

ESTUDO ELETROFORÉTICO DAS PROTEÍNAS PLASMÁTICAS DO BAGRE, *Rhamdia hilarii*, EM RELAÇÃO AO CICLO REPRODUTIVO

(Electrophoretic study of the plasma proteins of the catfish, *Rhamdia hilarii*, in relation to the reproductive cycle).

Nely FENERICH-VERANI<sup>1</sup>  
Heloisa Maria GODINHO<sup>1</sup>  
Phan van NGAN<sup>2</sup>

RESUMO

Foram estudadas as proteínas plasmáticas do bagre, *Rhamdia hilarii*, pelo método de eletroforese em membranas de poliacrilamida e determinadas as concentrações de proteína total pelo método de biureto, durante um ciclo reprodutivo. Nos eletroferogramas, identificou-se uma fração, específica de fêmeas que já iniciaram o processo de vitelogenese.

Paralelamente, testaram-se os efeitos de benzoato de estradiol e de gonadotropina coriônica humana (HCG) sobre os padrões eletroforéticos, tendo-se constatado que o estrógeno induziu o aparecimento de fração específica de fêmeas maduras em todos os exemplares tratados. Entretanto, com o HCG, nenhuma alteração foi observada.

A concentração de proteína total variou de 2,35 g/dl a 5,80g/dl, para ambos os sexos e nenhuma marcada alteração foi detectada durante o ciclo reprodutivo ou em relação à variação do comprimento total dos peixes.

ABSTRACT

Plasma proteins of the catfish *Rhamdia hilarii*, were analysed by the method of electrophoresis on polyacrylamide gels, and measured the total protein contents by the biuret reaction, during the reproductive cycle. The electropherograms showed a specific band in females that had started the vitellogenesis process.

Parallel tests were performed in order to investigate the effects of estradiol benzoate and human chorionic gonadotropin (HCG) on the electropherograms. It was observed that the estradiol benzoate caused the appearance of the specific band of mature females in all treated fishes. No alteration was observed in the fishes injected with HCG.

The total plasma protein content ranged from 2,35 g/dl to 5,80 g/dl for males and females and no obvious changes were detected throughout the reproductive cycle or in relation to the body length of the fishes.

1. INTRODUÇÃO

Durante o ciclo reprodutivo dos peixes, ocorrem alterações em numerosos componentes do sangue, tendo sido detectadas variações nos padrões eletroforéticos das proteínas do soro sanguíneo para uma série de espécies BOOKE (1964a), THRUSTON (1967), AIDA; NGAN; HIBIYAT (1973).

Com relação à reprodução, foram registradas variações nos níveis plasmáticos de cálcio GARROD & NEWALL, (1958) BOOKE, (1964b), AIDA; NGAN; HIBIYAT (1973), de sódio HIROSE & ISHIDA, (1974) de lipídios e de aldeídos de

vitamina A PLACK & WOODHEAD (1966). Essas variações estão aparentemente relacionadas com o grau de concentração do hormônio sexual durante a maturação gonadal HOAR, (1969).

Os objetivos do presente trabalho foram verificar o padrão eletroforético do plasma sanguíneo do bagre, *Rhamdia hilarii*, suas variações fisiológicas e quantificar a concentração de proteína total do plasma durante o ciclo reprodutivo. Pretendeu-se ainda examinar a ação de hormônios envolvidos na maturação gonadal e na ovulação sobre os padrões eletroforéticos plasmáticos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

As amostras de sangue analisadas neste estudo foram obtidas de exemplares adultos de bagre, *Rhamdia hilarii*, com gônadas em diferentes estádios de maturação, coletados quinzenalmente, de

novembro de 1978 a agosto de 1980, no rio Jaguari, Estado de São Paulo.

O sangue foi retirado com seringa através da aorta dorsal e imediatamente centrifugado durante

(1) Pesquisadores Científicos - Seção de Biologia Aquática-Divisão de Pesca Interior-Instituto de Pesca.

(2) Professor Assistente-DR-Departamento de Oceanografia Biológica - Instituto Oceanográfico - USP.

Enviado para publicação em 16.05.84.

