

Universidade Federal do Rio Grande - FURG
Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas
Fisiologia Animal Comparada - PPGCF

**Efeitos da exposição ao atrazina na diferenciação sexual e
na reprodução de filhotes de *Poecilia vivipara***

Graciela Quintana Saalfeld

Dissertação de defesa no âmbito do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas – Fisiologia Animal Comparada para a obtenção do grau de MESTRE em Fisiologia Animal Comparada.

Orientador: Elton Pinto Colares

Rio Grande, Maio de 2012

Dedico este trabalho aos meus pais, Selmar e Alvina, fonte de inspiração e exemplo de esforço e dedicação, e ao meu noivo, Christian, companheiro de todos os momentos.

Agradecimentos

Primeiramente agradeço a Deus por ter me dado forças e iluminado o meu caminho, para que pudesse concluir mais uma etapa em minha vida;

Minha eterna gratidão aos meus pais Selmar e Alvina, por todo o amor, dedicação, educação, paciência e confiança;

Ao meu irmão Robison pela amizade e apoio;

Ao meu noivo Christian por ter acreditado em meu potencial, pelo incentivo, colaboração e compreensão e por ser um verdadeiro amigo e companheiro em todos os momentos que passamos juntos.

A vó Eva, por ter me acolhido tão bem em sua casa, pelo carinho, atenção e por ser um exemplo de vida para mim;

A tia Eliane, Danny, Thiaguinho, Marina, Isabelle, Bruy, Igor, Cauã, pela amizade e pela acolhida em Rio Grande;

Aos meus sogros, Rubens e Luciane e meus cunhados Thiago e Priscila, pelo carinho e incentivo, mesmo distantes sei que torcem por mim;

Ao meu orientador Elton pelos ensinamentos, paciência, dedicação e disponibilidade, sem os quais seria impossível a realização deste trabalho;

Aos professores Antônio Sérgio e Carine, além da equipe do laboratório de Reprodução Animal da Universidade Federal de Pelotas, pela realização das análises espermáticas, pelos ensinamentos importantes e pela disponibilidade e disposição de trabalho inclusive nos fins de semana;

Aos amigos que fiz durante o curso, pela verdadeira amizade que construímos em particular aqueles que estavam sempre ao meu lado (Renatinha, Felipe, Cynthia, Miguel, João Henrique, Natinha, Cris, Rodrigo). Sem vocês essa trajetória não seria tão prazerosa;

Aos meus queridos amigos Tatiane e Gilson, por todo o auxílio e disponibilidade nos “intermináveis” fins de semana e feriados de trabalho;

A Cyntia Harayashiki, colega de pós-graduação, pelos ensinamentos das técnicas histológicas e pela paciência com que esclareceu as minhas dúvidas;

A Pati, do Laboratório de Microcontaminantes Orgânicos e Ecotoxicologia Aquática (CONECO), pelo fornecimento da solução estoque de Atrazina;

A Carol e a Glauce pelo auxílio e orientação nas técnicas realizadas nos laboratórios de Histologia e Toxicologia;

Aos membros da banca de avaliação por aceitarem o convite e pelas futuras correções e sugestões que certamente irão enriquecer este trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Animal Comparada;

A CAPES e ao INCT-TA, pelo apoio financeiro para a execução desse projeto.

E finalmente, agradeço a todos que me ajudaram direta ou indiretamente para o desenvolvimento deste trabalho. Um MUITO OBRIGADA a todos vocês!

*Mudam-se os tempos, mudam-se as vontades,
Muda-se o ser, muda-se a confiança;
Todo o mundo é composto de mudança,
Tomando sempre novas qualidades.*

Luís de Camões

Sumário

Resumo	1
1. Introdução.....	3
2. Objetivos.....	13
2.1. Objetivo geral	13
2.2. Objetivos específicos.....	13
3. Artigo.....	14
Atrazine affects sexual differentiation and reproduction of guppies (<i>Poecilia vivipara</i>).....	15
Abstract.....	16
1. Introduction	17
2. Material and Methods.....	19
2.1. Fish culture and maintenance.....	19
2.2. Experimental groups	19
2.3. Atrazine exposure and fish sampling	19
2.4. Histological analysis	20
2.5. Spermatic analysis.....	20
2.6. Statistical analysis	22
3. Results	22
3.1. Sex Ratio	23
3.2. Diameter of ovarian follicles and maturation.....	23
3.3. Spermatogenesis stages	23
3.4. Sperm parameters.....	24
4. Discussion.....	24

5. Conclusion.....	28
6. Acknowledgements	28
7. References	28
4. Conclusões gerais	42
5. Referências bibliográficas	43

Resumo

A crescente utilização de agrotóxicos na agricultura nacional, aliada ao seu uso incorreto, causa a contaminação de corpos d'água, gerando assim impactos em diversas espécies não alvos. O herbicida atrazina é muito utilizado no Brasil para o controle de ervas daninhas em culturas de milho e cana de açúcar. Apesar da natureza seletiva deste herbicida, diversos estudos reportam efeitos danosos do atrazina na capacidade reprodutiva de diversas espécies de animais. A espécie *Poecilia vivipara* é um peixe encontrado em todo Brasil e que apresenta grande resistência a ambientes poluídos. Este trabalho avaliou os efeitos do atrazina em aspectos reprodutivos de machos e fêmeas de *Poecilia vivipara* expostos ao herbicida em diferentes estágios de vida. Para a realização do experimento foram utilizados filhotes da espécie *Poecilia vivipara* em diferentes estágios de vida (nascimento, 2 e 3 meses), expostos via água a diferentes concentrações de atrazina (2, 10 e 100 µg/L) e aos controles (com e sem metanol) por um mês. Análises histológicas nas gônadas de fêmeas foram realizadas, com o objetivo de verificar os estágios de desenvolvimento folicular e o diâmetro folicular. Nos machos, foram analisados histologicamente os diferentes estágios de espermatogênese. Também foi verificada a capacidade espermática através da análise da integridade de DNA, funcionalidade mitocondrial, integridade de membrana, viabilidade e número total de espermatozoides. Os resultados mostraram que a exposição à maior concentração de atrazina (100 µg/L), aumentou a porcentagem de fêmeas em relação ao de machos. O crescimento dos folículos ovarianos foi inibido nas fêmeas expostas ao controle metanol, quando comparado com o controle água. A exposição ao atrazina, em todos os estágios de vida, estimulou o crescimento folicular quando comparada ao controle metanol. No entanto a maturação das fêmeas não foi afetada em nenhum dos tratamentos e estágios analisados. Nos machos, os estágios da espermatogênese não foram alterados, porém a capacidade espermática em

machos expostos aos 3 meses de vida ao atrazina foi reduzida. Houve uma diminuição no número de células espermáticas com DNA íntegro na concentração de 10 µg/L; no número de células espermáticas com mitocôndrias funcionais na concentração de 100 µg/L e na integridade de membrana dos espermatozóides nas concentrações de 10 e 100 µg/L. Portanto, esses dados demonstram que a exposição ao atrazina prejudicou a reprodução da espécie *Poecilia vivipara*, causando uma desproporção sexual e reduzindo a capacidade espermática dos machos.

1. Introdução

Os agrotóxicos são substâncias químicas utilizadas na produção agrícola e na pastagem, com a finalidade de alterar a composição destes e, assim, preservá-los frente à ação danosa de pragas e doenças, que podem reduzir os ganhos econômicos, diminuindo a produtividade agrícola (Rodrigues, 2008).

Durante os anos 90, o Brasil ocupava uma posição de destaque mundial na venda de agrotóxicos (Binetin e Devillers, 1996). Mas foi na última década que o uso de agrotóxicos no Brasil assumiu proporções assustadoras. Entre os anos de 2001 e 2008 o movimento financeiro gerado com a venda de produtos agrícolas no país saltou de pouco mais de US\$ 2 bilhões para mais US\$ 7 bilhões, quando alcançamos a posição de maior consumidor mundial de agrotóxicos. Em 2010, o faturamento desse mercado subiu para US\$ 7,2 bilhões (Londres, 2011). Existem atualmente 366 ingredientes ativos para uso agrícola registrados no Brasil, pertencentes a mais de 200 grupos químicos diferentes, que dão origem a 1.458 produtos formulados para venda no mercado. São inseticidas, fungicidas, herbicidas, nematicidas, acaricidas, rodenticidas, moluscidas, formicidas, reguladores e inibidores de crescimento. Os herbicidas sozinhos representam 48% deste mercado, seguidos pelos inseticidas (25%) e pelos fungicidas (22%) (Pelaez *et al.*, 2009).

Assim, o uso incorreto e exagerado desses produtos representa uma das maiores fontes de poluentes aplicados nos ambientes terrestres e aquáticos em todo o mundo (Spanò *et al.*, 2004). Entretanto, já foi comprovado através de diversos estudos (Ramalho *et al.*, 2000; Dores e De-Lamonica-Freire, 2001; Peres *et al.*, 2003) que a presença de agrotóxicos nos sistemas hídricos é mais comum do que se imaginava, principalmente nos sistemas hídricos próximos a regiões agrícolas de intensa utilização de agrotóxicos.

A contaminação dos ambientes aquáticos pode ocorrer pela aplicação intencional, no tratamento sanitário dos cultivos aquáticos, ou por meio do escoamento superficial, a partir de aplicações em áreas agrícolas e pecuárias (Figura 1). A infiltração dos agrotóxicos através do solo pode ocasionar a contaminação de lençóis freáticos (Edwards, 1973). Alguns agrotóxicos e/ou metabólitos podem também retornar à atmosfera por volatilização (Nimmo, 1985). Estima-se que mais de 700 diferentes compostos orgânicos, particularmente agrotóxicos e seus produtos de degradação, tais como surfactantes, fenóis e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, possam ser encontrados na água (Gascón *et al.*, 1997).

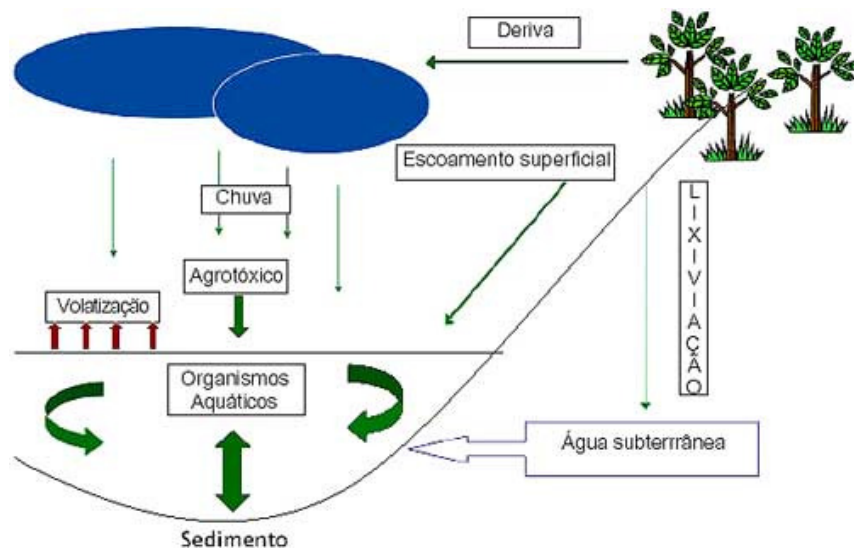


Figura 1. Contaminação de ambientes aquáticos (adaptado de Nimmo, 1985).

