



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
(FURG)
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS: FISIOLÓGIA
ANIMAL COMPARADA**



**EFEITO DA EXPOSIÇÃO À ATRAZINA E BISFENOL-A EM *Poecilia vivipara*
SOBRE A EXPRESSÃO DOS GENES *StAR* E *CYP19A2* E O
COMPORTAMENTO REPRODUTIVO**

**LIC. SANDRA ISABEL MORENO ABRIL
MESTRANDA**

**ORIENTADOR: PROF. DR. PABLO ELÍAS MARTINEZ
CO-ORIENTADOR: PROF. DR. JULIANO ZANETTE**

RIO GRANDE

2012

Agradecimentos

Dou graças a Deus pela oportunidade de vir neste país permitirem conhecer pessoas maravilhosas.

Graças a minha família (mãe, pai, as minhas irmãs, seus esposos e meus sobrinhos), pelo seu apoio tanto emocional quanto econômico em tudo momento.

As pessoas que permitiram minha chegada incluindo o Alexander.

A Ana Cristina e Ana Luiza por cuidarem sempre de mim, oferecerem sua amizade e companhia sempre.

A Lupe, Tati, Cecilia, Liane, Dani e Maira por me escutar, me acompanhar, me abrirem sempre as portas de suas casas e acima de tudo por sua amizade.

Marcio, Rubens e Roger pela companhia a colaboração no lab. e na salinha.

Cássia por compartilhar juntas tantos momentos de trabalho engraçados ou de estresse máximo.

A Cristina por me cuidar e ajudar sempre que precisei.

Pablo pela sua orientação e disposição para sempre me escutar

Juca pelas mil coisas que sempre tentou me ensinar e as mil birras que me fez ter

Dani Barros pelo seu apoio incondicional

Loraine pela companhia, o apoio e ajuda

A Romano e Adalto por me brindar o apoio para continuar meus planos

A todos os professores por sua dedicação esforço y conhecimento.

A todas as pessoas com as que compartilham nestes dois anos.

A Juan por chegar na minha vida, encher ela de musica, de alegria, de força, apoio e confiança.

A meus amigos de sempre Leo, Bibi, Ma, Nathy, Julita e Rut

A meus gatinhos pela companhia e amor durante todos estes anos

Capes, Reuni, CNPQ, INCT, pelo financiamento.

Abreviaturas

AhR Receptor de hidrocarbonetos aromáticos

AMPc Monofosfato de Adenosina Cíclico

AR Receptor de Andrógenos

ATR Atrazina

BPA Bisfenol A

CRE Elemento de resposta ao AMPc

CREB Elemento de Ligação ao AMPc

ERE Elemento de Resposta a Estrogênio

ERs Receptores de Estrógenos

E2 Estradiol

IMM Membrana Mitocondrial Interna

OMM Membrana Mitocondrial Externa

PKA Proteína Kinase A

SF-1 Fator Esteroidogênico tipo 1

StAR Proteína Reguladora da Esteroidogênese Aguda

START Domínio de Transferência Relacionado a Lipídeos da StAR

TIF-2 Fator Inibitório tumoral 2

17B-HSD 17B- hidroxisteróide desidrogenase

Sumario

1. Resumo	6
2. Introdução	7
2.1. <i>Poecilia vivipara</i>	8
2.1.1. Comportamento reprodutivo	9
2.2. Esteroidogênese	11
2.2.1. StAR	12
2.2.2. Aromatase	13
2.3. Desreguladores Endócrinos	16
2.3.1. Bisfenol A	17
2.3.2. Atrazina	19
3. Objetivos	20
3.1. Geral	20
3.2. Específico	20
4. Artigo	22
5. Conclusões	44
6. Perspectivas	45
7. Bibliografia	46

1. Resumo

Grande abundância de contaminantes são liberados nos corpos de água com potencial efeito sobre os animais que habitam este ecossistema. Desreguladores endócrinos são substâncias que podem interferir no sistema endócrino de diferentes maneiras, apresentando em alguns casos atividade estrogênica, e/ou afetando diretamente a via de produção ou degradação do estrogênio o qual pode prejudicar o sucesso reprodutivo das espécies afetadas. O colesterol é precursor na síntese dos esteróides gonadais: progestágenos, andrógenos e estrógenos. A proteína reguladora da esteroidogênese aguda (StAR) disponibiliza o colesterol na membrana mitocondrial interna para a atuação da primeira enzima da esteroidogênese (P450_{scc}) sendo este transporte um ponto limitante de regulação da esteroidogênese. Aromatase é a enzima responsável pela transformação final dos andrógenos aromatizáveis em estrógenos. Em peixes são conhecidas duas isoformas da Aromatase, uma que é codificada preferencialmente nas gônadas pelo gene *CYP19A1* e outra preferencialmente no cérebro pelo gene *CYP19A2*. Pela sua relevância nestes dois pontos da esteroidogênese, foi avaliada a expressão dos genes que codificam para a proteína StAR e a enzima Aromatase em machos e fêmeas do peixe (*Poecilia vivipara*) colonizador do ambiente estuarino. Nossos resultados mostraram em fêmeas de *P. vivipara* atividade esteroidogênica no intestino e fígado, fato que merece estudos adicionais. Os resultados apresentados mostraram em machos de *P. vivipara* a existência de esteroidogênese completa no sistema nervoso. Para analisar o efeito sub-crônico (96h) da exposição na água a dois poluentes com atividade estrogênica, Atrazina (ATR) e Bisfenol A (BPA) em concentrações ecologicamente relevantes (2, 10 e 100 µg/L) foi avaliada (em machos) a expressão dos genes *StAR* e *CYP19A2* de *Poecilia vivipara*. Nenhuma das concentrações de ATR alterou a expressão de *StAR* nem de *CYP19A2* quando analisadas no cérebro. A exposição a 10 µg/L de BPA tanto na gônada como no cérebro gerou aumento da expressão de *CYP19A2* (duas vezes na gônada) e na concentração 100 µg/L aumentou a expressão de *StAR* nas gônadas (seis vezes). Em nível comportamental foram

caracterizados dois movimentos clássicos do cortejo nos poecilídeos o “gonopodial thrusting” e o “sigmoid display”, e foi medida sua frequência nos animais expostos a diferentes concentrações de BPA. A frequência do “gonopodial thrust” foi diminuída significativamente ($p < 0.05$) pelas exposições a BPA 2 $\mu\text{g/L}$ e 100 $\mu\text{g/L}$. O “sigmoid display” não foi afetado significativamente por nenhuma das concentrações, embora a resposta apresentou semelhança com os registros do “gonopodial thrust”. “Simgoid display” e “gonopodial thrust” apresentaram correlação (87%) significativa ($p < 0.05$), “Sigmoid display” e “gonopodial thrust” mostraram uma correlação de 98 e 91% ($p < 0.05$) com *CYP19A2*, respectivamente. Finalmente a exposição ao BPA mostrou uma resposta não monotônica para *StAR*, *CYP19A2*, “gonopodial thrust” e “sigmoid display”. Estes achados indicam que em machos de *P. vivipara* tanto a expressão de *CYP19A2* e o comportamento reprodutivo sofrem alterações quando expostos a BPA.

2. Introdução

Atividades agrícolas, industriais e domésticas, liberam no ambiente grandes volumes de contaminantes. Alguns destes químicos, tanto de origem natural como sintética, afetam a função endócrina dos organismos, e são denominados Desreguladores Endócrinos (DEs). Entre os DEs são foco de nosso estudo dois contaminantes presentes no ambiente aquático, a Atrazina (ATR), um herbicida empregado mundialmente e o Bisfenol A (BPA) utilizado na produção de plásticos. Estes dois contaminantes por meio de mecanismos complexos e pouco entendidos afetam a esteroidogênese gerando maior atividade estrogênica. Em resumo, ATR atua sobre receptores nucleares da família NR5A, tal como o fator esteroidogênico tipo 1 (SF-1) e também sobre o elemento de resposta ao AMPc (CRE). O BPA age principalmente sobre receptores de estrógeno ($\text{ER}\alpha$, β e γ).

A esteroidogênese é um processo multienzimático regulado por um grande número fatores, sendo que os DEs podem interferir em diferentes pontos desta

via. Com o objetivo de melhorar a compreensão dos mecanismos envolvidos na desregulação endócrina do ATR e BPA foi estudada no peixe *Poecilia vivipara*, a expressão gênica da proteína StAR (proteína regulatória da esteroidogênese aguda) por ser limitante na síntese de esteroides e da CYP19A2 (aromatase cerebral) enzima envolvida na síntese de estrógenos a partir de andrógenos aromatizáveis. Em peixes são conhecidas duas isoformas da Aromatase, codificadas por dois genes diferentes o *CYP19A1* para a aromatase gonadal e *CYP19A2* para a aromatase cerebral, cada um de estes genes pode responder diferencialmente a DEs pelas suas diferenças na região promotora. A esteroidogênese que ocorre no cérebro permite a disponibilidade de estrógenos que agem como fatores tróficos, intervêm em processos de neurogênese e neuroproteção e determinam o comportamento sexual (Tsutsui *et al.*, 2000). Sendo este último de grande interesse devido a que segundo alguns toxicologistas o comportamento pode ser um biomarcador mais sensível e efetivo para avaliar efeitos agudos de contaminantes já que podem ser evidenciados precocemente em resposta a pequenas mudanças hormonais, e é bastante útil frente a o efeito de substâncias que não tem uma relação dose-resposta diretamente proporcional (Clotfelter *et al.*, 2004).

2.1. *Poecilia vivipara*

Poecilia vivipara (guarú) é um peixe que pertence à família dos Poeciliidae, os quais têm reprodução gonocórica ou bissexuada com ovoviviparidade; o dimorfismo sexual é tardio (a partir de aproximadamente 15 mm), em que o terceiro ou quarto raio da nadadeira anal se fundem, formando o gonopódio ou órgão copulador, os machos são geralmente menores do que as fêmeas (Mendonça e Andreatta, 2001).

Os poecilídeos apresentam uma notável adaptação reprodutiva, tendo desenvolvido a capacidade de fertilização interna, com várias modificações no sistema reprodutivo, como: tamanho e número de ovos, tamanho dos embriões, tamanho dos jovens recém-nascidos, quantidade de suplemento nutricional da mãe para os embriões, grau de desenvolvimento placentário e de

superfetação, variações no intervalo e períodos de gestação da prole, duração do período reprodutivo e duração da vida reprodutiva, mudando assim o conjunto de estratégias reprodutivas utilizadas (Thimbault e Shultz, 1978). Seu estilo reprodutivo é de carregador interno obrigatório, ou seja, a fecundação é sempre interna e as fêmeas carregam os embriões e/ou jovens (Mendonça e Andreatta, 2001).

A proporção de fêmeas a machos é 3:1; os embriões apresentam quatro estágios de desenvolvimento até o dia que atingem a maturidade sexual, depois dos 15mm. O primeiro estágio apresenta embriões menos desenvolvidos, não sendo possível ainda observar nenhuma característica específica, por esta ser a fase mais elaborada, os embriões são intimamente ligados à mãe e com uma abundante camada de vitelo, podendo ser considerada como "fase ovo"; o segundo estágio apresenta embriões maiores, com uma menor camada de vitelo, observando-se pequenos olhos; no terceiro estágio, os embriões já se situam fora da camada de vitelo, com a formação das nadadeiras; no quarto estágio, os embriões são bem maiores do que a camada de vitelo, observando-se as nadadeiras e as pigmentações características da espécie (Mendonça e Andreatta, 2001).