30 minutos a 3500 rpm. O plasma, coletado e conservado em congelador a -20°C, foi utilizado dentro de um limite máximo de 30 dias após a amostragem. De cada exemplar, foram anotados dados de comprimento total em centímetros, peso total e peso das gônadas em gramas, identificando-se o sexo e o estágio de desenvolvimento gonadal GODINHO, (1972).

Para se examinar a ação dos hormônios, envolvidos na maturação gonadal e na ovulação, sobre os padrões eletroforéticos plasmáticos, foram desenvolvidos experimentos com aplicação de benzoato de estradiol, independentemente do sexo e do estágio de desenvolvimento gonadal e de gonadotropina coriônica humana em fêmeas maduras.

Para os experimentos com benzoato de estradiol, 50 exemplares foram colocados em aquários individuais de 100 l cada, com arejamento constante e temperatura ao redor de 20°C. Estes experimentos tiveram a duração de sete dias, as injeções e a alimentação forçada com fígado bovino foram ministradas no primeiro e no quarto dia. No sétimo dia, retiraram-se as amostras de sangue através da aorta dorsal e imediatamente sacrificou-se o animal. O regime experimental constou de injeções intraperitoneais de 10 µg por grama de peso total; animais controle receberam injeções de solução salina.

Os experimentos com HCG, realizados com 50 animais, tiveram a duração de três dias. No primeiro dia implantou-se uma cânula na aorta dorsal segundo NGAN; HANUY; HIBIYA (1973), retirando-se amostra do sangue. Vinte e quatro horas após a implantação, injetou-se pela cânula 2 IU/g de peso total. Foram retiradas mais duas amostras de sangue, uma a cada 12 horas subsequentes. Animais controle receberam injeções de solução salina. Nos experimentos de indução da reprodução desta espécie, o HCG induz à desova entre 14 e 18 horas após sua aplicação.

**Análises** – No início do presente estudo foram testadas técnicas de eletroforese em acetato de celulose e em poliacrilamida. Esta última propiciou um número maior de frações que poderiam oferecer um perfil mais completo das proteínas plasmáticas

do bagre. O método utilizado foi o de AKROYD (1967), com algumas modificações. As principais foram: permitiu-se um contato direto entre o gel e o tampão em lugar de ponte de papel de filtro, o gel foi preparado dentro da cuba utilizando-se 20% de agar em tampão em vez de plasticina para selar a abertura inferior, entre as placas de molde. A membrana era constituída de duas camadas de diferentes concentrações de gel em diferentes tampões BREWER; PESCE; ASHWORTH (1974). Para visualização das bandas foi utilizada a coloração Comassie Blue para proteína total. Foram empregados também as colorações PAS (para glicoproteínas) e Sudan Black (para lipoproteínas) nos eletroferogramas de fêmeas com gônadas em maturação, maduras e de animais experimentais. Foram realizados eletroferogramas de amostras de plasma de 164 exemplares, 89 fêmeas e 75 machos, em diferentes estádios de maturação gonadal e de todos os peixes experimentais.

Como estudos sobre cruzamentos não foram realizados, a base genética da variação eletroforética foi inferida pela concordância de distribuições fenotípicas pela lei de Hardy-Weinberg FER-GUSON, (1980).

A concentração de proteína total do plasma foi medida pelo método colorimétrico de biureto GORNALL et alii, (1963), CAMPBELL et alii (1964), tendo-se utilizado 382 exemplares, 169 fêmeas e 213 machos, coletados durante um ciclo reprodutivo. Esses dados foram agrupados mensalmente, por sexo, e analisados graficamente em relação à curva de maturação da espécie, representada pela distribuição mensal dos valores médios do índice gônado-somático:

$$\overline{\text{IGS}} = \frac{\text{peso da gônada}}{\text{peso total do corpo}} \cdot 100$$

Os dados de concentração de proteína total plasmática foram também relacionados à variação do comprimento total dos exemplares analisados.

### 3. RESULTADOS

#### Eletroforese

Foram analisados os eletroferogramas de machos e de fêmeas coletados durante um ciclo reprodutivo, tendo-se constatado grande variedade de diferenças individuais. Foram reconhecidas 8 regiões, designadas do cátodo ao ânodo em A, B, C, D, E, F, G e H (Figura 1).

