

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E  
BIOCIÊNCIAS**

---

Elisa Carolina Ferreira

**IDENTIFICAÇÃO E ANÁLISE DA TRANSCRIÇÃO  
DIFERENCIAL DE GENES EM PEIXES *Poecilia vivipara*  
EXPOSTOS AO HERBICIDA ATRAZINA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia e Biociências do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia e Biociências.

Orientador: Prof. Dr. Afonso Celso Dias Bainy

FLORIANÓPOLIS

2012

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Ferreira, Elisa Carolina

IDENTIFICAÇÃO E ANÁLISE DA TRANSCRIÇÃO DIFERENCIAL DE  
GENES EM PEIXES *Poecilia vivipara* EXPOSTOS AO HERBICIDA  
ATRAZINA [dissertação] / Elisa Carolina Ferreira ;  
orientador, Afonso Celso Dias Bainy - Florianópolis, SC,  
2012.

59 p. ; 21cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-  
Graduação em Biotecnologia e Biociências.

Inclui referências

1. Biotecnologia e Biociências. 2. SSH. 3. Atrazina. 4.  
Peixe. 5. Marcadores moleculares. I. Bainy, Afonso Celso  
Dias . II. Universidade Federal de Santa Catarina.  
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências.  
III. Título.

Elisa Carolina Ferreira

**IDENTIFICAÇÃO E ANÁLISE DA TRANSCRIÇÃO  
DIFERENCIAL DE GENES EM PEIXES *Poecilia vivipara*  
EXPOSTOS AO HERBICIDA ATRAZINA**

Esta dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de mestre e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós Graduação em Biotecnologia e Biociências.

Florianópolis, 04 de maio de 2012.

---

Coordenador do Curso

**Banca Examinadora:**

---

Prof. Dr. Afonso Celso Dias Bainy  
Orientador  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Maria Risoleta Freire Marques  
Relator  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Helena Cristina da Silva Assis  
Universidade Federal do Paraná

---

Igor Dias Medeiros  
Universidade do Sul de Santa Catarina



## **AGRADECIMENTOS**

A minha família, sempre presentes em todos os momentos da minha vida - pelo amor, carinho e por terem acreditado na minha escolha.

Ao meu orientador Dr. Afonso Celso Dias Bainy, por ter aceitado me orientar, pela sabedoria compartilhada, pelas oportunidades, amizade e consideração.

À profa. Maria Risoleta Freire Marques pela amizade, apoio, críticas e sugestões nesse tempo de convívio.

A todos os companheiros do LABCAI, em especial a Flávia, Marília, Clei, Jacó, Fabrício, Tarquin e Talita por suas preciosas ajudas no laboratório e pela convivência e incentivo durante esse tempo.

As amigas Aline, Celina e Rafaela por todos os conselhos e conversas.

A Universidade Federal de Santa Catarina, e ao programa de Pós-graduação em Biotecnologia e Biociências pela estrutura e apoio durante todo o mestrado.

À banca examinadora pela aceitação do convite e atenção dada ao trabalho.

Ao programa REUNI-Capes pela bolsa concedida durante o período do mestrado.



"A mente que se abre a uma nova idéia, jamais voltará ao seu estado original."  
(Albert Einstein)