2.1.1. Comportamento Reprodutivo

Devido ao seu tipo de reprodução, os poecilídeos apresentam um comportamento de cortejo e cópula facilmente quantificável (Schröder e Peters, 1988).

Segundo Farr (1980) o cortejo é o primeiro determinante do sucesso reprodutivo em machos, pois os machos mais ativos têm uma chance maior de achar fêmeas receptivas e são preferidos por elas. Quando os machos competem pela inseminação da mesma fêmea, seu sucesso corresponde amplamente à quantidade relativa de atos de cortejo previamente exibidos (Farr; 1980; Schröder e Peters, 1988) ou taxa de cortejo, que pode ser alterada quando um macho corteja a fêmea frente a outras fêmeas ou outros machos

(Farr, 1980). Os machos de guarú maximizam sua atividade de cortejo na presença de um competidor e a atividade de cortejo de dois machos que competem pode ser quantificada simultaneamente (Schröder e Peters, 1988). A exibição de cortejo nos machos de guarú consiste num arqueamento sigmoidal do corpo, com as nadadeiras ímpares, totalmente estendidas (“exibição aberta”) ou fechadas (“exibição fechada”). As taxas de exibição aberta ou fechada podem variar dependendo de mudanças na fertilidade e receptividade da fêmea (Farr, 1980). Durante a cópula, os intentos do macho de levar seu gonopódio (nadadeira anal modificada em órgão da cópula) para uma posição que permita alcançar o poro genital feminino é chamado de “gonopodial thrusting” acontece mais frequentemente quando as fêmeas não estão na fase receptiva do seu ciclo reprodutivo (Farr, 1980; Schröder e Peters, 1988).

Classicamente acreditava-se que as substâncias em geral apresentavam uma relação linear dose-resposta. Recentemente, é aceito que muitas substâncias não obedecem a este dogma, e a detecção de respostas não lineares e uma área na que os estudos comportamentais podem fazer contribuições significativas à ecotoxicologia (Clotfelter *et al.*, 2004). Sendo o comportamento sensível, mesmo a pequenas mudanças nos níveis hormonais, os critérios de julgamento de parâmetros comportamentais brindam uma boa resposta para a detecção de relações não lineares (vom Saal *et al.*, 1995; Clotfelter *et al.*, 2004). As medidas comportamentais têm grande potencial como biomarcadores de desregulação endócrina, porque o comportamento é uma manifestação física da resposta ao ambiente (Clotfelter *et al.*, 2004).

Existem poucos biomarcadores com a capacidade de vincular a exposição a xenoestrógenos que comprometam a capacidade reprodutiva (Bayley *et al.*, 1999). O sucesso reprodutivo de muitos animais depende fortemente da sua habilidade de desenvolver um comportamento sexual adequado, estando a exibição sexual dos machos de guarú fortemente ligada ao sucesso reprodutivo (Bayley *et al.*, 1999).

2.2. Esteroidogênese

Os esteróides são uma variedade de compostos lipóides, todos com uma estrutura básica derivada do colesterol com quatro anéis carbônicos conhecidos como ciclo-pentano-per-hidro-fenantreno ou núcleo esteroide. Entre os compostos esteróides naturais estão os corticosteróides e os esteroides sexuais gônadais: andrógenos, estrógenos e progestógenos (Norris, 2007).

Os hormônios esteróides são sintetizados nos tecidos esteroidogênicos, como ovário, glândula suprarrenal e placenta a partir de um precursor comum, o colesterol (Norris, 2007). Estes hormônios regulam diferentes funções fisiológicas, incluindo o controle do processo reprodutivo, o metabolismo de carboidratos e o equilíbrio osmótico (Whitfield *et al.*, 1999). É bem conhecido que os hormônios esteróides têm múltiplos efeitos na função e estrutura cerebral no desenvolvimento e em adultos (Schumacher *et al.*, 1996). A progesterona e seus derivados reduzidos são reconhecidos por promover a mielinização dos nervos periféricos após uma lesão (Koenig *et al.*, 1995). A plasticidade cerebral também é regulada por esteróides como Dehidro-Epi-Androsterona (DHEA) ou estradiol. Estes esteróides afetam a neurotransmissão (Schumacher *et al.*, 2000), a formação de espinhos dendríticos (Compagnone e Mellon, 1998; Segal e Murphy, 2001) potenciação a longo termo, depressão (Yoo *et al.*, 1996; Foy, 2001) e aprendizado (Schumacher *et al.*, 2000; Holmes *et al.*; 2002, Sierra, 2004).

Todos os esteróides biorreguladores são sintetizados a partir do colesterol (esteroide C27) (Fig. 1), num processo denominado esteroidogênese, que inicia com o colesterol exógeno ou com uma série de reações intracelulares que transformam o acetato (acetil-coenzima A) em colesterol (Norris, 2007). Por muitos anos acreditou-se que o colesterol entrava na membrana mitocondrial por difusão simples. Entretanto, recentes descobertas tem identificado a proteína StAR, a qual facilita a transferência de colesterol da membrana mitocondrial externa para a membrana mitocondrial interna onde está localizada a P450_{scc}. Os níveis da proteína StAR determinam a capacidade de

uma célula transformar colesterol em pregnenolona. Por esta razão, pode ser considerado este o passo limitante na esteroidogênese, embora a StAR não seja uma enzima (Norris, 2007). A remoção da cadeia lateral do colesterol é realizada pela enzima que cliva a cadeia lateral associada com a membrana mitocondrial interna, P450scc (citocromo P450 da família 11, subfamília A, CYP11A). Um passo chave posterior a clivagem da cadeia lateral, é a transformação de pregnenolona a progesterona, a que envolve a movimentação da dupla ligação do anel B ao anel A (troca de $\Delta 5$ a $\Delta 4$ e transformação do grupo álcool (-OH) do carbono 3, numa cetona (=O) (Norris, 2007). A testosterona, o hormônio andrógênio de muitos vertebrados, é sintetizada a partir de androstenediona, pela enzima 17β -hidroxiesteróide desidrogenase (17β -HSD), a qual pode ser transformada pela enzima aromatase, P450arom ou CYP19 (citocromo P450 da família 19), que gera a perda de um carbono e a aromatização do anel A para produzir estradiol, um esteróide C18 (Norris, 2007).

2.2.1 StAR

A proteína reguladora da esteroidogênese aguda, StAR, media o fluxo rápido de colesterol da membrana mitocondrial externa (OMM) para a membrana mitocondrial interna (IMM), permitindo as células esteroidogênicas fazer grandes quantidades de esteróides em curto tempo (Miller, 2007).

O passo chave da esteroidogênese, é o acesso do colesterol à primeira enzima esteroidogênica P450scc. P450scc está localizada na IMM enquanto que o colesterol para a esteroidogênese acumula se na OMM, o espaço intermembrana aquoso não permite que o colesterol de natureza hidrofóbica difunda numa taxa suficiente para explicar a quantidade de esteróides produzidos nos tecidos esteroidogênicos após estimulação hormonal (Stocco, 2001). Como resultado, precisa se que uma proteína entregue o colesterol para a IMM, e por tanto o acesso de colesterol a P450scc é o passo limitante na esteroidogênese (Miller, 1995). Embora o mecanismo pelo qual a StAR media o

transporte de colesterol para o interior da mitocôndria tenha sido amplamente estudado, ainda não é bem conhecido (Sierra, 2004).

StAR é sintetizada como uma proteína de 37kDa, que é rapidamente importada na mitocôndria e processada a uma forma madura inativa de 30kDa que se acha na matriz mitocondrial (Sierra, 2004). A região C-terminal chamada de domínio de transferência relacionada a lipídeos da StAR (START), é biologicamente ativa e contém um saco hidrofóbico que pode estar implicado na “dessorção” do colesterol da OMM (rica em colesterol) para a IMM (pobre em colesterol). O domínio N-terminal da StAR ancora esta proteína na mitocôndria e a clivagem deste domínio termina com a entrega do colesterol para a P450scc (Sierra, 2004).

A regulação da expressão do gene *StAR* é complexa, e dentre os mecanismos conhecidos, está a via AMPc/PKA. Vertebrados apresentam os elementos de resposta presentes no promotor da *StAR* para os fatores de transcrição conhecidos por mediar as respostas de AMPc. Dentre estes, estão o fator esteroideogênico tipo 1 (SF)-1, a proteína ativadora (AP)-1, a proteína ligante do elemento de resposta a AMPc (CREB). Apesar de alguns elementos de resposta no promotor da *StAR* serem bem conhecidos, sabe-se que existem também múltiplos elementos de transcrição com função ainda desconhecida (Kocerha *et al.*, 2009).

2.2.2 Aromatase

Aromatase (enzima CYP19, citocromo P450arom) catalisa a transformação dos andrógenos em estrógenos (Hinfrey. *et al.*, 2006; Forlano *et al.*, 2006; Lassiter e Linney, 2007; Huang e Leunga, 2009). A aromatase é um membro da superfamília das enzimas citocromos P450, é a única enzima que nos vertebrados pode criar um anel aromático nos andrógenos, passo necessário para a formação dos compostos estrogênicos (Forlano *et al.*, 2006). A CYP19 é codificada pelo gene *CYP19* (Tong e Shung, 2003; Forlano *et al.*, 2006).

Os estrógenos cumprem um importante papel nos processos anátomo-funcionais e comportamentais dos vertebrados. Durante o desenvolvimento os

estrógenos agem diretamente na diferenciação e no dimorfismo sexual (Tong e Shung, 2003). No tecido nervoso, os estrógenos participam em processos de neurogênese (Mouriec *et al.*, 2009), afetam a proliferação e sobrevivência neuronal, a morfologia e a sinaptogênese (Callard *et al.*, 2001, Forlano *et al.*, 2006). Como metabólito central dos andrógenos produzidos local ou periféricamente, os estrógenos podem ligar-se nos receptores de estrógeno e assim modular a transcrição de numerosos genes ou ativar a sinalização de vias de transcrição para a modulação da fisiologia celular, ligar a subunidades receptoras de neurotransmissores e agir como fatores de crescimento mediante interações com receptores (Forlano *et al.*, 2006).

Diferentemente dos mamíferos, muitos peixes teleósteos possuem duas formas do gene *CYP19* no seu genoma (loci diferentes para *CYP19A1* e *CYP19A2*), produzindo, assim, dois diferentes DNAs que são expressos diferencialmente no cérebro e ovário (Callard *et al.*, 2001; Tong e Shung, 2003; Hinfrey *et al.*, 2006; Lassiter e Linney, 2007). O gene *CYP19A2* é expresso predominantemente no cérebro, porém no ovário o gene *CYP19A1* é o predominante (Hinfrey *et al.*, 2006, Cheshenko *et al.*, 2008). No peixe-zebra, *CYP19A2* codifica a isoforma de P450aromB no cérebro, retina e pituitária, tecidos que expressam altos níveis do RNAm e da enzima, no ovário o RNAm da outra isoforma, P450aromA, é codificado pelo gene *CYP19A1* (Hinfrey *et al.*, 2006). Existem evidências da expressão destes genes fora do cérebro e do ovário para algumas espécies de teleósteos (Forlano *et al.*, 2006).

Comparações na sequência e análises filogenéticas indicam que as formas derivadas de P450arom no cérebro e no ovário de alguns peixes são ortólogas das aromatases previamente identificadas em mamíferos e aves, membros de clados parálogos com a linhagem dos peixes, que têm múltiplos loci para cópias únicas de genes em mamíferos, o qual presume é a consequência de um evento de duplicação precoce no genoma em ancestrais de peixes (Kishida e Callard, 2001).

