



Universidade Federal do Rio Grande – FURG

Instituto de Ciências Biológicas – ICB

Programa de Pós - graduação em Ciências Fisiológicas – Fisiologia Animal Comparada

**Identificação e expressão de genes relacionados à via
esteroidogênica e resposta antioxidante após a
exposição à Atrazina em *Poecilia vivipara* (Poeciliidae,
Cyprinodontiformes)**

Dissertação defendida no âmbito do
Programa de Pós-graduação em Ciências
Fisiológicas – Fisiologia Animal
Comparada, como parte dos requisitos
para a obtenção do título de MESTRE em
Fisiologia Animal Comparada.

Biól. Cássia Rodrigues da Silveira

Orientador: Luis Fernando Marins

Co-orientador: Juliano Zanette

Março, 2012

AGRADECIMENTOS

Eu gostaria de agradecer a todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para a elaboração dessa dissertação.

Primeiramente, eu gostaria de agradecer ao meu orientador, Luis Fernando Marins, o Luf. Na verdade, acho que nunca vou conseguir agradecer o suficiente. Obrigada, mais uma vez, por me aceitar a seis anos atrás, e por ter acreditado em mim. Eu com certeza eu devo a ti e ao laboratório todo o amadurecimento profissional (e grande parte do amadurecimento pessoal) que eu tive até o presente momento. Obrigada por toda a contribuição, pelos conselhos, pelos ensinamentos, e pelos puxões de orelha também. Aqui, se fecha um ciclo que foi muito proveitoso pra mim e que deu muito certo. E eu sei que ele não vai se fechar completamente, porque vou continuar convivendo e aprendendo muito contigo.

Gostaria de agradecer também ao meu co-orientador, Juliano Zanette, por todo o conhecimento repassado, pelas análises das sequências, pela ajuda que foi essencial para o desenvolvimento do trabalho, e pela contribuição para o meu desenvolvimento profissional. Mas também pela amizade, pela parceria, pela paciência. Por estar sempre disponível para nos orientar nos momentos de dúvidas, e porque não dizer também nos momentos de desespero. Obrigada Juca!

Ao professor Pablo, por ter aceitado participar da banca, pela amizade, e pela contribuição no meu interesse pela Toxicologia. Nos últimos momentos do meu mestrado, a dúvida em relação ao futuro como era de se esperar apareceu, e aproveitando a oportunidade, gostaria de agradecer também ao professor Pablo pela

ajuda, pelas conversas, e principalmente por me aceitar em seu grupo de pesquisa. Tenho certeza de que, mais uma vez, estou iniciando uma ótima parceria.

A todos os professores do programa, pelos ensinamentos e também pela amizade, pela atenção, pelos conselhos. A convivência com cada um de vocês seja em sala de aula, nos corredores, ou tomando um café na cozinha, sempre traz muitas coisas boas, e principalmente, muito aprendizado.

Aos meus colegas da Fisiologia, por todos os momentos agradáveis que proporcionaram nesses últimos dois anos, pela amizade, troca de experiências, conversas no corredor, lanches no CC, congressos, etc. Obrigada por estarem comigo sempre, nas horas boas e ruins!

Ao pessoal do Laboratório de Biologia Molecular, pelo apoio e aprendizado não só no período do mestrado, mas nos últimos seis anos. Obrigada em especial ao Márcio, Dani, Lupe, Ju, Nino e Bruna, por, junto com o Luf, me acolherem no laboratório e me ensinarem cada passo lá dentro, sendo os principais responsáveis pelo o que hoje eu sei e o que me trouxe até aqui. Obrigada também a Rê, por ter estado do meu lado todo esse tempo, aprendendo junto, acertando, errando, compartilhando os ensinamentos, e principalmente construindo uma sólida amizade. Gostaria de agradecer também a Isabel, por cada dia de experimento que passamos juntas, pela ajuda que foi fundamental, pelas palavras animadoras quando ficávamos bem cansadas, enfim, por todo o apoio! Obrigada minha grande parceira de experimentos do mestrado!

À salinha de permanência quatro, simplesmente pelo dia-a-dia. Pelo convívio fácil, pelas risadas, pelos momentos bons, pelos lanches divididos, pelas alegrias divididas, por tudo. Nos últimos dois anos vocês foram de extrema importância em

minha vida, ouvindo meus lamentos, comemorando minhas vitórias, presenciando meus cansaços e respeitando meus silêncios. Acho que somos muito mais que alunos de pós graduação em uma sala em comum, somos um grupo forte de amigos, e isso faz toda a diferença.

Também não posso esquecer os colegas que começaram comigo toda essa jornada na pesquisa, mesmo que em áreas diferentes. Gostaria de agradecer então, aos meus colegas de graduação, muitos que por agora estão também se tornando mestres. Em especial, à Gabi, Fabi, Tamy, Lu e Rê, pela parceria e amizade que já dura seis anos e que tem um força enorme, obrigada gurias, por tudo o que representam pra mim.

Aos meus amigos, que são muitos, então não vou citar nomes pra não esquecer ninguém. Obrigada por tudo, principalmente por entenderem a minha ausência em alguns momentos, por ouvirem minhas reclamações, por me dar colo pra chorar quando eu precisei. Não só no período do mestrado, mas alguns deles durante a minha vida toda.

Gostaria de agradecer também a toda a minha família, simplesmente pela base e pelo exemplo que sempre vão ser pra mim. Obrigada pelo apoio, pelos colos, por acreditarem e se orgulharem de mim a cada vitória!

E por fim, gostaria de agradecer às pessoas que realmente fizeram com que tudo isso pudesse acontecer, com que eu pudesse chegar até aqui: Mãe e pai. OBRIGADA POR TUDO! Amo vocês.

Sumário

RESUMO	7
ABSTRACT.....	9
INTRODUÇÃO GERAL	11
1. Desreguladores endócrinos.....	13
1.1. Atrazina	14
2. Via esteroidogênica	17
3. Sistema de defesa antioxidante.....	21
4. Biomarcadores	23
5. Modelo experimental	25
OBJETIVO GERAL.....	28
Objetivos específicos.....	28
ARTIGO - Atrazine exposure modified the expression of steroidogenesis and oxidative stress-related genes in the fish <i>Poecilia vivipara</i>	
Abstract.....	29
1.Introduction	30
2.Methodology.....	33

3.Results	36
4.Discussion.....	43
5.References	50
CONCLUSÕES GERAIS	60
PERSPECTIVAS	60
REFERÊNCIAS	62

RESUMO

O herbicida Atrazina (ATR) é um agrotóxico utilizado há cerca de 50 anos, responsável pelo controle seletivo de plantas daninhas em cultivo de arroz, milho e cana-de-açúcar, principalmente. Estudos recentes apontam diversos efeitos desse herbicida em invertebrados e vertebrados, através da contaminação do solo, bem como da lixiviação para os ecossistemas aquáticos. Foi demonstrado que a ATR é um desregulador endócrino, além de causar efeitos como estresse oxidativo, imunotoxicidade e distúrbios no metabolismo energético. No presente estudo, a espécie nativa *Poecilia vivipara* foi utilizada como modelo experimental para identificar e analisar a expressão de genes atuantes na via esteroidogênica (*StAR* e *Cyp19a1*) e genes atuantes no sistema de defesa antioxidante enzimático (*SOD-1* e *CAT*), frente a exposição à diferentes concentrações de ATR. Sequências parciais dos genes-alvo foram obtidas e comparadas com sequências disponíveis de espécies próximas. Foram analisadas a expressão órgão-específica para cada um dos genes isolados, bem como a expressão dos genes frente à exposição ao herbicida atrazina. Os animais foram expostos a ATR em concentrações de 2, 10 e 100 µg/L e a expressão dos genes em gônadas e fígado desses animais foram analisadas em 24 e 96 horas de exposição. As sequências obtidas dos genes *StAR*, *Cyp19a1*, *SOD-1* e *CAT* apresentaram 821, 80, 954, 350 pares de bases respectivamente, com identidades que variam de 86 a 100% com espécies filogeneticamente próximas a *P. vivipara*. Os animais apresentaram uma maior expressão dos genes *StAR* e *Cyp19a1* nas gônadas e no fígado, enquanto a menor expressão se mostrou em órgãos como intestino e baço. Já os genes *SOD* e *CAT* apresentaram uma maior expressão no fígado, e menor expressão no intestino. Em relação à expressão gênica frente à exposição à ATR, os resultados apontaram para uma indução dos genes *StAR*, *SOD* e *CAT* em 24 horas, nas gônadas e no fígado, enquanto

que a expressão do gene *Cyp19a1* foi aumentada apenas após 96 horas de exposição. Foi demonstrado que o herbicida ATR, mesmo em baixas concentrações, é capaz de desregular a expressão de genes que codificam tanto para proteínas componentes da via de síntese de hormônios esteróides, quanto para enzimas atuantes na resposta antioxidante celular de *P. vivipara*.

Palavras-chave: Atrazina, Aromatase, Defesa antioxidante, *Poecilia vivipara*, Via esteroidogênica

ABSTRACT

The herbicide Atrazine (ATR) is a pesticide used in the last 50 years and responsible for the selective control of weeds mainly in rice, corn and sugarcane fields. Recent studies have documented the effects of this herbicide in invertebrates and vertebrates by soil and lixiviation of aquatic environments contamination. ATR has been shown as endocrine disruptor and caused effects, such as oxidative stress, immunotoxicity and energetic metabolism disturbances. The native species *Poecilia vivipara* was used in the present study, as an experimental animal model, to identify and analyze the expression of genes involved in the steroidogenic pathway (*StAR* and *Cyp19a1*) and enzymatic antioxidant defense system (*SOD-1* and *CAT*) by challenging the animal with different ATR concentrations. Partial sequences from the target genes were obtained and compared with available sequences from close species. We analyzed the specific organ expression for each of the isolated genes and the expression of genes before exposure to atrazine. The animals were exposed to ATR concentrations of 2, 10 and 100 µg/L and genes expression, in gonads and liver from these animals, was analyzed in 24 and 96 hours of exposition. The obtained sequences of *StAR*, *Cyp19a1*, *SOD-1* and *CAT* genes presented 821, 80, 954 and 350 base pairs, respectively, with identities of phylogenetically close species to *P. vivipara* varying from 86 to 100%. The animals exhibited a higher expression of *StAR* and *Cyp19a1* genes in gonads and liver and lower in tissues such as intestine and spleen. *SOD* and *CAT* genes have presented higher expression in liver and lower in intestine. Regarding gene expression challenged by ATR exposure, the results have evidenced an induction of *StAR*, *SOD* and *CAT* genes in 24 hours, in gonads and liver, while *Cyp19a1* gene expression was increased only after 96 hours of exposure. Even in low concentrations, it was demonstrated that ATR herbicide is able to interfere over the expression of genes coding for proteins from the

steroid hormones synthesis pathway and for enzymes involved in cellular antioxidant response in *P. vivipara*.

Keywords: Atrazine, Aromatase, Antioxidant Defense, *Poecilia vivipara*, Steroidogenic Pathway

INTRODUÇÃO GERAL

Estima-se que cerca de 1,4 milhões de pessoas no mundo vivem em áreas de bacias hidrográficas, onde a utilização destes recursos excede os níveis de reposição, conduzindo assim a dessecação, poluição e ao esgotamento de águas subterrâneas. Esta má utilização dos recursos hídricos vai de encontro ao paradoxo de vivermos em um planeta com 70,8% de sua superfície coberta de água, sendo que somente cerca de 2% deste montante é de água doce e que destes somente 0,3% encontram-se disponíveis para o consumo humano (GEO - Recursos Hídricos, 2007). Dentro do atual desenvolvimento tecnológico, a utilização da água tem dois componentes em conflito: por um lado representa um item indispensável para a existência humana, sendo seu consumo cada vez mais aumentado, e por outro lado a água serve como veículo de transporte e diluição de diferentes compostos tóxicos que são direta ou indiretamente gerados como consequência da atividade humana (Schnurstein e Braunbeck, 2001).

Mais de um terço da água doce renovável do planeta está sendo utilizada na agricultura, indústria e no âmbito doméstico (Schwarzenbach *et al.*, 2006). No século XX, estima-se que milhares de poluentes orgânicos, como os bifenilos policlorados (PCB), pesticidas organoclorados (POPs), hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), dibenzofuranos policlorados (PCDF) e dioxinas tenham sido produzidos e, em parte, liberados no meio ambiente (Oost *et al.*, 2003). Entre essas substâncias liberadas, calcula-se que apenas 6.000 possuem avaliação considerada satisfatória sobre os riscos à saúde do homem e do meio ambiente, levando-se em consideração que, a cada ano, entre 1.000 e 2.000 novas substâncias são liberadas para o mercado (Freitas e Sá, 2003).

Desde o início dos anos 60, a humanidade tornou-se consciente dos potenciais efeitos em longo prazo destes produtos químicos e seus riscos para os ecossistemas

aquáticos e terrestres. O destino final da maioria destes contaminantes é o ambiente aquático, devido a descargas diretas ou a processos hidrológicos e atmosféricos (Hahn e Stegeman, 1994). Entre os setores que contribuem para a liberação de compostos tóxicos no ambiente, um dos mais importantes é a agricultura, através da utilização de pesticidas em geral, e os conflitos entre a produção agrícola e qualidade ambiental têm crescido, nas últimas décadas, bem como as preocupações relativas à utilização de pesticidas formam um foco nos debates sobre sustentabilidade (Freemark e Bontin, 1995; Mineau e McLaughlin, 1996).

Os pesticidas são definidos pela Agência de proteção Ambiental dos EUA dentro da Ação federal de inseticidas, fungicidas, e rodenticidas (USEPA, 2003) como uma substância ou mistura destinada para prevenir, destruir, repelir ou mitigar qualquer praga incluindo insetos, roedores e ervas daninhas. Os pesticidas utilizados exclusivamente na agricultura são mais comumente chamados de agrotóxicos (Laws e Hayes, 1991). Esses compostos e seus resíduos estão entre os agentes mais devastadores atualmente tanto para os ecossistemas aquáticos, quanto para os organismos, afetando a cadeia alimentar desde o menor nível até níveis superiores (Duursma e Marchand, 1974). A grande maioria dos pesticidas não são rapidamente degradáveis por razões técnicas, já que a degradação rápida pode reduzir sua aplicabilidade. Portanto, é provável que um grande volume de resíduos de pesticidas se acumule no ambiente em um processo contínuo (Islam e Tanaka, 2004).

No Brasil, o uso de herbicidas, incluindo a ATR, dobrou nos últimos 10 anos (Sindag, 2003), o que está ligado à classificação do Brasil como um líder global em exportações agrícolas. Dado que os agrotóxicos estão sendo cada vez mais utilizados e que eles não são facilmente substituídos em larga escala, então o conhecimento do

destino desses produtos químicos em ambientes tropicais é necessário para minimizar a bioacumulação desses poluentes nas reservas de água doce (Correia *et al.*, 2007).

1.Desreguladores Endócrinos

Alguns desses compostos liberados no ambiente por atividades antrópicas, como os agrotóxicos, têm se mostrado desreguladores da produção e da atividade hormonal dos animais, os quais são importantes para diversos processos biológicos, como o desenvolvimento (Phillips e Harrison, 1999). Esses compostos podem alterar os mecanismos de regulação hormonal atuando de forma direta ou indireta, ligando-se a receptores hormonais ou interferindo na produção, liberação, transporte, metabolização ou eliminação dos hormônios endógenos. Essa interferência na regulação endócrina por poluentes ambientais em geral e alguns químicos naturais é chamada de desregulação endócrina química (Norris, 2007). A interferência dos poluentes na regulação endócrina, relacionada principalmente às funções reprodutivas, tem gerado crescente interesse público uma vez que os efeitos têm sido observados tanto em humanos quanto em outros animais. Esses efeitos incluem queda de fertilidade (Petersen *et al.*, 1998), câncer de mama (Wolff *et al.*, 1993; 2000) puberdade precoce (Honma *et al.*, 2001) ou puberdade tardia (Faqi *et al.*, 1998), e anormalidades gonadais (Roos *et al.*, 2001; Cook *et al.*, 2003). Em relação aos efeitos reprodutivos, a maioria dos desreguladores endócrinos possui um efeito estrogênico ao organismo, sendo que alguns destes compostos, como o bisfenol A, apresentam esses efeitos ligando-se diretamente aos receptores de estrógeno (Kuiper *et al.*, 1998; Safe *et al.*, 2001; Scippo *et al.*, 2004). No entanto, outros desreguladores endócrinos não são capazes de competir com estrógenos naturais, ou seja, não têm capacidade de se ligar diretamente a um receptor específico, mas ainda assim causam efeitos estrogênicos nos organismos, provavelmente através de

outros mecanismos. Nesse último grupo está incluído um dos herbicidas mais conhecidos e utilizados mundialmente, a Atrazina (ATR) (Roberge *et al.*, 2004).