## RESUMO

A Atrazina é muito utilizada no controle de erva-daninhas em cultivos agrícolas, e como consequência de seu uso, tem sido detectada no solo, águas superficiais e subterrâneas. Peixes tem sido muito utilizados como modelos em estudos de ecotoxicologia, indicando o risco biológico de exposição a contaminantes. O objetivo desse trabalho foi identificar e validar genes diferencialmente transcritos no fígado de *Poecilia vivipara* expostos a ATZ (100µg/L). Para tanto, foi realizada uma primeira exposição com 100ug/L de ATZ a peixes *P. vivipara* oriundos de biotério e empregado o método de hibridização subtrativa supressiva (SSH). A identificação destes genes foi realizada por homologia com o banco de dados NCBI (Blastx), resultando em 34 sequências que aparentemente tiveram uma repressão na transcrição e 61 dos genes que apresentaram um aumento na transcrição. Visando a análise de alguns genes provenientes da biblioteca subtrativa, uma segunda exposição foi realizado com peixes provenientes de ambiente natural e expostos a concentrações crescentes de ATZ (2, 10 e 100 ug/L) por 24h. Os genes selecionados foram *fibrinogenio gama e beta*, *inibidor de BAX*, *vitelogenina A*, *componente complemento C3 e C9* e *ligante de ácidos graxos*. Os genes *C9* e *Fibrinogênio Beta* aparentemente mostraram um aumento na transcrição nos tratamentos de 10 e 100 ug/L de ATZ em relação ao grupo controle; e *Vitelogenina A* apresentou um aumento na transcrição nos animais do tratamento de 10ug/L de ATZ em relação ao controle. Entretanto, os dois primeiros foram identificados na biblioteca dos genes reprimidos por ATZ. De forma similar, o gene *Inibidor Bax-1* apresentou uma diminuição em sua transcrição no fígado dos animais tratados com 10ug/L de ATZ, apesar de estar presente na biblioteca dos genes induzidos. Tais discrepâncias podem ser atribuídas a possíveis alterações populacionais, uma vez que o experimento preparatório para a subtração foi realizado com animais provenientes de cultivo no biotério da FURG-RS e os experimentos de validação foram realizados com populações de animais de ambiente natural em Florianópolis - SC.

**Palavras-chave:** SSH, Atrazina, peixes, marcadores moleculares.



## ABSTRACT

Many pesticides are used to control grass-weeds in agricultural crops, especially atrazine (ATZ). As a consequence of its use, the ATZ has been detected in soil, surface water and groundwater. Animals such as fish, can be used as models for studies of ecotoxicology, aiding in mapping the risk of exposure to organic contaminants. The aim of this study was to identify and analyze genes differentially transcribed in the liver of *Poecilia vivipara* exposed to ATZ (100 $\mu\text{g} / \text{L}$ ). For this purpose, we performed a first exposition to 100 $\text{ug.L}^{-1}$  ATZ fish *P. vivipara* from the animal vivarium and used the method of suppressive subtractive hybridization (SSH). The identification of these genes was performed by homology with sequences from NCBI database (Blastx), resulting in 34 sequences that composed the list of genes that apparently had a repression in transcription and 61 genes that showed an increase in transcription. In order to analyze some genes from the library subtractive, a second exposure was performed with fish provenientes natural environment and exposed to increasing concentrations of ATZ (2, 10 and 100  $\text{ug.L}^{-1}$ ) in a fixed time of 24 hours. The genes were selected *fibrinogen gamma* and *beta*, *inhibitors of BAX*, *vitellogenin A*, *complement component C3* and *C9* and *Liver type fatty acids binding*. *Fibrinogen beta* and *C9* apparently showed an increase in transcription in the treatments of 10 and 100  $\text{ug} / \text{L}$  of ATZ in relation to the control group, and vitellogenin A showed an increase in transcription in the treatment of animals 10 $\text{ug.L}^{-1}$  of ATZ in relation to the control. However, the first two were identified on the list of genes repressed by ATZ. Similarly, the gene Bax Inhibitor-1 showed a decrease in its transcription in the liver of animals treated with 10 $\text{ug.L}^{-1}$  ATZ, but was present in the library of genes apparently activated by ATZ. Such discrepancies may be attributed to possible changes or experimental population, since the preparation for the subtraction experiment was conducted with animals from growing in the vivarium of FURG and validation experiments were performed with populations of animals in natural environment in Florianopolis. In experimental terms, the main difference was attributed to the use of anesthetic benzocaine in the first experiment and the utilization of different populations of *P. vivipara*, which could have influenced the molecular response of the animals.

**Keywords:** SSH, Atrazine, fish, Molecular Biomarkers



## LISTA DE FIGURAS E TABELAS

### Tabelas:

<b>Tabela 1:</b> Biblioteca Subtrativa de genes induzidos .....	36
<b>Tabela 2:</b> Biblioteca Subtrativa de genes reprimidos.....	39
<b>Tabela 3:</b> Sequência dos iniciadores senso (F) e anti-senso (R) dos genes de <i>Poecilia vivipara</i> selecionados para a validação da técnica de SSH.....	42