O cérebro de peixes teleósteos apresenta grandes concentrações da enzima P450aromB e alta expressão do gene *CYP19A2*, sendo estes níveis mais altos dos apresentados em outros vertebrados (Callard *et al.*, 2001). O gene é

altamente sensível a andrógenos e estrógenos, por estas razões peixes teleósteos são modelos ideais para pesquisar os efeitos dos estrógenos em diferentes processos de desenvolvimento, neurogênese, neuroplasticidade, (Kishida e Callard, 2001; Hinfrey *et al.*, 2006; Mouriec *et al.*, 2009) e a influência de substâncias externas ao organismo que podem interferir na expressão da aromatase nas diferentes etapas do desenvolvimento.

Muitas substâncias nos ecossistemas aquáticos podem atuar adversamente na expressão e atividade da aromatase nos ovários e no cérebro. Em adultos de peixe-zebra, tratamentos com estradiol (E2) não tem efeito na expressão ou atividade da aromatase no cérebro, contudo, nos estágios larvais, o E2 aumenta fortemente a expressão do *CYP19A2*. Porém, a indução do gene *CYP19* dependente dos estrógenos pode ser bloqueada por um co-tratamento com um excesso do antagonista puro do receptor de estrogênio (ER), o ICI182-780, indicando que ER funcionais estão envolvidos. No cérebro dos peixes teleósteos, o gene *CYP19* está sob o controle de retro-alimentação positiva pelo E2, principal produto da aromatização (Hinfrey *et al.*, 2006).

A regulação do estradiol mediada pelos ERs envolve o ERE (o elemento responsivo a receptor de estrogênio), localizado no promotor do gene *CYP19A2* (Mouriec *et al.*, 2009).

2.3. Desreguladores Endócrinos (DEs)

São definidos como desreguladores endócrinos “agentes exógenos que interferem com a síntese, secreção, transporte, ligação, ação ou eliminação dos hormônios naturais, os quais são responsáveis pela manutenção da homeostase, reprodução, desenvolvimento e/ou o comportamento”. O termo foi proposto em 1991, numa conferência organizada pela Doutora Theo Colborn (Colborn e Clement, 1992). O termo foi cunhado pela cientista ao observar as alterações endócrinas que sofriam animais silvestres expostos a poluentes ambientais. Entre os DEs se incluem químicos que atuam como agonistas ou

antagonistas dos receptores de estrogênio (ERs), receptores de andrógenos, receptores do hormônio tireóideo e outros.

Existem controvérsias e debates acerca de existência de curvas dose-resposta, efeitos a baixas doses e a importância de considerar períodos críticos de exposição nos delineamentos experimentais (Vandenberg *et al.*, 2009). Esses debates abrangem também o possível efeito da exposição intrauterina ou pós-natal dos DEs no potencial reprodutivo de animais de pecuária (Sweeney, 2002).

Entre os DEs, incluem-se compostos naturais e sintéticos no ambiente, que podem alterar a fisiologia normal e a endocrinologia de espécies domésticas e silvestres. Atualmente tem aumentado o número de pesquisas que consideram os efeitos adversos dos DEs em peixes teleósteos, e sua influência no declínio das populações, afetando as funções endócrinas, a produção do precursor da proteína vitelogenina no vitelo (VTG) nos machos e jovens e o desenvolvimento das gônadas. Porém, os delineamentos experimentais têm focado principalmente em peixes adultos sem considerar os efeitos dos DEs em baixas concentrações em fases iniciais do desenvolvimento (Jin *et al.*, 2009).

Devido a sua alta sensibilidade aos estrógenos o gene *CYP19* é um alvo para certas substâncias químicas desreguladoras endócrinas com atividade estrogênica. Estudos recentes demonstram claramente os efeitos dos DEs na expressão do *CYP19A2* (Cheshenko *et al.*, 2008; Mouriec *et al.*, 2009). Lembrando que *CYP19A2* se expressa primordialmente no cérebro, é importante enfatizar que existe evidência crescente de que os DEs podem afetar o desenvolvimento cerebral e potencialmente causar alterações comportamentais e no aprendizado (Mouriec *et al.*, 2009).

2.3.1. Bisfenol A

Bisfenol-A (BPA) é uma substância química de origem industrial, utilizada na manufatura do policarbonato e numerosos artigos plásticos. Estudos recentes demonstram que BPA pode ser lixiviado de muitos produtos, incluindo embalagens plásticas de bebidas e alimentos, mamadeiras de plástico e

selantes odontológicos (Lyons, 2000; Le *et al.*, 2008), poluindo os ecossistemas marinho, de água doce e terrestre. Têm se demonstrado que a contaminação por BPA é amplamente difundida em indivíduos pertencentes a populações industrializadas (Le *et al.*, 2008). O BPA é onipresente no ambiente e, em estudo realizado no Brasil o BPA foi o xenoestrógeno mais detectado em águas de rios, águas de esgotos e até em água da rede pública, com altas concentrações que oscilaram entre 25-84 ng/L (Sodré *et al.*, 2010).

A molécula de BPA é constituída por dois anéis de benzeno e dois substituintes OH, que ajustam no local de ligação do ER (Vandenberg et al., 2009), atuando como composto estrogênico que também possui outras atividades como desregulador químico mediando múltiplos caminhos moleculares (Le et al., 2008). BPA interage com os receptores de estrógeno, ER α , ER β e ER γ , com maior afinidade pelo ER β , (Le et al., 2008; Suzawa e Ingraham, 2008; Vandenberg et al., 2009). Adicionalmente, BPA interage também com o receptor de andrógenos (AR), apresentando então tanto atividade estrogênica quanto anti-androgênica (Bondesson et al., 2009).

Estudos desenvolvidos no ER α têm identificado duas regiões de transativação AF1 (na região amino terminal) e AF2 (na região carboxila terminal). Agonistas de ER são subdivididos baseados na sua habilidade de ativar estas regiões. A ligação de xenoestrógenos a ERs altera sua habilidade para recrutar co-ativadores que podem ser importantes para diferenciar respostas dependentes de tecido. Por exemplo, análises bioquímicas indicam que BPA pode induzir grandes câmbios na expressão de genes em células que contem ER β onde TIF2 é o co-ativador alvo. Baseados em estudos moleculares e bioquímicos, se propõe que as diferenças na capacidade do ER α ou ER β em recrutar seus co-ativadores podem ser modificadas pelo BPA o qual pode contribuir para o entendimento das complexas respostas tecido-específicas observadas frente a exposições a BPA (Vandenberg *et al.*, 2009).

Espécies que carecem de cromossomas sexuais, como alguns peixes, anfíbios e alguns invertebrados, são especialmente sensíveis a fatores ambientais que perturbam os níveis de esteróides sexuais (Suzawa e Ingraham, 2008). Devido à atuação do BPA como estrogênico em baixas

concentrações (por exemplo, 10^{-7} e 10^{-8} M), ocorre um aumento significativo no número de fêmeas em *Xenopus laevis* (Levy *et al.*, 2004). Tais alterações na proporção de machos e fêmeas têm importantes implicações ao nível populacional. BPA estimula a produção de ovos em gastrópodes e causa o inchamento das glândulas sexuais femininas, bloqueando então os ductos, impedindo que os ovos sejam transportados, fazendo que a glândula que contém os ovos fique sob muita pressão e estoure, ocasionando a esterilidade permanente destes caracóis (Lyons, 2000).

No cérebro, exposições a BPA afetam a morfologia, anatomia e comportamento de roedores (Patisaul e Polston, 2008). BPA exerce efeitos miméticos dos hormônios esteróides, como também altera a expressão dos mesmos receptores (Lee *et al.*, 2007). BPA em ratos afeta a transcrição, simulando a ação dos estrógenos em áreas de emoção, percepção, memória e aprendizado (Bondesson *et al.*, 2009). Distintas regiões do cérebro respondem diferentemente ao estrógeno e BPA, respectivamente, no hipocampo, tratamentos com BPA e estrógenos, resultaram em efeitos opostos na expressão de vários genes. Estes resultados indicam que diferentes regiões do cérebro respondem diferencialmente a estrógenos e DEs como BPA e sugerem que a via afetada pelos receptores nucleares é dependente do contexto celular (Bondesson *et al.*, 2009). Alterações epigenéticas podem ter também outro mecanismo de ação do BPA (Bondesson *et al.*, 2009). Em nossos laboratórios, foi constatado que a exposição ao BPA por via oral em baixa dose em ratos no estágio pré e pós-natal, causam alterações comportamentais, incluindo algumas relacionadas à diferenciação sexual do SNC (Gonçalves *et al.*, 2010). Tais estudos indicam que biomarcadores comportamentais são ferramentas úteis para o estudo de desregulação endócrina.

2.3.2. Atrazina

Atrazina (2-cloro-4-etilamino-6-isopropilamino-striazina, ATR), é um herbicida utilizado mundialmente no controle de pastos e ervas daninha, e tem sido encontrado nos corpos de água na superfície e no fundo. Concentrações de

atrazina de até 108 µg/L foram registradas em rios da América do Norte (USEPA, 2002). Na China foram verificadas concentrações de ATR de 3 µg/L na água de consumo humano, nas cidades de Guanting (Ren *et al.*, 2002) e Taihu Lake (Dong *et al.*, 2006).

ATR apresenta efeitos nos animais como DE (Fan *et al.*, 2007; Albanito *et al.*, 2008; Rosenberg *et al.*, 2008), e análises *in vivo* e *in vitro* sugerem que ATR afeta a sinalização hormonal e as redes de transcrição endócrinas em células de peixes e mamíferos (Suzawa e Ingraham, 2008).

Entre outros efeitos como desregulador endócrino, ATR interfere em processos mediados por andrógenos e estrógenos, embora sua baixa afinidade pelos receptores ER e AR (não atuando como agonista ou antagonista), ATR aumenta a concentração de AR e ER (Yang *et al.*, 2010), reduz a síntese de andrógenos e aumenta a produção de estrógenos, ação mediada através de diversos mecanismos (Fan *et al.*, 2007; Albanito *et al.*, 2008).

A concentração de ATR em áreas de agricultura impactada é de 6 a 20 ppb. Animais expostos a concentrações ecologicamente relevantes apresentam aumento significativo na expressão de aromatase endógena, e neste sentido exposições agudas e crônicas a ATR aumentam os níveis endógenos de *CYP19A* que codifica para aromatase nas gônadas e altera a proporção de machos e fêmeas em condições ambientais em modelos de vertebrados (Suzawa e Ingraham, 2008). Estudos *in vitro* realizados com linhas celulares demonstram que ATR aumenta a concentração de aromatase ligando e inibindo a enzima fosfodiesterase, resultando no acréscimo da concentração de AMPc, o que resulta no aumento da transcrição do gene *CYP19* (Fan *et al.*, 2007). Em peixe-zebra ambos promotores de aromatase possuem sítios de ligação para o CREB o que pode indicar que a transcrição destes genes é regulada por AMPc. ATR atua de maneira dose- e tempo-dependente na regulação do *CYP19A1*, mas não tendo efeitos aparentes na expressão do *CYP19A2* no cérebro (Suzawa e Ingraham, 2008).