1.1.

Atrazina

O herbicida Atrazina (ATR: 2-cloro-4-ethylamino-6-isopropylamino-s-triazina) (Fig. 1) é um dos principais herbicidas utilizados na agricultura, e é usado mundialmente há mais de 50 anos. Registrado inicialmente em 1958, controla seletivamente a presença de certas gramíneas, e sua atuação está focada na inibição da fotossíntese. O termo “controle seletivo” significa que as plantas daninhas alvo são controladas com pouca ou nenhuma lesão ao cultivo (Ribaud e Bouzaher, 1994). A ATR é muito utilizada, por exemplo, para controlar gramíneas anuais e ervas daninhas de folhas largas em vegetais selecionados, culturas de cereais, cana de açúcar, milho, etc. Esse composto tornou-se um dos herbicidas mais utilizados do mundo, com aplicação que varia em torno de 70.000 a 90.000 toneladas por ano (Steinberg *et al.*, 1995). A ATR é considerada um composto moderadamente hidrofílico, com uma alta solubilidade aquosa, indicando um alto potencial de lixiviação, especialmente em perfis de solos bem estruturados com macroporos (Graymore *et al.*, 1999).

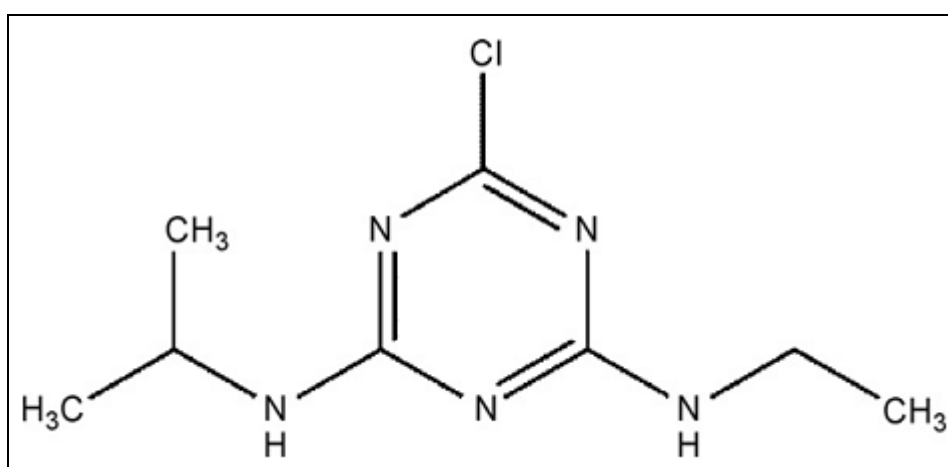


Figura 1 – Representação molecular da Atrazina (Figura extraída do trabalho de Vera *et al.*, 2009)

Apesar do uso difundido mundialmente desse herbicida, nas últimas décadas foram realizados estudos apontando diversos danos aos organismos frente à presença desse poluente principalmente em ecossistemas aquáticos, decorrente da lixiviação do solo (Graymore *et al.*, 2001). Na União Européia a utilização desse herbicida foi recentemente proibida (2004/248/CE), mas passou a ser utilizada uma fórmula quase idêntica, a Terbutilazina. No entanto, no resto do mundo a ATR continua sendo amplamente utilizada, sendo que em algumas regiões o seu uso é restrito. Nos Estados Unidos, a quantidade máxima de ATR permitida pela Agência de Proteção Ambiental (USEPA) é de 3 µg/L em água potável (definida em 1991), entretanto, nos últimos anos o país aprovou um recadastramento do composto, com atualização de rótulo e de riscos. Já no Brasil, segundo a resolução 357/2005 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), a quantidade máxima permitida de ATR em água doce é 2 µg/L.

A ATR pode alcançar o ambiente de diversas maneiras, e é frequentemente introduzida em águas superficiais e subterrâneas por escoamento e de filtração do solo, ou então pode permanecer adsorvida às partículas do solo após a aplicação. O transporte e a deposição de ATR em ambientes aquáticos adjacentes a áreas de agricultura intensiva já estão bem documentados (Thurman e Cromwell, 2000). Após a entrada no ambiente aquático, esse composto, em água doce, por exemplo, têm uma meia-vida entre 8 e 350 dias, dependendo do ambiente e suas características físico-químicas (Diana *et al.*, 2000; Tavera-Mendoza *et al.*, 2002). Em relação à água doce e estuários a taxa de ATR pode variar em média de 1.000 µg/L em águas próximas às regiões de aplicação do herbicida, a 0,2 µg/L (Pereira e Hostettler, 1993; Shottler *et al.*, 1994) . Na América do Norte, esse composto foi detectado nos rios, em concentrações de até 108 µg/L (USEPA, 2002), e em água de enxurrada na mesma região os níveis chegaram a

uma concentração de 275 µg/L (Huber, 1993). Na China, as concentrações de ATR excedendo os padrões para água potável (3 µg/L) foram também relatadas no reservatório de Guanting (Ren *et al.*, 2002) e Taihu Lake (Dong *et al.*, 2006).

A prevalência do uso de ATR amplamente como herbicida e a sua persistência no ambiente revelam a importância do entendimento do impacto deste composto em nível molecular nos organismos expostos. Este herbicida tem como principal ação afetar a sinalização hormonal reprodutiva, atuando como um desregulador endócrino e levando a um efeito estrogênico em diversos organismos (Fan *et al.*, 2007). Em anfíbios, concentrações de 0,1 a 25 µg/L ou exposição a curto prazo (48 horas) a ATR aumentam o número de sapos hermafroditos (Hayes *et al.*, 2002; 2003), e prejudicam o desenvolvimento gonadal normal (Tavera - Mendoza *et al.*, 2002). Consistente com esses fenótipos, a exposição aguda a ATR reduz os níveis de testosterona e altera desenvolvimento gonadal em peixes juvenis (Moore e Waring, 1998; Spano *et al.*, 2004) e em ratos machos (Friedmann, 2002). Além disso, também é bem demonstrado que a ATR é capaz de suprimir a conversão de testosterona em diidrotestosterona no hipotálamo, pituitária anterior e próstata (Kniewald *et al.*, 2000) e também é associada à redução de qualidade espermática e fertilidade em homens habitantes de áreas agrícolas onde o herbicida é utilizado (Swan, 2006).

Suzawa e Ingraham (2008) verificaram que a exposição aguda e crônica à ATR aumenta significativamente os níveis de expressão do gene *zcyp19a1*, que codifica a aromatase gonadal e altera a razão sexual em *Danio rerio*, um modelo de estudo relevante para vertebrados. Além de induzir a expressão do gene *Cyp19a1* em peixes, a ATR é capaz de alterar a expressão de diversos outros genes relacionados à via esteroidogênica, como por exemplo, o gene que codifica para a proteína reguladora aguda da esteroidogênese (StAR) (Suzawa e Ingraham, 2008; Pogrmic *et al.*, 2009).

Além dos efeitos reprodutivos e comportamentais, a exposição à ATR pode causar também, segundo estudos recentes, alterações na expressão de enzimas relacionadas ao metabolismo energético, detoxificação celular e sistema de defesa antioxidante (Londono *et al.*, 2007; Anderson *et al.*, 2008; Jin *et al.*, 2010). Entre esses estudos, Jin *et al.* (2010), por exemplo, verificaram uma indução na expressão gênica e na atividade proteica das enzimas superóxido dismutase 1 (SOD-1) e catalase (CAT), atuantes no sistema de defesa antioxidante enzimático, indicando que a presença desse composto pode estar causando uma situação de estresse oxidativo no animal.

2. Via Esteroidogênica

Os hormônios esteróides desempenham papéis críticos no desenvolvimento sexual, homeostase, respostas ao estresse, metabolismo de carboidratos e reprodução, e são produzidos principalmente em órgãos esteroidogênicos especializados (Bentley, 1998; Norris, 2007). Diversos estudos comparativos sugerem que as enzimas chave da produção de esteróides, bem como a via em si, são extremamente conservadas entre membros de diferentes classes de vertebrados (Bourne, 1991; Selcer e Leavitt, 1991).

Os esteróides são sintetizados a partir do colesterol, através de uma série de reações enzimáticas, onde participam principalmente enzimas da família citocromo p450 (Norris, 2007). As enzimas responsáveis pela síntese dos hormônios esteróides sexuais estão representadas na figura 2. A produção de esteroides ocorre em órgãos esteroidogênicos clássicos, tais como o córtex adrenal, testículo, ovário e placenta, no caso de mamíferos. Estes órgãos são capazes, portanto, de converter colesterol em pregnenolona pela enzima P450 a partir da clivagem da cadeia lateral do colesterol (P450_{scc}), no interior da mitocôndria, e a partir da pregnenolona, produzir os outros

esteróides ativos, utilizando a maquinaria enzimática específica da via esteroidogênica (Ueyama *et al.*, 2002).

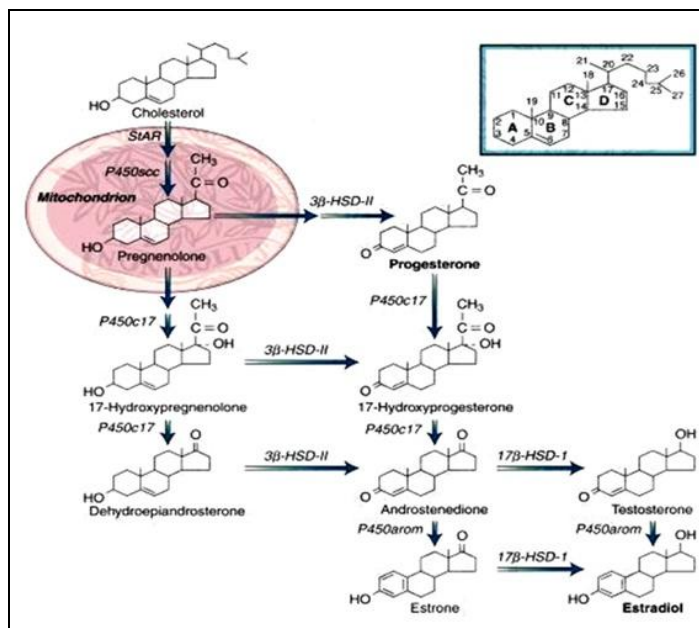


Figura 2 - Representação da via de produção de hormônios esteróides sexuais (Kronenberg *et al.*, 2011)

Além da síntese de esteróides pelas células requerer a atividade de diversas enzimas Citocromo P450 e desidrogenases, existe também um fator importante na regulação do tempo e da taxa de esteroidogênese, descoberto recentemente, que é a proteína de regulação aguda da esteroidogênese (StAR) (Stocco e Clark, 1996). Essa proteína tem como função promover a transferência do colesterol através do espaço aquoso que separa a membrana mitocondrial externa da membrana mitocondrial interna (Christenson e Strauss, 2001). Os dados mais relevantes implicando a função da StAR na regulação aguda da esteroidogênese vieram de estudos com humanos, de pacientes com hiperplasia lipoide adrenal congênita (lipóide CAH), onde esta doença tem sido associada a mutações no gene *StAR* (Lin *et al.*, 1995). A entrada do colesterol com o auxílio da proteína StAR acontece para que, por sua vez, a enzima de clivagem de cadeia lateral do colesterol, P450scc, dentro da mitocôndria, converta o colesterol em

pregnenolona, e a partir de então a diversas enzimas envolvidas na via esteroidogênica sintetizam os hormônios esteróides (Stocco, 2001).

Em contraste com a regulação crônica da esteroidogênese, que é em grande parte mediada pelo aumento da transcrição de genes que codificam para as enzimas da via, a proteína reguladora aguda da esteroidogênese atua, portanto, regulando a entrada de colesterol na mitocôndria, que é uma etapa crucial para o processo de síntese dos hormônios esteróides (Stocco e Clark, 2005). A proteína StAR é localizada principalmente nas gônadas e nas glândulas supra-renais e é rapidamente sintetizada em resposta à estimulação hormonal e aumento do AMPc intracelular (Clark *et al.*, 1994; Stocco e Clark, 1996). Além disso, estudos sugerem que elementos de resposta do gene StAR são alvos de receptores nucleares da família NR5A, e portanto esses receptores também atuam regulando a sua expressão (Suzawa e Ingraham, 2008). A maioria dos estudos de estrutura e função da proteína StAR são provenientes de mamíferos. Entretanto, o gene StAR tem sido isolado e identificado em peixes, anfíbios e aves (Bauer *et al.*, 2000; Kusakabe *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2003). A partir desses estudos, parece que há uma alta conservação da estrutura desta proteína dentro do grupo dos vertebrados (Bauer *et al.*, 2000; Kusakabe *et al.*, 2002).

Outra componente chave da via esteroidogênica é a enzima Citocromo P450 Aromatase (CYP19) que catalisa uma etapa final e limitante da via, atuando na conversão de andrógenos em estrógenos. Os estrógenos e andrógenos são hormônios esteróides que atuam no desenvolvimento sexual dos organismos e são encontrados em representantes de todas as classes de vertebrados terrestres e marinhos, incluindo peixes, anfíbios, répteis, aves e mamíferos (Lange *et al.*, 2003), bem como em alguns invertebrados (Zhu *et al.*, 2003; Osada *et al.*, 2004). A presença de atividade da

aromatase em uma célula ou tecido é um indicador da capacidade de transformar andrógenos em estrógenos (Norris, 2007). Em mamíferos, com exceção dos suínos (Corbin *et al.*, 1999), existe um único gene *cyp19* que se expressa em uma variedade de órgãos (Simpson, 1994). Teleósteos, em contraste, adquiriram ao longo da evolução uma duplicação gênica do *Cyp19*, contendo, portanto dois genes estruturalmente distintos que compartilham apenas a identidade de 60%: *cyp19a1* e *cyp19a2*, preferencialmente expressos no ovário e no cérebro, respectivamente. Em zebrafish, o gene *zcyp19a1*, que codifica para a aromatase gonadal, se expressa em maior intensidade nas gônadas e contém em sua região promotora, assim como o gene *StAR*, um sítio de ligação de receptores nucleares da família 5A (NR5A), o qual é provavelmente reconhecido também por ortólogos do fator esteroidogênico 1 (SF-1) / receptor do hormônio luteinizante 1 (LRH-1) (vonhofsten e Olsson, 2005). Já o gene *zcyp19a2* contém um elemento de resposta a estrogénos (ERE) e é sensível aos estrogénos ou xenoestrógenos (Kazeto *et al.*, 2004). Ambos promotores de aromatase em zebrafish contêm sítios de elementos de ligação ao AMPc (CREB) em seu promotor e que, portanto, são responsivos à sinalização por AMPc.

Bauer *et al.* (2000) demonstraram que os genes *StAR* e *Cyp19a1*, em peixes, são concomitantemente expressos e parecem apresentar uma maior expressão nos órgãos com alta atividade esteroidogênica, como gônadas, supra-renais e fígado. Além disso, sua regulação parece ter alguns pontos em comum como os elementos de resposta nos promotores alvos de receptores NR5A e a resposta ao aumento de AMPc celular (Suzawa e Ingraham, 2008; Abarikwu *et al.*, 2011).