A região designada como A é constituída por uma banda identificada somente nos eletroferogramas das fêmeas com ovários nos estádios de maturação e maduro (FIGURA 2). Esta banda apresentou reação positiva ao PAS e ao Sudan Black, o que indica que seja uma glicolipoproteína. Sua posição é a mais catódica, sendo de baixa mobili-

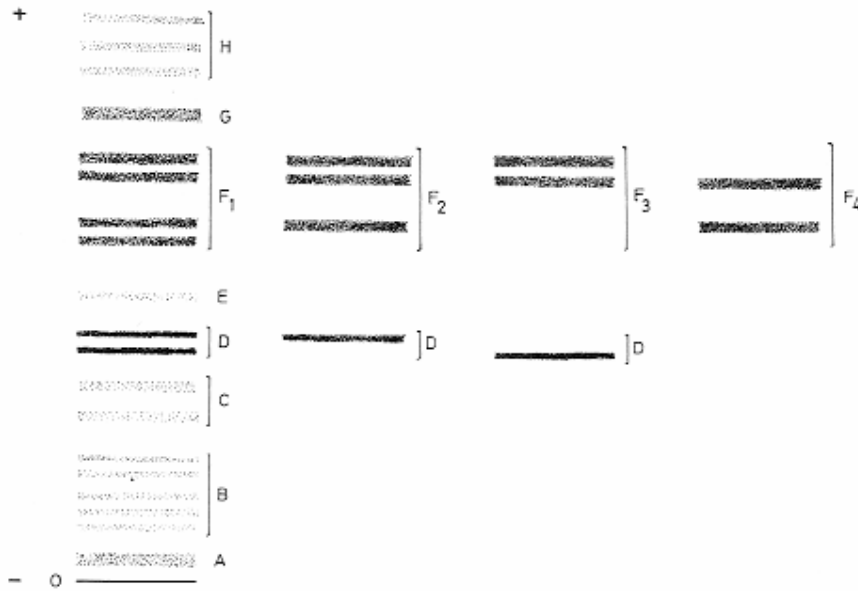


FIGURA 1 – Esquema do padrão eletroforético das proteínas plasmáticas do bagre, *R. hilarii*, e representação das variações fenotípicas ocorridas nas regiões D e F. (O – interface de dois géis).

TABELA 1  
 Frequências fenotípicas observadas e esperadas da região D dos eletroferogramas plasmáticos de bagre, *Rhamdia hilarii*.

Frequências	Fenótipos			Total	X <sup>2</sup> observado
	AA	AB	BB		
Observadas	40	110	73	223	0,0165 **
Esperadas	40,47	109,06	73,47	223	

p = 0,4260 (probabilidade de ocorrência do alelo A)

q = 0,5740 (probabilidade de ocorrência do alelo B)

(\*\*) não significativo ao nível de 99% de confiança

TABELA 2  
 Frequências absolutas e percentuais (entre parênteses) dos padrões observados na região F dos eletroferogramas plasmáticos de bagre, *Rhamdia hilarii*, considerados para fêmeas (A) e machos (B), em relação aos estádios de desenvolvimento gonadal.

(A)					
Estádios	Padrões				Total
	F <sub>1</sub>	F <sub>2</sub>	F <sub>3</sub>	F <sub>4</sub>	
Repouso	6 (16)	14 (37)	5 (13)	13 (34)	38
Maturação	2 (14)	3 (21)	3 (21)	6 (43)	14
Maduro	9 (43)	4 (19)	3 (14)	5 (24)	21
Esgotado	2 (12)	7 (44)	- (-)	7 (44)	16
Total	19 (21)	28 (32)	11 (12)	31 (35)	89

(B)					
Estádios	Padrões				Total
	F <sub>1</sub>	F <sub>2</sub>	F <sub>3</sub>	F <sub>4</sub>	
Repouso	1 (9)	2 (18)	2 (18)	6 (55)	11
Maturação	2 (15)	- (-)	1 (8)	10 (77)	13
Maduro	1 (3)	12 (43)	5 (18)	10 (36)	28
Esgotado	2 (9)	8 (35)	1 (4)	12 (52)	23
Total	6 (8)	22 (29)	9 (12)	38 (51)	75

dade eletroforética.

Na região B foi possível constatar até cinco bandas finas e algumas combinações entre elas.

Na região C, duas bandas foram constantes, assim como a banda da região E e da região G.