3. Objetivos:

3.1. Geral

Analisar os efeitos da exposição a Atrazina e Bisfenol A em dois pontos da esteroidogênese a nível molecular (expressão da *StAR* e *CYP19A2*) e comportamental (cortejo) no peixe *Poecilia vivipara*

3.2. Específicos

- Sequenciar o gene *CYP19A2* de *Poecilia vivipara*;
- Avaliar a expressão do *CYP19A2* em diferentes órgãos de machos e fêmeas de *Poecilia vivipara*, para estabelecer sua distribuição no organismo;
- Analisar a expressão do gene *CYP19A2* e *StAR* no cérebro de machos adultos de *Poecilia vivipara* expostos a diferentes concentrações de ATR e BPA (2,0 µg/L, 10,0 µg/L e 100,0µg/L);
- Analisar a expressão de *StAR* e *CYP19A2* em fígado e gônadas de machos adultos de *Poecilia vivipara* expostos a diferentes concentrações de BPA (2,0 µg/L, 10,0 µg/L e 100,0µg/L);
- Caracterizar os principais aspectos comportamentais do cortejo em *Poecilia vivipara*;
- Identificar as alterações no comportamento de cortejo em machos adultos de *Poecilia vivipara* expostos a diferentes concentrações de BPA (2,0 µg/L, 10,0 µg/L e 100,0µg/L);
- Comparar as possíveis mudanças comportamentais com a expressão da *CYP19A2* no cérebro de animais expostos a diferentes concentrações de BPA (2,0 µg/L, 10,0 µg/L e 100,0µg/L).

4. Artigo

Effect of estrogenic pollutants Atrazine and Bisphenol-A on the gene expression of *StAR* and *CYP19A2*, and the reproductive behavior in *Poecilia vivipara*

Sandra I. M. Abril, Juliano Zanette, Luis Fernando Marins, Cassia R. Silveira, Pablo E. Martinez

Federal University of Rio Grande, State of Rio Grande do Sul, Brazil

Abstract

Atrazine (ATR) and Bisphenol-A (BPA) are contaminants with endocrine-disruptor activity with effects on steroidogenesis pathways. For the steroid synthesis the StAR protein is the rate limiting step. Aromatase brain enzyme (codificated by *CYP19A2* gene) finally converts androgens to estrogens. A *CYP19A2* nucleotide sequence of 1080 bp was identified for the first time in the fish *Poecilia vivipara* using degenerated primers and PCR. The basal expression of *StAR* and *CYP19A2* in the brain suggest that in nervous system of *P. vivipara* occurred complete steroidogenesis. Furthermore a higher brain level of *CYP19A2* in some males might indicate that similar to mammalian, estrogen plays an important role in male behavior. The levels of gene expression for *StAR* and *CYP19A2* were quantified after sub-chronic (96h) environmentally relevant concentration exposure to ATR or BPA (2, 10 e 100 µg/L). ATR did not affect the gene expression. BPA induced by 2-fold the *CYP19A2* at 10 µg/L and by 6-fold the *StAR* at 100 µg/L in gonads. Similar to other poecilids *P. vivipara* presents the two characteristic behavioral displays “gonopodial thrusting” and “sigmoid display”. BPA caused a reduction in the frequency of gonopodial thrusting at 2 and 100 µg/L. Sigmoid display and gonopodial thrust showed significant ($p < 0.05$) correlation (87%). Sigmoid display and gonopodial thrust displayed correlation of 98 and 91% ($p < 0.05$) with *CYP19A2*, respectively. Finally, BPA exposure showed a non-monotonic response to *StAR*, *CYP19A2*, sigmoid display and gonopodial thrust. These

findings indicate that in males of *P. vivipara* the StAR and CYP19A2 gene expression and reproductive behavior are altered when exposed to BPA.

Atrazine, Bisphenol-A, Endocrine disruptor, *CYP19*, *StAR*, aromatase, steroidogenesis

4. 1. Introduction

Human activities like agriculture, industry and domestic, produces great quantity of chemicals that are released into the environment. Chemicals that affect the normal endocrine function of the organism are called Endocrine Disruptors (EDs), defined as “exogenous agents that interfere with the synthesis, secretion, transport, binding, action, or elimination of natural hormones in the body that are responsible for the maintenance of homeostasis, reproduction, development, and/or behavior” (US EPA, 1998).

A recognized effect of some EDs is the estrogenic activity. The estrogen production is part of a bigger steroid synthesis process. Steroidogenesis begins with the steroidogenic acute regulatory protein, StAR, that is present in specialized steroidogenic cells (Miller, 2007), and act in the cholesterol delivery from the outer mitochondrial membrane (OMM) to the inner mitochondria membrane (IMM). The steroidogenesis involves a number of enzymes that transform cholesterol in many steroids including testosterone. Testosterone is further converted in estradiol by the enzyme aromatase P450aro = CYP19 by the loss of one carbon and aromatization of the A ring (Norris, 2007). StAR and CYP19A2 are modulated by estrogenic substances.

The xenoestrogen Bisphenol A (BPA) is an industrial chemical, used to manufacture polycarbonate and plastic articles, and it can be leached out from those products (Lyons 2000). The BPA molecule contains two benzene rings, each one with one hydroxyl group (OH), and it is believed that this group adjusts in the ligation pocket of estrogen receptors (ER) (Vandenberg *et al.*, 2009). Thus, BPA can act as an estrogenic compound by interacting with the *estrogen receptor isoforms ER α and ER β , with higher affinity to the last* (Le *et al.*, 2008; Suzawa e Ingraham, 2008; Vandenberg *et al.*, 2009). *Additionally, BPA interacts with the androgen receptor (AR), showing anti-androgenic activity*

(Bondesson *et al.*, 2009). BPA have other effects as ED, interfering in multiple pathways (Le *et al.*, 2008).

Atrazine (ATR) is an herbicide employed at world scale in the control of grasses and weeds, and it can be found in superficial water and groundwater. ATR acts as ED (Fan *et al.*, 2007; Albanito *et al.*, 2008; Rosenberg *et al.*, 2008), although it has a low affinity to the ER and AR, acts as agonist and antagonist respectively, interfering in process mediated by androgens and estrogens (Yang *et al.*, 2010), reducing the androgens production and increasing the estrogen production (Fan *et al.*, 2007; Albanito *et al.*, 2008).

Behavior in fish must be altered by estrogenic substances, especially in ovoviviparous species as poecilideans, that presents a characteristic courtship behavior. Due to the relation between the expression of some steroidogenic genes with behavior, and the fact that *Poecilia vivipara* as an ovoviviparous specie, need the copulation to the fertilization and fecundation process, we characterized the relative organ specific distribution of esteroidogenic genes *StAR* and *CYP19A2* (sequenced) in adult males and females of *P. vivipara*. Furthermore, analyzed in males the *StAR* and *CYP19A2* gene expression after exposure to ATR and BPA at environmentally relevant concentrations and also characterized and quantified male reproductive behavior after BPA exposition.

4. 2. Material and Methods

4.2.1. Fish collection and maintenance

Adults of *Poecilia vivipara* (n=150, 3-5 cm length and 0.5-2.5 g whole body weight) were caught in Cassino beach stream (Rio Grande, RS, Brazil), in March and September 2011, were transported to the Laboratory of Aquatic Animals in the Biological Sciences Institute of the Federal University of Rio Grande (FURG). Fish were kept at least two months for acclimation, under 14-h light / 10-h dark cycle, salinity 12 ppt, temperature 19 -22 °C and density of one fish per liter of water. Food was given twice a day (Alcon BASIC® MEP 200 Complex). The organ specific distribution of the genes was done in animals

acclimated and none exposed. The procedures used in these experiments were approved by the Animal Care and Use Committee (CEUA) at FURG.

4.2.2. Identification of *CYP19A2* in *P. vivipara*

Forward and reverse primers were designed to anneal specific *CYP19A2* regions (Table 1). Those regions were chosen based on the alignment of *CYP19A2* sequences of the zebrafish *Danio rerio* (NM_131642.1, *GenBank*), *Poecilia reticulata* (AY395692), *Fundulus heteroclitus* (AY428666), *Jenynsia multidentata* (EU851873) and *Oryzias latipes* (NM_001105093) in order to find conserved regions. Regions that were shared with other CYP isoforms, especially *CYP19A1* (sequences AY428665 for *F. heteroclitus* and D82968 for *O. latipes* were used in the alignment) were avoided. The *Primer3* (Rozen and Skaletsky, 2000) software was employed in the primer designing, and the specificity of the primers for the *CYP19A2* fish sequences was tested using the *FastPCR* software (Kalendar et al., 2009).

The amplification of *P. vivipara* cDNAs, was done from an adult brain RNA extracted and synthesized, by polymerase chain reaction (PCR), using previously designed primers and *Advantage 2 PCR mix* (Clontech). The PCR product was visualized in TBE agarose gel 1%, cut, purified with *Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare) and cloned into *pGEM-T vector* (Promega). Chemo-competent *Escherichia coli*, was transformed with the vector/insert and cultured in a agar plate 35g/L (LB Agar- Sigma) containing ampicillin (100mM), IPTG (0.5 mM) and X-GAL (50mM), incubated by 18 hours at 37 °C. Colonies containing the vector were replicated to the LB culture medium 20g/L (LB Broth – Sigma) and ampicillin 100mM, incubated by 18 hours at 37 °C in constant agitation (250 rpm). The preparation of the plasmid fragments was done with the plasmid Prep Mini Spin kit (GE Healthcare). Sequencing was done in four capillary ABI 3033 equipment. The comparison between the *P. vivipara* *CYP19A2* and the other species was done with the *ClustalW software* (Larkin et al., 2007)

From this sequence where designed specific primers to rapid amplification of 5' and 3' cDNA ends (RACE) and Real time PCR (qPCR) (Table 1), with the BD Smart™ RACE cDNA Amplification Kit (Clontech). Gel-purified 3' and 5' RACE products were cloned and sequenced as described above. Nucleotide and deduced amino acid sequences were aligned with *Danio rerio* and *Fundulus heteroclitus* CYP19A1 and CYP19A2.

4.2.3. ATR and BPA exposure experiment

Animals were acclimated progressively to 24 ppt salinity and maintained five days in this condition before the exposure experiment according to the INCT TA requirements. Fish were exposed for 96 hours to ATR (n=7 for experimental group) and BPA (n=10 for experimental group) in 21 L aquariums, at concentrations 2, 10 and 100 µg/L dissolved in ethanol, the control group was exposed to the vehicle. The solutions were prepared to a final concentration of ethanol lower than 0.01% v/v in the aquarium. Animal density was one fish per liter of water. Feed and renovation of water were done every 24 hours.

4.2.4. Behavioral test

After BPA exposure fish were transferred to a transparent acrylic aquarium (18 x 10.5 x 12.5 cm) filled with 900 mL of water, and placed inside a bigger white box (35 x 35 x 15 cm), in order to isolate the animals to the environment. One female was placed in the transparent aquarium together with two adult males. The two males, with equivalent sizes, were rested to compete one another. The fish behavior was recorded during 15 minutes with a camera SONY HandyCam DCR-SR68 Digital. The frequencies of two characteristics courtship displays were quantified in the male fish: gonopodial thrusting and sigmoid display. Quantification was done during 5 minutes to each male, starting from the first effort made in direction to the female.

4.2.5 Gene expression analysis

After the exposure and reproductive behavior test, the animals exposed to BPA were decapitated and dissected. The fish that were exposed to ATR were

decapitated and dissected also, without performing the behavioral test. Organs (whole brain, gonads, eyes, spleen, gills and a part of the intestine free fat) were immediately placed in RNA lather (Ambion). The samples were held 24-h at 4 °C, and then stored at -20 °C according to the RNAlater manufacturer's instructions.