Diversos estudos têm demonstrado um efeito do herbicida ATR na expressão de genes atuantes na via esteroidogênica. Tais estudos focam principalmente sobre a

expressão do gene *Cyp19a1*, que codifica para a aromatase gonadal em peixes, enquanto a quantidade de estudos com o efeito do composto na expressão do gene *StAR*, que codifica para proteína reguladora aguda a esteroidogênese, é bem menor. Sabe-se que doses de ATR 20 µg/L aumentam a expressão e atividade da aromatase em linhagens celulares seletivas de mamíferos (Sanderson *et al.*, 2002) e doses maiores são capazes de provocar reversão sexual em peixes (Suzawa e Ingraham., 2008). Recentemente, foi proposto que a ATR pode se ligar e ativar o receptor nuclear SF-1 (família NR5A) (Fan *et al.*, 2007). Esta hipótese é interessante, uma vez que ortólogos de SF-1 são encontrados em todos os vertebrados, incluindo teleósteos, principalmente tendo em conta o papel crítico do SF-1 no desenvolvimento sexual dos mamíferos e esteroidogênese, tendo como alvo a região promotora de genes-chave dessa via, entre eles, *StAR* e *Cyp19a1* (Shen *et al.*, 1994). Neste mesmo sentido, em análises de microarranjo, também foi observado um aumento da expressão de diversos genes envolvidos na via esteroidogênica, como *StAR*, *CYP11A1*, *Cyp17a1*, *LHR* e *3b-HSD* frente a baixas doses de ATR, em linhagens celulares de mamíferos (Abarikwu *et al.*, 2011; Suzawa e Ingraham, 2008)

3. Sistema de Defesa Antioxidante

As espécies reativas de oxigênio (EROS) abrangem o ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), e radicais hidroxilas (HO^\cdot), que estão envolvidas em diferentes vias de sinalização celular, incluindo apoptose, mas também estão implicados no desenvolvimento de patologias, produzindo dano em vários componentes celulares como lipídios não saturados, proteínas e ácidos nucleicos. O estresse oxidativo ocorre quando a geração de EROS excede a capacidade de remoção e os efeitos deletérios incluem oxidação de proteínas, DNA e componentes esteróides, bem como peroxidação

dos lipídios insaturados das membranas celulares (Sies, 1993). Estima-se que cerca de 0,1% de todo o oxigênio consumido por um organismo seja parcialmente reduzido na mitocôndria formando EROS (Fridovich, 2004). A situação de dano oxidativo, pode se dar, entre outros fatores, pela presença de xenobióticos nos organismos. Águas residuais, por exemplo, contém uma grande variedade de poluentes orgânicos e metálicos, incluindo pesticidas, hidrocarbonetos aromáticos, dibenzofuranos, compostos estrogênicos e muitos metais, sendo a maioria dessas substâncias, agentes oxidantes (Avci *et al.*, 2005).

A defesa dos organismos contra danos oxidativos pode ser não enzimática, através de substâncias antioxidantes, como algumas vitaminas, ácido úrico, glutathione e carotenóides. Além disso, existe em todas as classes de vertebrados e em invertebrados um sistema de defesa antioxidante enzimático, onde diversas enzimas antioxidantes, entre elas superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT), atuam impedindo a cascata de reações oxidantes, interceptando e inativando os compostos reativos de oxigênio intermediários (Figura 3). As enzimas antioxidantes são, portanto, cruciais no esforço de neutralizar a toxicidade de oxigênio quando o fornecimento de outros compostos antioxidantes são escassos ou esgotados (Ahmad, 1995).

A enzima SOD, por exemplo, parece ser a primeira linha de defesa enzimática contra ROS, e atua catalisando a dismutação de O_2^- para O_2 e H_2O_2 (Ken *et al.*, 2003). Sendo o O_2^- um precursor para várias outras espécies altamente reativas, o controle da concentração de radicais livres por SOD constitui um importante mecanismo de proteção celular contra danos oxidativos em macromoléculas (Fridovich, 1997). Subsequentemente, a enzima CAT catalisa a produção de H_2O a partir de H_2O_2 (Tripathi *et al.*, 2006). Recentemente, medidas da atividade dessas enzimas antioxidantes têm

sido utilizadas para avaliar os danos oxidativos causados por produtos químicos em ecossistemas aquáticos (Zhang *et al.*, 2009).

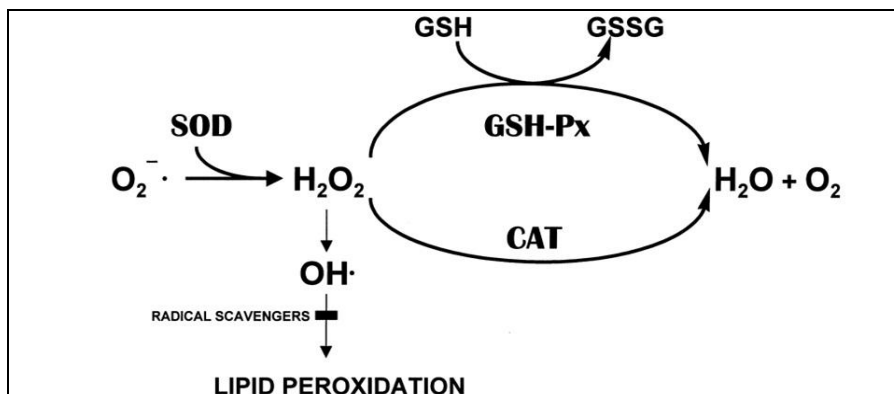


Figura 3 - Representação das enzimas antioxidantes SOD, CAT e dependentes de glutaciona (Yao *et al.*, 1998)

Em relação ao composto utilizado no presente estudo, ATR, alguns estudos demonstram que, além de atuar como um desregulador endócrino, algumas concentrações desse composto são capazes de gerar estresse oxidativo em peixes. Elia *et al.* (2002) demonstraram que concentrações de ATR 3, 6 e 9 mg/ L podem aumentar a concentração das enzimas antioxidantes SOD e GSH no fígado do peixe *Lepomis macrochirus* (bluegill) após 96h de exposição. Além disso, concentrações ainda menores do composto têm a capacidade de induzir peroxidação lipídica, e aumentar a expressão dos genes de SOD-1 e CAT, bem como sua atividade enzimática, no fígado de zebrafish (Jin *et al.*, 2010).

4. Biomarcadores

Torna-se muito complexo avaliar o nível de risco dos poluentes ao meio ambiente através de estudos macroecológicos, uma vez que os efeitos observáveis tendem a se manifestar após longos períodos de exposição, sofrem interferência de inúmeros fatores externos e acabam sendo consequências irreversíveis da contaminação (Moore *et al.*,

2004). Logo, elucidar os mecanismos iniciais (a níveis moleculares e/ou celulares) de resposta rápida na presença de contaminantes pode garantir uma compreensão mais rápida sobre a situação do meio ambiente, a tempo de evitar danos maiores a níveis ecológicos. Assim, um biomarcador pode ser definido como medidas de fluidos corporais, células ou tecidos que indicam em termos bioquímicos ou celulares a presença de contaminantes ou a magnitude da resposta do hospedeiro (Livingstone *et al.*, 2000). Usualmente, os biomarcadores são classificados como específicos ou não específicos. Alguns biomarcadores podem ser considerados específicos para determinado grupo de poluente, desde que condições fisiológicas e naturais, sejam levadas em conta. O uso de biomarcadores específicos como metalotioneínas, por exemplo, tem sido amplamente empregado para indicar a presença de metais pesados no ambiente (Giguère *et al.*, 2003), apesar de alguns estudos mais recentes apontarem efeitos abióticos como salinidade influenciando nesse parâmetro. Outro exemplo de biomarcador específico é a medição atividade da enzima acetilcolinesterase, por sua vez é considerada um biomarcador específico de organofosforados, pesticidas carbamatos e neurotoxinas como a anatoxina-a (Monserrat e Bianchini, 2000; Monserrat *et al.*, 2002; Hyne e Maher, 2003)

Por outro lado, uma vez que diversos poluentes podem modificar o equilíbrio entre a concentração de pró-oxidantes e antioxidantes nos organismos, a determinação de estresse oxidativo, bem como de respostas antioxidantes, como expressão gênica e atividade enzimática de enzimas como SOD-1, CAT e GPx, são comumente empregadas como biomarcadores não-específicos (Bainy *et al.*, 1996; Geracitano *et al.*, 2004).

Os genes relacionados à via esteroidogênica, *StAR* e *Cyp19a1*, parecem ser biomarcadores para a presença de desreguladores endócrinos no ambiente, com especificidade intermediária (Kortner e Arukwe, 2007; Storvik *et al.*, 2011). Já os

genes que codificam para as enzimas antioxidantes *SOD-1* e *CAT* são considerados por muitos autores como biomarcadores inespecíficos, utilizados para inferir poluição ambiental, em geral (Olsvik *et al.*, 2005; Torres *et al.*, 2008).

A identificação dos genes que codificam para Aromatase em peixes (*Cyp19a1* e *Cyp19a2*) já foi realizada para diversas espécies, incluindo *Ictalurus punctatus* (Trant, 1994), medaka *Oryzias latipes* (Fukada *et al.*, 1996), tilápia do Nilo *Oreochromis niloticus* (Kwon *et al.*, 2001; Chang *et al.*, 2005), *Carassius auratus* (Tchoudakova e Callard, 1998), *Danio rerio* (Kishida e Callard, 2001), truta arco-íris *Oncorhynchus mykiss* (Dalla Valle *et al.*, 2002), *Fundulus heteroclitus* (Greytak *et al.*, 2005), peixe-rei *Odontesthes bonariensis* (Strobl -Mazzulla *et al.*, 2005), entre outros. Já o gene que codifica para a proteína StAR foi identificado para um número reduzido de espécies de teleósteos como o bacalhau *Gadus morhua* (Kortner e Arukwe, 2007) e o bagre africano *Clarias gariepinus* (Sreenivasulu *et al.*, 2009).

Os genes relacionados ao sistema de defesa antioxidante, como os utilizados no presente trabalho, também têm sido identificados em espécies de teleósteos. O gene completo *SOD-1* já foi caracterizado em *Danio rerio* (Ken *et al.*, 2003) e para o peixe antártico *Trematomus bernacchii* (Santovito *et al.*, 2006), além de diversas outros grupos taxonômicos, incluindo alguns invertebrados (Park *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2011). O gene *CAT*, por sua vez, também já foi identificado para *Danio rerio* (Ken *et al.*, 1998), bem como para *Salmo salar* (Olsvik *et al.*, 2005).

5. Modelo experimental

Muitos estudos têm sido dedicados ao entendimento das causas da desregulação endócrina em peixes, não só porque estes animais aquáticos são frequentemente expostos a múltiplas fontes de desreguladores endócrinos, e diversos casos de desenvolvimento anormal possivelmente causada pela exposição a esses compostos foram relatados, mas também por causa da possibilidade de extrapolação e previsão de risco para vertebrados superiores, incluindo seres humanos (Guillette *et al.*, 1995; Eggen *et al.*, 2003; Goksoyr, 2006)

Os peixes do gênero *Poecilia*, conhecidos popularmente como barrigudinhos, são abundantes e habitam regiões dulciaquícolas e estuarinas desde os Estados Unidos até a Argentina (Neves e Monteiro, 2003). Sua alta tolerância a condições ambientais extremas, especialmente de salinidade e temperatura, faz com que seja uma das poucas espécies presente em todos os ambientes lênticos (Bizerril e Primo, 2001). Dessa forma, muitas espécies desta família são comumente encontradas em regiões limpas e em córregos contendo resíduos de esgotos domésticos e pluviais (Araújo *et al.*, 2009).

Existem casos de reversão sexual em algumas espécies de Poeciliidae, natural (Howell *et al.*, 1980; Yan, 1986) ou induzida por certos agentes químicos (Denton *et al.*, 1985; Howell e Denton, 1989). A técnica de reversão sexual induzida quimicamente, via esteróides, é frequente dentre os aquariófilos, que a usam para a seleção artificial de características genéticas na formação de novas variedades da espécie, com interesse comercial (Fernando e Phang, 1985). A determinação genotípica do sexo em barrigudinhos é mediada pelo sistema endócrino, com possibilidades de geração de hermafroditas, onde a partir de uma gônada juvenil primária indiferenciada pode-se desenvolver a gônada masculina e feminina. Entretanto, para a espécie utilizada no

presente estudo, *Poecilia vivipara*, a questão da reversão sexual ainda não é bem esclarecida, devido à pequena quantidade de estudos (Betito, 2006).

Entre os poecilídeos, *Poecilia vivipara* (Bloch e Schneider, 1801) é uma das espécies de peixes mais comuns em pequenas lagoas, rios e regiões costeiras ecossistemas do Brasil (Santos *et al.*, 2011). A espécie é amplamente distribuída, ao longo da costa da América do Sul, habitando cursos de grandes rios (Parenti e Rauchenberger, 1989).

No presente trabalho identificamos sequências parciais dos genes *StAR*, *Cyp19a1*, *SOD-1* (citossólica) e *CAT* em *P. vivipara*, e verificamos a expressão desses genes em vários órgãos do animal (gônadas, fígado, olho, cérebro, intestino, brânquias e baço), bem como frente à exposição a diferentes concentrações do herbicida Atrazina.

OBJETIVO GERAL

Identificar e caracterizar fragmentos dos genes *StAR*, *cyp19a1*, *SOD-1* e *CAT* de *Poecilia vivipara* e analisar o perfil de expressão desses genes em diferentes órgãos expostos a concentrações do herbicida Atrazina.

Objetivos específicos

- Identificar, em *Poecilia vivipara*, fragmentos dos genes *StAR* e *Cyp19a1*, que codificam para proteínas componentes da via esteroidogênica, e *SOD-1* e *CAT*, que codificam para proteínas componentes do sistema de defesa antioxidante enzimático.
- Realizar análises das sequências em comparação com genes já descritos de espécies filogeneticamente próximas a espécie do estudo.
- Desenhar iniciadores específicos a partir das sequências obtidas, para a realização dos experimentos de expressão gênica em Tempo Real (qPCR).
- Analisar o perfil de expressão dos genes *StAR*, *Cyp19a1*, *SOD-1* e *CAT*, nos diferentes órgãos do animal.
- Verificar a expressão do gene *StAR*, *Cyp19a1*, *SOD-1* e *CAT* em gônadas e fígado de *P. vivipara*, frente às diferentes concentrações e tempos de exposição do herbicida Atrazina.

Atrazine exposure modified the expression of steroidogenesis and oxidative stress-related genes in the fish *Poecilia vivipara*

Silveira, C.R., Abril, S.I., Zanette, J., Marins, L.F.

Abstract

Atrazine (ATR) herbicide is a vertebrate controversial endocrine disruptor and also causes effects adverse such as oxidative stress, immunotoxicity and energetic problems. We identified and verified gene expression of steroidogenic pathway: steroidogenic acute regulatory protein (*StAR*) and aromatase (*Cyp19a1*) and enzymatic antioxidant defense system: Cu/Zn Superoxide dismutase (*SOD-1*) and catalase (*CAT*) in *Poecilia vivipara* fish exposed to ecological relevant ATR concentrations. The genes were isolated by PCR using degenerate primers. After sequencing, specific primers were designed for use in quantitative PCR. *StAR*, *Cyp19a1*, *SOD-1* and *CAT* partial gene sequences isolated present 821, 80, 954 and 358 base pairs, respectively, and nucleotide identity range from 86 to 100% when compared to other close species. The animals have presented a higher expression of *Cyp19a1* and *StAR* genes in gonads and liver and a lower expression was observed in intestine and spleen. On the other hand, *SOD* and *CAT* gene expression was higher in liver and lower in the intestine. ATR exposure has increased gene expression in gonads and liver for *StAR*, *SOD-1* and *CAT* in 24 hours, and in 96 hours for *Cyp19a1*. These findings are of environmental interest considering that exposure to low concentrations of ATR caused effect on expression of genes coding for proteins related to steroid hormones synthesis pathway and for enzymes involved in cellular antioxidant response in *P. vivipara*.

Keywords: Atrazine, Aromatase, Antioxidant Defense, *Poecilia vivipara*, Steroidogenic Pathway

1.

INTRODUCTION

Atrazine (2-chloro-4-ethylamino-6-isopropylamino-s-triazine) is a selective herbicide from triazine family that acts over weed plants by interfering in photosynthesis electron transport mechanisms (Graziano *et al.*, 2006). Initially registered in 1958, this compound has been an important herbicide in agriculture worldwide used over more than 50 years (Brodeur *et al.*, 2009). With regard to physicochemical properties, atrazine (ATR) has a molecular weight of 215.7 g/mol, water solubility of 33 mg / L (at 25° C) and half-life in soil approximately 60 days (Wauchope *et al.*, 1991; Tomlin, 2000).

Although the reports about ATR as endocrine disruptor (ED) on aquatic vertebrates are inconsistent according Solomon *et al.* (2008), its wide usage and environmental persistence showed that affects organisms (Graymore *et al.*, 2002). Concerning amphibian, ATR levels of 0.1 to 25 mg/L have raised the number of hermaphrodite frogs (Hayes *et al.*, 2002; 2003), and disturbs normal gonad development (Tavera-Mendoza *et al.*, 2002). Thus, ATR acute exposure, in the developing alligator (Crain *et al.*, 1997), and in young peripubertal male rats (Friedman, 2002). In fish, ATR is able to alter the ionic balance (Paulino *et al.*, 2012), reduces testosterone levels and hinders juvenile fish gonad development (Moore and Waring, 1998; Spano *et al.*, 2004), and cause feminization in chronic exposure (Suzawa and Ingraham, 2008).