### Figuras:

<b>Figura 1:</b> Estrutura química da Atrazina.....	22
<b>Figura 2:</b> Fotografias de peixes da espécie <i>Poecilia vivipara</i> . Fêmea a esquerda e Macho na imagem a direita.....	26
<b>Figura 3:</b> Transcrição dos genes <i>complement component C3 (C3)</i> , <i>BAX 1-inhibitor</i> , <i>fibrinogen gamma chain precursor (FibroG)</i> e <i>vitellogenin a (VitA)</i> , por PCR quantitativo no grupo de peixes <i>Poecilia vivipara</i> expostos a diferentes concentrações de Atrazina (2ug/L, 10ug/L e 100ug/L) após 24h. ..	43
<b>Figura 4:</b> Transcrição dos genes <i>complement component c9 (C9)</i> , <i>liver-type fatty acid- binding protein (FABP)</i> , <i>glutathione S-transferase (GST)</i> , <i>fibrinogen beta chain precursor (FibroB)</i> por PCR quantitativo no grupo de peixes <i>Poecilia vivipara</i> expostos a diferentes concentrações de Atrazina (2ug/L, 10ug/L e 100ug/L) após 24h. ....	44



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATZ – Atrazina.

BAX – *Bax inhibitor*.

BLAST - *Basic Local Alignment Search Tool* (algoritmo para comparação de sequências biológicas utilizando alinhamento local).

C3 – *Complement component 3*.

C9 – *Complement component 9*.

CAP3 - *Sequence Assembly Program*

CCA – Centro de Ciências Agrárias.

cDNA - Sequência nucleotídica complementar de DNA.

FABP – *Fatty Acid Binding Protein*.

FibroB – *Fibrinogênio Beta*.

FibroG – *Fibrinogênio gama*.

FURG – Fundação Universidade de Rio Grande.

GenBank - Banco de genes público que possui os dados produzidos pelo NCBI.

GST - Glutathione S-transferase

LABCAI – Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática e Imunoquímica.

LAPMAR - Laboratório de Piscicultura Marinha.

NCBI - *National Center for Biotechnology Information* (Centro Nacional de Informação Biotecnológica dos EUA).

PCR - Reação em cadeia da polimerase.

qPCR - Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real quantitativo.

RNA - Ácido ribonucleico.

RNAm - RNA mensageiro.

REST - Relative expression software tool.

SSH - Hibridização subtrativa supressiva.

UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina.

VitA - Vitelogenina A.



## SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO .....	19
1.1	HERBICIDA ATRAZINA .....	20
1.2	BIOMONITORAMENTO AMBIENTAL .....	22
2.	OBJETIVOS .....	25
2.1	OBJETIVO GERAL.....	25
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	25
2.3	REVISTA ESCOLHIDA PARA SUBMISSÃO DO ARTIGO CIENTÍFICO .....	25
3.	IDENTIFICAÇÃO E ANÁLISE DA TRANSCRIÇÃO DE GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS EM PEIXES <i>POECILIA VIVIPARA</i> EXPOSTOS AO HERBICIDA ATRAZINA.....	26
3.1	INTRODUÇÃO .....	28
3.2	MATERIAIS E MÉTODOS .....	29
3.2.1	<i>Transcrição diferencial de genes</i> .....	30
3.2.2	<i>Análise dos genes diferencialmente transcritos</i> .....	31
3.2.3	<i>Análises Estatísticas</i> .....	32
3.3	RESULTADOS .....	33
3.3.1	<i>Genes diferencialmente transcritos identificados através da metodologia da SSHs</i> .....	33
3.3.2	<i>Efeito na transcrição de genes de Poecilia vivipara exposto a Atrazina por 24h</i> .....	38
3.4	DISCUSSÃO .....	43
3.5	CONCLUSÕES .....	49
3.6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	50
4.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA INTRODUÇÃO .....	55



## INTRODUÇÃO

A água apresenta uma função paradoxal na sociedade humana, pois trata-se de um recurso indispensável à vida e um meio onde são descartados poluentes (SCHNURSTEIN e BRAUNBECK, 2001).

A poluição aquática é definida como qualquer alteração das características físicas, químicas e biológicas que pode causar danos à saúde, à segurança e ao bem estar das populações, além de dificultar a utilização dos recursos hídricos para fins agrícolas, industriais, comerciais, recreativos e, também, a existência da fauna e flora aquática (BRASIL, 1961).

Organismos aquáticos têm sido sucessivamente expostos a uma variedade de contaminantes provenientes da atividade industrial, agrícola e de efluentes urbanos (SCHNURSTEIN e BRAUNBECK, 2001), tais como, metais pesados, pesticidas, compostos orgânicos, hidrocarbonetos, etc.