Total RNA was extracted with QIAzol (Quiagen), and reversely transcribed with the High capacity cDNA reverse transcription kit (Applied biosystems), oligo-dT primers and RNase inhibitor (Applied biosystems). Real time PCR was used in order to quantify the relative expression of *CYP19A2* and *StAR* genes using the GoTaq Kit (Promega) and ABI PRISM® 7300 machine (Applied Biosystems). The obtained results were normalized using beta-actin as housekeeping gene.

4.2.6. Statistics

The relative values for the organ-specific distribution were analyzed by the $E^{\Delta CT}$ method using beta-actin as housekeeping gene, according to Schmittgen and Livak (2008). Homogeneity of variance for the gene expression data was tested through Bartlett's test. Data were logarithmically transformed if the test rejected the assumption of homogeneity variances. Differences in the gene expression among the organs brain, gonad, eyes, spleen, intestine, liver and gill were made using one way ANOVA statistics, and expressed as mean \pm standard deviation. The comparison between the gene expression levels of the control group and the exposed groups (2 ug/L, 10 ug/L and 100 ug/L for ATR and BPA) was done using the *REST 2008 software* (Pfaffl *et al.*, 2002) and results were presented as fold induction/repression in respect to the control. Reproductive behavior was analyzed using the one way non-parametric ANOVA (Kruskal–Wallis) and Dunn's post test to establish the difference between groups, and data on graphs are showed as median and range. Pearson correlation among gene expression and male behaviors were studied.

4.3. Results and Discussion

Although poorly studied so far, the cyprinodontiform *P. vivipara* is a promising model species to be used in ecotoxicology, since it is adapted to live in polluted environments and other stressing conditions (e.g., salinity, oxygen and temperature). In addition, different than other model fish, as the killifish *Fundulus heteroclitus*, *P. vivipara* is ovoviviparous, being an interesting model to understand mother-embryo toxicological interaction during the embryonic development and reproductive behavior that could be altered by toxic compounds. In the present study we added important information regarding the steroidogenic pathway in this species by identifying the brain aromatase gene *CYP19A2* and testing the possible alteration in the gene expression and behavior facing the ED exposure.

4.3.1 Identifying new *CYP19A2* transcripts in *P. vivipara*.

The use of degenerate primers allowed the PCR amplification and sequencing of a 168 bp cDNA fragment in *P. vivipara* liver, eye and brain with a high identity with the equivalent region of the previously known *F. heteroclitus* *CYP19A2*. The use of the RACE technique using specific primers, designed based in the first identified sequence, allowed the uncovering of 5' and 3' cDNA and fragments, with 625 bp and 710 bp length, respectively. A contig sequence obtained from the three achieved sequences allowed the uncovering of a 1180 bp sequence in *P. vivipara*, that correspond to ~ 89 % of the total ORF, based on the alignment with the killifish *CYP19A2* deduced sequence (AY428666) (Figure 1). Known *CYP19A2* ORF from different fish species varies around 1530 bp on common carp *Cyprinus carpio* (EU375456) (Barney *et al.*, 2008), 1524 bp on rare minnow *Gobiocypris rarus* (GU220393) (Wang *et al.*, 2010), 1521 bp on Southern catfish *Silurus meridionalis* (AY325907) (Liu *et al.*, 2007), 1518 bp on *Rivulus marmoratus* (DQ339106) (Lee *et al.*, 2006), 1500 bp on channel catfish *Ictalurus punctatus* (AF417239) (Kazeto and Trant, 2005), 1497 bp on killifish (AY428666) (Greytak *et al.*, 2005), and 1494 pb on gobbid fish *Trimma okinawae* (Kobayashi *et al.*, 2004).

The new *P. vivipara* contig shared 89.3% and 68.8% identity in the deduced amino acid sequence, and 89,7% and 70,0%, in the nucleotide sequence, comparing with the corresponded *F. heteroclitus* and *D. rerio CYP19A2* a.a. and nc regions, respectively (Table 2). This high identity (> 55%) let us to classify this new sequence in the CYP19A sub-family, according to Josephy and Mannervik (2006). In addition, a lower identity of 64.7% with the *F. heteroclitus CYP19A1* nucleotide sequence, than the identity with *F. heteroclitus CYP19A2*, was observed. This these data, altogether allowed us to preliminarily classify this new *P. vivipara* sequence as *CYP19A2*.

The partial ORF have the three conserved regions observed in aromatase aminoacid sequences, corresponding to I-helix (I); aromatase-specific conserved region (II); and heme-binding region (III) (Figure 1). Those putative domains were highly conserved comparing to killifish *CYP19A2*, sharing 96.7% in the I-helix (region I) 91.3% in the aromatase-specific conserved region (region II) and 100% in the heme-binding region (III). Although the identity among the two fish aromatases *CYP19A2* and *CYP19A1* is high, the lower identity of 65,2% with the *F. heteroclitus CYP19A1* isoform in the aromatase specific conserved region (II) suggest that can exist differences in the catalytic properties and specificity for substrates between the two *CYP19A* isoforms.

4.3.2 Organ-specific distribution of *StAR* and *CYP19A2*

The low expression of *StAR* in the brain of *P. vivipara* males (Figure 2.A) and females (Figure 2.B) is an indicative that in this species the brain aromatization may occur in specific regions, as in mammals, where the steroidogenesis is restrict to hippocampus (in fish lateral pallium is the homolog structure (Rodriguez *et al.*, 2002)) and cerebellum (Tsuitsui *et al.*, 2000). Another possibility is that fish, as mammals, have a protein with a homologue function as the MLN64 (Watari, 1997), as demonstrate in trout (Kusakabe *et al.*, 2002) or another gene that codify to *StAR* (Arukwe, 2005) or that brain steroidogenesis is not complete, as affirmed by Hoar *et al.* (1983), who establish that estrogen production in fish brain is dependent of exogenous precursors, it is according with studies in eel (*Anguilla japonica*) (Li *et al.*, 2003) where the *StAR*

expression is too low, and cod (*Gadus morhua*) (Goetz *et al.*, 2004) and trout (Kusakabe *et al.*, 2002) where the expression is non-detectable.

The expression of *CYP19A2* in males was not different among the organs analyzed. Figure 2.A, shows that mean in brain is higher than other organs, but due to high SD, caused provably by the diversity on the population, none statistical difference could be established. In fish, brain is the classical organ for *CYP19A2* expression, fact that have been evidenced in species as *Oryzias latipes* (Patil and Gunasekera, 2008), killifish (Greytak *et al.*, 2005), gobiid fish (Kobayashi *et al.*, 2004), southern catfish (Liu *et al.*, 2007), rare minnow *Gobiocypris rarus* (Wang *et al.*, 2010) and *Rivulus marmoratus* (Lee *et al.*, 2006).

CYP19A2 expression in females is polemic, because the fluctuating hormone levels, all females used in this analysis were non pregnant, collected, acclimated and slaughtered at the same period of the year, to attempt minimize a possible circa-annual influence. The organ specific distribution in males (Figure 2.B) show that *CYP19A2* is expressed as in classic steroidogenic organs (gonad and brain), as in others non characterized as steroidogenic (liver, eye, spleen, intestine and gill) where its function remains unknown.

According to our results, considering that the initial sample was whole brain the presence of the *StAR* and *CYP19A2*, let us to suggest that in the central nervous system of *P. vivipara* steroidogenesis is complete.

On other hand, female brain is not the organ with the highest expression of *CYP19A2*, although our experiment do not let us to compare directly the expression between males and females, is know that some species express differentially this gene from males to females, in fish as killifish (Greytak *et al.*, 2005), southern catfish (Liu *et al.*, 2007) and medaka (Patil and Gunasekera, 2008) females express more aromatase than males. Another species as *Fundulus heteroclitus* (Patel *et al.*, 2006) and zebrafish *Danio rerio* (Sawyer *et al.*, 2006) show not have differences in aromatase expression between males and females. Comparing with another vertebrates who have just one gene that codify aromatase, rats have a sexual dimorphism in the aromatase activity and expression on specific brain regions (e.g. preoptic area), where it is more active

in males than in females (Roselli and Resko, 1997). In birds (zebra finch) males have 2-fold more aromatase in pre-synaptic buttons than females (Peterson *et al.*, 2005), that may be implicated in behavioral aspects. The relative low expression of *CYP19A2* in *P. vivipara* females implies that in adult females the expression of this gene may be not as much essential as in males. Furthermore, high expression of *CYP19A2* found in the nervous system in some males suggests that the local production of estrogen may play a role in sexual behavior.

The significant effect of BPA in males at different concentrations in *StAR* ($p=0.05$ significant) (Figure 4.A) and *CYP19A2* ($p=0.048$ significant) (Figure 4.B) in gonads, suggest that the expression of these genes in gonad is functional and can be altered by EDs with estrogenic activity. Although in male gonad, the expression of *CYP19A2* was not too high, the presence of this gene in gonad, as in other species, suggest that might occur an overlapping with *CYP19A1*. Patil and Gunasekera (2008) suggest that this overlapping is a division of a possible labor that is not clear-cut, and the possibility that each isoform still has the ability to compensate the other or their function in tandem to regulate the action of estrogen in a dose-dependent fashion.

The comparative analysis of *StAR* relative expression in adult male organs (Figure 2.A) show that liver is the principal local of expression, being significantly different of the other analyzed organs. In females, liver was also the organ with the highest relative expression of *CYP19A2*, this is different from the other organs analyzed ($p<0.05$), except intestine (Figure 2.B), nevertheless, other studies show that in fish as southern flounder (Luckenbach *et al.*, 2005), killifish (Greytak *et al.*, 2005), gobiid fish (Kobayashi *et al.*, 2004), rare minnow (Wang *et al.*, 2010), the liver expression of *CYP19A2* is low, or undetectable in southern catfish (Liu *et al.*, 2007) and *Rivulus marmoratus* (Lee *et al.*, 2006). The expression of these two genes in fish liver has been little studied and must to be implicated as in estrogen metabolism, as in detoxification pathways, because the prominent trend to be inhibited after BPA exposition (Figure 4.A and B).

Few studies have evaluated the expression of steroidogenic genes in the intestine, the organ specific for *StAR* expression, show that in females it is the organ with the highest expression (Figure 2.B). In the same way, intestine *CYP19A2* expression was high, another studies show that species as killifish (Greytak *et al.*, 2005), Southern catfish (Liu *et al.*, 2007), rare minnow (Wang *et al.*, 2010) do not have a significant expression of this gene, this is a new finding that must to be carefully studied, because generally the organ specific distribution is evaluated in males. Males of *P. vivipara* have low expression of the gene (Figure 2.C), although was not exactly the same, the proportional expression of these two steroidogenic genes in the same organ in females let us to hypothesize about the complete steroidogenesis, or a possible alternative function of these genes in intestine a non classic steroidogenic organ.