ATR molecular mechanism of action has been studied and, in a study realized by Suzawa and Ingraham (2008), it was verified that acute and chronic herbicide exposure

significantly raises the expression of gonad aromatase coding gene, *zcyp19a1*, and alters the sex ratio in zebrafish *Danio rerio*. Aromatase is an enzyme present in all vertebrates that acts by converting androgens to estrogens during a process named aromatization (Thompson and Siiter, 1974; Simpson, 1994). Therefore, those compounds acting by enhancing the expression of *Cyp19a1* gene, which encodes for a gonadal aromatase in fishes, may cause sexual reversion in population (Cheshenko *et al.*, 2008).

Moreover, other effects caused by this compound have been already documented in vertebrates, such as immunotoxicity, oxygen consumption rise and oxidative stress induction (Elia *et al.*, 2002; Jelaso *et al.*, 2008; Anderson *et al.*, 2008). Like all aerobic organisms, fish are susceptible to the attack of reactive oxygen species and have developed antioxidant defenses demonstrated by research primarily dating to the 1980s. Specially adapted enzymes, such as superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) have been detected in most fish species investigated to date (Rudneva, 1997).

Superoxide dismutase (SOD) is a representative antioxidant enzyme which catalyzes dismutation of superoxide to oxygen and hydrogen peroxide. SODs are ubiquitous and known as three forms, based on the metal cofactor in active sites: copper/zinc (Cu/Zn-SOD), iron SOD (Fe-SOD) and manganese SOD (Mn-SOD) in eukaryotes. In animals, two kinds of SODs have been commonly well-studied: cytosolic Cu/Zn-SOD (SOD-1) and mitochondrial Mn-SOD (SOD-2) (Gómez-Anduro *et al.*, 2006). Catalase is other important antioxidant enzymes that catalyze the decomposition of hydrogen peroxide to oxygen and water (Ken *et al.*, 1998). Recently, antioxidant enzymes were demonstrated to be useful biomarkers of environmental pollutants which cause oxidative stress in fish (Roche and Boge, 1996).

Regarding oxidative stress responses, it was observed a significant increase in gene expression and activity of the enzymes superoxide dismutase – 1 (Cu/Zn-SOD) and catalase (CAT) from livers of *Danio rerio* exposed to low ATR doses (10µg/L) (Jin *et al.*, 2010). Elia *et al.* (2011) also observed increased antioxidant responses before exposure to ATR in Bluegill Sunfish *Lepomis macrochirus*. Additionally, Qian *et al.* (2008) have reported that ATR exposure caused a significant dose-dependent induction of SOD and CAT activity in the microalgae *Chlorella sp.*

Estuarine areas act as final receptors of organic matter and pollutants that are usually derived from anthropogenic activity by fluvial and atmospheric lixiviation (Gagosian and Peltzer, 1986; Bouloubassi and Saliot, 1993). Fish species inhabiting those areas have been proposed as sentinels for pollution monitoring by sensible biomarkers evaluation. Biomarkers can be defined as changes in biological responses ranging from molecular to behavioral changes, which may be related to exposition or environment contamination effects (Depledge *et al.*, 1995).

The present study used *Poecilia vivipara* (Poeciliidae) as experimental animal model, a species widely distributed along South America coast, inhabiting courses of great rivers and estuarine regions of Patos Lagoon, RS, Brazil (Parenti and Raucherberger, 1989). The afore mentioned species is omnivore, viviparous and tolerant to extreme environmental conditions such as salinity and temperature (Bizerril and Primo, 2001). Therefore, the present work aimed to isolate and characterize the genes acting in steroidogenic pathway, *StAR* and *Cyp19a1*, and composing the antioxidant defense system, *SOD-1* and *CAT*, for further gene expression analysis after *P. vivipara* acute exposure to ecological relevant atrazine herbicide concentrations.

2. METHODOLOGY

2.1. *Animals*

The animals used in the experiments of exposure to ATR herbicide were collected in Cassino Beach (Rio Grande, RS – Brazil) during the period of autumn/winter. Only males were used in the experiment, which were kept in laboratory during 15 days under a temperature of 28°C, salinity 15 ppt, 12L: 12D photoperiod and daily fed with commercial ration (Tetracolor). Animals from this group were taken for RNA extraction and further PCRs reactions using degenerate primers. Concerning the ATR exposure experiment, the animals were acclimated at salinity 24 ppt for more 7 days.

2.2. *StAR, Cyp19a1, SOD-1 and CAT genes cloning*

Gonad excision and total RNA extraction was realized, using Trizol reagent (Invitrogen, Brazil), from a randomly selected non-treated fish acclimated during 15 days after capture. The RNA was treated with DNase (DNASE I AMP GRADE, Invitrogen, Brazil), intending to remove any genomic DNA traces in the sample, quantified (QUANT-IT SSDNA ASSAY KIT, Invitrogen, Brazil) and after used for cDNA synthesis by reverse transcription (High Capacity, Applied Biosystems, Brazil). Degenerate primers were designed for the analyzed genes in the present study (*StAR*, *Cyp19a1*, *SOD* and *CAT*), using conserved sequences from genes of fish species of Cyprinodontiformes order, which are phylogenetically close to *P. vivipara* (ex.: *Poecilia reticulata*, *Fundulus heteroclitus* and *Jenynsia multidentata*). Concerning CYP19 family, conserved region sequences among different isoforms were avoided

aiming to increase the chances of amplifying *Cyp19a1*, the desired gene isoform for this study. PCR reactions were run using degenerate primers and the obtained results were visualized in 1 % agarose gel stained with ethidium bromide. The resulting gel bands were purified (GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit, GE Healthcare, Brazil) and inserted into cloning vectors using Topo TA cloning Kit (Invitrogen, Brazil). Subsequently, *E. coli* bacteria were transformed with the vector ligation product and growth in solid medium. The colonies were selected by a coloration dependent system in which the white colonies, containing the insert, were growth overnight in liquid medium with a specific antibiotic (Kanamicin, 30 µg/mL). Purification of plasmids containing the inserts was realized by Mini-Prep (QiaPrep, Qiagen, Brazil) for further sequencing. After sequencing, it was realized a sequence alignment with close species using BLAST tool from *GenBank* (NCBI – <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), for each one of the genes aiming to confirm the identity of the sequence. Finally, specific primers were designed for *StAR*, *Cyp19a1*, *SOD-1* and *CAT* genes from *P. vivipara* (Table 1) aiming quantitative gene expression analysis by real time PCR (Platinum SYBR Green qPCR SuperMix – Invitrogen, Brazil), after atrazine exposure, and obtaining gene sequences as long as possible by rapid amplification of cDNA ends (RACE) protocol with the BD Smart™ RACE cDNA Amplification Kit (Clontech) (Frohman *et al.*, 1988).

Table 1. Primers employed in the *StAR*, *Cyp19a1*, *SOD-1*, *CAT* and *beta-actin* qPCR reactions.

Primer name	Primer Sequence 5' – 3'
<i>StAR</i> forward	cgggcctacctgtatagtgatgaagc
<i>StAR</i> reverse	acctgcgtctgcgagagcactttg
<i>Cyp19a1</i> forward	ctcacgtggacgtcctcagttgc

<i>Cyp19a1</i> reverse	acgtccacgtgagccaagctgt
<i>SOD-1</i> forward	gcctcacacctggtgagcatggtt
<i>SOD-1</i> reverse	tagtgtggccctgactgatgcac
<i>CAT</i> forward	tgttcacgctaaaggcgca
<i>CAT</i> reverse	tgttccccgcaggtcca
<i>Beta-actin</i> forward	accatcaccggagtcctgacga
<i>Beta-actin</i> reverse	atgtacgttgccatccaggccgt

2.3. Organ-specific expression analysis

Non-treated males were randomly chosen for the isolated genes organ-specific analysis. Five animals were used for this analysis the excised organs were gonads, liver, intestine, spleen, eye, brain and gills. The expression analysis was realized by qPCR and *beta-actin* gene was used as normalizing. The partial sequence of the beta actin *P. vivipara* has 482 base pairs and about 70% of identity with closely related species (manuscript in preparation) and the specific primers for the beta actin gene were kindly provided by Juliano Zanette. The expression results were given as the primer efficiency (E) elevated to the subtraction of the CT (Cycle Threshold) from the normalizing gene by the CT of the target gene (Schmittgen and Livak, 2008).

2.4. ATR exposure

The exposure experiments were realized using ATR (Sigma, 45330 - 250 mg) diluted in ethanol at 0.001%. Acclimated animals were transported to 16 liters glass aquariums where the herbicide exposure was realized. Four aquariums were used: control group (containing ethanol, the ATR solvent), 2 µg/L, 10 µg/L and 100 µg/L of

ATR. Total number of animals in each aquarium was 16 and exposure time was 24 and 96 hours. Thus, after 24 hours exposure, 8 animals from each aquarium were taken to tissues RNA extraction and further cDNA synthesis used for 24 hours exposure gene expression analysis. From then, the aquarium's water was renovate (about 80%) every 24 hours until 96 hours were accomplished, aiming to conserve the compound under experimental concentrations. After 96 hours of exposure, 8 animals from each group were taken for gene expression analysis. Gene expression was performed by qPCR and *beta-actin* gene was used as normalizing gene.

2.5. Statistical Analysis

Analysis of variance (ANOVA – $p < 0,05$) followed by *a posteriori* Tukey's test was realized for organ-specific gene expression analysis. The statistical analysis of qPCR gene expression experiments was realized by the statistical software *REST 2009* (Pfaffl, 2002).

3. RESULTS

3.1. Gene Isolation

After running a PCR with degenerate primers, the initial fragments of the genes studied in the present work were obtained. The initial sequences obtained for *StAR*, *Cyp19a1*, *SOD-1* and *CAT* presented 156, 80, 355 and 350 base pairs respectively. These fragments were aligned with fragments/genes already sequenced of phylogenetically close species and reached identities varying from 83 to 100%. After partial sequences were obtained, specific primers were designed and used for gene expression experiments and performing PCR, using RACE kit, intending to obtain the 3' e 5' extremities sequences and cover most part of gene sequences. Based on the

mentioned methodology, two larger fragments from *StAR* and *SOD-1* genes were obtained, with 821 and 954 base pairs respectively, representing over 80% of the complete coding regions when compared to *Danio rerio* and *Salmo salar*. Regarding *Cyp19a1* and *CAT* genes, it was not possible to obtain a larger number of base pairs from the initial fragments. The obtained results and respective sequence comparisons to close species are shown in Table 2.

Table 2. Identity of nucleotide sequences obtained from *Poecilia vivipara* *StAR*, *Cyp19a1*, *SOD-1* and *CAT* genes using the BLAST tool from GenBank.

Gene	Blast e-value	Identity	GenBank Accession Number
<i>pv_StAR</i> (821bp)	1e-37	88%	EF640987 – <i>Spaaurus aurata</i> steroidogenic acute regulatory protein (StAR) mRNA , complete cds.
<i>pv_Cyp19a1</i> (80bp)	2e-29	100%	FJ26623 – <i>Poecilia reticulata</i> aromatase <i>Cyp19a1</i> gene, partial cds.
<i>pv_SOD-1</i> (954 bp)	2e-143	91%	HM241653 – <i>Xiphophorus helleri</i> Cu/Zn superoxide dismutase mRNA, complete cds
<i>pv_CAT</i> (350 bp)	3e-15	86%	EU116026 – <i>Kryptolebias marmoratus</i> catalase mRNA complete cds.

3.2. Gene Expression

3.2.1. Organ-specific expression

The animals have exhibited the highest *StAR* gene expression in liver and gonads and lowest in other organs such as gills and intestine. *Cyp19a1* gene has presented similar pattern, also presenting the higher expression levels in liver and gonads and lower in the other tissues, with particular low expression in brain (Fig. 1).

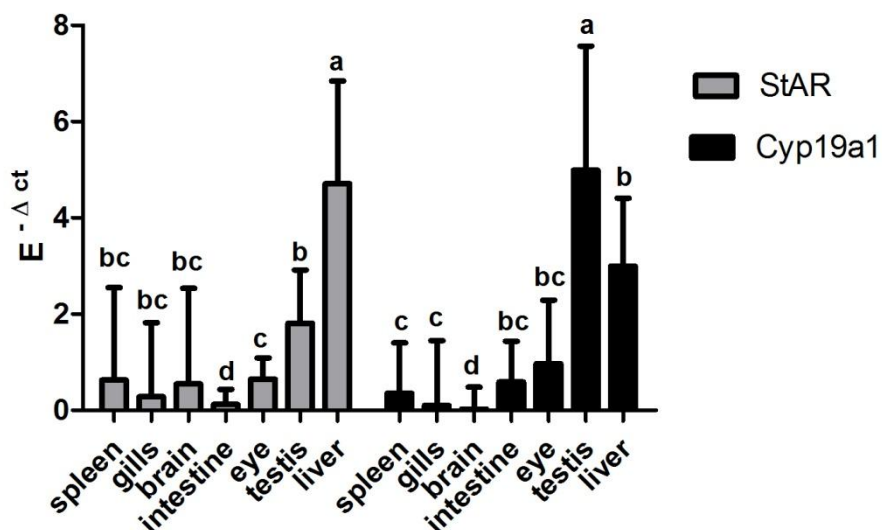


Figure 1. Expression of genes related to steroidogenic pathway, *StAR* and *Cyp19a1*, in different organs (n = 5). The results are given by subtracting the CT from the normalizing gene by the CT of the target gene. Different letters represent significant differences among groups (ANOVA – p< 0.05 – Tukey).

Concerning the genes involved in the antioxidant pathway, *SOD-1* presented a considerably higher expression in liver and lower in other organs, such as gills and spleen, while *CAT* demonstrated its highest expression in brain and liver and lowest in intestine and eye (Fig. 2).

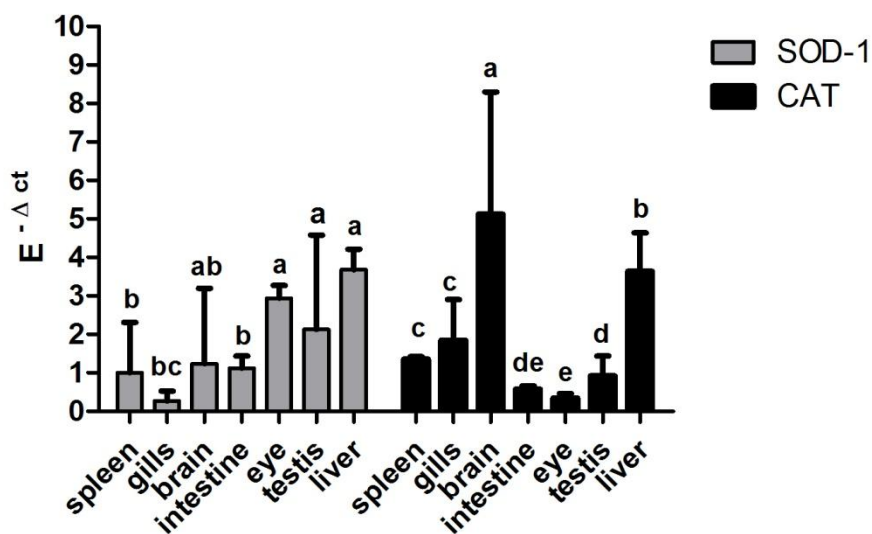


Figure 2. Expression of genes related to antioxidant defense system, *SOD* and *CAT*, in different organs (n= 5). The results are given by subtracting the CT from the normalizing gene by the CT of the target gene. Different letters represent significant differences among groups (ANOVA – $p < 0.05$ – Tukey).

3.2.2. Gene expression in animals exposed to ATR

The exposure experiment was realized by exposing the animals to different concentrations of the herbicide (2, 10 and 100 $\mu\text{g/L}$) for 24 and 96 hours. The gene expression of this experiment was analyzed in gonads and liver. No mortality was observed for both times of exposure.

The genes related to steroidogenic pathway, *StAR* e *Cyp19a1*, have presented significant differences, in relation to control group, concerning different time conditions, ATR concentrations and analyzed organ. The *StAR* gene, coding for steroidogenic acute regulatory protein, presented a significant induction in 24 hours of exposure to atrazine in gonads. The expression of this gene exhibited a 12-fold induction in relation to control in 2 $\mu\text{g/L}$, 9-fold compared to 10 $\mu\text{g/L}$ and 3-fold compared to 100 $\mu\text{g/L}$. The same gene expression in 96 hours of exposure did not present significant difference compared to control group. Similarly, *StAR* gene expression in liver presented induction only in 24 hours of exposure, for the concentration 100 $\mu\text{g/L}$, and did not demonstrated alterations in the other concentrations even in 96 hours of exposure (Fig. 3).

