosomes in a *Phytomonas* sp. isolate from *Euphorbia characias*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **54**: 185-200.
- Scarano, S., Calabrese, E., Kostecki, P., Baldwin, P., Baldwin, L., Leonard, D. (1994) Evaluation of a rodent peroxisome proliferator in two species of freshwater fish: rainbow trout (*Onchorynchus mykiss*) and Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Ecotoxicol. Environ. Safety*, **29**: 13-19.
- Schoonjans, K., Geneviève, M., Staels, B., Auwerx, J. (1997) Peroxisome proliferator-activated receptors, orphans with ligands and functions. *Current Opinion Lipidol.* **8**:159-166.
- Schoonjans, K., Peinado-Onsurbe, J., Lefebvre, A., Heyman, R., Briggs, M., Deeb, S., Staels, B., Auwerx, J. (1996a). PPAR α and PPAR γ activators direct a distinct tissue-specific transcriptional response via a PPRE in the lipoprotein lipase gene. *EMBO J.* **15**:5336-5348.
- Schoonjans, K., Staels, B., Auwerx, J. (1996) Role of the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) in mediating the effects of fibrates and fatty acids on gene expression. *J. Lipid Res.* **37**: 907-925.
- Schulz, H. (1991) β -Oxidation of fatty acids. *Biochim. Biophys. Acta.* **1081**: 109-120.

- Scott, A. (1987) Reproductive endocrinology of fish. In: *Fundamentals of Comparative Vertebrate Endocrinology*. (Chester-Jones, I., Ingleton, P. M., Phillips, J. G. eds.), Plenum Press, New York, pp. 223-256.
- Scott, P., Visentin, L., Allen, J. (1969) The enzymatic characteristics of peroxisomes of amphibian and avian liver and kidney. *Ann. NY Acad. Sci.* **168**: 244-264.
- Segner, H., Braunbeck, T. (1990) Adaptative changes of liver composition and structure in golden ide during winter climatization. *J. Exp. Zool.* **255**: 171-185.
- Shalev, A., Siegrist-Kaiser, C., Yen, P., Wahli, W., Burger, A., Chin, W., Meier, C. (1996) The peroxisome proliferator-activated receptor α is a phosphoprotein: regulation by insulin. *Endocrinology* **137**: 4499-4502.
- Sharpe, R. M., Skakkebaek, N. (1993) Are oestrogens involved in falling sperm counts and disorders of the male reproductive tract? *Lancet* **341**: 1392-1399.
- Shen, K., Novak, R. (1997) DDT stimulates c-erbB2, c-met and STATs tyrosine phosphorylation, Grb2-Sos association, MAPK phosphorylation and proliferation of human breast epithelial cells. *Biochem. Biophys. Resear. Communic.* **231**: 17-21.
- Shiraishi, H., Carter, D., Hites, R. (1989) Identification and determination of tert-alkylphenols in carp from the Trenton channel of the Detroit River, USA. *Biomed-Environ. Mass Spec.* **18**: 478-483.
- Shore, L., Gurewitz, M., Shemesh, M. (1993) Estrogen as an environmental pollutant. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **51**: 361-366.
- Silversand, C., Haux, C. (1995) Fatty acid composition of vitellogenin from four teleost species. *J. Comp. Physiol.* **164B**: 593-599.
- Singh, I. (1997) Biochemistry of peroxisomes in health and disease. *Mol. Cell Biochem.* **167**: 1-29.
- Small, G. M., Szabo, L., Lazarow, P. (1988) Acyl-CoA oxidase contains two targeting sequences each of which can mediate protein import into peroxisomes. *EMBO J.* **7**: 1167-1173.
- Smith, J., Thomas, P. (1990) Binding characteristics of the hepatic estrogen receptor of spotted seatrout, *Cynoscion nebulosus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **77**: 29-42.