Esses compostos, quando presentes em corpos d'água, são capazes de penetrar em organismos aquáticos por diferentes vias. A taxa de acumulação depende da disponibilidade e da persistência do contaminante na água, e especialmente das características físicas e químicas desses compostos (Spacie e Hamelink, 1985). Os peixes podem acumular agrotóxicos em concentrações muito maiores que aquelas encontradas nas águas em que vivem, pois tais compostos têm a capacidade de aglutinar-se nas partículas em suspensão, sendo facilmente ingeridos pelos organismos aquáticos (Nimmo, 1985). Além da ingestão,

esses compostos químicos podem também ser absorvidos através das brânquias e da pele (Schlenk, 2005).

Estudos mostram que diversos agrotóxicos atuam como desreguladores endócrinos (Cooper *et al.*, 1999; Koifman *et al.*, 2002; Olea-Serrano *et al.*, 2002). Uma das definições mais aceitas e empregadas pela comunidade científica e entidades reguladoras é a de que um desregulador endócrino é toda substância exógena que interfere com a síntese, armazenamento/liberação, transporte, metabolismo, atividade conjugadora ou eliminação de hormônios naturais responsáveis pelo desenvolvimento e pela regulação da homeostase (Koifman e Paumgartem, 2002; Olea-Serrano *et al.*, 2002). Entre esses compostos está incluído um grande número de herbicidas (Eroschenko, 1981; Chambers, 1984; Johnson *et al.*, 1992). Esses compostos, por persistirem no ambiente, constituem um risco para os seres humanos e animais silvestres (Campagna *et al.*, 2007).

Postula-se que herbicidas possam provocar uma variedade de efeitos adversos nas espécies, incluindo distúrbios no trato reprodutivo e redução na aptidão reprodutiva (Gray *et al.*, 1997). A exposição aos herbicidas pode contribuir para a infertilidade, sendo relacionada a baixas taxas de gravidez em ratos (Auger *et al.*, 1995; Zinaman *et al.*, 1996); morte fetal intra-uterina, deformações no nascimento em humanos (Shepard, 1986); além de falha ovariana em bovinos (Pocar *et al.*, 2003). Em peixes os efeitos reportados da exposição aos herbicidas incluem inibição do crescimento gonadal, redução no número e na qualidade das células germinativas, feminilização em machos e masculinização em fêmeas (Arukwe, 2001).

Dentro desse contexto, destaca-se o herbicida atrazina (2-chloro-4-ethylamino-6-isopropylamino-s-triazine) (Fig. 2). Esse composto pertence ao grupo químico das triazinas, sendo registrado no Brasil exclusivamente para uso na agricultura. Esse herbicida é empregado nas culturas de algodão, milho, soja, feijão, abacaxi, sorgo e cana-de-açúcar, e no preparo de áreas para plantio; sendo utilizado para o controle seletivo de gramíneas e ervas

daninhas, pois inibe a fotossíntese dessas plantas (Binetin e Devillers, 1996; Steves e Summer, 1991). É considerado um potencial contaminante devido as suas características químicas, que incluem lipofilicidade, baixa hidrólise, moderada a baixa solubilidade em água, e maior solubilidade em matéria orgânica e tecido adiposo (Ross *et al.*, 2009). Segundo Eisler (1989), o atrazina é persistente em solo e água e sua meia-vida pode variar de 2 a 300 dias em água e de 20 a 385 dias em solo. A alta salinidade e o pH ácido são alguns fatores que favorecem a degradação do atrazina na água. Para o solo, os fatores que aceleram sua degradação são alta umidade, temperaturas elevadas, alta porcentagem de matéria orgânica, alta densidade microbiana, pH ácido, alta incidência de raios ultravioletas e disponibilidade nas camadas superficiais do solo.

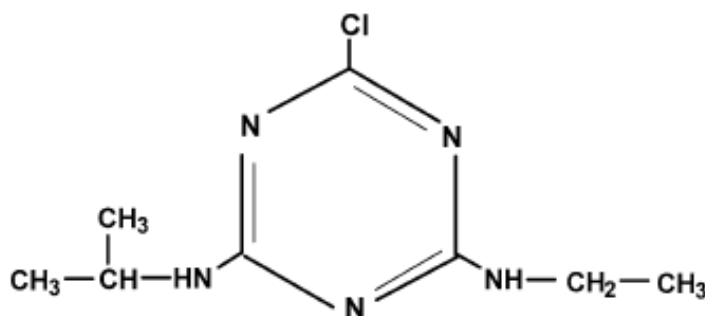


Figura 2. Estrutura química do atrazina (Adaptado de Cox, 2001).

O uso intensivo do atrazina no mundo e sua considerável mobilidade nos solos têm contribuído para que níveis acima do limite permitido sejam frequentemente detectados em águas superficiais e subterrâneas. Países da Comunidade Européia adotam como concentração máxima admissível de defensivos agrícolas, o valor de 0,1 µg/L por composto na água potável (Walker *et al.*, 2000). No Brasil, o Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) estabelece para o atrazina o valor máximo aceitável de 2 µg/L (CONAMA, 2005). No entanto

concentrações de atrazina maiores do que a permitida pelo CONAMA são frequentemente encontradas próximas de campos de cultivo no Brasil (Armas *et al.*, 2007).

Recentemente, diversos estudos têm reportado os efeitos do atrazina como desregulador endócrino em mamíferos, anfíbios e peixes (Stanko *et al.*, 2010; Hayes *et al.*, 2003, 2006; Tavera-Mendoza *et al.*, 2002a,b; Carr *et al.*, 2003; Spanò *et al.*, 2004; Orton *et al.*, 2006).

O mecanismo pelo qual o atrazina desregula o sistema endócrino foi revelado recentemente. Ele se liga e inibe a enzima fosfodiesterase (PDE) na célula. A inibição da fosfodiesterase aumenta os níveis de AMPc, o que resulta em uma elevação na transcrição do gene CYP 19 que codifica para a enzima aromatase. A função da aromatase é converter a testosterona em estrógeno, assim o efeito final causado pelo atrazina é uma elevação dos níveis de estrógenos nos organismos (Fan *et al.*, 2007).

O efeito estrogênico do atrazina já foi demonstrado em diversos animais, tais como mamíferos (Victor-Costa *et al.*, 2010), aves (Wilhelms *et al.*, 2006), anfíbios (Coady *et al.*, 2005) e peixes (Spanò *et al.*, 2004); assim como a redução na concentração de testosterona em machos adultos de sapos (Hecker *et al.*, 2005), ratos (Stoker *et al.*, 2000; Zirkin *et al.*, 2001) e peixes (Spanò *et al.*, 2004). Dessa forma, pesquisas sugerem que esse desequilíbrio hormonal causado pelo atrazina seja responsável pela feminilização parcial verificada em gônadas de machos de peixes (Tillitt *et al.*, 2010), anfíbios (Hayes *et al.*, 2010) e répteis (De Solla *et al.*, 2006).

Além disso, a exposição ao atrazina no período gestacional e no início do desenvolvimento dos filhotes de ratos causou atrasos na puberdade (Rayner *et al.*, 2007), alterações no desenvolvimento reprodutivo e diminuição nas concentrações de testosterona no plasma em machos (Rosenberg *et al.*, 2008). Em ratas adultas expostas oralmente ao atrazina

por 21 dias na dosagem de 75 – 300 mg/Kg, foram observadas irregularidades nos ciclos estrais e alterações morfológicas nos ovários (Cooper *et al.*, 1996). Ademais, a exposição ao atrazina diminui o sucesso de acasalamento (baixas taxas de gravidez) (Simic *et al.*, 1994) e também aumenta a incidência de tumores nas glândulas mamárias (Wetzel *et al.*, 1994). Em ratos machos adultos, expostos oralmente a 120 ou 200 mg/Kg de atrazina durante 7 e 16 dias, foram observados efeitos no número de espermatozóides nos testículos e epidídimo, na motilidade, viabilidade, morfologia e produção diária de esperma (Abarikwu *et al.*, 2009). Além disso, estudos apontam que a exposição ao atrazina causa diminuição da taxa de migração espermática, mudanças histopatológicas nos testículos e redução da concentração de proteínas testiculares (Rosenberg *et al.*, 2008).

Em peixes, Tillitt *et al.* (2010) verificaram anormalidades gonadais, como folículos atresícos e cistos ovarianos em fêmeas de peixes da espécie *Pimephales promelas*, expostas ao atrazina. Em machos da mesma espécie foi verificado material mineralizado nos túbulos seminíferos e ductos eferentes, degeneração das membranas intersticiais dos testículos além de inflamações granulomatosas. Também em *Pimephales promelas* foi observada uma diminuição na produção de ovos (fecundidade), redução nas taxas de fertilização, e reduções na maturação dos espermatozóides e no Índice Gonadossomático (GSI), devido à exposição ao atrazina (Bringolf *et al.*, 2004). Em machos da espécie *Carassius auratus* expostos a 1.000 µg/L de atrazina por 21 dias, houve uma supressão nos hormônios testosterona e 11-ketotestosterona e um aumento de 17β-estradiol (Spanò *et al.*, 2004).

O herbicida atrazina também pode ser responsável pela indução de estresse oxidativo, interferindo em diferentes parâmetros fisiológicos e produzindo espécies reativas de oxigênio (EROs) em peixes (Piancini, 2011). Assim, os peixes são dotados de mecanismos de defesa para neutralizar o impacto de EROs resultantes do metabolismo de vários poluentes químicos. A primeira linha de defesa consiste nas moléculas antioxidantes, como a glutatona (GSH),

vitamina C, E, e os carotenóides (Martínez-Álvarez *et al.*, 2005). Outro mecanismo de defesa é composto por enzimas antioxidantes, incluindo as enzimas eliminadoras de radicais: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), entre outras (Valavanidis *et al.*, 2006).

O estresse oxidativo ocorre quando há um desequilíbrio entre a razão de pró-oxidantes e antioxidantes, levando a produção de EROs. Dessa forma, a exposição a contaminantes ambientais, tais como o herbicida atrazina, modula os sistemas antioxidantes de defesa e causa danos oxidativos em organismos aquáticos através da produção de EROs (Risso-de Facerney *et al.*, 2001; Banudevi *et al.*, 2006). Espécies reativas de oxigênio, tais como: peróxido de hidrogênio (H₂O₂), ânion superóxido (O²⁻) e radical hidroxila (OH[·]) em níveis elevados, podem reagir com macromoléculas biológicas levando à inativação de enzimas, peroxidação lipídica, danos de DNA e até morte celular (Peña-Llopis *et al.*, 2003; Banudevi *et al.*, 2006).

Diversos estudos têm reportado o envolvimento do atrazina com a indução do estresse oxidativo. Jin *et al.*, (2010) verificaram aumento nas atividades das enzimas antioxidantes CAT e SOD no fígado e gônadas de *Danio rerio*, após exposição ao atrazina. Além disso, estudos apontam aumento nos níveis de peroxidação lipídica (Abarikwu *et al.*, 2009; Dehkhargani *et al.*, 2011) e maior incidência de danos no DNA celular (Nwani *et al.*, 2010; Feyzi-Dehkhargani *et al.*, 2012) em animais após exposição ao atrazina.

A espécie *Poecilia vivipara*, objeto do presente estudo, pertence à família Poeciliidae, grupo dos Cyprinodontiformes. Essa espécie é conhecida popularmente como Guarú ou Barrigudinho, assim denominada graças às feições arredondadas que a região abdominal assume quando as fêmeas estão grávidas (Betito, 2006). Distribui-se praticamente no Brasil inteiro, por ter sido introduzida para o combate a larvas do mosquito transmissor da dengue (Santos, 1958). É um peixe muito resistente, que suporta água poluída e com baixo teor de

oxigênio. Apresenta o corpo alongado, sendo os machos geralmente menores, atingindo um tamanho máximo de 6 cm, enquanto que as fêmeas chegam a 8 cm (Montenegro *et al.*, 2009).