A manifestação das bandas da região D foi interpretada como um polimorfismo em um loco gênico envolvendo dois alelos codominantes (A, B), cujos padrões fenotípicos podem ser observados nas FIGURAS 1 e 3. As distribuições de frequência de ocorrência fenotípicas observadas corresponderam às esperadas pela aplicação da lei de Hardy-Winberg, pois através do teste  $\chi^2$  (qui-quadrado) obteve-se um valor não significativo a nível de 99% de confiança (TABELA 1). Os três tipos de padrão independem de sexo, estágio de desenvolvimento gonadal e do comprimento total do corpo.

A região F é a mais evidenciada, podendo ser constituída por quatro, três ou duas bandas. Para

se verificar a possível causa dessa variação os diferentes padrões (F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub>, F<sub>3</sub> e F<sub>4</sub>) foram analisados separadamente, considerando-se os sexos em relação aos estádios de desenvolvimento gonadal (TABELA 2) e às classes de comprimento total (TABELA 3). Pela análise das tabelas, para o total de exemplares analisados, constatou-se que tanto para machos como para fêmeas há maior ocorrência dos padrões F<sub>2</sub> e F<sub>4</sub>. Entretanto, observou-se ainda que não há uma distribuição tendenciosa das frequências percentuais dos diferentes padrões em relação aos estádios de desenvolvimento gonadal, sendo válida a mesma consideração quando analisadas em relação às classes de comprimento total.

Finalmente, a região H apresentou de uma a três bandas fracamente coradas.

Com relação aos animais experimentais, verificou-se o aparecimento daquela banda específica de fêmeas maduras nos eletroferogramas plasmá-

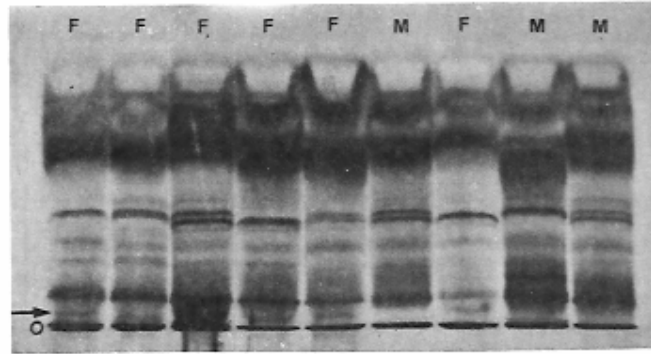


FIGURA 2 – Eletroferogramas das proteínas plasmáticas de fêmeas maduras (F) e de machos (M) do bagre, *R. hilarii*. A seta indica a banda A, específica de fêmeas maduras (O – interface de dois géis).

ticos de todos os peixes tratados com benzoato de estradiol. Mesmo nos machos, essa banda apresentou-se bastante evidente, corando-se fortemente por Comassie Blue, PAS e Sudan Black.

Não foram observadas alterações na composição das proteínas plasmáticas de peixes controle.

Nenhuma alteração foi induzida nos eletroferogramas plasmáticos dos peixes injetados com HCG.

**Concentração de proteína total** – A amplitude dos valores de concentração de proteína total foi de 2,35 g/dl a 5,80 g/dl, para ambos os sexos. Embora mensalmente tenham sido observadas oscilações dentro desta amplitude, os resultados parecem não indicar uma variação direcionada em relação ao processo reprodutivo, analisado em função da curva de maturação (FIGURA 5). Esta observação pode também ser considerada em relação à variação do comprimento total dos peixes (de 17 a 37 cm).

#### 4. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Os eletroferogramas em policrilamida das proteínas do plasma sanguíneo do bagre revelaram várias bandas, sendo uma delas específica de fêmeas com ovários que já iniciaram o processo de vitelogenese (em maturação e maduros). Diferenças sexuais na composição das proteínas plasmáticas em relação à maturação gonadal foram encontradas em várias espécies de teleosteos DRILHON & FINE, (1963), AIDA; NGAN; HIBIYAT (1973), HARA, (1978).