- Solé, M., Porte, C., Albaigés, J. (1995) Seasonal variation in the mixed-function oxygenase system and antioxidant enzymes of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Environ. Toxicol. Chem.* **14**: 157-164.
- Sørensen, H. N., Treuter, E., Gustafsson, J. (1998) Regulation of Peroxisome Proliferator-Activated Receptors. *Vitamins and Hormones*. **54**: 121-166.
- Soto, A., Justicia, H., Wray, J., Sonnenschein, C. (1991) P-nonylphenol: an estrogenic xenobiotic released from modified polystyrene. *Environ. Health Perspect.* **92**: 167-173.
- Soto, A., Lin, T., Justicia, H., Silvia, R., Sonnenschein, C. (1992) An "in culture" bioassay to assess the estrogenicity of xenobiotics (E-Screen). In: *Chemically Induced Alterations in Sexual and Functional Development: The Wildlife/Human Connection* (Colburn, T. and Clement, C., eds), Princeton Scientific Publishing, Princeton, New Jersey, pp. 295-309.
- Spearow, J., Doemeny, P., Sera, R., Leffler, R., Barkley, M. (1999) Genetic variation in susceptibility to endocrine disruption by estrogen in mice. *Science* **285**: 1259-1261.
- Steinmetz, R., Young, P., Caperell-Grant, A., Gize, E., Madhukar, B., Ben-Jonathan, N., Bigsby, R. (1996) Novel estrogenic action of the pesticide residue β -hexachlorocyclohexane in human breast cells. *Cancer Resear.* **54**: 5403-5409.
- Sterio, D. (1984) The unbiased estimation of number and sizes of arbitrary particles using the disector. *J. Microscop.* **134**: 127-136.
- Stewart, J., Carlin, R., MacDonald, J., Van Iderstine, S. (1994) Fatty acid binding proteins and fatty acid catabolism in marine invertebrates: peroxisomal β -oxidation. *Invertebr. Reprod. Develop.* **25**: 73-82.
- Subramani, S. (1993) Protein import into peroxisomes and biogenesis of the organelle. *Annu. Rev. Cell Biol.* **9**: 445-478.
- Subramani, S. (1996a) Convergence of model systems for peroxisomes biogenesis. *Curr. Opin. Cell Biol.* **8**: 513-518.
- Subramani, S. (1996b) Protein translocation into peroxisomes. *J. Biol. Chem.* **271**: 32483-32486.

- Sumpter, J., Jobling, S. (1995) Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. *Environ. Health Perspect.* **103**: 173-178.
- Sundram, K., Szeto, S. (1981) The dissipation of nonylphenol in stream and pond water under simulated field conditions. *J. Environ. Sci. Health* **16**: 767-776.
- Swan, S., Elkin, E., Fenster, L. (1997) Have sperm densities declined? A reanalysis of global trend data. *Environ. Health Perspect.* **105**: 1228-1232.
- Swinkles, B., Gould, S., Bodnar, A., Rachubinski, R., Subramani, S. (1991) A novel cleavable peroxisomal targeting signal at the amino-terminus of the rat 3-ketoacyl-CoA-thiolase. *EMBO. J.* **10**: 3255-3262.
- Takada, Y., Noguchi, T. (1986) Ureidoglycolate lyase, a new metalloenzyme of peroxisomal urate degradation in marine fish liver. *Biochem. J.* **235**: 391-397.
- Tanghe, T., Dhooge, W., Yestraete, W. (1999) Isolation of a bacterial strain able to degrade branched nonylphenol. *Appl. Environ. Microb.* **65**: 746-751.
- Thibaut, R., Debrauwer, L., Rao, D., Cravedi, J. (1998). Characterization of biliary metabolites of 4-n-nonylphenol in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Xenobiotica* **28**: 745-757.
- Thomas, J. (1997) Phytoestrogens and hormonal modulation: a mini-review. *Environ. Nutr. Interact.* **1**: 5-12.
- Thung, S., Gerber, M. (1996) Liver. In: *Histology for Pathologists*. (Sternberg, S., eds) Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, USA. **pp.** 625-638.
- Tisher, C., Bulger, R., Trump, B. (1966) Human renal ultrastructure. I. Proximal tubule of healthy individuals. *Lab. Invest.* **15**: 1357-1394.
- Tisher, C., Finkel, R., Rosen, S., Kendig, E. (1968) Renal microbodies in the Rhesus monkey. *Lab. Invest.* **19**: 1-6.
- Tontonoz, P., Hu, E., Graves, R., Budavari, A., Spiegelman, B. (1994) mPPAR γ 2: Tissue-specific regulator of an adipocyte enhancer. *Genes and Development.* **8**: 1224-1234.