Os Poecilídeos apresentam um desenvolvimento direto com fecundação interna e o desenvolvimento dos filhotes ocorre internamente, com a liberação destes ocorrendo apenas quando estão aptos a viver independentemente; enquanto isso não ocorre, os nutrientes são fornecidos pelo saco vitelino (Vazzoler, 1996). A gestação é estimada em 28 dias (Betito, 1999).

As fêmeas de *Poecilia vivipara* possuem a capacidade de reter o esperma de uma cópula para várias fecundações sucessivas (Wourms *et al.*, 1988) sem necessitar de novos reencontros com os machos para reproduzir (Betito, 1999).

A gônada feminina de *Poecilia vivipara* é ímpar, resultado da anastomose dos dois ovários, formando uma espécie de bolsa de tecido germinativo com os oócitos (Figura 3). Rocha *et al.* (2011), observaram a existência de oócitos, embriões e larvas ocorrendo simultaneamente no mesmo estágio de desenvolvimento ovariano em fêmeas adultas, após ter ocorrido a fecundação, indicando que o ciclo reprodutivo ocorre em curto período de tempo, o que pode ser considerado uma vantagem reprodutiva para essa espécie. O oviduto é um canal curto e reto, em posição central na gônada, por onde ocorre a fecundação dos oócitos e os embriões alcançam o meio externo (Marcant, 1972).

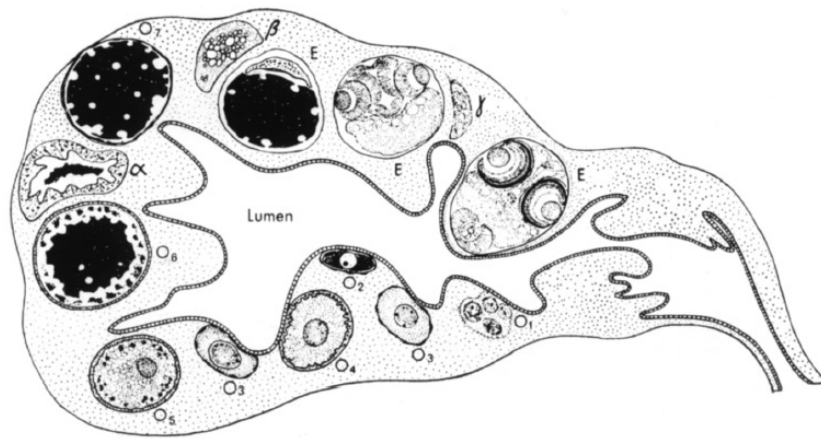


Figura 3. Representação esquemática de um corte transversal de um ovário de Poecílideo. O₁ – O₇: oócitos em diferentes estágios de desenvolvimento; E: embriões; α, β e γ: estágios de atresia folicular. (Lambert, 1970).

Os machos possuem um gonopódio formado pela modificação da nadadeira anal, sendo o órgão utilizado durante a cópula (Vazzoler, 1996). Os testículos dos poecílideos são desiguais em tamanho, formando gônadas assimétricas (Betito, 2006). Os túbulos seminíferos contêm cistos com os diferentes estágios da espermatogênese (Kinnberg *et al.*, 2000) (Figura 4). Na região periférica dos túbulos, encontram-se as espermatogônias (primeiro estágio) associadas às células de Sertoli. Na região mediana encontram-se os espermatócitos (segundo estágio). Em direção ao centro, é possível observar as espermátides (terceiro estágio). Nessa região também ocorre a espermiogênese. Na região central do testículo, os túbulos apresentam espermatozóides livres (quarto estágio) ou reunidos em espermatozeugmatas, que consistem em conjuntos de espermatozóides com as cabeças voltadas para o epitélio tubular e as caudas para o lúmen tubular (Grier, 1981). Pires *et al.* (2011) sugerem que a organização dos espermatozóides em espermatozeugmata pode facilitar a transferência espermática até o poro genital das fêmeas por meio do gonopódio, uma vez que o meio aquático é capaz de dispersar os gametas masculinos, diminuindo assim a eficiência da fecundação dos Poecílideos.

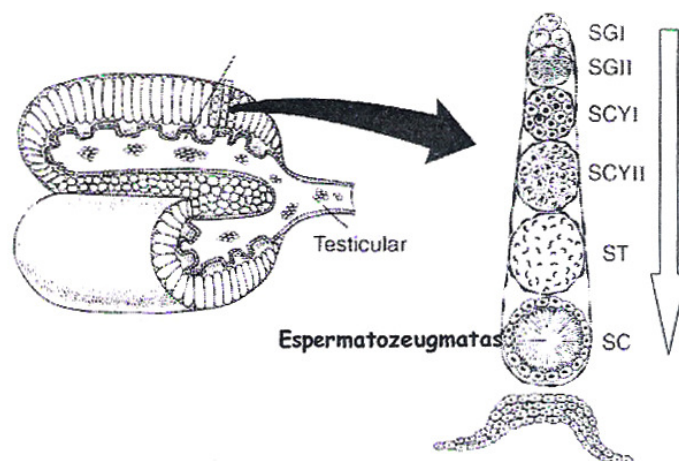


Figura 4. Representação esquemática de um corte de testículo de Poecilídeo, destacando os estágios da espermatogênese - SGI e SGII: espermátogônias I e II; SCYI e SCYII: espermátócitos I e II; ST: espermátides e SC: espermatózeugmata (Grier, 1981).

A avaliação e o monitoramento da morfologia reprodutiva em peixes têm se mostrado mecanismos úteis para o estudo dos efeitos de substâncias químicas, que atuam como desreguladores endócrinos em populações selvagens. Esses químicos podem alterar o comportamento e as características sexuais secundárias, além de induzirem alterações a nível celular e tecidual das gônadas de peixes, alterando dessa forma a capacidade reprodutiva. Desse modo, salienta-se a importância da realização de estudos de histologia gonadal e análise espermática, para verificar os possíveis efeitos desses contaminantes na morfologia reprodutiva das espécies.

Além disso, as disfunções morfológicas no aparelho reprodutivo e o aumento da ocorrência de fêmeas em populações da espécie *Poecilia vivipara* podem causar reduções no número de indivíduos dessas populações. Tais implicações impactam o ambiente, pois uma redução drástica nessas populações levaria à extinção da espécie. Outro ponto fundamental, ao considerar os impactos da diminuição da população da espécie *Poecilia vivipara*, é seu

papel no controle biológico, posto que larvas de mosquitos e de outros vetores fazem parte de sua alimentação.

Tendo em vista tais constatações, o presente estudo mostra-se importante para elucidar as respostas morfológicas de indivíduos da espécie *Poecilia vivipara* expostos ao atrazina, que em estudos anteriores mostrou-se um potente disruptor endócrino em diversas espécies.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Verificar os efeitos do atrazina em aspectos reprodutivos de filhotes da espécie *Poecilia vivipara*, expostos ao herbicida em diferentes estágios de vida.

2.2. Objetivos específicos

- Determinar o sexo de filhotes expostos a diferentes concentrações de atrazina, em distintos estágios de vida;
- Verificar os estágios de desenvolvimento dos folículos ovarianos em fêmeas expostas a diferentes concentrações do atrazina, em distintos estágios de vida;
- Quantificar o menor diâmetro dos folículos ovarianos de fêmeas expostas a diferentes concentrações do atrazina, em distintos estágios de vida;
- Analisar o desenvolvimento da espermatogênese de machos expostos a diferentes concentrações do atrazina, em distintos estágios de vida;
- Analisar os parâmetros espermáticos (integridade de membrana, funcionalidade mitocondrial, dano de DNA, viabilidade e número total de espermatozóides) em machos expostos a diferentes concentrações de atrazina, em distintos estágios de vida.

3. Artigo

Este artigo encontra-se de acordo com as normas exigidas pela revista
“Aquatic Toxicology”, à qual será submetido.

Atrazine affects sexual differentiation and reproduction of guppies (*Poecilia vivipara*)

Graciela Quintana Saalfeld¹; Tatiane Rossales Xavier²; Gilson Junior Cordeiro²; Guilherme Rizzoto³; Antonio Sergio Varela Junior²; Carine Dahl Corcini^{1,3}; Elton Pinto Colares^{1,2*}

¹ Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas: Fisiologia Animal Comparada, Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Avenida Itália, Km 8 s/n, Caixa Postal 474, Cep: 96201-900, Rio Grande, RS, Brasil.

² Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Avenida Itália, Km 08 s/n, Caixa Postal 474, Cep: 96201-900, Rio Grande, RS, Brasil.

³ Faculdade de Veterinária – UFPel, Campus Universitário s/n, Cep: 96010-900, Pelotas, RS, Brasil.

*Corresponding author:

Elton Pinto Colares

Universidade Federal de Rio Grande – FURG

Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas; Instituto de Ciências Biológicas.

Avenida Itália, Km 08 s/n, Caixa Postal 474, Cep: 96201-900, Rio Grande, RS, Brasil.

Tel./Fax: 53 3230 6854

e-mail address: eltoncolares@furg.br

Abstract

Atrazine is an herbicide known to affect the reproductive capacity of several species. The present study evaluated the reproductive aspects of males and females of *P. vivipara* after exposure to atrazine. Fish at distinct life stages (newborns, 2 and 3 months) were exposed to different atrazine concentrations: 0 (control groups with and without methanol), 2, 10 and 100 $\mu\text{g/L}$, during one month. The results have shown an increase larger than 70% in female gender at the highest atrazine concentration (100 $\mu\text{g/L}$), in all life stages studied. The females maturity was not affected, although follicular diameter was reduced in females exposed to methanol during newborn stage, two and three months (364 ± 139 , 291 ± 35 and 349 ± 140 μm respectively), when compared to control water (604 ± 97 μm). Exposure to atrazine, at all concentrations and life stages, increased follicle diameter, when compared to control methanol, presenting follicular diameter greater than 461 ± 157 μm . Three months old exposed males presented a percentual reduction of cells with intact DNA in the atrazine treated group, at the concentration of 10 $\mu\text{g/L}$ ($18\% \pm 25\%$), when compared to water and methanol control groups ($90\% \pm 16\%$ and $92\% \pm 12\%$). The mitochondrial function was also affected in animals exposed at 3 months of life to a 100 $\mu\text{g/L}$ ($33\% \pm 15\%$) concentration compared with the percentages found in water and methanol controls ($76\% \pm 15\%$ and $83\% \pm 8\%$). Furthermore, there was a reduction in the percentage of intact sperm membranes in animals exposed to concentrations of 10 $\mu\text{g/L}$ ($43\% \pm 11\%$) and 100 $\mu\text{g/L}$ ($40\% \pm 12\%$) when compared with water and methanol control ($85\% \pm 10\%$ and $80\% \pm 10\%$). However, the effects in males were not permanent. These results showed that atrazine impairs *Poecilia vivipara* reproduction causing sexual disparity in populations and reducing male sperm capacity.

Keywords: Atrazine; *Poecilia vivipara*; follicular diameter; sperm capacity

1. Introduction

The indiscriminate use of herbicides in crops aiming to increase food production generates impacts over non-target organisms, particularly aquatic species and their environment. Atrazine (2-chloro-4-ethylamino-6-isopropylamino-1,3,5-triazine) is a herbicide widely used in many countries for weeds and grasses control in crops (Solomon *et al.*, 2008). The mentioned herbicide is widely used in Brazil's sugar cane and corn cultures and is considered a potential contaminant due to its chemical properties, such as lipophilicity, low hydrolysis, low to moderate water solubility and high solubility in organic matter and adipose tissue (Ross *et al.*, 2009).