The *Cyp19a1* gene, coding for the enzyme aromatase and acting in the steroidogenic pathway, did not presented significant differences compared to control group in 24 hours of exposure in both organs. Differently, in 96 hours of exposure, a significant induction of 3.5 and 4-fold was observed in gonads under the concentrations of 2, 10 and 100 $\mu\text{g/L}$, respectively. *Cyp19a1* gene expression in liver was also

significantly increased after 96 hours of ATR exposure in 10 $\mu\text{g/L}$ (10-fold induction) and 100 $\mu\text{g/L}$ (9-fold induction) (Fig.4).

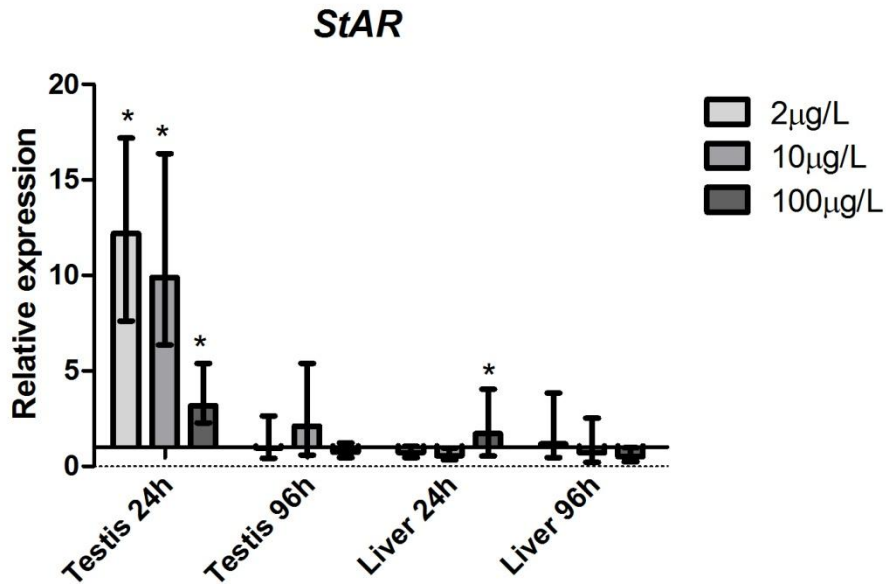


Figure 3. *StAR* gene expression in gonads and liver of *P. vivipara* exposed to ATR concentrations of 2, 10 and 100 $\mu\text{g/L}$ for 24 and 96 hours (n = 8). The relative expression results are normalized by the values of *beta-actin* gene expression and the control group is represented by the line of the x axis (1). Asterisks represent significant differences in relation to control group.

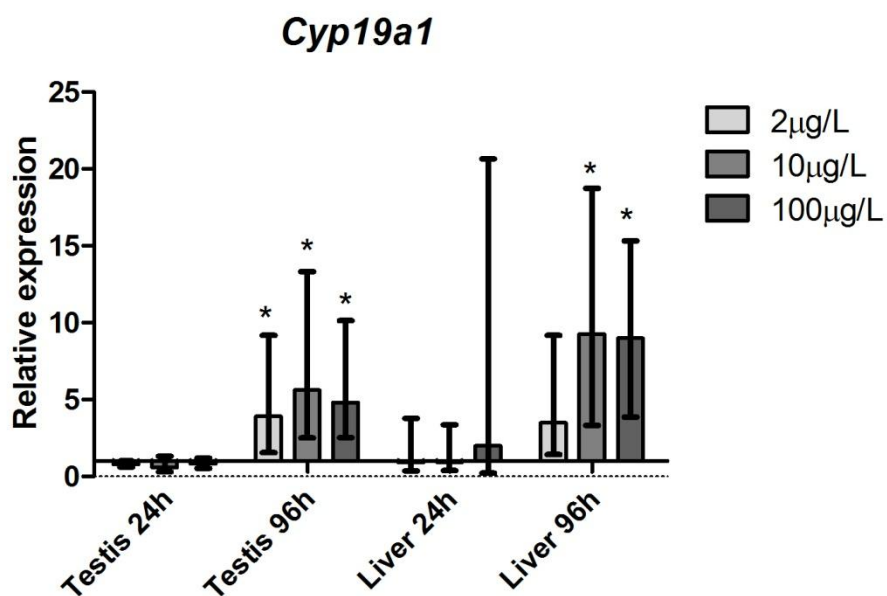


Figure 4. *Cyp19a1* gene expression in gonads and liver of *P. vivipara* exposed to ATR concentrations of 2, 10 and 100 µg/L for 24 and 96 hours (n = 8). The relative expression results are normalized by the values of *beta-actin* gene expression and the control group is represented by the line of the x axis (1). Asterisks represent significant differences in relation to control group.

Concerning the genes coding for enzymes related to the antioxidant defense system, there were observed expression alterations in gonads and liver only by 24 hours of exposure time. *SOD-1* gene was induced in gonads only in the lowest ATR used concentration (2 µg/L), by the time of 24 hours, presenting a 7-fold induction in relation to control group, and then returned to basal levels in higher concentrations. Concerning the liver, *SOD-1* exhibited a significant induction, compared to control group, at the concentrations of 2 and 10 µg/L, also by the time of 24 hours, and returned to control similar values at the concentration of 100 µg/L. This gene did not present significant differences, in relation to control group, by the time of 96 hours of exposure in none of the analyzed organs neither in the used concentrations (Fig. 5).

Finally, the gene coding for catalase enzyme exhibited a similar pattern to *SOD-1* expression, presenting a 2-fold induction in gonads, by the time of 24 hours, only at the minor concentration. *CAT* was significantly induced in liver, at the three tested concentrations, presenting a 6, 3 and 4-fold induction at the concentrations of 2, 10 and 100 µg/L, respectively. Comparatively to *SOD-1*, this gene did not present significant alteration compared to control group by the time of 96 hours (Fig. 6).

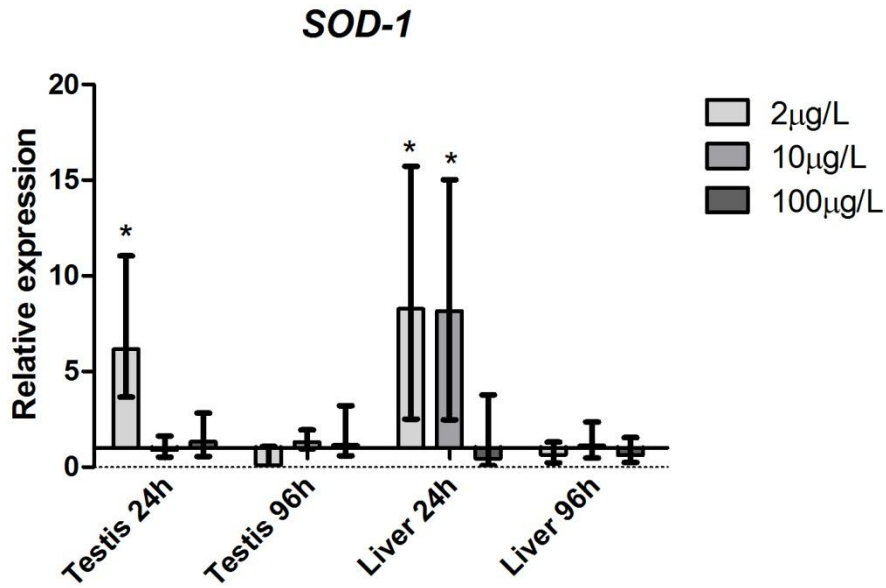


Figure 5. *SOD-1* gene expression in gonads and liver of *P. vivipara* exposed to ATR concentrations of 2, 10 and 100 µg/L for 24 and 96 hours (n = 8). The relative expression results are normalized by the values of *beta-actin* gene expression and the control group is represented by the line of the x axis (1). Asterisks represent significant differences in relation to control group.

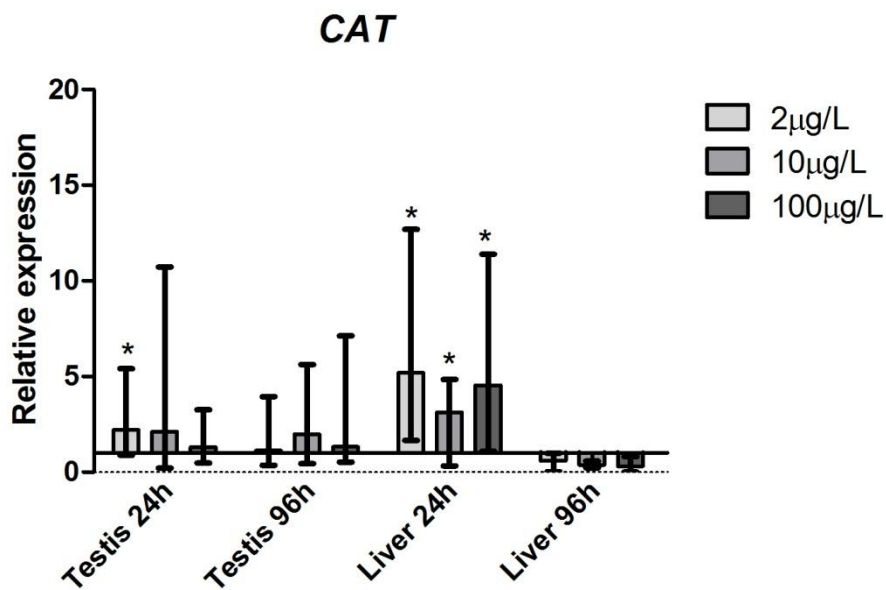


Figure 6. *CAT* gene expression in gonads and liver of *P. vivipara* exposed to ATR concentrations of 2, 10 and 100 µg/L for 24 and 96 hours (n = 8). The relative expression results are normalized by the values of *beta-actin* gene expression and the control group is represented by the line of the x axis (1). Asterisks represent significant differences in relation to control group.

4. DISCUSSION

4.1. Genes isolation

Several studies have been realized taking Poecillidae as model animal for toxicological researches due to, mainly, its high tolerance to extreme environmental conditions, including extremely polluted environments (Larsson *et al.*, 2002; Betito, 2006; Mattos *et al.*, 2009). Molecular tools, such as pollution biomarkers coding genes, are used in fish and aquatic invertebrates for biomonitoring studies of aquatic environments (Monserrat *et al.*, 2007). However, these tools are still poorly applied concerning South American guppy species because little information on these animals is available, except for studies focused on ecological population (Betito, 2006).

Intending to investigate the molecular responses of these animals, against the ATR herbicide, we have carried out the sequencing of fragments of target genes. Thus, the cloning of *Cyp19a1*, *StAR*, *SOD-1* and *CAT* gene fragments, from *Poecilia vivipara*, was realized using degenerate primers designed based on phylogenetically close species such as *Poecilia reticulata*, *Jenynsia multidentata* and *Oryzias latipes*.

StAR gene was already identified in teleost species such as the codfish *Gadus morhua* (Kortner and Arukwe, 2007), the African catfish *Clarias gariepinus* (Sreenivasulu *et al.*, 2009) and the Atlantic salmon *Salmo salar* (Arukwe, 2005). The genes *Cyp19a1* (gonadal aromatase) and *Cyp19a2* (brain aromatase) have been already identified in teleost fish such as *Ictalurus punctatus* (Trant, 1994), medaka *Oryzias latipes* (Fukada *et al.*, 1996), *Fundulus heteroclitus* (Greytak *et al.*, 2005) and others. The *StAR* fragment obtained contained 821 base pairs and presented identity of 88% with sequence fragments from the species *Spaurus aurata* (Fig. 1). Besides, it also

presented relatively high identity compared to *Salmo salar* and *Xiphophorus helleri*, up to 86 and 88 % respectively.

The antioxidant enzymes coding genes, *SOD-1* and *CAT*, have been already sequenced in teleost species, such as *Salmo salar* and *Danio rerio*, and in some aquatic invertebrates (Ken *et al.*, 1998; 2003; Park *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2011). The obtained sequence for *SOD-1* from *P. vivipara* consists of 954 pair bases and, according to GenBank alignments, presents 91% of identity with *SOD-1* from *Xiphophorus helleri*, which is also phylogenetically close to *P. vivipara*. The fragment obtained for *CAT* is composed by 358 base pairs and presents higher identity (86%) with *Kryptolebias marmoratus* (Fig. 1).

4.2.

Gene expression

4.2.1 *Organ-specific expression*

Aiming to realize a relative quantitative distribution analysis of the target genes from *P. vivipara*, different organs (brain, eye, spleen, intestine, gonads and liver) were used for qPCR tests and for comparison of gene expression in non-treated animals

The results of *StAR* gene expression have shown that its higher expression occurs in liver and testis, although its expression was also observed in non-steroidogenic organs (ex. spleen and intestine). Studies realized in mammals have been demonstrated that a predominant site for *StAR* gene transcripts expression is present in steroidogenic organs, including testis, ovaries, brain and kidneys, and the expression of the mentioned gene is, therefore, strictly related to steroidogenesis (Bauer *et al.*, 2000;

Kusakabe *et al.*, 2002). However, in the present study we have found *StAR* gene expression in steroidogenic and non-steroidogenic organs, such as intestine and spleen, reinforcing the results of Kusakabe *et al.* (2002) which, in a similar study realized with the rainbow trout, have also reported a relatively elevated *StAR* gene expression in non-steroidogenic organs. The difference of the *StAR* gene expression pattern, observed in fishes and mammals, may be indicating a different biological function for the protein, principally in non-steroidogenic organs.

Cyp19a1 gene presented higher expression in gonads and its minor expression levels were detected in brain and non-steroidogenic organs, such as intestine and spleen. Tang *et al.* (2010) have performed a differential expression study of *Cyp19a1* and *Cyp19a2* in organs from *Cyprinus carpio*, and reported low basal expression of *Cyp19a1* in brain regions while *Cyp19a2* presented high expression levels in these same regions. Additionally, it was reported by the same authors a relatively high expression of *Cyp19a1* in males' testis as well as in females' ovaries, with a 3-fold induction observed in females. Our work has only concerned about males *Cyp19a1* gene expression, in which gonadal gene expression was approximately 5-fold higher than in brain, evidencing that, in *P. vivipara*, this gene codes for a kind of aromatase more intensively expressed in gonads (gonadal aromatase) following data found in other fish species (Cheshenko *et al.*, 2008; Suzawa and Ingraham, 2008; Tang *et al.*, 2010).

Concerning *SOD-1* e *CAT* genes, both exhibited similar expression patterns, with higher liver expression and less variable expression levels among organs when compared to steroidogenesis-related genes *StAR* e *Cyp19a1*. Although these genes are expressed in almost all organs (Alvarez *et al.*, 2005), its basal expression and induction by xenobiotics may occur as organ-specific, presenting higher levels in detoxification

organs, such as liver and hepatopancreas, besides muscular and brain organs (Ozcan *et al.*, 2004).

4.2.2

Gene expression in ATR

exposed animals

ATR herbicide is widely used in Brazil, principally regarding rice fields regions, and its maximum load allowed in fresh water is 2 µg/L following resolution 357– (CONAMA, 2005). The interaction of this compound with biological systems and reproductive problems in males exposed to ATR has been documented in juvenile fishes (Moore and Waring, 1998; Spano *et al.*, 2004), crocodilian reptiles (Crain *et al.*, 1997) and peripubertal rats (Friedmann, 2002). The findings of the present work reinforced these studies and have demonstrated the capacity of the herbicide of altering genes from the steroidogenic pathway as well as from the antioxidant response system in *P. vivipara*.

The StAR protein is present in mitochondrial membrane of steroidogenic cells and is essential for initial and acute regulation of the steroid hormone production process, in general, and also a velocity limiting factor of this pathway (Norris, 2007). Although there are vertebrates studies evidencing alterations in the expression of this gene caused by endocrine disruptors and natural estrogens, the mechanisms relying under these disturbances still remains not well elucidated (Wang *et al.*, 2006). Studies focused on endocrine disruptors with steroidogenic action have demonstrated that these compounds are capable of inducing the *StAR* gene expression in fish species, such as *Kryptolebias marmoratus* and *Salmo salar*, evidencing that this gene, jointly with the other genes coding for proteins from the steroidogenic pathway, appears to be a main target of endocrine disruptors (Arukwe, 2008; Rhee *et al.*, 2011). Concerning the

compound used in the present work, earlier studies have been already demonstrated alterations in the expression of this gene caused by relatively low ATR doses (Suzawa and Ingraham, 2008; Abariwku *et al.*, 2011).

StAR gene was induced after 24 hours of acute exposure, and only at lower concentrations in gonads, suggesting that a compensatory response against the herbicide could be occurring over the hormonal synthesis in the highest and subchronic (96 h) exposure, in which no induction of this gene was observed. Our findings supports the studies that demonstrates the induction of *StAR* gene in mammals cells, as an efficient biomarker to acute ATR exposure and also highlights that this gene becomes less responsive at high ATR doses, presenting its higher response at considered average dosages (Abarikwu *et al.*, 2011). Based on the expression of *StAR* gene, against ATR exposition, it can be suggested that this gene might be an interesting model concerning acute ATR contamination studies, at moderate/low doses, including the maximum load of 2 µg/L allowed by Brazilian legislation (CONAMA, 2005).