- Tugwood, J., Issemann, I., Anderson, R., Bundell, K., McPheat, W., Green, S. (1992). The mouse peroxisome proliferator activated receptor recognizes a response element in the 5' flanking sequence of the rat acyl CoA oxidase gene. *EMBO J.* **11**: 433-439.
- Tyler, C. (1991) Vitellogenesis in salmonids. In Proc. 4th Int. Symp. Reproductive Physiology of Fish (Scott, A., Sumpter, J., Kime, D. and Rolfe, M., eds), Sheffield, *Fish Simp.* **91**: 295
- Usuda, N., Hayashi, S., Fujiwara, S., Noguchi, T., Nagata, T., Rao, M., Alvares, K., Reddy, J., Yeldandi, A. (1994) Uric acid degrading enzymes, urate oxidase and allantoinase, are associated with different subcellular organelles in frog liver and kidney. *J. Cell Sci.* **107**: 1073-1081.
- Usuda, N., Reddy, M., Hashimoto, T., Rao, M., Reddy, J. (1988) Tissue specificity and species differences in distribution of urate oxidase in peroxisomes. *Lab. Invest.* **58**: 100-111.
- Van Bohemen, Ch., Lambert, J., Peute, J. (1981) Annual changes in plasma and liver in relation to vitellogenesis in the female rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **44**: 94-107.
- Van Breemen, V., Montgomery, J. (1960) Ultrastructure of cytoplasmic "metasomes" found in renal proximal tubular cells. *Norelco Rep.* **7**: 7-18.
- Van den Bosch, H., Schutgens, R., Wanders, R., Tager, J. (1992) Biochemistry of peroxisomes. *Annu. Rev. Biochem.* **61**: 157-197.
- van den Munckhof, R., Bosch, K., Frederiks, W. (1998) The different effects of the peroxisome proliferators clofibric acid and bis(2-ethylhexyl)phthalate on the activities of peroxisomal oxidases in rat liver. *Histochem. J.* **30**: 339-349.
- Van Veldhoven, P., Just, W., Mannaerst, G. (1987) Permeability of the peroxisomal membrane to cofactors of β -oxidation. Evidence for the presence of a pore-forming protein. *J. Biol. Chem.* **262**: 4310-4318.
- Veenhuis, M., Wendelaar Bonga (1977) The cytochemical demonstration of catalase and D-amino acid oxidase in the microbodies of teleost kidney cells. *Histochem. J.* **9**: 171-181.
- Veenhuis, M., Wendelaar Bonga, S. (1979) Cytochemical localization of catalase and several hydrogen peroxide-producing oxidases in the nucleoids and matrix of rat liver peroxisomes. *Histochem. J.* **11**: 561-572.

- Veldhoven, P., Mannaerts, G. (1985) Comparison of the activities of some peroxisomal and extraperoxisomal lipid-metabolizing enzymes in liver and extrahepatic tissues of the rat. *Biochem. J.* **227**: 737-741.
- Veranic, P., Pipan, N. (1992) The relationship between endoplasmic reticulum and peroxisomes in fish hepatocytes during 17 β -estradiol stimulation and after cessation of vitellogenesis. *Period. Biol.* **94**: 29-34.
- VölK, A., Baumgart, E., Fahimi, H. (1988) Localization of urato oxidase in the cores of rat liver peroxisomes by immunocytochemistry and immunoblotting. *J. Histochem. Cytochem.* **36**: 623-632.
- Vom Saal, F. S., Montan, M., Wang, M. (1992) Sexual differentiation in mammals. In: *Chemically Induced Alterations in Sexual and Functional Development: the wildlife/ human connection*. (Colborn, T. and Clemens, C., eds.). Scientific Publishing, Princeton, New Jersey, pp, 17-83.
- Xing, Y., Drackley, J., Odle, J. (1998) Food deprivation changes peroxisomal β -oxidation activity but not catalase activity during postnatal development in pig tissues. *Biochem. Molec. Roles Nutrien.* 1114-1121.
- Williams, P., Warwick, R. (1980) Splanchnology – The Liver. In: *Gray's anatomy*. (Churchill L., eds), London, U.K., pp: 1374-1382.
- Yadatie, F., Arukwe, A., Goksoyr, A., Male, R. (1999) Induction of hepatic estrogen in juvenile Atlantic salmon in vivo by the environmental estrogen, 4-nonylphenol. *Scien. Total Environ.* **233**: 201-210.
- Yamamoto, T. (1962) Some observations on the fine structure of the terminal biliary passages in the goldfish liver. *Anat. Rec.* **142**: 293.
- Yamamoto, T. (1965) Some observations on the fine structure of the intrahepatic biliary passages in goldfish (*Carassius auratus*). *Zeitsch. Zellforsch.* **65**: 319-330.
- Yamamoto, T. (1969) Sex differentiation. In: *Fish Physiology*. (Hoar, W, S. and Randall, d. J., eds.), Academic Press, New York, Vol.III, pp. 117-175.
- Yamamoto, K., Fahimi, H. (1987) Three-dimensional reconstruction of a peroxisomal reticulum in regenerating rat liver: evidence of interconnections between heterogenous segments. *J. Cell Biol.* **105**: 713-722.