Although atrazine is a selective herbicide, studies have been shown toxicity in many animals such as mammals, amphibians and fish (Stanko *et al.*, 2010, Solomon *et al.*, 2008, Rohr and McCoy, 2010). Studies reported that individuals exposed to atrazine have shown decreased immune responses (Rymuszka *et al.*, 2007, Tierney *et al.*, 2007), oxidative stress (Fatima and Ahmad, 2006; Abarikwu *et al.*, 2009), mutagenic and genotoxic effects (Ventura *et al.*, 2008), disturbances on fish osmoregulation and ionic balance (Waring and Moore, 2004) as well as on reproduction (Tillitt *et al.*, 2010, Victor-Costa *et al.*, 2010, Davis *et al.*, 2010).

Concerning reproduction, previous studies have shown that atrazine induces the expression and activity of aromatase (Hayes *et al.*, 2002; Islam *et al.*, 2002; Fan *et al.*, 2007; Dong *et al.*, 2009). Aromatase is an enzyme that promotes the conversion of androgens into estrogens hormones (Sanderson *et al.*, 2001). The effect of atrazine over aromatase results in

increased production of estrogen and decreased testosterone levels, already described in several species (Spanò *et al.*, 2004, Hecker *et al.*, 2005; Suzawa and Ingraham, 2008). There are studies suggesting that the hormonal imbalance caused by atrazine is responsible for partial feminization observed in male fish (Tillitt *et al.*, 2010), amphibians (Hayes *et al.*, 2010) and reptiles (De Solla *et al.*, 2006) gonads.

Moreover, it has been reported that atrazine exposure affects the reproductive capacity of several species. Studies in females report increased incidence of mammary tumors and delayed puberty in mammals (Wetzel *et al.*, 1994, Rayner *et al.*, 2007), reduced eggs production, decreased fertilization rates and gonadal abnormalities, such as atretic follicles and ovarian cysts in fish (Bringolf *et al.*, 2004; Spanò *et al.*, 2004). Atrazine exposure in males has shown a delay in sexual maturation, weight reduction of prostate and seminal vesicle, decrease in number and motility of spermatozoa in mammals (Trentacoste *et al.*, 2001; Abarikwu *et al.*, 2009), hermaphroditism in frogs (Hayes *et al.*, 2002) and changes in sex ratio of fishes and amphibians (Suzawa and Ingraham, 2008; Oka *et al.*, 2008).

Poecilia vivipara (Block and Schneider, 1801) is a neotropical euryhaline fish, widely distributed in Brazil, which shows sexual dimorphism, internal fertilization and ovoviviparity (Betito, 2006). This species is highly resistant to polluted environments. Based on this information and aware of the potential toxicity of atrazine herbicide, it is of great importance studying its effects over reproduction of resistant species which can be found in potentially contaminated areas. Therefore, this study aims to evaluate atrazine effects on reproductive aspects of *Poecilia vivipara*, males and females, exposed to the herbicide at different life stages.

2. Material and Methods

2.1. Fish culture and maintenance

Fish used in this study were descendants of healthy wild-type guppies (*Poecilia vivipara*) from Federal University of Rio Grande Aquatic Vivarium. Individuals were kept in tanks under constant aeration with water temperature maintained at 25 °C, pH 7.5, salinity 24 and 12h/12h photoperiod. The maintenance of these conditions was weekly verified. Animals were daily fed (TetraColor ®) at rate of 20% from their weight.

2.2. Experimental groups

One hundred eighty young fish divided into 3 groups, according to the age, were used. The fish distribution was as it follows: 60 newborns, 60 two months aged and 60 three months aged. Each 60 fish group was divided into 5 groups of 12 individuals each.

2.3. Atrazine exposure and fish sampling

Each group of animals was exposed to different concentrations of atrazine herbicide in the water. The concentrations used were 0 (control groups with and without methanol), 2, 10 and 100 µg/L, during one month. The aquarium water was renewed every day, thereby maintaining the indicated concentration. Concerning the chemical exposures, atrazine was firstly diluted in methanol (concentration of the stock solution 10 µg/L) then the solution was

dissolved in the aquarium water to obtain the required concentrations. Control group with methanol had 100 µg/L of methanol dissolved per liter of water.

After exposure period the animals were maintained in non-contaminated water, under controlled laboratory conditions, until they complete 4 months. Animals were further anesthetized with 1 g/L of Benzocaine solution until death and then sexed.

2.4. Histological analysis

The gonads (ovaries and testes) were removed, fixed in formalin 10% solution during 24h, dehydrated, cleared, impregnated and embedded in Paraplast Xtra (P 3808 - Sigma ®). Five micrometers thick sections were stretched on slides and stained, with hematoxylin and eosin, for histological analyzes.

The histological material of female gonads was registered by microphotography and analyzed by optical microscope. Oocytes distinct developmental stages were classified according to Rocha *et al.* (2011). The software Image J - Image Processing and Analysis in Java (National Institutes of Health - United States of Department of Health & Human Services - USA) was used to measure the smallest diameter of ovarian follicles in the later stage of development, before fertilization, in each female.

Histological analyzes of males were done, with an optical microscope, and the average of cysts at different stages of spermatogenesis was verified in each testicle.

2.5. Spermatic analysis

Sperm analyses were performed at the Laboratory of Animal Reproduction - Federal University of Pelotas. Males excised testicles were initially stored in a conical tube containing

1.5 ml of dilution solution (207 mM Sodium Chloride, 5.4 mM Potassium Chloride, 1.3 mM Calcium Chloride, 0.49 mM Chloride Magnesium, 0.41 mM Magnesium Sulfate, 10 mM Tris and pH 7.5) and further manually agitated to release the testicular sperm.

Aiming membrane integrity evaluation, an epifluorescence microscope, at 400x magnification (Olympus BX 51®, INC. America, São Paulo - Brazil), was used for mitochondrial functionality and DNA integrity.

Sperm cells DNA integrity evaluation was carried out after dilution of 20 µL of sperm in 5 µL of TNE (0.01 M of Tris-HCl, 0.15 M of NaCl, 0.001 M of EDTA and pH 7.2). Thirty seconds after dilution 20 µL of Triton 1x was added, and, after more thirty seconds, 5 µL of acridine orange (2 mg/mL in deionized H₂O) was added. The sperm cells presenting green fluorescence had their DNA considered intact while the remaining cells, showing red or orange fluorescence, had their DNA considered denatured (Bencharif *et al.*, 2008). Sperm DNA integrity quantification was performed by the relation between number of sperm cells, with intact DNA (green fluorescence), and total number of sperm cells in percentage values.

The functionality of sperm mitochondria was assayed by incubating 10 µL of sperm in 20 µL of rhodamine 123 (13 mM) solution, at a temperature of 20°C, for 10 minutes. Sperm cells showing green fluorescence (rhodamine positive) were considered as having functional mitochondria while cells showing no fluorescence (rhodamine negative) were classified as non-functional mitochondria (He and Woods, 2004). The rate of mitochondrial functionality was determined by the ratio between number of cells emitting green fluorescence and total number of cells.

Aiming to evaluate sperm membrane integrity, 10 µL of spermatic fluid was diluted in 20 µL of isotonic saline solution (1.7 mM formaldehyde, 20 mM carboxy fluorescent diacetate - CFDA, and 7.3 mM of iodide propidium -IP). The sperm cells presenting green fluorescence were considered intact, and those with red or green and red fluorescence were

considered not intact. The sperm membrane integrity was quantified by the ratio between number of cells showing green fluorescence and total number of cells analyzed, given in percentage values.

The sperm cells' membrane viability was evaluated by diluting 1 μL of sperm in 10 μL of a solution containing 5g of eosin Y and 10g of nigrosine homogenized in BTS. One minute after this procedure, a smear was prepared and then completely dried (Varela *et al.*, 2012). After this procedure, 200 sperm cells were counted using a bright field microscope for 1000x magnification objective. The membranes of sperm cells were considered viable when they remained colorless and nonviable when they presented pink or red colors (Maria *et al.*, 2012). The percentage of viable cells was quantified by the ratio between the amount of colorless cells and total number of cells.

The total number of sperm cells, into 500 μL of diluents solution, was determined by counting in a Neubauer chamber.

2.6. Statistical analysis

Sex percentage and ovarian maturation data were statistically analyzed using the chi-square test and follicular diameter stages, of spermatogenesis and sperm parameters data (membrane integrity, mitochondrial function, DNA integrity, viability and number total sperm), were analyzed by one-way Analysis of Variance - ANOVA, with comparison of means by Tukey test. Data were tested with the Cochran C., Hartley, Bartlett normality test.

3. Results

3.1. Sex Ratio

There was found an increase on females rate (female/total individuals) of more than 70% under the highest concentration of atrazine (100 µg/L) at all stages examined. Control groups (water and methanol) showed sex ratio of about 50% for each sex (Table 1).

3.2. Diameter of ovarian follicles and maturation

The follicular diameters of females treated with atrazine, at all concentrations and all stages of life, were very similar to those found in water control group. However, atrazine-treated females, at all stages of life, presented follicular diameters significantly higher ($p < 0.05$) when compared to methanol control group. The follicular diameters of methanol-treated females were significantly decreased when compared with water control group (Figure 1). The follicular diameters of females exposed to 100 µg/L atrazine during 2 months could not be verified because all the females presented embryos in development.

The follicular development stages analysis has shown that all females were mature and presenting follicles at development stages IV and V.

3.3. Spermatogenesis stages

The histological analysis performed in fish testes revealed that all animals exhibited all stages of spermatogenesis. The mean and standard deviation of cysts containing spermatogonia, spermatocytes, spermatids and presence of espermatozeugmatas, in water control group, was 15 ± 8 , 32 ± 11 , 53 ± 21 and 87 ± 50 respectively. There was no significant difference ($p \geq 0.05$) between treatments and water control group in all analyzed stages.

3.4. Sperm parameters

The sperm parameters analysis demonstrated that newborn and 2 months old animals exposed to atrazine, showed no differences between treatments in any of the investigated parameters. However, 3 months old males under the same treatment showed a significant reduction ($p < 0.05$) in the number of cells with intact DNA from the group treated with 10 $\mu\text{g/L}$ of atrazine, reduction in the number of cells with functional mitochondria in animals exposed to 100 $\mu\text{g/L}$ of the pesticide, and reduction of spermatozoa membrane integrity when exposed to greater or equal to concentrations of atrazine at 10 $\mu\text{g/L}$ (Figure 2).

4. Discussion

The phenotype of sex differentiation in fish can be easily affected by pollutants with estrogenic effects in the aquatic environment (Devlin and Nagahama, 2002, Segner *et al.*, 2003). Studies on zebrafish (*Danio rerio*) have shown an increase in the percentage of females compared to males after atrazine exposure (Suzawa and Ingraham, 2008). Concerning the experiments performed in our study, atrazine exposure at the highest concentration (100 $\mu\text{g/L}$) presented more than 70% of females in all analyzed stages.

The feminizing effect, observed in the present work, is pronounced in some fish species which, due to their sexual development, are more sensitive to compounds with estrogenic properties. For example, some poeciliidae species have a great sex reversal capacity when induced by hormonal level changes during the embryogenesis, after birth, or even after sexual maturity (Kavumpurath and Pandian, 1992). These fish also present gonadal

development in which all individuals initially develop ovaries and, under natural conditions, approximately half of the population transforms ovaries into testis (Yamamoto, 1969).

Therefore, the data suggest that exposure to 100 µg/L of atrazine may have increased estrogen levels in plasma which, combined with the remarkable ability of sex reversal of this species, stimulated the maintenance of ovaries in individuals exposed shortly after birth, or even the species sex reversal after maturation.