Cyp19a1 gene did not shown significant differences, compared to control group, in 24 hours for any of the analyzed organs. However, a significant induction was observed in 96 hours at all concentrations in gonads and at 10 and 100 µg/L in liver. The induction response of this gene against ATR exposure in 96 hours, presented in our study, supports the findings of Suzawa and Ingraham (2008) in zebrafish exposed to similar ATR concentrations. *Cyp19a1* gene has been suggested as one of the main affected genes by ATR (Fan *et al.*, 2007; Anderson *et al.*, 2008; Suzawa and Ingraham, 2008; Tinfo *et al.*, 2011). Nevertheless, several studies demonstrate that the ATR-dependent induction of *Cyp19a1* occurs in a late matter, between 48 and 96 hours of

exposure, as it was observed in the present study (Anderson *et al.*, 2008; Suzawa and Ingraham, 2008).

ATR molecular action over the induction of genes from steroidogenic pathway is still poorly understood. However, it is known that, in the promoter region from *StAR* and *Cyp19a1* genes there are target response elements from nuclear receptors of NR5A family. Thus, some studies have been demonstrated that ATR is able to activate these nuclear receptors enabling their ligation to their target genes response elements and increasing the transcription of these. Therefore, the mechanism of induction of these genes by ATR apparently occurs via NR5A nuclear receptors (Suzawa and Ingraham, 2008; Fan *et al.*, 2007).

The genes coding to key enzymes from the enzymatic antioxidant defense system, *SOD-1* and *CAT*, were induced in liver and gonads from ATR-treated animals. Likewise *StAR*, these genes have exhibited a similar induction pattern only in the lower concentrations, except for *CAT* gene in the liver, which was induced in all tested concentrations. These results corroborate to Jin *et al.* (2010) study that demonstrated an expression increase of this gene caused by low ATR concentrations in zebrafish and then returning to normality in the highest concentration applied in the study.

Pesticides and its metabolites may be responsible for the oxidative stress induction in fishes once that, normally, it presents a considerably high oxidative potential (Alvarez *et al.*, 2005). Similarly to the present work, exposition to xenobiotics in fishes has shown that the response pattern for *SOD-1*, as well as for *CAT*, appears to be organ-specific (Ahmad *et al.*, 2004; Ozcan *et al.*, 2004).

Concerning the present study, except for *Cyp19a1* gene, the observed response pattern presented genes induction at the lower ATR concentrations applied while in higher doses the expression returned to levels near to the control group. The absence of *SOD-1*, *CAT* and *StAR* genes induction at higher doses may be related to accessory mechanisms impeding the compound accumulation in cells at a certain concentration. In this sense, Islam *et al.* (2002) have demonstrated that this compound is able to induce genes from multidrug resistance family (MDR), such as P-glycoprotein. Besides, detoxification components such as GST and CYPs can be induced as well, which seems to contribute for a resistance phenotype. Therefore, a mechanism associated to cell exportation pumps may be acting when the organism is challenged with relatively high concentrations of the herbicide.

The activity of exportations pumps, such as P-glycoprotein, is directly related to ATP expense (Hennessy and Spiers, 2007) and, therefore, is a mechanism of elevated energetic costs to animals' cells. Studies involving insects and amphibian species have shown that higher doses and subchronic times of ATR exposure affects the energetic metabolism of these animals and rises the oxygen consumption and key genes expression from the main cell's energy production pathways (Anderson *et al.*, 2008; Zaya *et al.*, 2011). The high energetic expense of the exposed animals becomes worrying once it affects the efficiency of essential physiological mechanism such as reproduction and growth.

Our results have demonstrated that the herbicide ATR, even at relatively low concentrations, is capable of altering the expression of genes from the steroidogenic pathway, such as *StAR* and *Cyp19a1*, as well as genes related to cellular antioxidant response, such as *SOD-1* and *CAT* evidencing, therefore, that the used model is sensible

to the herbicide presence in the water. Besides, although *Cyp19a1* was also induced by ATR, the *StAR* gene expression appears to serve as a potential contamination biomarker for this endocrine disruptor, once it presents induction at the lower concentrations, and in acute exposures, representing, therefore, an animal's early response to the pollutant in the aquatic environment.

5. REFERENCES

Abarikwu S.O., Farombi, E.O., Kashyap, M.P., Pant, A.B., 2011. Atrazine induces transcriptional changes in marker genes associated with steroidogenesis in primary cultures of rat Leydig cells. *Toxicol. in Vitro*. doi:10.1016/j.tiv.2011.06.002

Ahmad, I., Pacheco, M., Santos, M.A., 2004. Enzymatic and non enzymatic antioxidants as an adaptation to phagocyte-induced damage in *Anguilla anguilla* L. following in situ harbor water exposure. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 57, 290 – 302.

Alvarez, R.M., Morales, A.E., Sanz, A., 2005. Antioxidant defenses in fish: Biotic and abiotic factors. *Rev. Fish Biol. Fish.* 15, 75 – 88.

Anderson T.D., Jin-Clark, Y., Begum, K., *et al.*, 2008. Gene expression profiling reveals decreased expression of two hemoglobin genes associated with increased consumption of oxygen in *Chironomus tentans* exposed to atrazine: A possible mechanism for adapting to oxygen deficiency. *Aq. Toxicol.* 86, 148 – 156.

Arukwe, A., 2005. Modulation of brain steroidogenesis by affecting transcriptional changes of steroidogenic acute regulatory (StAR) protein and cholesterol side chain

cleavage (P450_{scc}) in juvenile atlantic salmon (*Salmo salar*) is a novel aspect of nonylphenol toxicity. Environ. Sci. Technol. 39, 9791 – 9798.

Arukwe, A., 2008. Steroidogenic acute regulatory (StAR) protein and cholesterol side-chain cleavage (P450_{scc})- regulated steroidogenesis as an organ-specific molecular and cellular target for endocrine disrupting chemicals in fish. Cell. Biol. Toxicol. 24, 527 – 540.

Bauer, M.P., Bridgham, J.T., Langenau, D.M., *et al.*, 2000. Conservation of steroidogenic acute regulatory (StAR) protein structure and expression in vertebrates. Mol. Cell. Endocrinol. 168, 119 – 125.

Betito, R., 2006. Comparação da complexidade das adaptações bioecológicas de dois Peixes (*Jenynsia multidentata* e *Poecilia vivipara*) (Cyprinodontiformes) no estuário da Lagoa dos Patos (RS - Brasil). Ver. Didat. Sist. 3, 71 – 100.

Bizerril, C. R. S., Primo, P. B. S., 2001. Peixes de Aguas Interiores do Estado do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro: FEMAR-SEMADS.

Bouloubassi I., Saliot A., 1993. Investigation of anthropogenic and natural organic inputs in estuarine sediments using hydrocarbon markers (NAH, LAB, PAH). Oceanol. Acta. 16, 145 – 61.

Brodeur., J.C., Svartz, G., Perez-coll, C.S., *et al.*, 2009. Comparative susceptibility to atrazine of three developmental stages of *Rhinella arenarum* and influence on metamorphosis: Non-monotonous acceleration of the time to climax and delayed tail resorption. Aq. Toxicol. 91, 161 – 170.

Cheshenko, K., Pakdel, F., Segner, H., *et al.*, 2008. Interference of endocrine disrupting chemicals with aromatase CYP19 expression or activity, and consequences for reproduction of teleost fish. *Gen. Comp. Endocrinol.* 155, 31 – 62.

CONAMA, 2005. Conselho Nacional do Meio Ambiente/ Ministério do Meio Ambiente. Resolução No. 357 de 17 de março de 2005. Disponível em <<http://www.mma.gov.br/port/conama/legiano1.cfm?codlegitipo=3&ano=2005>>.

Crain, D.A., Guillette, L.J., Rooney, A.A., Pickford, D.B., 1997. Alterations in steroidogenesis in alligators (*Alligator mississippiensis*) exposed naturally and experimentally to environmental contaminants. *Environ. Health Perspect.* 105, 528 – 533.

Depledge, M.H., Aagaard, A., Gyorko, R., 1995. Assessment of trace metal toxicity using molecular, physiological and behavioural biomarkers. *Mar. Pollut. Bull.* 31, 19 – 27.

Elia, A.C., Waller, W.T., Norton S.J., 2002. Biochemical responses of Bluegill Sunfish (*Lepomis macrochirus*, Rafinesque) to atrazine induced oxidative stress. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 68, 809 – 816.

Fan, W., Yanase, T., Morinaga, H., *et al.*, 2007. Atrazine - induced aromatase expression is SF-1 dependent: Implications for endocrine disruption in wildlife and reproductive cancers in humans. *Environ. Health Perspect.* 115, 720 - 727.

Friedmann, A.S., 2002. Atrazine inhibition of testosterone production in rat males following peripubertal exposure. *Reprod. Toxicol.* 16, 275 – 279.

- Frohman, M. A., Dush, M. K., Martin, G. R., 1988. Rapid production of full-length cDNA from rare transcripts: Amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 8998 – 9002.
- Fukada, S., Tanaka, M., Matsuyama, K., *et al.*, 1996. Isolation, characterization, and expression of cDNAs encoding the medaka (*Oryzias latipes*) ovarian follicle cytochrome P-450 aromatase. *Mol. Reprod. Dev.* **45**, 285 – 290.
- Gagosian R.B., Peltzer E.T., 1986. The importance of atmospheric input of terrestrial organic material to deep sea sediments. *Org. Geochem.* **10**, 661 – 9.
- Gómez-Anduro, G.A., Barillas-Mury, C.V., Peregrino-Uriarte, A.B., *et al.*, 2006. The cytosolic manganese superoxide dismutase from the shrimp *Litopenaeus vannamei*: molecular cloning and expression. *Dev. Comp. Immunol.* **30**, 893 – 900.
- Graymore, M., Allinson, G., Allinson, M., *et al.*, 1999. Environmental fate of pesticides used in Australian viticulture: V. behavior of atrazine in the soils of the South Australian Riverland. *Toxicol. Environ. Chem.* **70**, 427 – 39.
- Graymore, M., Stagnitti, F., Allinson, G., 2001. Impacts of atrazine in aquatic ecosystems. *Environ. Internat.* **26**, 483 – 495.
- Graziano N., Mcguire, M.J., Roberson A., *et al.*, 2006. 2004 national atrazine occurrence monitoring program using the abraxia ELISA method. *Environ. Sci. Technol.* **40**, 1163 - 1171.
- 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. *Aquat.Toxicol.* 71, 371 – 389.

Hayes, T.B., Haston, K., Tsui B., *et al.*, 2002. Feminization of male frogs in the wild. *Nature.* 419, 895 – 896.

Hayes, T.B., Haston, K., Tsui B., *et al.*, 2003. Atrazine-induced hermaphroditism at 0.1 ppb in American leopard frogs (*Rana pipiens*): laboratory and field evidence. *Environ. Health Perspect.* 111, 568 – 575.

Hayes, T.B., Beasley, V.R., Solla, S., *et al.*, 2011. Demasculinization and feminization of male gonads by atrazine: Consistent effects across vertebrate classes. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* 127, 64 – 73.

Hennessy, M., Spiers, J.P., 2007. A primer on the mechanics of P-glycoprotein the multidrug transporter. *Pharmacol. Res.* 55, 1 – 15.

Islam, M.O., Hara, M., Myiake, J., 2002. Induction of P-glycoprotein, glutathione-S-transferase and cytochrome P450 in rat liver by atrazine. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 12, 1 – 6.

Jelaso, A., Celestine, R., Zaya, R., *et al.*, 2008. Chronic exposure to high levels of atrazine alters expression of genes that regulate immune and growth-related functions in developing *Xenopus laevis* tadpoles. *Environ. Res.* 109, 379 – 389.

Jin, Y., Zhang, X., Shu, L., *et al.*, 2010. Oxidative stress response and gene expression with atrazine exposure in adult female zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere.* 78, 846 – 852.

Ken, C., Lin, C., Wu, J., Shaw, J., 1998. Cloning and expression of a cDNA coding for catalase from zebrafish (*Danio rerio*). J.Agric.Food Chem. 48, 2092 – 2096.

Kim, B., Rhee, J., Park, G.S., *et al.*, 2011. Cu/Zn- and Mn-superoxide dismutase (SOD) from the copepod *Tigriopus japonicus*: Molecular cloning and expression in response to environmental pollutants. Chemosphere. 84, 1467 – 147

Kortner, T.M., Arukwe, A., 2007. The xenoestrogen, 4-nonylphenol, impaired steroidogenesis in previtellogenic oocyte culture of Atlantic cod (*Gadus morhua*) by targeting the StAR protein and P450scc expressions. Gen. Comp. Endocrinol. 150, 419 – 429.

Kusakabe, M., Todo, T., McQuillan, H.J., *et al.*, 2002. Characterization and expression of steroidogenic acute regulatory protein and MLN64 cDNAs in trout. Endocrinology. 143, 2062 – 2070.

Larsson., D.J.K., Kinnberg, K., Sturve, J., *et al.*, 2002. Studies of masculinization, detoxification, and oxidative stress responses in Guppies (*Poecilia reticulata*) exposed to effluent from a Pulp Mill. Ecotoxicol. Environ. Saf. 52, 13 – 20.

Mattos, J.J., Siebert, M.N., Luchmann, K.H., *et al.*, 2009. Differential gene expression in *Poecilia vivipara* exposed to diesel oil water accommodated fraction. Mar. Environ. Res. 69, 31 – 33.

Monserrat., J.M., Martínez, P.E., Geracitano, L.A., *et al.*, 2007. Pollution biomarkers in estuarine animals: Critical review and new perspectives. Comp. Biochem. Physiol. 146, 221 – 234.

Moore, A., Waring, C., 1998. Mechanistic effects of a triazine pesticide on reproductive endocrine function in mature male Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) parr. *Pest. Biochem. Physiol.* 62, 41 – 50.

Norris, D. 2007. *Vertebrate Endocrinology*. 4^a ed. Elsevier Academic Press.

Ozcan, E., Sevgiler, Y., Uner, N., 2004. Tissue - specific oxidative stress responses in fish exposed to 2,4-D and azin-phosmethyl. *Comp. Biochem. Physiol.* 137, 43 – 51.

Parenti, L. R., Raucherberger, M., 1989. Systematic overview of the Poeciliines. In *The Ecology and Evolution of Poeciliid Fishes (Poeciliidae)* (Meffe, A. & Snelson, F.F., eds), pp. 3–12. New Jersey: Prentice Hall.

Park, H., Ahn, I., Lee, J.K., *et al.*, 2009. Molecular cloning, characterization, and the response of manganese superoxide dismutase from the Antarctic bivalve *Laternula elliptica* to PCB exposure. *Fish Shellfish Immunol.* 27, 522 – 528.

Paulino, M.G., Sakuragui, M.M., Fernandes M.N., 2012. Effects of atrazine on the gill cells and ionic balance in a neotropical fish, *Prochilodus lineatus*. *Chemosphere.* 86, 1-7.

Pfaffl, M. W., Horgan, G. W., Dempfle, L., 2002. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in Real time PCR. *Nucl. Ac. Res.* 9, 30 - 36.

Qian, H.F., Sheng, G.D., Liu, W.P., *et al.*, 2008. Inhibitory effects of atrazine on *Chlorella vulgaris* as assessed by real-time polymerase chain reaction. *Environ. Toxicol. Chem.* 27, 182 – 187.

Rhee, J., Kim, B., Li, C.J., *et al.*, 2011. Bisphenol A modulates expression of sex differentiation genes in the self-fertilizing fish, *Kryptolebias marmoratus*. *Aq. Toxicol.* 104, 218 – 229.

Roche, H., Boge, G., 1996. Fish blood parameters as a potential tool for identification of stress caused by environmental factors and chemical intoxication. *Mar. Environ. Res.* 41, 27 - 43.

Rudneva, I.I., 1997. Blood antioxidant system of Black Sea elasmobranch and teleost. *Comp. Biochem. Physiol.* 118, 255–260.

Schmittgen, T.D., Livak, K.J., 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nat. Protoc.* 3, 1101–1108.

Simpson, E.R., 1994. Aromatase cytochrome - P450: structure, function and regulation. *Faseb J.* 8, 12 - 41.

Spano, L., Tyler, C.R., Van Aerle, R., *et al.*, 2004. Effects of atrazine on sex steroid dynamics, plasma vitellogenin concentration and gonad development in adult goldfish (*Carassius auratus*). *Aq. Toxicol.* 66, 369 – 379.