4.3.3. Effect of estrogenic pollutants Atrazine and Bisphenol-A in the expression of *StAR*, *CYP19A2* and reproductive behavior of *Poecilia vivipara*

Few studies had addressed the expression of steroidogenic genes in brain of fish. Expression of *StAR* and *CYP19A2* in brain, involves the biosynthesis of neuroestrogens and other neurosteroids. Even less studies show the regulation of these genes as consequence of exposition to EDs, and the effects of this regulation at great scale, according to Suzawa and Ingraham (2008), the gene responsiveness might be explained from their known sites in the promoter region. A transcription factor that may be important in the regulation of the *StAR* gene is steroidogenic factor 1 (SF-1). Several SF-1 consensus-binding sites have been identified in the *StAR* promoter in mammals (Caron *et al.*, 1997; Sandhoff *et al.*, 1998; Sugawara *et al.*, 1997). Although *StAR* gene lacks a recognizable cAMP response element (CRE) suggesting that the cAMP response element-binding protein (CREB), it is know that CREB may act indirectly on the *StAR* promoter, but the regulation of *StAR* do not imply just these factors, virtually every agent that stimulates the steroid biosynthesis also increase the expression of the *StAR* protein (Stocco, 2001). The sub-chronic ATR exposition did not generate significant changes or trends in the expression of brain *StAR* or *CYP19A2* (Figure 3.A and B), Suzawa and Ingraham 2008,

postulate that the action mechanism of ATR (in *CYP19A1*) must to be done by the regulation of receptors NRA5 and cAMP concentrations, (induced by ATR) that also regulate *StAR*. In rat Leydig Cells exposed to ATR a decreasing in the expression of *StAR*, cAMP and SF-1 (Pogrmic *et al.*, 2009) confirm this hypothesis, but although our results do not evaluate this parameter, the responsiveness of *StAR* to ATR suggest that the regulation mechanism in *P. vivípara* *StAR* gene is different. Otherwise the ATR response can occur earlier. Trends generated by BPA exposition in the *StAR* expression (Figure 4.A) in gonad (induction BPA 100µg/L 6-fold p=0.050) and liver (inhibition), suggest, that in this organs the expression of *StAR* is regulated mainly by the positive feedback between elements of the steroidogenic pathway (*CYP19A2*, Figure 4.B), that have the same trend in the same organs. For example in rat ovarian theca-interstitial and granulose cells BPA increase the *StAR* mRNA abundance (Zhou *et al.*, 2008). While cultured antral follicles, the BPA exposition cause a dose dependent down regulation in the *StAR* expression (Peretz *et al.*, 2011). The different patterns of expression in different organs at different concentrations (Figure 4.A and B) evidence that the induction or inhibition is organ dependent.

Suzawa and Ingraham (2008) evaluated the influence of ATR and BPA in the *CYP19A2* expression of zebrafish, in the same way that our study, ATR do not altered the *CYP19A2* expression mean while BPA up regulated it significantly. In fish, ATR alter the activity and estrogen production according to Fan *et al.*, (2007) and inhibiting phosphodiesterase (Roberge *et al.* 2004), resulting in elevated cAMP (in some human cancer cell lines) that produce a increased transcription of the aromatase gene *CYP19* (*CYP19A1*), increasing in the aromatase activity, and a consequently estrogen production, but non the *CYP19A2* isoform.

The *CYP19A2* contain an estrogen responsive element (ERE) on the promoter region (Kallivretaki, 2006; Tong and Chung, 2003) that is regulated by BPA. So and according with Zhao *et al.* (2001), the physiological up regulation of brain aromatase expression is thought to be driven by an auto regulatory feedback loop involving the product of aromatization (neuroestrogen). Although no

concentration caused significant difference in brain, the significant induction of *CYP19A2* by BPA 10µg/L (2-fold p=0.048) in testicle, is highly important, due to the overlapping of the two isoforms in fish gonad, other studies that analyze the expression of this gene in zebrafish adult male brain and embryos (Kallivretaki, 2006; Chung *et al.*, 2011), and adult brain of hermaphroditic *Rivulus marmoratus* (Lee *et al.*, 2006) show an induction. Oppositely in rare minnow juveniles, exposition to BPA caused a significant decrease of *CYP19A2* expression, they explain this difference speculating a possible quenching active ER complexes after its binding to AhR (Wang *et al.*, 2010), but they analyze the complete fish, this inhibition might be caused by the more expression of the gene in some organs with another kind of answer, as liver, where our analysis in *P. vivipara* show that the expression of *CYP19A2* is inhibited, so the expression of this gene change depending the organ analyzed (inhibited in liver and induced in brain and gonad).

Although the use of *guppy* reproductive behavior as bioindicator was postulated since 1988 (Schröder and Peters, 1988), as biomarker to estrogenic (Bayley *et al.*, 1999) and anti-androgenic substances (Baatrup and Junge 2001), few studies have show a relation between EDs exposition, reproductive behavior and brain steroidogenic pathway in other fish of this group . *P. vivipara*, as other poecilideans have two characteristic courtship displays, gonopodial thrusting and sigmoid display. The gonopodial thrust frequency (Figure 5.A) was affected significant by BPA 2 µg/L and 100µg/L (P < 0.05), none concentration affected significant the sigmoid display (Figure 5.B), although, the two behaviors show the same trend, to be more affected by the lowest concentration rearward by the highest. The gonopodial thrust, importance is due to it enhance the chance of effective inseminations (Farr, 1980). Another estrogenic substances (17β-estradiol and 4 tert-octiphenol by 4 weeks) affect the reproductive behavior of males of *P. reticulata*, another model specie of the same generous of *P. vivipara*, causing a dramatically decreased in the rate and intensity of sexual display, it is also important to consider whether the observed inhibition of male sexual display can be interpreted as a reduction in the animal Darwinian fitness

and, therefore, as an indicator of population health (Bayley *et al.*, 1999). Despite, Hallgren *et al.* (2006) find a relation between the inhibition of sigmoid display and the aromatase activity, after 12-14 days of exposition to fradazole (an Aromatase inhibitor) in *Poecilia reticulata*, we could not establish the same relation after 4 days of exposition because the expression of *CYP19A2* and *StAR* in brain was not significantly affected by the BPA exposition at none concentration tested. However, sigmoid display and gonopodial thrust showed significant ($p < 0.05$) correlation (87%). Sigmoid display and gonopodial thrust displayed correlation of 98 and 91% ($p < 0.05$) with *CYP19A2*. Nevertheless, we can affirm that the reproductive behavior was more sensible to the sub-chronic exposition to BPA, than the expression of steroidogenic genes *StAR* and *CYP19A2* in these experimental conditions.

4.4. Conclusions

CYP19A2 is a wide expressed gene in *P. vivipara*, found as in steroidogenic as and non steroidogenic organs, this organ specific distribution is different from males to females.

The *CYP19A2* and *StAR* expression in brain of *P. vivipara*, is not altered after sub-chronic exposition to ATR.

The gonadal expression of the steroidogenic genes *StAR* and *CYP19A2* was altered by sub-chronic BPA exposition.

Reproductive behavior (Gonopodial thrusting) in *P. vivipara*, is more sensible to sub-chronic expositions at low concentrations of BPA, than the expression of steroidogenic genes *StAR* and *CYP19A2*.

4.5. References

- Albanito L., Lappano R., Madeo A., Chimento A., Prossnitz E., Cappello A., Dolce V., Abonante S., Pezzi V., e Maggiolini M., 2008. G-Protein–Coupled Receptor 30 and Estrogen Receptor- alpha Are Involved in the Proliferative Effects Induced by Atrazine in Ovarian Cancer Cells *Environmental Health Perspectives*, 116, 12, 1648-1655.
- Arukwe A., 2005. Modulation of Brain Steroidogenesis by Affecting Transcriptional Changes of Steroidogenic Acute Regulatory (StAR) Protein and Cholesterol Side Chain Cleavage (P450scc) in Juvenile Atlantic Salmon (*Salmo salar*) Is a Novel Aspect of Nonylphenol Toxicity, *Environmental Science & Technology* 39, 9791-9798
- Baattrup E. and Junge M., 2001. Antiandrogenic Pesticides Disrupt Sexual Characteristics in the Adult Male Guppy (*Poecilia reticulata*). *Environmental Health Perspectives*, 109, 10, 1063-1070
- Barney M. L., Patil J. G., Gunasekera R. M., Carter C. G., 2008. Distinct cytochrome P450 aromatase isoforms in the common carp (*Cyprinus carpio*): Sexual dimorphism and onset of ontogenic expression. *General and Comparative Endocrinology* 156, 499–508
- Bayley M., Nielsen J. R., Baattrup E. 1999., Guppy Sexual Behavior as an Effect Biomarker of Estrogen Mimics. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 43, 68-73
- Bondesson M., Jonsson J., Pongratz I., Olea N., Cravedi J., Zalko D., H°akansson H., Halldin K., Di Lorenzo D., Behl C., Manthey D., Balaguer P., Demeneix B., Fini J., Laudet V. e Gustafsson J., 2009. A cascade of Effects of Bisphenol A, *Reproductive Toxicology* doi:10.1016/j.reprotox.2009.06.014.
- Caron K. M., Ikeda Y., Soo S. C., Stocco C. M., Parker K. L. and Clark B. J., 1997 Characterization of the Promoter Region of the Mouse Gene Encoding the Steroidogenic Acute Regulatory Protein, *Molecular Endocrinology*, 140, 11, 2
- Chung E., Genco M. C., Megrelis L., Ruderman J. V., 2011. Effects of bisphenol A and triclocarban on brain-specific expression of aromatase in early

- zebrafish embryos. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 108, 43 , 17732–17737
- Fan W., Yanase T., Morinaga H., Gondo S., Okabe T., Nomura M. Komatsu T., Morohashi K., Hayes T., Takayanagi T., e Nawata H., 2007. Atrazine-Induced Aromatase Expression Is SF-1 Dependent: Implications for Endocrine Disruption in Wildlife and Reproductive Cancers in Humans. Environmental Health Perspectives, 115, 5. 720-727
- Farr J. A., 1980. Social Behavior Patterns as Determinants of Reproductive Success in the Guppy *Poecilia reticulata* Peters (Pisces:Poeciliidae). Behavior 74, 1-2
- Goetz F. W., Norberg B., McCauley L. A. R., Iliev D. B., 2004. Characterization of the cod (*Gadus morhua*) steroidogenic acute regulatory protein (StAR) sheds light on StAR gene structure in fish . Comparative Biochemistry and Physiology Part B 137, 351–362
- Greytak S. R., Champlin D., Callard G. V., 2005, Isolation and characterization of two cytochrome P450 aromatase forms in killifish (*Fundulus heteroclitus*): Differential expression in fish from polluted and unpolluted environments. Aquatic Toxicology, 71, 371–389
- Hallgren S. L. E., Linderöth M., Olsen H., 2006. Inhibition of cytochrome p450 brain aromatase reduces two male specific sexual behaviours in the male Endler guppy (*Poecilia reticulata*), . General and Comparative Endocrinology, 147, 323–328
- Hoar W. S., Randall D. J., Donaldson E. M., 1983. Fish Physiology Vol. IX, Part. A., Endocrine Tissues and Hormones 7. The Gonadal Steroids., II Steroidogenic Tissues and Steroid Identification., C. Peripheral Sources of Sex Steroids 4, Brain 317
- Joseph P. D. and Mannervik B. 2006, P450 Enzyme Classification. Cytochrome P450: Chemical Aspects. The Discovery of P450. Molecular Toxicology. Second Edition, 211
- Kazeto Y. and Trant J. M. 2005. Molecular biology of channel catfish brain cytochrome P450 aromatase (CYP19A2): cloning, preovulatory induction of