The maturation age of *P. vivipara* was not found in the literature. On the other hand, unpublished data from our research group have shown that *P. vivipara*, under laboratory conditions, begins its sexual maturation after 50 days of life. The evaluation of follicular development stages in fish is a useful study tool once it indicates the female maturity and fertility. Female sexual maturation was not affected by the exposure to atrazine, in the present study, since all examined females showed mature follicles in the development stages IV and V after four months of life. These data support previous studies showing no effects in follicular development stages after exposure to atrazine of *Carassius auratus* and *Pimephales promelas* adult females (Spanò *et al.*, 2004; Bringolf *et al.*, 2003).

Significantly lower follicular diameters were observed for females treated with methanol, at all stages, when compared to water control group. Such reduction evinces an inhibitory effect on follicular growth caused by methanol, possibly reducing estrogen concentration, as observed in rainbow trout (Harris *et al.*, 2001). The present work has shown that atrazine increases follicular diameter, at all concentrations and ages of exposure tested, when compared to methanol control group. The same result was formerly observed when atrazine caused increased estrogen levels (Gross *et al.*, 1997). The elevated estrogen level stimulates follicle growth as shown in the study realized in juvenile *Ranna pipiens* frogs exposed to 10 µg/L of atrazine during 12 weeks (Orton *et al.*, 2006).

The herbicide atrazine did not affect spermatogenesis in males since there was no quantitative difference in the distribution of sex cell types from testes. Similar results were also found in *Carassius auratus* exposed to 100 and 1000 µg/L of atrazine for 21 days (Spanò *et al.*, 2004). However, the adverse effects of atrazine over reproductive capacity were observed in birds (Hussain *et al.*, 2011). The present study has verified a reduction in spermatocytes number, the presence of spermatids with necrotic cores and low or complete absence of sperm in the seminiferous tubules. Some studies have reported, in mammals, decreased migration rate of sperm in epididymis; reduced sperm motility and total number of sperm cells (Kniewald *et al.*, 2000; Dehkhargani *et al.*, 2011). Relations between low quality semen and atrazine exposures in humans have also been reported (Swan *et al.*, 2003).

There was observed a reduction in sperm production of salmon after exposure to atrazine (Moore and Waring, 1998). However, in the present study, no differences were found between atrazine treatments in any of the evaluated stage concerning the total number of spermatozoa. Also, deleterious effects on spermatozoa of *P. vivipara* were found in the present work evidencing that exposure to atrazine, of at least 10 µg/L, affected sperm parameters of males.

Therefore, in the present study, atrazine caused reduction of mitochondrial function in sperm cells from males exposed to the higher concentration (100 µg/L) at 3 months of life. The mentioned effect can be assigned to the capacity of atrazine of binding to ATP synthase enzyme (Hase *et al.*, 2008). ATP binding decreases mitochondrial function, by inhibiting the oxidative phosphorylation process, and thereby impairing ATP production. Mattiazzi *et al.* (2004) have found that, when oxidative phosphorylation is inhibited, the level of reactive oxygen species (ROS) production can be considerably increased.

The membrane integrity of sperm cells was also adversely affected in males exposed in their third month of life to atrazine at 10 and 100 µg/L. Similar results were also observed

in sperm of mice exposed to atrazine (Dehkhargani *et al.*, 2011; Feyzi-Dehkhargani *et al.*, 2012). Furthermore, studies examining the effects of atrazine in testis and epididymis of rats have found increased lipid peroxidation levels (Abarikwu *et al.*, 2009; Dehkhargani *et al.*, 2011) with consequent decrease in the enzymatic activity of the antioxidant enzymes glutathione-S-transferase (GST) and superoxide dismutase (SOD), in testis and epididymis, and catalase (CAT) in the epididymis (Abarikwu *et al.*, 2009). Thus, the data presented in the present work suggest that an increase in ROS production, induced by atrazine, may have caused lipid peroxidation culminating in membrane damage of sperm cells. Furthermore, increased ROS in sperm cells changes the membrane functionality by inactivating receptors and enzymes present in the membrane and reducing its fluidity (Halliwell, 2000).

The present study has also showed that males exposed to 10 µg/L of atrazine, at 3 months of life, presented a reduction in the number of cells with intact DNA. Such effect may indicate that ROS accumulation in sperm cells could be the reason for subsequent DNA damage. ROS preferentially attacks the carbon-hydrogen bonds, which are adjacent to double bonds, present in polyunsaturated fatty acids and initiates a cascade of lipid peroxidation which, if not stopped, affects the integrity of sperm chromatin and increases DNA damage frequency (Aitken and Krausz, 2001). The results of the present work are in agreement with those found in erythrocytes and fish gill cells (Nwani *et al.*, 2010), rat sperm cells (Feyzi-Dehkhargani *et al.*, 2012) and human lymphocyte (Zeljezic *et al.* 2006). All these studies have shown an increase in cellular DNA damage after exposure to atrazine.

However, the effects caused by this contaminant in sperm cells do not seem to be permanent, once the animals exposed in other development periods showed no changes in the evaluated parameters. These animals (newborns and two months old), during the post-exposure period, were kept in an environment free of contaminants, which may have caused the normalization of sperm production. Thus, it can be concluded that the exposure time of this work do not

cause irreversible damages to these animal testes. Moreover, animals exposed at three months of life were immediately removed for analysis after exposure to atrazine, avoiding time for recovery and in agreement with the experimental results, which showed a reduction in both membrane integrity and mitochondrial functionality of the sperm cells besides more DNA damage in those.

5. Conclusion

The herbicide atrazine caused a feminizing effect on the species *P. vivipara* and this effect was observed at the highest concentration of the pollutant (100 µg/L). In addition, atrazine stimulated follicular growth in females; and reduced sperm capacity of male, but not permanently.

6. Acknowledgements

The present work was supported by the Brazilian CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Brasília, DF, Brasil) and the Brazilian INCT-TA (Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia – Toxicologia Aquática).

7. References

Abarikwu SO, Adesiyan AC, Oyeloja TO, Oyeyemi MO, Farombi EO. Changes in Sperm Characteristics and Induction of Oxidative Stress in the Testis and Epididymis of

Experimental Rats by a Herbicide, Atrazine. *Archives of Environmental Contamination Toxicology*. 2009; 58: 874–882.

Aitken RJ, Krausz C. Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome. *Reproduction*. 2001; 122: 497-506.

Bencharif D, Amirat L, Pascal O, Anton M, Schmitt E, Desherces S, Delhomme G, Langlois ML, Barriere P, Larrat M, Tainturier D. The advantages of combining low density lipoproteins with glutamine for cryopreservation of canine semen. *Reproduction in Domestic Animals*. 2008; 45: 189-200.

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). *Revista Didática Sistêmica* 3, 71-100.

Bringolf RB, Belden JB, Summerfelt RC. Effects of atrazine on fathead minnow in a short-term reproduction assay. *Environment Toxicology and Chemistry*. 2004; 23: 1019-1025.

Davis LK, Murr AS, Best DS, Fraites MJP, Zorrilla LM, Narotsky MG, Stoker TE, Goldman JM, Cooper RL. The effects of prenatal exposure to atrazine on pubertal and postnatal reproductive indices in the female rat. *Reproductive Toxicology*, 2011; 32: 43-51.

De Solla SR, Martin PA, Fernie KJ, Park BJ, Mayne G. Effects of environmentally relevant concentrations of atrazine on gonadal development of snapping turtles (*Chelydra serpentina*). *Environmental Toxicology and Chemistry*. 2006; 25(2): 520–526.

Dehkhargani SF, Malekinejad H, Shahrooz R, Sarkhanloo RA. Detrimental Effect of Atrazine on Testicular Tissue and Sperm quality: Implication for Oxidative stress and Hormonal Alterations. *Iranian Journal of Toxicology*. 2011; 5(1,2): 426-435.

Devlin RH, Nagahama Y. Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. *Aquaculture*. 2002; 208: 191–364.

Dong X, Zhu L, Wang J, Wang J, Xie H, Hou X, Jia W. Effects of atrazine on cytochrome P450 enzymes of zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere*. 2009; 77(3): 404-412.

Fan W, Yanase T, Morinaga H, Gonda S, Okkabe T, Nomura M, Komatsu T, Morohashi KI, Hayes TB, Takayanagi R, Nawata H. Atrazine-induced aromatase expression is SF-1 dependent: implications for endocrine disruption in wildlife and reproductive cancers in humans. *Environmental Health Perspectives*. 2007; 115: 720-727.

Fatima RA, Ahmad M. *Allium cepa* derived EROD as a potential biomarker for the presence of certain pesticides in water. *Chemosphere*. 2006; 62: 527–537.

Feyzi-Dehkhargani S, Shahrooz R, Malekineja H, Sadrkhanloo RA. Atrazine in sub-acute exposure results in sperm DNA disintegrity and nuclear immaturity in rats. *Veterinary Research Forum*, 2012; 3(1): 19-26.

Gross TS, Shrestha S, Wieser CM, Wiebe JJ, Denslow ND, Chow C, Johnson WE, Stout R. Evaluation of potential endocrine-disrupting effects of water-soluble herbicides in largemouth bass. SETAC Annual Meeting, 1997; 16–20.

Halliwell B. The antioxidant paradox. *Lancet*. 2000; 355: 1179-1180.

Harris CA, Santos EM, Janbakhsh A, Pottinger TG, Tyler CR, Sumpter JP. Nonyl phenol affects gonadotropin levels in the pituitary gland and plasma of the female rainbow trout. *Environmental Science & Technology*. 2001; 35: 2909–2916.

Hase Y, Tatsuno M, Nishi T, Kataoka K, Kabe Y, Yamaguchi Y, Ozawa N, Natori M, Handa H, Watanabe H. Atrazine binds to F1F0-ATP synthase and inhibits mitochondrial function in sperm. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2008; 366:66–72.

Hayes TB, Collins A, Lee M, Mendoza M, Noriega N, Ali Stuart A, Vonk A. Hermaphroditic, demasculinized frogs after exposure to the herbicide atrazine at low ecologically relevant doses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002; 99(8): 5476-5480.

Hayes TB, Khoury V, Narayan A, Nazir M, Park A, Brown T, Adame L, Chan E, Buchholz D, Stueve T, Gallipeau S. Atrazine induces complete feminization and chemical castration in male African clawed frogs (*Xenopus laevis*). *Proceedings of the National Academy Sciences*. 2010; 107(10): 4612-4617.

He S, Woods LC. Effects of dimethylsulfoxide and glycine on cryopreservation induced damage of plasma membrane and mitochondria to striped bass (*Morone saxatilis*) sperm. *Cryobiology*. 2004; 48: 254–62.

Hecker M, Kim WJ, Park JW, Murphy MB, Villeneuve D, Coady KK, Jones PD, Solomon KR, Van Der Kraak GJ, Carr JA. Plasma concentrations of estradiol and testosterone, gonadal aromatase activity, and ultrastructure of the testis in *Xenopus laevis* exposed to estradiol and atrazine. *Aquatic Toxicology*. 2005; 72: 383–396.

Hussain R, Mahmood F, Khan MZ, Khan A, Muhammad F. Pathological and genotoxic effects of atrazine in male Japanese quail (*Coturnix japonica*). *Ecotoxicology*, 2011; 20: 1–8.

Islam MO, Hara M, Miyake J. Induction of P-glycoprotein, glutathione-S-transferase and cytochrome P450 in rat liver by atrazine. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 2002; 12: 1–6.

Kavumpurath S, Pandian TJ. Production of YY male in the guppy *Poecilia reticulata* by endocrine sex reversal and progeny testing. *Asian Fisheries Science*. 1992; 5: 265–276.