Sreenivasulu, G., Sidrevi, P., Sahoo, P.K., *et al.*, 2009. Cloning and expression of StAR during gonadal cycle and hCG-induced oocyte maturation of air-breathing catfish, *Clarias gariepinus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 154, 6 – 11.

Suzawa, M., Ingraham, H.A., 2008. The herbicide atrazine activates endocrine gene networks via non-steroidal NR5A nuclear receptors in fish and mammalian cells. *Plos one* 3, 1-9.

- Tang, B., Hu, W., Hao, J., Zhu, Z., 2010. Developmental expression of steroidogenic factor-1, cyp19a1a and cyp19a1b from common carp (*Cyprinus carpio*). Gen. Comp. Endocrinol. 167, 408 – 416.
- Tavera-Mendoza, L., Ruby, S., Brousseau, P., *et al.*, 2002. Response of the amphibian tadpole (*Xenopus laevis*) to atrazine during sexual differentiation of the testis. Environ. Toxicol. Chem. 21, 527 – 531.
- Thompson, E.A., Siiter, J., 1974. Utilization of oxygen and reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate by human placental microsomes during aromatization of androstenedione. J. Biol. Chem. 249, 5364 – 5372.
- Tinfo, N.S., Hotchkiss, M.G., Buckalew, A.R., *et al.*, 2011. Understanding the effects of atrazine on steroidogenesis in rat granulosa and H295R adrenal cortical carcinoma cells. Reprod. Toxicol. 31, 184 – 193.
- Tomlin C. 2000. The pesticide Manual: a world compendium. Twelfthed. Farnham (UK) 7 The British Crop Protection Council.
- Trant, J., 1994. Isolation and characterization of the cDNA encoding the channel catfish (*Ictalurus punctatus*) form of cytochrome P450 aromatase. Gen. Comp. Endocrinol. 95, 155 – 168.
- Wang L., Song, L., Hong, X., *et al.*, 2006. Low concentrations mono-butyl phthalate stimulates steroidogenesis by facilitating steroidogenic acute regulatory protein expression in mouse Leydig tumor cells (MLTC-1). Chem. Biol. Interact. 164, 15 – 24.

Wauchope, R.D., Butler, T.M., Hornsby, A.G., *et al.*, 1991. The SCS/ARS/CES pesticide properties database for environmental decision-making. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 123, 1–36.

Zaya, R.M., Amini, Z., Whitaker, A.S., Ide, C.F., 2011. Exposure to atrazine affects the expression of key genes in metabolic pathways integral to energy homeostasis in *Xenopus laevis* tadpoles. *Aq. Toxicol.* 104, 254 – 262.

CONCLUSÕES GERAIS

- As sequências parciais dos genes *StAR*, *Cyp19a1*, *SOD-1* e *CAT* foram identificadas e apresentaram um alta identidade com espécies filogeneticamente próximas a *P. vivipara*, possibilitando uma anotação preliminar das mesmas.
- O herbicida Atrazina foi capaz de alterar a expressão tanto dos genes relacionados à via esteroidogênica, *StAR* e *Cyp19a1*, afirmando o seu papel como desregulador endócrino, quanto os genes que codificam para enzimas antioxidantes, *SOD-1* e *CAT*.
- O modelo experimental utilizado no presente trabalho se mostrou, portanto, sensível à presença do poluente na água, inclusive na concentração máxima permitida pelo CONAMA (2 µg/L).
- O gene *StAR* mostrou ser um biomarcador potencial de contaminação por ATR em baixas concentrações e exposições agudas.
- Nas maiores concentrações de ATR não houve indução de genes como *StAR*, *SOD-1* e *CAT*, o que indica que outro sistema pode estar atuando frente a concentrações maiores do herbicida, como por exemplo o aumento da expressão/atividade de bombas de exportação como as glicoproteínas - P, o que implicaria em um alto custo energético ao animal.

PERSPECTIVAS

Como perspectivas do presente trabalho, temos a identificação do gene que codifica para a glicoproteína-P, bem como a expressão desse gene frente à concentrações de ATR semelhantes a do presente estudo. Ainda como perspectivas estão a realização de exposições subcrônicas e crônicas e análise histopatológica das gônadas dos animais, já que o gene que codifica para aromatase (*Cyp19a1*) demonstrou uma indução nos animais expostos por 96 horas a ATR.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abarikwu, S.O., Farombi, E.O., Kashyap, M.P., Pant, A.B., 2011. Atrazine induces transcriptional changes in marker genes associated with steroidogenesis in primary cultures of rat Leydig cells. *Toxicol. in Vitro.* 25, 1588 – 1595.

Ahmad, S., 1995. *Oxidative stress and antioxidant defenses in biology.* Chapman e Hall, New York.

Anderson, T.D., Jin-Clark, Y., Begum, K., *et al.*, 2008. Gene expression profiling reveals decreased expression of two hemoglobin genes associated with increased consumption of oxygen in *Chironomus tentans* exposed to atrazine: A possible mechanism for adapting to oxygen deficiency. *Aq. Toxicol.* 86, 148 – 156.

Araújo F.G., 2009. Distribution of Guppies *Poecilia reticulata* (Peters, 1860) and *Phalloceros caudimaculatus* (Hensel, 1868) Along a polluted stretch of the Paraíba do Sul River, Brazil. *Brazilian J. Biol.* 69, 41 - 48.

Avcı, A., Kacmaz, M., Durak, I., 2005. Peroxidation in muscle and liver tissues from fish in a contaminated river due to a petroleum refinery industry. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 60, 101 – 105.

Bainy, A.C.D., Saito, E., Carvalho, P.S.M., Junqueira, V.B.C., 1996. Oxidative stress in gill, erythrocytes, liver and kidney of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) from a polluted site. *Aq. Toxicol.* 34, 151 - 162.

Bauer, M.P., Bridgham, J.T., Langenau, D.M., Johnson, A.L., *et al.*, 2000. Conservation of steroidogenic acute regulatory (StAR) protein structure and expression in vertebrates. *Mol. Cell. Endocrinol.* 168, 119 – 125.

Bentley, P.J., 1998. *Comparative Vertebrate Endocrinology*, Cambridge University Press, Cambridge, UK.

Betito, R., 2006. Comparação da complexidade das adaptações bioecológicas de dois Peixes (*Jenynsia multidentata* e *Poecilia vivipara*) (Cyprinodontiformes) no estuário da Lagoa dos Patos (RS - Brasil). *Ver. Didat. Sist.* 3, 71 – 100.

Bizerril, C. R. S., Primo, P. B. S., 2001. *Peixes de Aguas Interiores do Estado do Rio de Janeiro*. Rio de Janeiro: FEMAR-SEMADS.

Bourne, A., 1991. Androgens. In: Pang, P.K.T., Schreibman, M.P.(Eds.), *Vertebrate endocrinology: fundamental and biomedical implications*. Academic Press, New York, 115–147.

Chang, X., Kobayashi, T., Senthilkumaran, B., *et al.*, 2005. Two types of Aromatase with different encoding genes, tissue distribution and developmental expression in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 141, 101 – 115.

Christenson, L.K., Strauss, J.F., 2001. Steroidogenic acute regulatory protein: an update on its regulation and mechanism of action. *Arch. Med. Res.* 32, 576 – 586.

Clark, B.J., Wells, J., King, S.R., Stocco, D.M., 1994. Purification, cloning and expression of a novel luteinizing hormone – induced mitochondrial protein in mouse Leydig tumor cells. Characterization of the steroidogenic acute regulatory protein (StAR). *J. Biol. Chem.* 269, 28314 – 28322.

CONAMA, 2005. Conselho Nacional do Meio Ambiente/Ministério do Meio Ambiente. Resolução No. 357 de 17 de março de 2005. Disponível em <<http://www.mma.gov.br/port/conama/legiano1.cfm?codlegitipo=3&ano=2005>>

Cook, P.M., Robbins J.A., Endicott, D.D., *et al.*, 2003. Effects of aryl hydrocarbon receptor mediated early life stage toxicity on lake trout populations in lake Ontario during the 20th century. *Environ. Sci. Technol.* 37, 3864 - 3877.

Corbin, C.J., Trant, J.M., Walters, K.W., Conley, A.J., 1999. Changes in testosterone metabolism associated with the evolution of placental and gonadal isozymes of porcine Aromatase cytochrome P450. *Endocrinology.* 140, 5202 - 5210.

Correia, F.V., Macrae, A., Guilherme, L.R.G., Langenbach, T., 2007. Atrazine sorption and fate in a Ultisol from humid tropical Brazil. *Chemosphere.* 67, 847 – 854.

Decisão da comissão, 10 de Março de 2004. Relativa à não inclusão da substância ativa atrazina no anexo I da Directiva 91/414/CEE do Conselho e à retirada das autorizações dos produtos fitofarmacêuticos que a contenham. *J. União Européia.* 2004/248/CE.

Denton, T.E., Howell, W.M., Allison, J.J., *et al.*, 1985. Masculinization of female mosquitofish by exposure to plant sterols and *Mycobacterium smegmatis*. *Bull Environ. Contam. Toxicol.* 35, 627- 32.

Dalla Valle, L., Ramina, A., Vianello, S., *et al.*, 2002. Cloning of two mRNA variants of brain Aromatase cytochrome P450 in rainbow trout (*Oncorhynchus mykissalbaum*). J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 82, 19 – 32.

Diana, L., Stephen, G., Resetarits, W., *et al.*, 2000. Effects of atrazine on amphibian growth and survival in artificial aquatic communities. Environ. Toxicol. Chem. 19, 2961 – 2967.

Dong, L., Chen, L., Li, Z., *et al.*, 2006. Quality assurance/quality control for monitoring and analysis of trace triazines in water. J. Saf. Environ. 6, 35 – 38.

Duursma, E.K., Marchand, M., 1974. Aspects of organic marine pollution. Oceanography Mar. Biol. Annu. Rev. 12, 315 - 431.

Eggen, R.I.L., Bengtsson, B.E., Bowmer, C.T., *et al.*, 2003. Search for the evidence of endocrine disruption in the aquatic environment: lessons to be learned from joint biological and chemical monitoring in the European Project COMPREHEND. Pure Appl. Chem. 75, 2445 – 2450.

Elia, A.C., Waller, W.T., Norton, S.J., 2002. Biochemical responses of Bluegill Sunfish (*Lepomis macrochirus*, Rafinesque) to atrazine induced oxidative stress. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 68, 809 – 816.

Fan, W., Yanase, T., Morinaga, H., *et al.*, 2007. Atrazine-induced aromatase expression is SF-1 dependent: Implications for endocrine disruption in wildlife and reproductive cancers in humans. Environ. Health Perspect. 115, 720 - 727.

Faqi A.S., Dalsenter P.R., Merker, H.J., Chahoud, I, 1998. Reproductive toxicity and tissue concentrations of low doses of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in male

offspring rats exposed throughout pregnancy and lactation. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 150, 383 – 392.

Fernando, A.A., Phang, V.P.E., 1985. Culture of the guppy, *Poecilia reticulata*, in Singapore. *Aquaculture*. 51, 49 - 63.

Freitas, C.M., Sá, I.M.B., 2003 Por um gerenciamento de riscos integrado e participativo na questão dos agrotóxicos. In: PERES, F.; MOREIRA, J. C. (orgs). *É veneno ou é remédio?* Rio de Janeiro: Fiocruz 211-50.

Freemark, K., Boutin, C., 1995. Impacts of agricultural herbicide use on terrestrial wildlife in temperate landscapes: A review with special reference to North America. *Agricult. Ecosyst. Environ.* 52, 67 – 91.

Fridovich, I., 1997. Superoxide anion radical, superoxide dismutases, and related matters. *J. Biol. Chem.* 250, 18515 – 18517.

Fridovich, I., 2004. Mitochondria: are they these at of senescence? *Aging Cell.* 3 , 13–16.

Friedmann, A.S., 2002. Atrazine inhibition of testosterone production in rat males following peripubertal exposure. *Reprod. Toxicol.* 16, 275 - 9.

Fukada, S., Tanaka, M., Matsuyama, *et al.*, 1996. Isolation, characterization, and expression of cDNAs encoding the medaka (*Oryzias latipes*) ovarian follicle cytochrome P-450 aromatase. *Mol. Reprod. Dev.* 45, 285 – 290.

GEO Brasil, 2007. Recursos hídricos : componente da série de relatórios sobre o estado e perspectivas do meio ambiente no Brasil. / Ministério do Meio Ambiente ; Agência

Nacional de Águas ; Programa das Nações Unidas para o Meio Ambiente. Brasília : MMA;. 264 p. : il. (GEO Brasil Série Temática : GEO Brasil Recursos Hídricos).

Geracitano, L.A., Monserrat, J.M., Bianchini, A., 2004. Oxidative stress in *Laeonereis acuta* (Polychaeta: Nereididae): environmental and seasonal effects. Mar. Environ. Res. 58, 625 – 630.

Giguère, A., Couillard, Y., Campbell, P.G.C., *et al.*, 2003. Steady-state distribution of metals among metallothionein and other cytosolic ligands and links to cytotoxicity in bivalves living along a polymetallic gradient. Aq. Toxicol. 64, 185 - 200.

Goksoyr, A., 2006. Endocrine disruptors in the marine environment: mechanisms of toxicity and their influence on reproductive processes in fish. J. Toxicol. Environ. Health. 69, 175–184.

Graymore M., Allinson, G., Allinson, M., *et al.*, 1999. Environmental fate of pesticides used in Australian viticulture: V. Behavior of atrazine in the soils of the South Australian Riverland. Toxicol. Environ. Chem. 70, 427 – 39.

Graymore, M., Stagnitti, F., Allinson. G., 2001. Impact of atrazine in aquatic ecosystems. Environ. Internat. 26, 483 - 495.

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. Aq.Toxicol. 71, 371 – 389.

Guillette, L.J.J., Crain, D.A., Rooney, A.A., Pickford, D.B., 1995. Organization versus activation: the role of endocrine-disrupting contaminants (EDCs) during embryonic development in wildlife. *Environ. Health Perspect.* 103, 157–164.

Hahn, M.E., Stegeman, J.J., 1994. Regulation of cytochrome p4501A1 in teleosts: sustained induction of CYP1A1 mRNA, protein, and catalytic activity by 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzofuran in the marine fish *Stenotomus crhysops*. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 127, 187 - 198.

Hayes, T., Haston, K., Tsui, M., *et al.*, 2002. Feminization of male frogs in the wild: Water-borne herbicide threatens amphibian populations in parts of the United States. *Nature.* 419, 895.

Hayes, T., Haston, K., Tsui, M., *et al.*, 2003. Atrazine induced hermaphroditism at 0.1 ppb in American leopard frogs (*Rana pipiens*): laboratory and field evidence. *Environ. Health Perspect.* 111, 568 – 575.

Honma, S., Suzuki, A., Buchanan, D.L., *et al.*, 2001. Low dose effect of in utero exposure to bisphenol A and diethylstilbestrol on female mouse reproduction. *Reprod. Toxicol.* 16, 117 – 122.

Howell, W.M., Black, D.A., Bortone, S.A., 1980. Abnormal expression of secondary sex characters in a population of mosquitofish, *Gambusia affinis holbrooki*: evidence for environmentally-induced masculinization. *Copeia.* 4, 676 - 681.

Howell, W.M., Denton, T.E., 1989. Gonopodial morphogenesis in female mosquitofish, *Gambusia affinis affinis*, masculinized by exposure to degradation products from plant sterols. *Environ. Biol. Fish.* 24, 43 - 51.

Huber, W., 1993. Ecotoxicological relevance of atrazine in aquatic systems. *Environ. Toxicol. Chem.* 12, 1865 – 1881.

Hyne R.V., Maher, W.A., 2003. Invertebrate biomarkers: links to toxicosis that predict population decline. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 54, 366 – 374.

Islam, M.S., Tanaka, M., 2004. Impacts of pollution on coastal and marine ecosystems including coastal and marine fisheries and approach for management: a review and synthesis. *Mar. Pollut. Bull.* 48, 624 – 649.

Jin, Y., Zhang, X., Shu, L., *et al.*, 2010. Oxidative stress response and gene expression with atrazine exposure in adult female zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere.* 78, 846 – 852.

Kazeto, R.G., Kight, K.E., Zohar, Y., *et al.*, 2004. Localization and expression of aromatase mRNA in adult zebrafish. *Gen. Comp. Endocrinol.* 139, 72 – 84.

Ken, C., Lin, C., Wu, J., Shaw, J., 1998. Cloning and expression of a cDNA coding for catalase from zebrafish (*Danio rerio*). *J. Agric. Food Chem.* 48, 2092 – 2096.