Injeções de benzoato de estradiol promoveram alterações no padrão eletroforético plasmático do bagre, evidenciando a fração específica nas fêmeas com ovários maduros e induzindo seu aparecimento em exemplares de ambos os sexos, independentemente do estágio de desenvolvimento gonadal. Essa fração caracterizou-se como lipoglicoproteína, de alto peso molecular, como indicado pela baixa mobilidade eletroforética. Em ayu, *Pleco-*

*glossus altivelis*, AIDA; NGAN; HIBIYAT, (1973) reconheceram duas proteínas plasmáticas específicas de fêmeas em maturação e em machos tratados com estrógenos, concluindo que pelo menos duas proteínas específicas são sintetizadas no início da vitelogenese e com administração de estrógenos.

Em anfíbios, a fração plasmática específica de fêmeas foi caracterizada como uma glicolipofosfolipoproteína, a vitelogenina, que é secretada pelo fígado sob controle estrogênico e, sob a influência de gonadotropinas é seletivamente tomada pelos oócitos em crescimento e convertida nas proteínas de vitelo lipovitelina e fosvitina WALLACE & BERGINK (1974).

Os eletroferogramas plasmáticos de bagre não apresentaram mudanças em relação às injeções de HCG, hormônio amplamente utilizado em indução da reprodução em peixes. O modo de ação das

TABELA 3  
 Freqüências absolutas e percentuais (entre parênteses) dos padrões observados na região F dos eletroferogramas plasmáticos de bagre, *Rhamdia hilarii*, considerados para fêmeas (A), para machos (B) e para sexos grupados (C), em relação às classes de comprimento total (L<sub>t</sub>).

(A)					
Classes de L <sub>t</sub> (cm)	Padrões				Total
	F <sub>1</sub>	F <sub>2</sub>	F <sub>3</sub>	F <sub>4</sub>	
17,0 - 23,0	9 (31)	5 (17)	3 (10)	12 (42)	29
23,0 - 29,0	7 (17)	15 (37)	4 (10)	15 (37)	41
29,0 - 35,0	3 (16)	8 (42)	4 (21)	4 (21)	19

(B)					
Classes de L <sub>t</sub> (cm)	Padrões				Total
	F <sub>1</sub>	F <sub>2</sub>	F <sub>3</sub>	F <sub>4</sub>	
17,0 - 23,0	2 (13)	4 (27)	2 (13)	7 (47)	15
23,0 - 29,0	4 (8)	13 (25)	7 (13)	28 (54)	52
29,0 - 35,0	- (-)	5 (62)	- (-)	3 (38)	8

(C)					
Classes de L <sub>t</sub> (cm)	Padrões				Total
	F <sub>1</sub>	F <sub>2</sub>	F <sub>3</sub>	F <sub>4</sub>	
17,0 - 23,0	11 (25)	9 (21)	5 (11)	19 (43)	44
23,0 - 29,0	11 (12)	28 (30)	11 (12)	43 (46)	93
29,0 - 35,0	3 (11)	13 (48)	4 (15)	7 (26)	27
Total	25 (15)	50 (31)	20 (12)	69 (42)	164

gonadotropinas não está elucidado, parecendo atuar no controle da esteroidogênese (HOAR, 1969). Estudos realizados em anfíbios WALLACE & BERGINK, (1974) indicam que as gonadotropinas podem estimular a taxa de síntese e secreção de fosfoproteína, mas não seu acúmulo no plasma sanguíneo.

Quanto à concentração de proteína total, MAHIEU (1972) e KONDRAT'YEVA (1977) en-

contraram alterações destes valores relacionados ao ciclo reprodutivo. Entretanto, o mesmo não ocorreu para o bagre no presente estudo, apesar de terem ocorrido oscilações dos valores de proteína total dentro da amplitude de 2,35 g/dl a 5,80 g/dl. Também em *Anguilla japonica* não foram detectadas tais alterações, tendo os valores registrados variado entre 2,11 g/dl e 4,93 g/dl (TAKASHIMA, TAKANO; HARA (1979).