Yamamoto T. Sex differentiation. In: *Fish Physiology*. Academic Press, 1969; 117–175.

Kniewald J, Jakominic M, Tomljenovic A, Simic B, Romac P, Vranesic D, Kniewald Z. Disorders of male rat reproductive tract under the influence of atrazine, *Journal of Applied Toxicology*. 2000; 20: 61–68.

Maria AN, Azevedo HC, Santos JP, Carneiro PCF. Hormonal induction and semen characteristics of tambaqui *Colossoma macropomum*. *Zygote*. 2012; 20:39-43.

Mattiazzi M, Vijayvergiya C, Gajewski CD, DeVivo DC, Lenaz G, Wiedmann M, Manfredi G. The mtDNA T8993G (NARP) mutation results in an impairment of oxidative phosphorylation that can be improved by antioxidants. *Human Molecular Genetics*. 2004; 13:869–879.

Moore A, Waring CP. Mechanistic effects of a triazine pesticide on reproductive endocrine function in mature male Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) parr. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 1998; 62: 41–50.

Nwani CD, Nagpure NS, Kumar R, Kushwaha B, Kumar P, Lakra WS. Mutagenic and genotoxic assessment of atrazine-based herbicide to freshwater fish *Channa punctatus* (Bloch) using micronucleus test and single cell gel electrophoresis. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 2010; 31: 314-322.

Oka T, Tooi O, Mitsui N, Miyahara M, Ohnishi Y, Takase M, Kashiwagi A, Shinkai T, Santo N, Iguch T. Effect of atrazine on metamorphosis and sexual differentiation in *Xenopus laevis*. *Aquatic Toxicology*. 2008; 87: 215–226.

Orton F, Carr JA, Handy RD. Effects of nitrate and atrazine on larval development and sexual differentiation in the northern leopard frog *Rana pipiens*. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 2006; 25: 65–71.

Rayner JL, Enoch RR, Wolf DC, Fenton SE. Atrazine induced reproductive tract alterations after transplacental and/or lactational exposure in male Long-Evans rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2007; 218: 238–248.

Rocha TL, Yamada AT, Costa RM, Saboia-Morais SMT. Analyses of the development and glycoproteins present in the ovarian follicles of *Poecilia vivipara* (Cyprinodontiformes, Poeciliidae). *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 2011; 31(1): 87-93.

Rohr JR, McCoy KA. A qualitative meta-analysis reveals consistent effects of atrazine on freshwater fish and amphibians. *Environmental Health and Perspectives*. 2010; 118: 20–32.

Ross MK, Jones TL, Filipov NM. Disposition of the herbicide 2-chloro-4- (ethylamino)-6- (isopropylamino)-s-triazine (atrazine) and its major metabolites in mice: a liquid chromatography/mass spectrometry analysis of urine, plasma, and tissue levels. *Drug Metabolism and Disposition*. 2009; 37: 776–786.

Rymuszka A, Siwicki AK, Sieroslawska A. Determination of modulatory potential of atrazine on selected functions of immune cells isolated from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *European Journal of Immunology*. 2007; 32: 97–100.

Sanderson JT, Letcher, RJ, Heneweer M, Giesy JP, Van Den Berg M. Effects of chloro-s-triazine herbicides and metabolites on aromatase activity in various human cell lines and on vitellogenin production in male carp hepatocytes. *Environmental Health Perspectives*. 2001; 109: 1027–1031.

Segner H, Carroll K, Fenske M, Janssen CR, Maack G, Pascoe D, Schäfers C, Vandenberg GF, Watts M, Wenzel A. Identification of endocrine-disrupting effects in aquatic vertebrates and invertebrates: report from the European IDEA project. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2003; 54(3): 302–314.

Solomon KR, Carr JA, Du Preez LH, Giesy JP, Smith EE, Kendall RJ, Van Der Kraak GJ. Effects of atrazine on fish, amphibians, and aquatic reptiles: a critical review. *Critical Reviews in Toxicology*. 2008; 38: 721–772.

Spanò L, Tyler CR, Aerleb R, Devos P, Mandiki SNM, Silvestre F, Thomé J, Kestemont P. Effects of atrazine on sex steroid dynamics, plasma vitellogenin concentration and gonad development in adult goldfish (*Carassius auratus*). *Aquatic Toxicology*. 2004; 66: 369–379.

Stanko JP, Enoch RR, Rayner JL, Davis CC, Wolf DC, Malarkey DE, Fenton SE. Effects of prenatal exposure to a low dose atrazine metabolite mixture on pubertal timing and prostate development of male Long-Evans rats. *Reproductive Toxicology*. 2010; 30: 540-549.

Suzawa M, Ingraham HA. The herbicide atrazine activates endocrine gene networks via non steroidal NR5A nuclear receptors in fish and mammalian cells. *PLoS One*. 2008; 3: 1–11.

Swan SH, Kruse RL, Liu F, Barr DB, Drobni EZ, Redmon JB, Wang C, Brazil C, Overstreet JW. Semen quality in relation to biomarkers of pesticide exposure. *Environmental Health Perspectives*, 2003; 111:1478–1484.

Tierney KB, Singh CR, Ross PS, Kennedy CJ. Relating olfactory neurotoxicity to altered olfactory-mediated behaviors in rainbow trout exposed to three currently-used pesticides. *Aquatic Toxicology*. 2007; 81: 55–64.

Tillitt DE, Papoulias DM, Whyte JJ, Richter CA. Atrazine reduces reproduction in fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Aquatic Toxicology*. 2010; 99(2): 149–159.

Trentacoste SV, Friedmann AS, Youker RT, Breckenridge CB, Zirkin BR. Atrazine effects on testosterone levels and androgen-dependent reproductive organs in peripubertal male rats. *Journal of Andrology*. 2001; 22: 142–148.

Varela Jr AS, Corcini CD, Gheller SMM, Jardim RD, Lucia Jr T, Streit DP, Figueiredo MRC. Use of amides as cryoprotectants in extenders for frozen sperm of tambaqui, *Colossoma macropomum*. *Theriogenology*. 2012; THERIO-D-11-00268R3.

Ventura BDC, De Angelis DDF, MAarin-Morales MA. Mutagenic and genotoxic effects of the Atrazine herbicide in *Oreochromis niloticus* (Perciformes, Cichlidae) detected by the micronuclei test and the comet assay. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 2008; 90(1): 42-51.

Victor-costa AB, Bandeira SMC, Oliveira AG, Mahecha GAB, Oliveira CA. Changes in testicular morphology and steroidogenesis in adult rats exposed to Atrazine. *Reproductive Toxicology*, 2010; 26: 323-331.

Waring CP, Moore A. The effect of atrazine on Atlantic salmon (*Salmo salar*) smolts in fresh water and after sea water transfer. *Aquatic Toxicology*. 2004; 66: 93-104.

Wetzel LT, Luempert LG, Breckenridge CB, Tisdell MO, Stevens JT, Thakur AK, Extrom P, Eldridge J. Chronic effects of atrazine on estrus and mammary tumor formation in female Sprague–Dawley and Fischer 344 rats. *Journal of Toxicology and Environment Health*. 1994; 43(2): 169–182.

Zeljezic D, Garaj-Vrhovac V, Perkovic P. Evaluation of DNA damage induced by atrazine and atrazine-based herbicide in human lymphocytes in vitro using a comet and DNA diffusion assay. *Toxicology In Vitro*. 2006; 20: 923–35.

Figure captions

Figure 1 – Follicular diameters of *Poecilia vivipara* females exposed at different stages of life (newborns, 2 and 3 months) and at different concentrations of atrazine, during one month. Data are expressed as mean \pm standard deviation. Different letters indicate significant differences between treatments ($p < 0.05$).

Figure 2 – Sperm parameters of *Poecilia vivipara* males after exposure to atrazine in different stages of development: (A) total number of sperm, (B) mitochondrial function, (C) membrane integrity, (D) DNA integrity and (E) cell viability. Data are expressed as mean \pm standard deviation. Different letters indicate significant differences between treatments ($p < 0.05$).

Table 1 – Sex ratio of *Poecilia vivipara* fishes exposed to different concentrations of atrazine during a month at different stages of life (newborns, 2 and 3 months).

GROUPS	NEWBORNS		TWO MONTHS		THREE MONTHS	
	FEMALES (%)	MALES (%)	FEMALES (%)	MALES (%)	FEMALES (%)	MALES (%)
WATER	51	49	51	49	51	49
METHANOL	60	40	50	50	59	41
2 µg/L	54	46	57	43	50	50
10 µg/L	28*	72	56	44	82*	18
100 µg/L	70*	30	72*	28	75*	25

(*) Significant difference (p<0.05) between treatments and control.