- Yamamoto, T., Ohashi, Y., Teranishi, M., Takaoka, M., Manabe, S., Matsunuma, N., Makita, T. (1995) Age-related changes in the susceptibility to clofibric acid, a hypolipidemic agent, of male rat liver. *Toxicol. Lett.* **78**: 141-145.
- Yang, J. H., Kostecky, P., Calabrese, E., Baldwin, L. (1990) Induction of peroxisomes proliferation in rainbow trout exposed to ciprofibrate. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **104**: 476-482.
- Yasuda-Kamatani, Y., Nakamura, M., Minakata, H., Nomoto, K., Sakiyama, F. (1995) A novel cDNA sequence encoding the precursor of the D-amino acid-containing neuropeptide fulicin and multiple α -amidated neuropeptides from *Achatina fulica*. *J. Neurochem.* **64**: 2248-2255.
- Yeldandi, A., Usuda, N., Chu, R., Erfurth, F., Yeldandi, V. (1995) Molecular analysis, subcellular localization and tissue distribution of enzymes involved in uric acid degradation. *Histochem. Cytochem. Acta* **28**: 173-180.
- Yeldandi, A., Wang, X., Alvares, k., Kumar, S., Rao, M., Reddy, J. (1990) Human urate oxidase gene: cloning and partial sequence analysis reveal a stop codon with the fifth exon. *Biochim Biophys. Res. Commun.* **171**: 641-646.
- Yeoh, C., Schreck, C., Feist, G., Fitzpatrick, M. (1996) Endogenous steroid metabolism is indicated by fluctuations of endogenous steroid and steroid glucuronide levels in early development of the stellhead trout (*Oncorhynchus mykiss*) *Gen. Comp. Endocrinol.* **103**: 107-114.
- Yokota, S. (1993) Formation of autophagosomes during degradation of excess peroxisomes induced by administration of dioctyl phthalate. *Eur. J. Cell Biol.* **61**: 67-80.
- Yokota, S., Asayama, K. (1990) Peroxisomes of the rat cardiac and soleus muscles increase after starvation. A biochemical and immunocytochemical study. *Histochemistry* **93**: 287-293.
- Yoshikuri, M., Nagahama, Y. (1991) Endocrine Regulation of Gametogenesis in Fish. *Bull. Inst. Zool.* **16**: 139-172.
- Wanders, R., Barth, P., Schutgens, R., Tager, J. (1993) Peroxisomal disorders. In: *Peroxisome: Biology and Importance in Toxicology and Medicine*. (Gibson, G. and Lake, B., eds.), Taylor & Francis, London, pp. 63-98.
- Waterham, H., Cregg, J. (1997) Peroxisomes biogenesis. *Bioassays* **19**: 57-66.

- Waterham, H., Titorenko, V., Swaving, G., Harder, W., Veenhuis, M. (1993) Peroxisomes in the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* do not necessarily derive from pre-existing organelles. *EMBO J.* **12**: 4785-4794.
- Weibel, E. (1979) *Stereological Methods. Vol. I. Practical Methods for Biological Morphometry.* Academic Press, London.
- White, G. F. (1993) Bacterial biodegradation of ethoxylated surfactants. *Pestic. Sci.* **37**: 159-166.
- White, R., Jobling, S., Hoare, S., Sumpter, J., Parker, M. (1994) Environmentally persistent alkylphenolic compounds are estrogenic. *Endocrinology* **135**: 175-182.
- Wolff, M., Toniolo, P., Lee, E., Rivera, M., Dubin, N. (1993) Blood levels of organochlorine residues and risk of breast cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* **85**: 648.
- Wouters, F., Mackman, M., De Graaf, P., Hauser, H., Tabak, H., Wirtz, K., Moorman, A. (1995) The immunohistochemical localization of non-specific lipid transfer protein (sterol carrier protein-2) in rat small intestine enterocytes. *Biochim. Biophys. Acta* **1259**: 192-196.
- Zaar, K. (1992) Structure and function of peroxisomes in the mammalian kidney. *Eur. J. Cell Biol.* **59**: 233-254.
- Zaar, K., Gorgas, K. (1985) Peroxisome-endoplasmic reticulum aggregates in the duck uropygial gland. *Eur. J. Cell Biol.* **38**: 322-327.
- Zaar, K., Völkl, A., Fahimi, H. (1989) D-aspartate oxidase in rat, bovine and sheep kidney cortex is localized in peroxisomes. *Biochem. J.* **261**: 233-238.
- Zaar, K., Völkl, A., Fahimi, H. (1991) Purification of marginal plates from bovine renal peroxisomes: identification of L- α -hydroxyacid oxidase B. *J. Cell. Biol.* **113**: 113-121.
- Zacharewski, T. (1997) A review of *in vitro* bioassays for assessing estrogenic substances. *Environ. Sci. Technol.* **31**: 613-623.
- Zhu, Y., Qi, C., Korenberg, J., Chen, X., Noya, D., Rao, M., Reddy, J. (1995) Structural organization of mouse peroxisome proliferator-activated receptor γ (mP-PAR γ) gene: Alternative promoter use and different splicing yield two mPPAR γ isoforms. *Proc Natl. Acad. Sci.* **92**: 7921-7925.