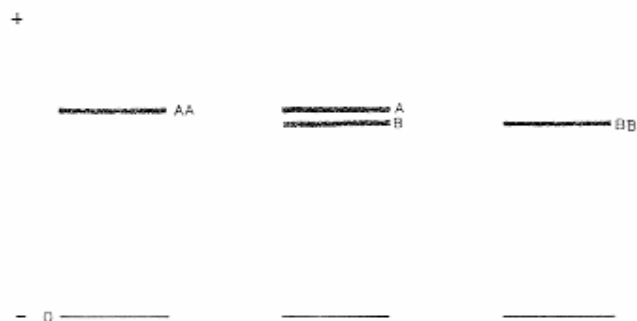


FIGURA 3 -- Esquema dos padrões fenotípicos observados na região D. (O – origem)

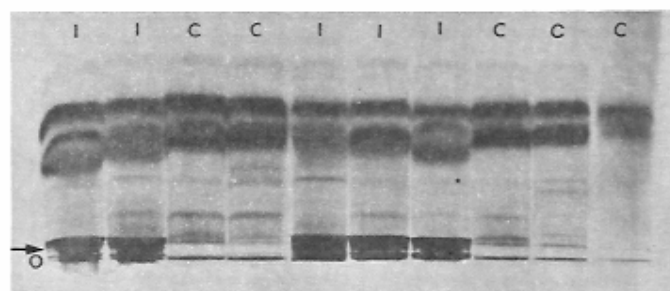


FIGURA 4 – Eletroferogramas das proteínas plasmáticas do bague, *R. hilarii*, evidenciando o efeito do benzoato de estadiol na formação da banda A (seta), I, injetado e C, controle (O – interface de dois géis).

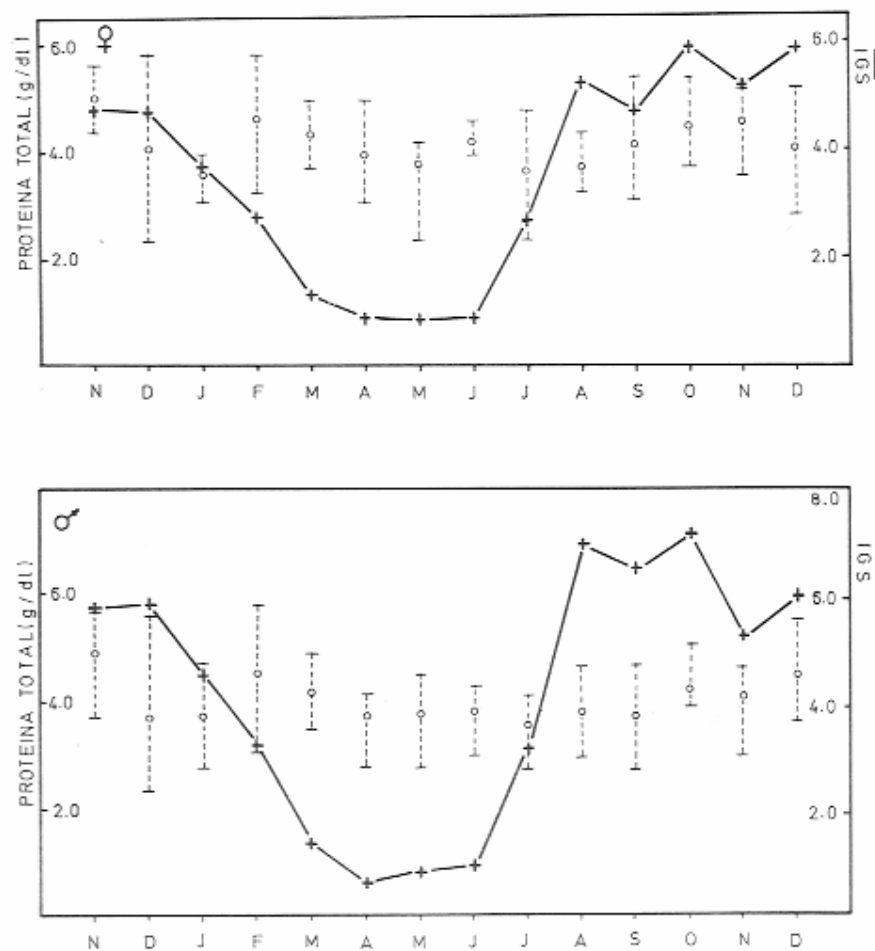


FIGURA 5 — Distribuição mensal dos valores mínimos, máximos e médios de proteínas plasmática total (g/dl) e curva de maturação de machos e fêmeas do bagre, *R. hilarii*.