Figure 1

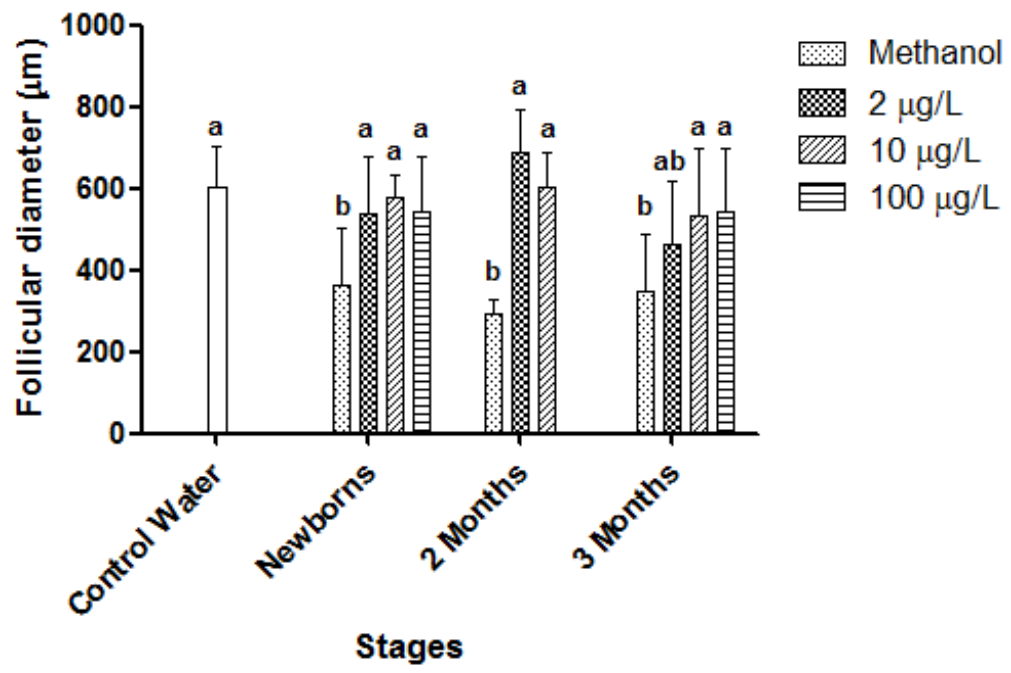
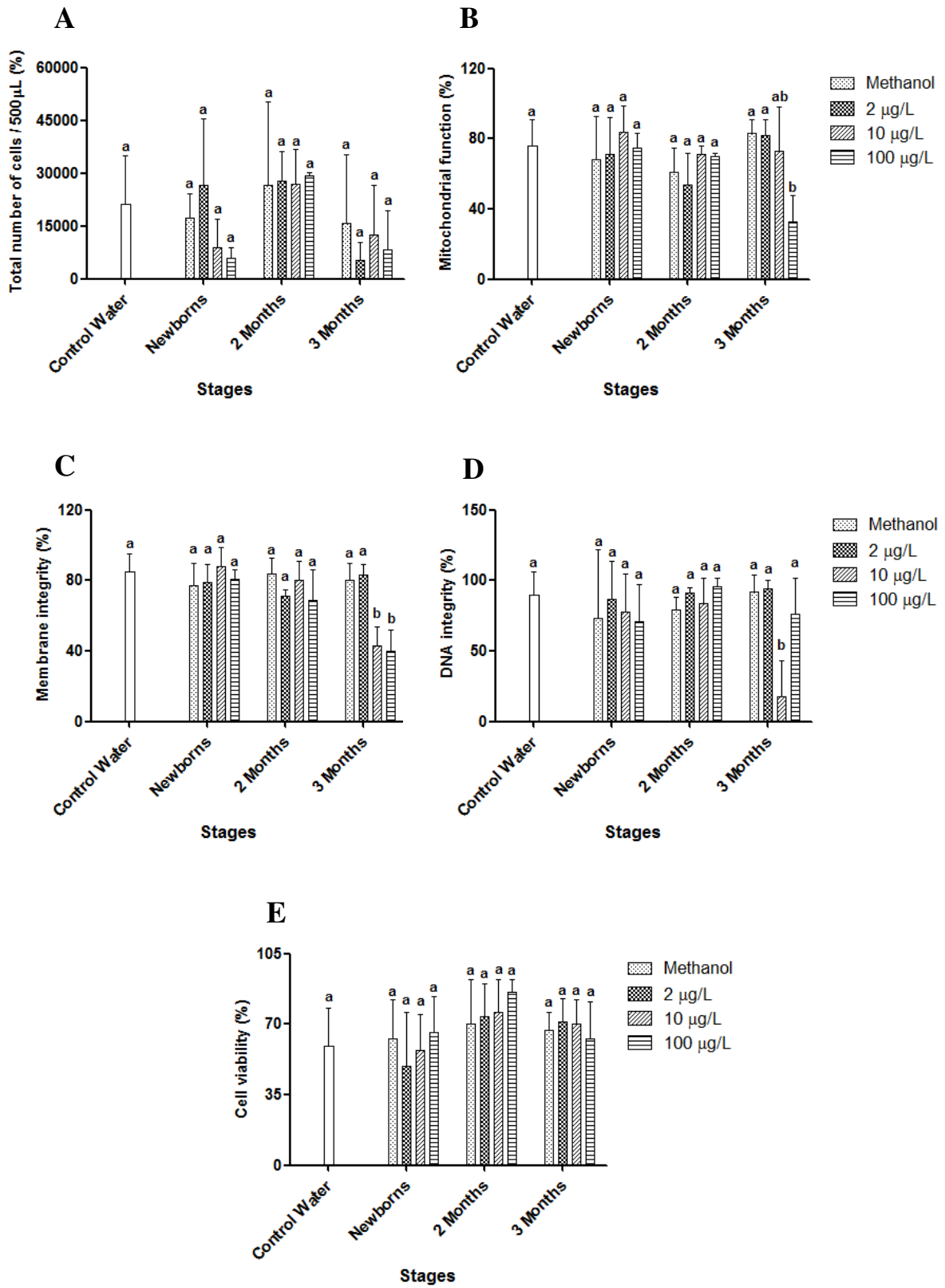


Figure 2



4. Conclusões gerais

O atrazina causou um efeito feminilizante na espécie *P. vivipara*, tendo o efeito sido observado na maior concentração do contaminante (100 µg/L). Dessa forma, altas concentrações do herbicida atrazina na água podem gerar desequilíbrios nas populações de *Poecilia vivipara*, levando a uma desproporção no número de machos e fêmeas, afetando assim a reprodução das mesmas em ambiente natural.

Além disso, o atrazina estimulou o crescimento folicular das fêmeas e reduziu a capacidade espermática de machos, porém essa redução não foi permanente.

Os estudos sobre os efeitos de contaminantes em peixes ainda é incipiente no Brasil, assim como pesquisas específicas com a espécie *Poecilia vivipara*. Cabe observar a necessidade da análise de outros parâmetros em trabalhos futuros, de modo a correlacionar os resultados com os obtidos neste trabalho.

5. Referências bibliográficas

Abarikwu SO, Adesiyun AC, Oyeloja TO, Oyeyemi MO, Farombi EO. Changes in Sperm Characteristics and Induction of Oxidative Stress in the Testis and Epididymis of Experimental Rats by a Herbicide, Atrazine. *Archives of Environmental Contamination Toxicology*. 2009; 58: 874–882.

Armas ED, Monteiro RTR, Antunes PM, Santos MAPF, Camargo PB, Abakerli RB. Diagnóstico espaço-temporal da ocorrência de herbicidas nas águas superficiais e sedimentos do rio corumbataí e principais afluentes. *Química Nova*. 2007; 5: 1119–1127.

Arukwe A. Cellular and molecular responses to endocrinomodulators and the impact on fish reproduction. *Marine Pollution Bulletin*. 2001; 42(8): 643–655.

Auger J, Kunstmann JM, Czyglik F, Jouannet P. Decline in semen quality among fertile men in Paris during the past 20 years. *The New England Journal of Medicine*. 1995; 332: 281–285.

Banudevi S, Krishnamoorthy G, Venkatataman P, Vignesh C, Aruldas MM, Arunakaran J. Role of α -tocopherol on antioxidant status in liver, lung and kidney of PCP exposed male albino rats. *Food and Chemical Toxicology*. 2006; 44: 2040–2046.

Betito R. Análise comparativa das estratégias de dinâmica populacional entre dois peixes ‘r’ estrategistas (*Jenynsia lineata* e *Poecilia vivipara*) (Cyprinodontiformes), no estuário da Lagoa dos Patos (RS - Brasil). Tese de Doutorado, Tomo I (182p.), Tomo II (460p.). Instituto Oceanográfico da USP. 1999.

Betito R. Comparação da complexidade das adaptações bioecológicas de dois peixes (*Jenynsia multidentata* e *Poecilia vivipara*) (Cyprinodontiformes) no estuário da Lagoa dos Patos (RS – Brasil). *Revista Didática Sistêmica*. 2006; 3: 71-100.

Binetin S, Devillers J. Evaluating the environmental fate of atrazine in france. *Chemosphere*. 1996; 32(12): 2441-2456.

Bringolf RB, Belden JB, Summerfelt RC. Effects of atrazine on fathead minnow in a short-term reproduction assay. *Environment Toxicology and Chemistry*. 2004 ; 23: 1019-1025.

Campagna C, Ayotte P, Sirard MA, Arsenault G, Laforest JP, Bailey JL. Effect of an environmentally relevant metabolized organochlorine mixture on porcine cumulus-oocyte complexes. *Reproductive Toxicology*. 2007; 23: 145–152.

Carr JA, Gentles A, Smith EE, Goleman WL, Urquidi LJ, Thuett K, Kendall RJ, Giesy JP, Gross TS, Solomon KR, Van Der Kraak G. Response of larval *Xenopus laevis* to atrazine: assessment of growth, metamorphosis, and gonadal and laryngeal morphology. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 2003; 22: 396–405.

Chambers JE. Oestrogenic effects of organochlorine insecticides in channel catfish. *American Chemical Society*. 1984; 187: 33.

Coady KK, Murphy MB, Villeneuve DL, Hecker M, Carr JA, Solomon KR, Van Der Kraak GJ, Smith EE, Kendall RJ, Giesy JP. Effects of atrazine on metamorphosis, growth, laryngeal and gonadal development, aromatase activity, and plasma sex steroid concentrations in *Xenopus laevis*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2005; 62: 160–173.

CONAMA, 2005. Conselho Nacional do Meio Ambiente / Ministério do Meio Ambiente. Resolução número 357 de 17 de março de 2005. Disponível em:

<http://www.mma.gov.br/port/conama/legiano1.cfm?codlegitipo=3&ano=2005S>. Acesso em março, 2012.

Cooper RL, Goldman JM, Stoker TE. Neuroendocrine and reproductive effects of contemporary-use pesticides. *Toxicology and Industrial Health*. 1999; 15(1-2): 26-36.

Cooper RL, Stoker TE, Goldman JM, Parrish MB, Tyrey L. Effect of atrazine on ovarian function in the rat. *Reproductive Toxicology*. 1996; 10(4): 257-64.

Cox, C. Atrazine: Toxicology. *Journal of pesticide reform*. 2001; 21(2): 12-20.

De Solla SR, Martin PA, Fernie KJ, Park BJ, Mayne G. Effects of environmentally relevant concentrations of atrazine on gonadal development of snapping turtles (*Chelydra serpentina*). *Environmental Toxicology and Chemistry*. 2006; 25(2): 520-526.

Dehkhargani SF, Malekinejad H, Shahrooz R, Sarkhanloo RA. Detrimental Effect of Atrazine on Testicular Tissue and Sperm quality: Implication for Oxidative stress and Hormonal Alterations. *Iranian Journal of Toxicology*. 2011; 5(1,2): 426-435.

Dores EFGC, De-Lamonica-Freire EM. Contaminação do ambiente aquático por pesticidas. Estudo de caso: águas usadas para humano em Primavera do Leste, Mato Grosso – análise preliminar. *Química Nova*. 2001; 24: 27-36.

Edwards CA. *Persistent pesticides in the environment*. 2th. ed. U.S.A: CRC. Press. 1973; 170p.

Eisler R. Tin Hazards to Fish, Wildlife, and Invertebrates: A Synoptic Review. *Contaminant Hazard Reviews. Biological Report*. 1989; 85: 1-15.

Eroschenko VP. Estrogenic activity of the insecticide chlorecdone in the reproductive tract of birds and mammals. *Journal Toxicology Environment Health*. 1981; 8: 731-742.

Fan W, Yanase T, Morinaga H, Gonda S, Okkabe T, Nomura M, Komatsu T, Morohashi KI, Hayes TB, Takayanagi R, Nawata H. Atrazine-induced aromatase expression is SF-1 dependent: implications for endocrine disruption in wildlife and reproductive cancers in humans. *Environmental Health Perspectives*. 2007; 115: 720-727.

Feyzi-Dehkhargani S, Shahrooz R, Malekineja H, Sadrkhanloo RA. Atrazine in sub-acute exposure results in sperm DNA disintegrity and nuclear immaturity in rats. *Veterinary Research Forum*, 2012; 3(1): 19-26.

Gascón J, Oubiiia A, Barceló D. Detection of endocrine-disrupting pesticides by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): application to atrazine. *Trends in analytical chemistry*. 1997; 16(10): 554- 562.

Gray MA, Metcalfe CD. Induction of testis-ova in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) exposed to p-nonylphenol. *Environment Toxicology and Chemistry*. 1997; 16: 1082–1086.

Grier HJ. Cellular organization of the testis and spermatogenesis in fishes. *American Zoologist*. 1981; 21: 345–357.

Hayes T, Haston K, Tsui M, Hoang A, Haeffele C, Vonk A. Atrazine-induced hermaphroditism at 0.1 ppb in American leopard frogs (*Rana pipiens*): laboratory and field evidence. *Environment Health Perspectives*. 2003; 111: 568–575.

Hayes TB, Khoury V, Narayan A, Nazir M, Park A, Brown T, Adame L, Chan E, Buchholz D, Stueve T, Gallipeau S. Atrazine induces complete feminization and chemical castration in

male African clawed frogs (*Xenopus laevis*). Proceedings of the National Academy Sciences. 2010; 107(10): 4612-4617.

Hayes TB, Stuart AA, Mendoza M, Collins A, Noriega N, Vonk A, Johnston G, Liu R, Kpodzo D. Characterization of atrazine-induced gonadal malformations in African clawed frogs (*Xenopus laevis*) and comparisons with effects of an androgen antagonist (cyproterone acetate) and exogenous estrogen (17beta-estradiol): support for the demasculinization/feminization hypothesis. Environment Health Perspectives. 2006; 114: 134–141.