Ken, C., Lin, C., Shaw, J.F., Wu, J., 2003. Characterization of fish Cu/Zn-superoxide dismutase and its protection from oxidative stress. *Mar. Biotechnol.* 5, 167 – 173.

Kim, B., Rhee, J., Park, G.S., *et al.*, 2011. Cu/Zn- and Mn-superoxide dismutase (SOD) from the copepod *Tigriopus japonicus*: Molecular cloning and expression in response to environmental pollutants. *Chemosphere.* 84, 1467 – 1475.

Kishida, M., Callard, G.V., 2001. Distinct cytochrome P450 aromatase isoforms in zebrafish (*Danio rerio*) brain and ovary are differentially programmed and estrogen regulated during early development. *Endocrinology*. 142, 740 - 750.

Kniewald, J., Jakominic, M., Tomljenovic, A., *et al.*, 2000. Disorders of male rat reproductive tract under the influence of atrazine. *J. Appl. Toxicol.* 20, 61 – 68.

Kortner T.M., Arukwe, A., 2007. The xenoestrogen, 4-nonylphenol, impaired steroidogenesis in previtellogenic oocyte culture of Atlantic cod (*Gadus morhua*) by targeting the StAR protein and P450scc expressions. *Gen. Comp. Endocrinol.* 150, 419 – 429.

Kronenberg, H.M., Mamed, S., Polonsky, S., Larsen, P.R., 2011. *Willians Textbook of Endocrinology*. 11 ed.

Kuiper, G.G., Lemmen, J.G., Carlsson, B., *et al.*, 1998. Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinology*. 139, 4252 – 4263.

Kusakabe, M., Todo, T., McQuillan, H.J., *et al.*, 2002. Characterization and expression of steroidogenic acute regulatory protein and MLN64 cDNAs in trout. *Endocrinology*. 143, 2062 – 2070.

Kwon, J.Y., Mcandrew, B.J., Penman, D.J., 2001. Cloning of brain aromatase gene and expression of brain and ovarian aromatase genes during sexual differentiation in genetic male and female Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Mol. Reprod. Dev.* 59, 359 - 370.

Lange, I.G., Hartel, A., Meyer, H.H.D., 2003. Evolution of estrogen functions invertebrates. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 83, 219 – 226.

Laws, E.R., Hayes, W.J., 1991. Handbook of Pesticide Toxicology. Agric. Food Chem. Academic Press, SanDiego, CA.

Li, Y.Y., Inoue, K., Takei, Y., 2003. Steroidogenic acute regulatory protein in eels: cDNA cloning and effects of ACTH and sea water transfer on its mRNA expression. Zool. Sci. 20, 211 – 219.

Lin, D., Sugawara, T., Strauss, J.F., *et al.*, 1995. Role of steroidogenic acute regulatory protein in adrenal and gonadal steroidogenesis. Science. 267, 1828 – 1831.

Livingstone, D.R., Chipman, J.K., Lowe, D.M., *et al.*, 2000. Development of biomarkers to detect the effects of organic pollution on aquatic invertebrates: recent molecular, genotoxic, cellular and immunological studies on the common mussel (*Mytilus edulis* L.) and other mytilids. Int. J. Environ. Pollut. 13, 56 – 91.

Londono, D.K., Siqueira, H.A.A., Wang, H., *et al.*, 2007. Cloning and expression of an atrazine inducible cytochrome P450, CYP4G33, from *Chironomus tentans* (Diptera: Chironomidae). Pestic. Biochem. Physiol. 89, 104 – 110.

Mineau, P., McLaughlin, A. 1996. Conservation of biodiversity with in canadian agricultural landscapes: Integrating habitat for wildlife. J. Agric. Environ. Ethics. 9, 93 – 113.

Monserrat, J.M., Bianchini, A., 2000. Methodological and biological aspects to be considered in acetylcholinesterase reactivation assays using 2-PAM. Environ. Toxicol. Pharmacol. 9, 39 – 47.

Monserrat, J.M., Bianchini, A., Bainy, A.C.D., 2002. Kinetic and toxicological characteristics of acetylcholinesterase from the gill so foysters (*Crassostrea rhizophorae*) and other aquatic species. *Mar. Environ. Res.* 54, 781 – 785.

Moore, A., Waring, C.P., 1998. Mechanistic effects of a triazine pesticide on reproductive endocrine function in mature male Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.) Parr. *Pestic. Biochem. Physiol.* 62, 41 – 50.

Moore, M.N., Depledge, M.H., Readman, J.W., Leonard, P.D.R., 2004. An integrated biomarker-based strategy for ecotoxicological evaluation of risk in environmental management. *Mut. Res.* 552, 247 – 268.

Neves, F.M., Monteiro, L.R., 2003. Body Shape and size divergence among populations of *Poecilia vivipara* in coastal lagoons of south eastern Brazil. *J. Fish Biol.* 63, 928 - 941.

Norris, D. 2007. *Vertebrate Endocrinology*. 4^a ed. Elsevier Academic Press.

Olsvik, P.A., Krinstensen, A., Wagboø, R., *et al.*, 2005. mRNA expression of antioxidant enzymes (SOD, CAT and GSH-Px) and lipid peroxidative stress in liver of Atlantic salmon (*Salmo salar*) exposed to hyperoxic water during smoltification. *Comp. Biochem. Physiol.* 141, 314 – 323.

Oost, R.V., Beyer, J., Vermeulen, N.P.E., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 13, 57 - 149.

Osada, M., Tawarayama, H., Mori, K., 2004. Estrogen synthesis in relation to gonadal development of Japanese scallop, *Patinopecten yessoensis*: gonadal profile and

immunolocalization of P450 aromatase and estrogen. *Comp. Biochem. Physiol.* 139, 123 – 128.

Parenti, L. R., Rauchenberger, M., 1989. Systematic overview of the Poeciliines. In *The Ecology and Evolution of Poeciliid Fishes (Poeciliidae)* (Meffe, A. & Snellson, F. F., eds), pp. 3–12. New Jersey: Prentice Hall.

Park, H., Ahn, I., Lee, J.K., *et al.*, 2009. Molecular cloning, characterization, and the response of manganese superoxide dismutase from the Antarctic bivalve *Laternula elliptica* to PCB exposure. *Fish Shellfish Immunol.* 27, 522 – 528.

Pereira, W.E., Hostettler, F.D., 1993. Nonpoint source contamination of the Mississippi river and its tributaries by herbicides. *Environ. Sci. Technol.* 27, 1542 - 1552.

Petersen, P.M., Giwercman, A., Skakkebaek, N.E., Rorth, M., 1998. Gonadal function in men with testicular cancer. *Semin. Oncol.* 25, 224 – 233.

Phillips, B., Harrison, P., 1999. Overview of the endocrine disruptor issue. Royal Soc. of Chem., Cambridge, UK.

Pogrmic, K., Fa, S., Dakic, V., *et al.*, 2009. Atrazine oral exposure of peripubertal male rats downregulates steroidogenesis gene expression in Leydig cells. *Toxicol. Sci.* 111, 189 – 197.

Ren, J., Jiang, K., Zhou, H., 2002. The concentration and source of atrazine residue in water of guanting reservoir. *Environ. Sci.* 23, 126 – 128.

Ribaudo, M.O., Bouzaher, A., 1994. Atrazine: environmental characteristics and economics of management. Agricultural Economic Report. Resources and Technology Division, Economic Research Service, U.S. Department of Agriculture.

Roberge, M., Hakk, H., Larsen, G., 2004. Atrazine is a competitive inhibitor of phosphodiesterase but does not affect the estrogen receptor. *Toxicol. Lett.* 154, 61 -68.

Roos, A., Greyerz, E., Olsson, M., Sandegren, F., 2001. The otter (*Lutra lutra*) in Sweden population trends in relation to sigma DDT and total PCB concentrations during 1968–99. *Environ. Pollut.* 111, 457 – 469.

Rudneva, I.I., 1997. Blood antioxidant system of Black Sea elasmobranch and teleosts. *Comp. Biochem. Physiol.* 118, 255 - 260.

Safe, S.H., Pallaroni, L., Yoon, K., *et al.*, 2001. Toxicology of environmental estrogens. *Reprod. Fertil. Dev.* 13, 307 – 315.

Santos, E.G.N., Cunha, R.A., Santos, C.P., 2011. Behavioral responses of *Poecilia vivipara* (Osteichthyies: Cyprinodontiformes) to experimental infections of *Acanthocollariotrema umbilicatum* (Digenea:Cryptogonimidae). *Exper. Parasit.* 127, 522 – 526.

Sanderson, J.T., Boerma, J., Lansbergen, G.W., Vandenberg, M., 2002. Induction and Inhibition of Aromatase (CYP19) activity by various classes of pesticides I n H295R human adrenocortical carcinoma cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 182, 44 – 54.

Santovito, G., Cassini, A., Piccini E., 2006. Cu, Zn superoxide dismutase from *Trematomus bernacchii*: Functional conservation and erratic molecular evolution in Antarctic teleosts. *Comp. Biochem. Physiol.* 143, 444 – 454.

Schnurstein, A., Braunbeck, T., 2001. Tail moment versus tail length — Application of an in vitro version of the comet assay in biomonitoring for genotoxicity in native surface waters using primary hepatocytes and gill cells from zebrafish (*Danio rerio*). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 49, 187 – 196.

Schottler, S.P., Eisenreich, S.J., Capel, P.D., 1994. Atrazine, alachlor and cyanazine in a large agricultural river system. *Environ. Sci. Technol.* 28, 1079 – 1089.

Schwarzenbach, R.P., Escher, B.I., Fenner, K., *et al.*, 2006. The challenge of micropollutants in aquatic systems. *Science.* 313, 1072 - 1077.

Scippo, M.L., Argiris, C., Weerd, C.V., *et al.*, 2004. Recombinant human estrogen, androgen and progesterone receptors for detection of potential endocrine disruptors. *Anal Bioanal Chem.* 378, 664 – 669.

Selcer, K.W., Leavitt, W.W., 1991. Progesterone downregulates progesterone receptor, but not estrogen receptor, in the estrogen-primed oviduct of a turtle (*Trachemys scripta*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 83, 316 – 323.

Shen, W.H., Moore, C.C., Ikeda, Y., *et al.*, 1994. Nuclear receptor steroidogenic factor 1 regulates the mullerian inhibiting substance gene: a link to the sex determination cascade. *Cell.* 77, 651 – 661.

Sies, H., 1993. Strategies of antioxidant defense. *Eur. J. Biochem.* 215, 213 - 219.

- SINDAG, 2003. Estatísticas de consumo de defensivos agrícolas no Brasil.
- Simpson, E.R., 1994. Aromatase cytochrome-P450— structure, function and regulation. *Faseb J.* 8, 12 - 41.
- Spano, L., Tyler, C.R., Aerle, R.V., *et al.*, 2004. Effects of atrazine on sex steroid dynamics, plasma vitellogenin concentration and gonad development in adult goldfish (*Carassius auratus*). *Aq. Toxicol.* 66, 369 – 379.
- Sreenivasalu, G., Sidrevi, P., Sahoo, P.K. *et al.*, 2009. Cloning and expression of StAR during gonadal cycle and hCG-induced oocyte maturation of air-breathing catfish, *Clarias gariepinus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 154, 6 – 11.
- Steinberg, C.E.W., Lorenz, R., Spienser, O.H., 1995. Effects of atrazine on swimming behavior of zebrafish, *Brachydanio rerio*. *Water Res.* 29, 981 - 985.
- Stocco, D.M., 2001. StAR protein and the regulation of steroid hormone biosynthesis. *Annu. Rev. Physiol.* 63, 193 - 213.
- Stocco, D.M., Clark, B.J., 1996. Role of the steroidogenic acute regulatory protein (StAR) in steroidogenesis. *Biochem. Pharmacol.* 51, 197 – 205.
- Stocco, D.M., Wang, X.J., Jo, Y., Manna, P.R, 2005. Multiple signaling pathways regulating steroidogenesis and steroidogenic acute regulatory protein expression: more complicated than we thought. *Mol. Endocrinol.* 19, 2647 – 2659.
- Storvik, M., Huuskonen, P., Kyllonen, T. *et al.*, 2011. Aflatoxin B1 – a potential endocrine disruptor – up-regulates CYP19A1 in JEG-3 cells. *Toxicol. Lett.* 202, 161 – 167.

Strobl-Mazzulla, P.H., Moncaut, N.P., Lopez, G.C., *et al.*, 2005. Brain Aromatase from pejerrey fish (*Odontesthes bonariensis*): cDNA cloning, tissue expression, and immunohistochemical localization. *Gen. Comp. Endocrinol.* 143, 21 – 32.

Suzawa, M., Ingraham, H.A., 2008. The herbicide atrazine activates endocrine gene networks via non-steroidal NR5A nuclear receptors in fish and mammalian cells. *Plos one* 3, 1 - 9.

Swan, S.H., 2006. Semen quality infertile US men in relation to geographical area and pesticide exposure. *Int. J. Androl.* 29, 62 – 68.

Tavera- Mendoza, L., Ruby, S., *et al.*, 2002. Reponse of the amphibian tadpole (*Xenopus laevis*) to atrazine during sexual differentiation of the testis. *Environ. Toxicol. Chem.* 21, 527 – 531.

Tchoudakova, A., Callard, G.V., 1998. Identification of multiple cyp19 genes encoding different cytochrome P450 aromatase isozymes in brain and ovary. *Endocrinol.* 139, 2179 – 2189.

Thurman, E.M., Cromwell, A.E., 2000. Atmospheric transport, deposition, and fate of triazine herbicides and their metabolites in pristine areas at Isle Royale National Park. *Environ. Sci. Technol.* 34, 3079 – 3085.

Torres, M.A., Barros, M.P., Campos, S.C.G., *et al.*, 2008. Biochemical biomarkers in algae and marine pollution: A review. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 71, 1– 15.

Trant, J., 1994. Isolation and characterization of the cDNA encoding the channel catfish (*Ictalurus punctatus*) form of cytochrome P450 aromatase. *Gen. Comp. Endocrinol.* 95, 155 – 168.

Tripathi, B.N., Metha, S.K., Amar, A., Gaur, J.P., 2006. Oxidative stress I (*Scenedesmus sp.*) during short and long-term exposure to Cu²⁺ and Zn²⁺. *Chemosphere*. 62, 538 – 544.

Ueyama, T., Shirasawa, N., Numazawa, M., 2002. Gastric parietal cells: potent endocrine role in secreting estrogen as a possible regulator of gastro-hepatic axis. *Endocrinology*. 143, 3162 – 3170.

USEPA, 2002. Summary of Atrazine Risk Assessment; United States Environmental Protection Agency: Washington, DC, 2002. http://www.epa.gov/oppsrrd1/registration/atrazine/srrd_summary_may02.pdf.

USEPA, 2003. Transmittal of Meeting Minutes of the FIFRA Scientific Advisory Panel meeting held June 17-20, 2003. August 4, 2003.

Vera, Y.M., Carvalho, R.J., Torem, M.L. Calfa, B.A., 2009. Atrazine degradation by in situ electrochemically generated ozone. *Chem. Eng. J.* 155, 691 – 697.

Vonhofsten, J., Olsson, P.E., 2005. Zebrafish sex determination and differentiation:

Involvement of FTZ-F1 genes. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 3, 63.

Wolff, M.S., Toniolo, P.G., Leel, E.W., *et al.*, 1993. Blood levels of organochlorine residues and risk of breast cancer. *J. Natl .Cancer Inst.* 85, 648 – 652.

Wolff, M.S., Berkowitz, G.S., Brower, S., *et al.*, 2000. Organochlorine exposures and breast cancer risk in New York City women. *Environ. Res.* 84, 151 – 161.

Yan, H.Y., 1986. Report of a naturally masculinized female of the Clear Creek gambusia, *Gambusia heterochir*. *Hubbs. J. Fish Biol.* 28, 55 - 60.

Yao, J.K., Reddy, R., McElhinny, L.G., van Kammen, D.P., 1998. Effects of haloperidol on antioxidant defense system enzymes in schizophrenia. *J. Psych. Res.* 21, 274 – 280.

Zhang, X., Xie, P., Li, D., *et al.*, 2009. Time-dependent oxidative stress responses of Crucian carp (*Carassius auratus*) to intraperitoneal injection of extracted microcystins. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 82, 574 – 578.

Zhu, W., Mantione, K., Jones, D., *et al.*, 2003. The presence of 17-beta estradiol in *Mytilus edulis* gonadal tissues: evidence for estradiol isoforms. *Neuro. Endocrinol. Lett.* 24, 137 – 140.