#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AIDA, K.; NGAN, P.V.; HIBIYAT, T. 1973 Physiological studies on maturation of fishes. I. Sexual difference in composition of plasma protein of ayu in relation to gonadal maturation. *Bull. Jap. Soc. Scient. Fish.*, 39(11):1091-1106.
- AKROYD, P. 1967 Acrylamide gel slab electrophoresis in a simple glass cell for improved resolution and comparison of serum proteins. *Analyt. Biochem.*, 19: 399-410.
- BOOKE, H.E. 1964a A review of variations in fish serum proteins. *N. Y. Fish and Game J.*, 11: 47-57.
- BOOKE, H.E. 1964b Blood serum protein and calcium levels in yearling brook trout. *Progr. Fish-Culturist*, 26: 107-110.
- VREWER, J.M.; PESCE, A.J.; ASHWORTH, R.B. 1974 Experimental techniques in biochemistry, Prentice Hall, Inc, Englewood Cliffs, New Jersey, 351 p.
- CAMPBELL, D.H. et alii 1964 Methods in immunology (a laboratory text for instruction and research). W.A. Benjamin, Inc, N.Y., Amsterdam.
- DRILHON, A. & FINE, J.M. 1963 Dimorphisme sexuel des protéines sériques de *Salmo salar*: étude électrophorétique. *Compt. Rend. Soc. Biol.* 157 (11): 1897-1900.
- FERGUSON, A. 1980 Biochemical Systematic and Evolution Blackie - Glasgow and London, 194 p.
- GARROD, D.J. & NEWALL, B.S. 1958 Ring formation in *Tilapia esculenta*. *Nature*, Lond. 181: 1411-12.
- GODINHO, H.M. 1972 *Contribuição ao estudo do ciclo reprodutivo de Pimelodus maculatus Lacépède (Pisces, Siluridae) associado a variações morfológicas do ovário e a fatores abióticos*. São Paulo, Instituto de Pesca (Tese de Doutorado, Departamento de Histologia e Embriologia, Instituto de Ciências Biomédicas, USP).
- HARA, A. 1978 Sexual differences in serum proteins of chum salmon and the purification of female-specific serum protein. *Bull. Jap. Soc. Scient. Fish.*, 44 (6): 689-93.
- HIROSE, K. & ISHIDA, R. 1974 Effects of cortisol and human chorionic gonadotropin (HCG) on ovulation in ayu *Plecoglossus altivelis* with special respect to water and ion balance. *J. Fish. Biol.*, 6:557-64.
- HOAR, W.S. 1969 - Reproduction. In "Fish Physiology" (Ed. Hoar, W. S. & Randall, D.J.), Vol. III, 1-72 p. Academic Press, N.Y.
- KONDRAT'YEVA, T.P. 1977 Changes in the total content and fractional compositions of blood-serum proteins in some black sea fish during spawning. *Hydrob. J.* 13 (4):65-9.
- MAHIEU, G.C. 1972 Variaciones en la concentración de proteína total y de las fracciones de proteínas del suero separadas por electroforesis en relación con el desarrollo sexual en *Squatina argentina*. *Marini. Inv. Mar.*, 3 (2):23-38.
- NGAN, P.V.; HANUY, J.; HIBIYA, T. 1973 Implantation of canule into dorsal aorta of carp. *Japan J. Ichthyol.*, 20:79-84.
- PLACK, P.A. & WOODHEAD, P.M.J. 1966 Vitamin A compounds and lipids in the blood of the cod *Gadus morhua* from the arctic, in relation to gonadal maturation. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.*, 46:547-59.
- TAKASHIMA, Y.; TAKANO, K.; HARA, A. 1979 Changes in female-specific serum proteins during the course of induced maturation of female Japanese eel (*Anguilla japonica*). *Bull. Fac. Fish. Hokkaido Univ.*, 30 (1):50-61.
- THURSTON, R.V. 1967 Electrophoretic patterns of blood serum proteins from rainbow trout (*Salmo gairdnerii*). *J. Fish. Res. Bd. Can.*, 24:2169-88.
- WALLACE, R.A. & BERGINK, W. 1974 Amphibian vitellogenin: properties, hormonal regulation of hepatic synthesis and ovarian uptake, and conversion to yolk proteins. *Amer. Zool.* 14:1159-75.