- gene expression, hormonal gene regulation and analysis of promoter region. *Journal of Molecular Endocrinology* 35, 571–583
- Kalendar R., Lee D., Schulman A. H. 2009. FastPCR Software for PCR Primer and Probe Design and Repeat Search. *Genes, Genomes and Genomics*, 3(1): 1-14
- Kallivretaki E., Eggen R., Neuhauss S., Alberti M., Kausch U., Segner H., 2006. Aromatase in zebrafish: A potential target for endocrine disrupting chemicals. *Marine Environmental Research*, 62 (1), 187–190
- Kobayashi Y., Kobayashi T., Nakamura M., Sunobe T., Morrey C. E., Suzuki N. and Yoshitaka N., 2004. Characterization of Two Types of Cytochrome P450 Aromatase in the Serial-sex Changing Gobiid Fish, *Trimma okinawae*. *Zoological Science*, 21, 417–425
- Kusakabe M., Todo T., MaQuillan J., Goetz F. W., Young G. 2002. Characterization and Expression of Steroidogenic Acute Regulatory Protein and MLN64 cDNAs in Trout, *Endocrinology*, 143(6):2062–2070
- Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23, 2947-2948
- Le H., Carlson E., Chua J. e Belcher S., 2008. Bisphenol A is released from polycarbonate drinking bottles and mimics the neurotoxic actions of estrogen in developing cerebellar neurons. *Toxicology Letters*, 176, 149–156
- Lee Y. M., Seo J. S., Kim I. C., Yoon Y. D., Lee J. S. 2006, Endocrine disrupting chemicals (bisphenol A, 4-nonylphenol, 4-tert-octylphenol) modulate expression of two distinct cytochrome P450 aromatase genes differently in gender types of the hermaphroditic fish *Rivulus marmoratus*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 345, 894–903
- Li Y. Y., Inoue K., Takei Y., 2003. Steroidogenic Acute Regulatory Protein in Eels: cDNA Cloning and Effects of ACTH and Seawater Transfer on Its mRNA Expression. *Zoological Science*, 20, 211–219
- Liu Z., Wu F., Jiao B., Zhang X., Hu C., Huang B., Zhou L., Huang X., Wang Z., Zhang Y., Nagahama Y., 2007, Molecular cloning of doublesex and mab-3-

- related transcription factor 1, forkhead transcription factor gene 2, and two types of cytochrome P450 aromatase in Southern catfish and their possible roles in sex differentiation. *Journal of Endocrinology*, 194, 223–241
- Luckenbach J. A., Early L., Rowe A. H., Borski R. J., Daniels H. V. Godwin J., 2005. Aromatase Cytochrome P450: Cloning, Intron Variation, and Ontogeny of Gene Expression in Southern Flounder (*Paralichthys lethostigma*). *Journal of Experimental Zoology*, 303A, 643–656
- Lyons G., 2000. Bisphenol-A A Known Endocrine Disruptor A WWF European Toxics Programme Report, 1-37
- Miller W. L., 2007. Steroidogenic acute regulatory protein (StAR), a novel mitochondrial cholesterol transporter. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1771, 663–676
- Norris D. O., 2007. *Vertebrate Endocrinology*, fourth ed. Chapter 3. Synthesis, Metabolism, and Actions of Bioregulators . II. Steroid Bioregulators, 72-91
- Patel M. R., Scheffler B. E., Wang L., Willett K. L., 2006. Effects of benzo(a)pyrene exposure on killifish (*Fundulus heteroclitus*) aromatase activities and mRNA . *Aquatic Toxicology*, 77, 267–278
- Patil J. G. and Gunasekera R. M., 2008. Tissue and sexually dimorphic expression of ovarian and brain aromatase mRNA in the Japanese medaka (*Oryzias latipes*): Implications for their preferential roles in ovarian and neural differentiation and development. *General and Comparative Endocrinology*, 158, 131–137
- Pfaffl, M. W., Graham, W. H. and Dempfle, L., 2002. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Research*, 30, 9-36
- Peretz J., Gupta R. K., Singh J., Ochoa I. H., Flaws J.A., 2011. Bisphenol A Impairs Follicle Growth, Inhibits Steroidogenesis, and Downregulates Rate-Limiting Enzymes in the Estradiol Biosynthesis Pathway. *Toxicological Sciences*, 119(1), 209–217
-

- Peterson R. S., Yarram L., Schlinger B. A. and Saldanha C., 2005. Aromatase is pre-synaptic and sexually dimorphic in the adult zebra finch brain. *Proc. R. Soc. B* 272, 2089-2096 doi:10.1098/rspb.2005.3181
- Pogrmic K., Fa S., Dakic V., Kaisarevic S., Kovacevic R., 2009. Atrazine Oral Exposure of Peripubertal Male Rats Downregulates Steroidogenesis Gene Expression in Leydig Cells. *Toxicological Sciences* 111(1), 189–197
- Roberge M., Hakk H., Larsen G., 2004. Atrazine is a competitive inhibitor of phosphodiesterase but does not affect the estrogen receptor. *Toxicology Letters*, 154, 61–68
- Rodriguez F., Lopez J.C., Vargas J. P., Broglio C. ,Gomez Y., Salas C., 2002. Spatial memory and hippocampal pallium through vertebrate evolution: Insights from reptiles and teleost fish. *Brain Research Bulletin*, 57, 499–503
- Roselli C. E. and Resko J. A., 1997, Sex Differences in Androgen-regulated Expression of Cytochrome P450 Aromatase in the Rat Brain. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 61, No. 3-6, 365-374
- Rosenberg B., Chen H., Folmer J., Liu J. Papadopoulos V. e Zirkin B., 2008. Gestational Exposure to Atrazine: Effects on the Postnatal Development of Male Offspring *Journal of Andrology*, 29, 3:304-311
- Rozen S., Skaletsky H., 2000. Primer3 on the WWW for General Users and for Biologist Programmers. *Methods in Molecular Biology*, vol. 132
- Sandhoff T. W., Hales D. B., Hales K. H., McLean M. P., 1998. Transcriptional Regulation of the Rat Steroidogenic Acute Regulatory Protein Gene by Steroidogenic Factor 1. *Endocrinology*, 139, 12 , 4821-4831
- Sawyer S. J., Gerstner K. A., Callard G. V., 2006. Real-time PCR analysis of cytochrome P450 aromatase expression in zebrafish: Gene specific tissue distribution, sex differences, developmental programming, and estrogen regulation. *General and Comparative Endocrinology*, 147, 108–117
- Schmittgen, T. D. and Livak, K. J., 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative C-T method. *Nature Protocols* 3:1101-1108
- Schöder J. H. and Peters K. 1988., Differential Courtship Activity of Competing Guppy Males (Poecilia reticulata Peters; Pisces: Poeciliidae) as an

- Indicator for Low Concentrations of Aquatic Pollutants. *Bulletin of Environmental Contamination Toxicology*, 40, 396-404
- Stocco D. M., 2001. Tracking the Role of a StAR in the Sky of the New Millennium. *Molecular Endocrinology* 15(8):1245–1254
- Sugawara T., Kiriakidou M., McAllister J. M., Kallen C. B. And Strauss J. F., 1997. Multiple Steroidogenic Factor 1 Binding Elements in the Human Steroidogenic Acute Regulatory Protein Gene 5'-Flanking Region Are Required for Maximal Promoter Activity and Cyclic AMP Responsiveness. *Biochemistry* 1997, 36, 7249-7255
- Suzawa M., Ingraham H., 2008. The Herbicide Atrazine Activates Endocrine Gene Networks via Non-Steroidal NR5A Nuclear Receptors in Fish and Mammalian Cells. *PLoS ONE* 3,5: 1-11, e2117. doi:10.1371/journal.pone.0002117 2008.
- Tong S. e Chung B. (2003) Analysis of zebrafish *cyp19* promoters. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* 86: 381–386
- Tsutsui K., Ukena K., Usui M., Sakamoto H., Takase M., 2000. Novel brain function: biosynthesis and actions of neurosteroids in neurons Review article, *Neuroscience Research* 36, 261 – 273
- US Environmental Protection Agency, 1998. Endocrine Disruptor Screening and Testing Advisory Committee (EDSTAC) Final Report. Washington, DC
- Vandenberg L., Maffini M., Sonnenschein C., Rubin B. e Soto A., 2009. Bisfenol-A and the great divide: A review of controversies in the field of endocrine disruption. *Endocrine Reviews* 30(1):75–95.
- Wang J., Liu X., Wang H., Wu T., Hu X., Qin F., Wang Z., 2010. Expression of two cytochrome P450 aromatase genes is regulated by endocrine disrupting chemicals in rare minnow *Gobiocypris rarus* juveniles. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 152 , 313–320
- Watari H., Arakane F., Moog-Lutz C., Kallen C., Tomasetto C., Gerton L., Rio M. C., Bakers M., Strauss J., 1997. MLN64 contains a domain with homology to the steroidogenic acute regulatory protein (StAR) that

stimulates steroidogenesis, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94, 8462–8467

Yang L., Zha J. e Zhang X., 2010. Alterations in mRNA expression of steroid receptors and heat shock proteins in the liver of rare minnow (*Grobicypris rarus*) exposed to atrazine and p,p'-DDE . *Aquatic Toxicology*, 98, 4, 381-387

Zhao J., Mak P., Tchoudakova A., Callard G., Chen S., 2001. Different Catalytic Properties and Inhibitor Responses of the Goldfish Brain and Ovary Aromatase Isozymes. *General and Comparative Endocrinology*, 123, 180–191

Zhou W., Liu J., Liao L., Han S., Liu J., 2008. Effect of bisphenol A on steroid hormone production in rat ovarian theca-interstitial and granulosa cells. *Molecular and Cellular Endocrinology* 283, 12–18

5. Conclusões

CYP19A2 é um gene amplamente expresso em *Poecilia vivípara*, encontrando-se tanto em tecidos classicamente esteroideogênicos como não esteroideogênicos, e sua expressão é diferenciada em machos e fêmeas.

A expressão de *StAR* no cérebro não é alterada pela exposição (96h) a ATR.

A expressão gonadal dos genes esteroideogênicos *StAR* e *CYP19A2*, é induzida pela exposição a BPA.

O comportamento reprodutivo (gonopodial thrusting) em *Poecilia vivípara* foi mais sensível a baixas concentrações de BPA que a expressão dos genes esteroideogênicos *StAR* e *CYP19A2*.

Foi possível estabelecer uma relação entre o comportamento reprodutivo com a expressão do gene *CYP19A2*.

6. Perspectivas

A partir da sequência do *CYP19A2*, realizar uma análise filogenética completa do gene, e uma modelagem da proteína para compreender sua responsividade frente a alguns poluentes estrogênicos.

Estudar o efeito de ATR e BPA em exposições de menor duração (aguda).

Avaliar a atividade enzimática de *CYP19A2* no cérebro de machos e fêmeas.

Sequenciar e analisar a expressão de outros genes da via esteroidogênica (*ERs*, *AR*, *CYP17*, *CYP11B*), e avaliar sua expressão em animais expostos a BPA.

Analisar a expressão de outros genes esteroidogênicos e a atividade enzimática de algumas proteínas em intestino de fêmeas de *P. vivipara*.

Analisar em animais expostos a expressão de genes de detoxificação da família do *CYP1* (*CYP1A*, *CYP1B*, *CYP1C*, *CYP1D*).

Avaliar o comportamento reprodutivo de *P. vivipara*, em animais expostos a outros poluentes estrogênicos.

Avaliar a atividade da 11-ketotestosterona, em animais expostos a poluentes estrogênicos que alterem o comportamento reprodutivo.