Hecker M, Kim WJ, Park JW, Murphy MB, Villeneuve D, Coady KK, Jones PD, Solomon KR, Van Der Kraak GJ, Carr JA. Plasma concentrations of estradiol and testosterone, gonadal aromatase activity, and ultrastructure of the testis in *Xenopus laevis* exposed to estradiol and atrazine. Aquatic Toxicology. 2005; 72: 383–396.

Jin Y, Zhang X, Shu L, Chen L, Sun L, Qian H, Liu W, Fu Z. Oxidative stress response and gene expression with atrazine exposure in adult female zebrafish (*Danio rerio*). Chemosphere. 2010; 78(7): 846-852.

Johnson DC, Sen M, Dey SK. Differential effects of DDT analogs, chlorecdone and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin on establishment of pregnancy in the hypophysectomized rat. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. 1992; 199: 42-48.

Kinnberg K, Korsgaard B, Bjerregaard P, Jespersen A. Effects of nonylphenol and 17β-estradiol on vitellogenin synthesis and testis morphology in male platyfish *Xiphophorus maculatus*. The Journal of Experimental Biology. 2000; 203: 171–181.

- Koifman S, Koifman RJ, Meyer A. Human reproductive disturbances and pesticide exposure in Brazil. *Cadernos de Saúde Pública*. 2002; 18(2): 435-445.
- Koifman S, Paumgarten FJR. O impacto dos desreguladores endócrinos ambientais sobre a saúde pública. *Cadernos de Saúde Pública*. 2002; 18(2): 354- 355.
- Lambert JGD. The Ovary of the Guppy *Poecilia reticulata*: The Granulosa Cells as Sites of Steroid Biosynthesis. *General and Comparative Endocrinology*. 1970; 15: 464-476.
- Londres F. Agrotóxicos no Brasil: um guia para ação em defesa da vida. AS-PTA. Rio de Janeiro. 1ª edição. 2011; 190 p.
- Marcant P. Contribution à l'étude technique et écologique de l'élevage des poissons vivipares (étude particuliere chez *Lebistes reticulatus*). Thèse Doctorat Veterinaire, Créteil. 1972.
- Martínez-Álvarez RM, Morales AE, Sanz A. Antioxidant Defenses in Fish: Biotic and Abiotic Factors. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*. 2005; 15(1-2): 75-88.
- Montenegro AKA. Aspectos da estrutura populacional e alimentar de *Poecilia vivipara* (Bloch & Schneider, 1801) do açude Taperoá II, semi-árido paraibano, Brasil. *Anais do IX Congresso de Ecologia do Brasil*, São Lourenço, MG. 2009.
- Nimmo DR. In: Rand, G.M. e Petrocelli, S.R. (eds.), *Fundamentals of aquatic toxicology: methods and applications*. Hemisphere. 1985; 335-373.
- Nwani CD, Nagpure NS, Kumar R, Kushwaha B, Kumar P, Lakra WS. Mutagenic and genotoxic assessment of atrazine-based herbicide to freshwater fish *Channa punctatus* (Bloch) using micronucleus test and single cell gel electrophoresis. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 2010; 31: 314-322.

Olea-Serrano N, Fernández-Cabrera MF, Pulgar-Encinas R, Olea-Serrano F. Endocrine disrupting chemicals. Harmful substances and how to test them. *Cadernos de Saúde Pública*. 2002; 18(2): 489-494.

Orton F, Carr JA, Handy RD. Effects of nitrate and atrazine on larval development and sexual differentiation in the northern leopard frog *Rana pipiens*. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 2006; 25: 65–71.

Pelaez V, Terra FHB, Silva LR. A regulamentação dos agrotóxicos no Brasil: entre o poder de mercado e a defesa da saúde e do meio ambiente. XIV Encontro Nacional de Economia Política / Sociedade Brasileira de Economia Política - São Paulo/SP. 2009; 22 p.

Peña-Llopis S, Ferrando MD, Peña JB. Fish tolerance to organophosphate- induced oxidative stress is dependent on the glutathione metabolism and enhanced by N- acetylcysteine. *Aquatic Toxicology*. 2003; 65: 337–360.

Peres F, Moreira JC, Dubois GS. Agrotóxicos, saúde e ambiente: uma introdução ao tema. In: Peres, F.; Moreira, J.C.; organizadores. *É veneno ou remédio? Agrotóxicos, saúde e ambiente*. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz. 2003; 21-41.

Piaini LDS. Utilização de biomarcadores genéticos na avaliação aguda do efeito mutagênico dos contaminantes atrazina e cloreto de cobre em *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Heptapteridae). Dissertação de Mestrado em Ciências Biológicas, UFPR, Curitiba. 2011.

Pires FS, Antunes AM, Freitas MA, Sobreiro MB, Rocha TL, Sabóia-Morais SMT. Citoarquitetura do testículo de *Poecilia reticulata* (Cyprinodontiformes, Poeciliidae). VII Congresso de Pesquisa, Ensino e Extensão PROEC-38, Anais CONPEEX, Goiânia. 2011.

Pocar P, Brevini TAL, Fischer B, Gandolfi F. The impact of endocrine disruptors on oocyte competence. *Reproduction*. 2003; 125: 313–325.

Ramalho JFGP, Amaral Sobrinho NMB, Velloso ACX. Contaminação da microbacia de caetés com metais pesados pelo uso de agroquímicos. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 2000; 35: 1289-303.

Rayner JL, Enoch RR, Wolf DC, Fenton SE. Atrazine-induced reproductive tract alterations after transplacental and/or lactational exposure in male Long–Evans rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2007; 218: 238–248.

Risso-de-Facerney C, Devaux A, Lafaurie M, Girard JP, Bailly B, Rahmani R. Cadmium induces apoptosis and genotoxicity in rainbow trout hepatocytes through generation of reactive oxygen species. *Aquatic Toxicology*. 2001; 53: 65–76.

Rocha TL, Yamada AT, Costa RM, Saboia-Morais SMT. Analyses of the development and glycoproteins present in the ovarian follicles of *Poecilia vivipara* (Cyprinodontiformes, Poeciliidae). *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 2011; 31(1): 87-93.

Rodrigues SSB. Avaliação dos efeitos ecotoxicológicos do herbicida Atrazina Nortox 50 SC sobre a espécie *Eisenia foetida* (Annelida: Oligochaeta). Monografia do curso de Gestão Ambiental da Escola Agrotécnica Federal de Inconfidentes, MG. 2008.

Rosenberg BG, Chen H, Folmer J, Liu J, Papadopoulos V, Zirkin BR. Gestational exposure to atrazine: effects on the postnatal development of male offspring. *Journal Andrology*. 2008; 29(3): 304–11.

Ross MK, Jones TL, Filipov NM. Disposition of the herbicide 2-chloro-4- (ethylamino)-6- (isopropylamino)-s-triazine (atrazine) and its major metabolites in mice: a liquid

chromatography/mass spectrometry analysis of urine, plasma, and tissue levels. *Drug Metabolism and Disposition*. 2009; 37: 776–786.

Santos EO. Peixes de água doce (vida e costumes dos peixes do Brasil). Belo Horizonte, Ed. Itatiaia, Vol. 2. 1958; 267p.

Schlenk D. *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes*, vol. 6. 2005.

Shepard TH. Human teratogenicity. *Advances in Pediatrics*. 1986; 33: 225–268.

Simic B, Kniewald J, Kniewald Z. Effects of atrazine on reproductive performance in the rat. *Journal of Applied Toxicology*. 1994; 14: 401–404.

Spacie A, Hamelink JL. Bioaccumulation. (eds.). In: Rand, G.M.; Petrocelli, S.R. *Fundamentals of aquatic toxicology: methods and applications*. Hemisphere. 1985; 495-525.

Spanò L, Tyler CR, Aerleb R, Devos P, Mandiki SNM, Silvestre F, Thomé J, Kestemont P. Effects of atrazine on sex steroid dynamics, plasma vitellogenin concentration and gonad development in adult goldfish (*Carassius auratus*). *Aquatic Toxicology*. 2004; 66: 369–379.

Stanko JP, Enoch RR, Rayner JL, Davis CC, Wolf DC, Malarkey DE, Fenton SE. Effects of prenatal exposure to a low dose atrazine metabolite mixture on pubertal timing and prostate development of male Long-Evans rats. *Reproductive Toxicology*. 2010; 30: 540-549.

Stevens JT, Sumner DD. Herbicides. In: Hayes WJ, Laws ER, editors. *Handbook of pesticide toxicology*. New York: Academic Press. 1991; 1317–1408.

Stoker TE, Laws SC, Guidici DL, Cooper RL. The effect of atrazine on puberty in male wistar rats: an evaluation in the protocol for the assessment of pubertal development and thyroid function. *Toxicological Sciences*. 2000; 58(1): 50–59.

- Tavera-Mendoza L, Ruby S, Brousseau P, Fournier M, Cyr D, Marcogliese D. Response of the amphibian tadpole (*Xenopus laevis*) to atrazine during sexual differentiation of the testis. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 2002a; 21:527–531.
- Tavera-Mendoza L, Ruby S, Brousseau P, Fournier M, Cyr D, Marcogliese D. Response of the amphibian tadpole *Xenopus laevis* to atrazine during sexual differentiation of the ovary. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 2002b; 21: 1264–1267.
- Tillitt DE, Papoulias DM, Whyte JJ, Richter CA. Atrazine reduces reproduction in fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Aquatic Toxicology*. 2010; 99(2): 149–159.
- Valavanidis A, Vlahogianni T, Dassenakis M, Scoullou M. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicology and environmental safety*. 2006; 64(2): 178-189.
- Vazzoler AEAM. *Biologia da reprodução de peixes Teleósteos: teoria e prática*. Maringá: Eduem. 1996; 169p.
- Victor-Costa AB, Bandeira SMC, Oliveira AG, Mahecha GAB, Oliveira CA. Changes in testicular morphology and steroidogenesis in adult rats exposed to Atrazine. *Reproductive Toxicology*. 2010; 29(3): 323-331.
- Zinaman MJ, Clegg ED, Brown C, O'Connor J, Selevan SG. Estimates of human fertility and pregnancy loss. *Fertility and Sterility*. 1996; 65: 503–509.
- Zirkin RB, Stephanie VT, Andrew SF, Robert TY, Charles BB. Atrazine effects on testosterone levels and androgen-dependent reproductive organs in peripubertal male rats. *Journal of Andrology*. 2001; 22: 142–148.

Walker AE, Holman RE, Elisa RB. Analysis of pesticide residues in North Carolina. *Journal of the American Water Resources Association*. 2000; 36: 67-74.

Wetzel LT, Luempert LG, Breckenridge CB, Tisdell MO, Stevens JT, Thakur AK, Extrom P, Eldridge J. Chronic effects of atrazine on estrus and mammary tumor formation in female Sprague–Dawley and Fischer 344 rats. *Journal of Toxicology and Environment Health*. 1994; 43(2): 169–182.

Wilhelms KW, Fitzpatrick KF, Scanes CG, Anderson LL. In Ovo Exposure to a Triazine Herbicide: Effects of Atrazine on Circulating Reproductive Hormones and Gonadal Histology in Young Japanese Quail. *Archives of Environmental Contamination Toxicology*. 2006; 51: 117–122.

Wourms JP, Grove BD, Lombardi J. The maternal-embryonic relationship in viviparous fishes. In: *Fish Physiology*, Hoar WS, Randall JJ (Eds.), XIB: 1-134, Academic Press, NY. 1988.