7. Bibliografia

- Albanito L., Lappano R., Madeo A., Chimento A., Prossnitz E., Cappello A., Dolce V., Abonante S., Pezzi V., e Maggiolini M. (2008) G-Protein–Coupled Receptor 30 and Estrogen Receptor- alpha Are Involved in the Proliferative Effects Induced by Atrazine in Ovarian Cancer Cells *Environmental Health Perspectives*, 116, 12, 1648-1655.
- Bayley M., Nielsen J. R., Baatrup E., 1999. Guppy Sexual Behavior as an Effect Biomarker of Estrogen Mimics. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 43, 68-73
- Bondesson M., Jonsson J., Pongratz I., Olea N., Cravedi J., Zalko D., H°akansson H., Halldin K., Di Lorenzo D., Behl C., Manthey D., Balaguer P., Demeneix B., Fini J., Laudet V. e Gustafsson J. (2009) A cascade of Effects of Bisphenol A, *Reproductive Toxicology* , doi:10.1016/j.reprotox.2009.06.014.
- Callard G., Tchoudakova A., Kishida M. e Word E. (2001) Differential tissue distribution, developmental programming, estrogen regulation and promoter characteristics of *cyp19* genes in teleost fish. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* 79 305–314
- Cheshenko K., Pakdel F., Sener H., Kah O. e Eggen R. (2008) Interference of endocrine disrupting chemicals with aromatase CYP19 expression or activity, and consequences for reproduction of teleost fish. *General and Comparative Endocrinology* 155: 31–62.
- Clotfelter E. D., Bell A. M., Levering K., 2004. The role of animal behaviour in the study of endocrine-disrupting chemicals. *Animal Behaviour* 68, 665–676
- Colborn T. e Clement C. (1992) In: *Chemically-Induced Alterations in Sexual and Functional Development: the Wildlife/Human Connection*, Princeton, New Jersey: Princeton Scientific Publ. *Advances in Modern Environmental Toxicology* 21, 403

- Compagnone N. A., Mellon S.H., 1998. Dehydroepiandrosterone: a potential signalling molecule for neocortical organization during development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 95, 4678–4683
- Dong L., Chen L., Li Z., Gao H. e Li J., 2006. Quality assurance/quality control for monitoring and analysis of trace triazines in water. *J. Safe Environ.* 6, 35–38.
- Fan W., Yanase T., Morinaga H., Gondo S., Okabe T., Nomura M. Komatsu T., Morohashi K., Hayes T., Takayanagi T., e Nawata H. (2007) Atrazine-Induced Aromatase Expression Is SF-1 Dependent: Implications for Endocrine Disruption in Wildlife and Reproductive Cancers in Humans. *Environmental Health Perspectives*, 115,5. 720-727.
- Farr J. A., 1980. Social Behavior Patterns as Determinants of Reproductive Success in the Guppy *Poecilia reticulata* Peters (Pisces:Poeciliidae). *Behavior* 74, 1-2
- Forlano P., Schlinger B. e Bass A. (2006) Brain aromatase: New lessons from non-mammalian model systems. *Frontiers in Neuroendocrinology* 27 247–274.
- Foy M.R., 2001, 17beta-estradiol. effect on CA1 hippocampal synaptic plasticity. *Neurobiology of Learning and Memory*, 76: 239–252
- Gonçalves C., Wigg R., Barros D. e Martinez P. (2010) Prenatal and postnatal exposure effects of Bisphenol A low dose on behavior and memory in rats *Environmental Toxicology and Pharmacology* DOI: 10.1016/j.etap.2010.06.003.
- Hinfray N., Palluel O., Turies C., Cousin C., Porcher J. e Brion F., 2006. Brain and Gonadal Aromatase as Potential Targets of Endocrine Disrupting Chemicals in a Model Species, the Zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Toxicology* DOI 10.1002/tox. 332-337.
- Holmes M. M., Wide J. K., Galea L.A., 2002. Low levels of estradiol facilitate, whereas high levels of estradiol impair, working memory performance on the radial arm maze. *Behavioral Neuroscience*, 116: 928–934.

- Huang H. e Leunga L. (2009) Bisphenol A downregulates CYP19 transcription in JEG-3 cells. *Toxicology Letters* 189: 248–252.
- Jin Y., Chen R., Sun L., Qian H., Liu W. e Fu Z. (2009) Induction of estrogen-responsive gene transcription in the embryo, larval, juvenile and adult life stages of zebrafish as biomarkers of short-term exposure to endocrine disrupting chemicals *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 150 414–420.
- Kishida M. e Callard G. (2001) Distinct Cytochrome P450 Aromatase Isoforms in Zebrafish (*Danio rerio*) Brain and Ovary Are Differentially Programmed and Estrogen Regulated during Early Development. *Endocrinology*, 142, 2. 740-750.
- Kocerha J., Prucha M. S., Kroll K. J., Steinhilber D., Denslow N., 2009. Regulation of Steroidogenic Acute Regulatory Protein Transcription in Largemouth Bass by Orphan Nuclear Receptor Signaling Pathways. *Endocrinology* 2010 151:341-349
- Koenig H.L., Schumacher M., Ferzaz B., Thi A.N., Ressouches A., Guennoun R., Jung-Testas I., Robel P., Akwa Y., Baulieu E.E., 1995. Progesterone synthesis and myelin formation by Schwann cells. *Science*, 268: 1500–1503
- Lassiter C. e Linney E. (2007) Embryonic Expression and Steroid Regulation of Brain Aromatase *cyp19a1b* in Zebrafish (*Danio rerio*) *Zebrafish* 4, 1. 49-57
- Lee Y. M., Seong M. J., Lee J. W., Lee Y.K., Kim T. M., Nam S. Y., Kim D. J., Yun Y. W., Kim T. S., Han S. Y., Hong J. T. (2007) Estrogen receptor independent neurotoxic mechanism of bisphenol A, an environmental estrogen. *Journal of Veterinary Science*. 8, 1, 27-38
- Le H., Carlson E., Chua J. e Belcher S. (2008) Bisphenol A is released from polycarbonate drinking bottles and mimics the neurotoxic actions of estrogen in developing cerebellar neurons. *Toxicology Letters* 176: 149–156
- Levy G., Lutz I., Kruger A., Kloas W., 2004. Bisphenol A induces feminization in *Xenopus laevis* tadpoles *Environmental Research* 94, 102–111
- Lyons G. (2000) Bisphenol A *A Known Endocrine Disruptor* A WWF European Toxics Programme Report April 2000. 1-37.

- Mendonça J. e Andreato J. (2001) Aspectos reprodutivos de *Poecilia vivípara* (Bloch & Schneider) (Poeciliidae) da Lagoa Rodrigo de Freitas, Rio de Janeiro, Brasil Revista Brasileira de Zoologia. 18, 4: 1041-1047.
- Miller W.L., 1995, Mitochondrial specificity of the early steps in steroidogenesis. J Steroid Biochem Mol Biol 1995; 55: 607–616.
- Miller W. L., 2007. Mechanism of StAR's regulation of mitochondrial cholesterol import. Molecular and Cellular Endocrinology 265–266, 46–50
- Mouriec K., Lareyre J., Tong S., Le Page Y., Vaillant C., Pellegrini E., Pakdel F., Chung B., Kah O., e Anglade I. (2009) Early Regulation of Brain Aromatase (*cyp19a1b*) by Estrogen Receptors During Zebrafish Development. Developmental dynamics 238:2641-2651.
- Norris D. O., 2007. Vertebrate Endocrinology, fourth ed. Chapter 3. Synthesis, Metabolism, and Actions of Bioregulators . II. Steroid Bioregulators , 72-91
- Patisaul H.B., Polston E.K. (2008) Influence of endocrine active compounds on the developing rodent brain. Brain Research Reviews. 57. 2:352-62.
- Ren J., Jiang K. e Zhou H., 2002. The concentration and source of Atrazine residue in water of guanting reservoir. Environ. Sci. 23, 126–128.
- Rosenberg B., Chen H., Folmer J., Liu J. Papadopoulos V. e Zirkin B. (2008) Gestational Exposure to Atrazine: Effects on the Postnatal Development of Male Offspring Journal of Andrology, 29, 3:304-311.
- vom Saal, F. S. , Nagel, S. C., Palanza, P., Boechler, M., Parmigiani, S. & Welshons, W. V. 1995. Estrogenic pesticides: binding relative to estradiol in MCF-7 cells and effects of exposure during fetal life on subsequent territorial behavior in male mice. Toxicology Letters, 77, 343–350
- Schöder J. H. and Peters K. 1988., Differential Courtship Activity of Competing Guppy Males (*Poecilia reticulata* Peters; Pisces: Poeciliidae) as an Indicator for Low Concentrations of Aquatic Pollutants. Bulletin of Environmental Contamination Toxicology, 40, 396-404
- Schumacher M, Robel P, Baulieu EE., 1996. Development and regeneration of the nervous system: a role for neurosteroids. Developmental Neuroscience; 18: 6–21
-

- Schumacher M., Akwa Y., Guennoun R., Robert F., Labombarda F., Desarnaud F., Robel P., De Nicola A. F., Baulieu E. E., 2000. Steroid synthesis and metabolism in the nervous system: trophic and protective effects. *Journal of Neurocytology*, 29: 307–326
- Segal M, Murphy D. 2001. Estradiol induces formation of dendritic spines in hippocampal neurons: functional correlates. *Hormones and Behavior*, 40, 156–159
- Sierra A., 2004. Neurosteroids: The StAR Protein in the Brain. *Journal of Neuroendocrinology*, 2004, Vol 16, 787–793
- Sodré F., Pescara I., Montagner C. e Jardim W. (2010) Assessing selected estrogens and xenoestrogens in Brazilian surface waters by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Microchemical Journal*, 96: 92–98
- Stocco D. M., 2001. Tracking the Role of a StAR in the Sky of the New Millennium. *Molecular Endocrinology* 15(8):1245–1254
- Suzawa M. e Ingraham H. (2008) The Herbicide Atrazine Activates Endocrine Gene Networks via Non-Steroidal NR5A Nuclear Receptors in Fish and Mammalian Cells. *PLoS ONE* 3,5: 1-11, e2117. doi:10.1371/journal.pone.0002117 2008
- Sweeney T. (2002). Is exposure to endocrine disrupting compounds during fetal/post-natal development affecting the reproductive potential of farm animals? *Domestic Animal Endocrinology*. 23: 203–209
- Thimbault R. e Shultz R. (1978) Reproductive adaptation among viviparous fishes (Cyprinodontiformes: Poeciliidae). *Evolution* 32, 2: 320-333
- Tong S. e Chung B. (2003) Analysis of zebrafish *cyp19* promoters. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* 86: 381–386
- Tsutsui K., Ukena K., Usui M., Sakamoto H., Takase M., 2000. Novel brain function: biosynthesis and actions of neurosteroids in neurons Review article, *Neuroscience Research* 36, 261 – 273
- U.S. EPA, (2002). Reregistration Eligibility Science Chapter for Atrazine Environmental Fate and Effects Chapter. U.S. EPA, Washington, DC, USA
-

- Vandenberg L., Maffini M., Sonnenschein C., Rubin B. e Soto A. (2009) Bisfenol-A and the great divide: A review of controversies in the field of endocrine disruption. *Endocrine Reviews* 30(1):75–95
- Whitfield G. K., Jurutka P. W., Haussler C. A., Haussler M. R., 1999. Steroid Hormone Receptors: Evolution, Ligands, and Molecular Basis of Biologic Function . *Journal of Cellular Biochemistry Supplements* 32/33:110–122
- Yang L., Zha J. e Zhang X. (2010) Alterations in mRNA expression of steroid receptors and heat shock proteins in the liver of rare minnow (*Grobicypris rarus*) exposed to atrazine and p,p '-DDE . *Aquatic Toxicology*, 98, 4: 381-387
- Yoo A, Harris J, Dubrovsky B. 1996. Dose–response study of dehydroepiandrosterone sulfate on dentate gyrus long-term potentiation. *Experimental Neurology*, 137, 151–156.
-