O termo pesticida, biocida, defensivo agrícola, praguicida e agrotóxico são comumente utilizados com o mesmo significado, embora definições mais restritas possam incluir ou excluir dessa classificação diferentes grupos de substâncias químicas (MARASCHIN, 2003). Segundo a *United States Environmental Protection Agency* (USEPA) um pesticida é qualquer substância ou mistura de substâncias com capacidade de prevenir, destruir, repelir ou atenuar qualquer peste (USEPA, 2009).

Para atender a demanda crescente de insumos agrícolas tanto no mercado interno, como externo, tem sido verificado um aumento significativo no uso de agrotóxicos em diversos cultivos. Estes agrotóxicos estão distribuídos em diferentes classes de acordo com a sua finalidade e composição, tais como inseticidas, herbicidas, acaricidas, mas que comumente apresentam alguma classe de toxicidade (AMARANTE, BRITO e RIBEIRO, 2002).

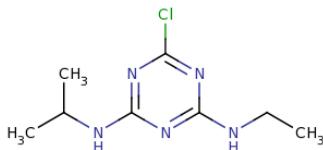
De acordo com Amarante *et al.* (2002), o maior problema no emprego de herbicidas está relacionado à questão ambiental, uma vez que a maioria destes compostos apresenta baixa adsorção em solos e apresentam altos potenciais de lixiviação. Os efeitos adversos da interação poluente químico - biota pode alcançar diferentes níveis tróficos da cadeia alimentar em um sistema aquático.

A atrazina (ATZ) (**Figura 1**) é um dos herbicidas mais utilizados em todo o mundo e tem sido encontrado em altas concentrações, tanto

em águas superficiais, como subterrâneas (LUDOVICE, ROSTON e FILHO, 2003). Segundo Ghiselli e Jardim (2007), o herbicida ATZ é considerado um interferente endócrino da classe dos xenoestrogênios (substâncias produzidas para utilização nas indústrias, na agricultura e para os bens de consumo), ou seja, uma substância química que pode interferir no funcionamento do sistema endócrino de diferentes espécies, incluindo os seres humanos. No entanto, as alterações provocadas por ATZ a nível molecular ainda são pouco conhecidas em animais aquáticos.

### 1.1 Herbicida Atrazina

As triazinas são grupos de compostos derivados de anéis aromáticos tri-substituídos por átomos de nitrogênio, e são muito utilizados como herbicidas. As mais utilizadas apresentam anel simétrico (1,3,5 – triazinas), sendo que as de primeira geração, representada pela ATZ, são formadas por um átomo de cloro no anel (**Figura 1**). Existem também as triazinas de segunda geração, que são formadas pela introdução de grupos metoxila (6-metoxi – 1,3,5-triazinas, ou metoxitriazinas ou triatonas), como as ametrinas, simetrinas, prometonas (MIDIO e MARTINS, 1997).



**Figura 1:** Estrutura química da Atrazina (formula C<sub>8</sub>H<sub>14</sub>ClN<sub>5</sub>)

Dentre os herbicidas da classe das triazinas, a ATZ é o mais conhecido. Foi introduzido no mercado em 1958 pela empresa CIBA-GEIGY, usado mundialmente como herbicida no controle de plantas infestantes de diversas culturas agrícolas. A sua ação se dá pela inibição da fotossíntese. Em concentrações elevadas, tem sido utilizada para

eliminar todas as plantas vivas, por exemplo, para criar áreas de estacionamento de veículos (BAIRD, 2002).

Os pesticidas estão divididos em quatro classes toxicológicas. A classe I abrange os compostos considerados altamente tóxicos para seres humanos; a II, os medianamente tóxicos; a III, os pouco tóxicos e a IV, os compostos considerados praticamente não-tóxicos para seres humanos. A ATZ é classificada como um herbicida de classe III. (SANCHES *et al.*, 2003).

No Brasil, o ingrediente ativo ATZ compõe formulações comerciais de herbicidas registrados e comercializadas para o controle de plantas daninhas em diferentes culturas, como milho, cana-de-açúcar e sorgo. No entanto, desde 1993 o uso desse ingrediente ativo foi restrito nos Estados Unidos da América devido a estudos que constataram riscos de efeitos tóxicos em água para consumo humano. Na Europa, houve uma baixa na comercialização de ATZ a partir de 1989, devido às restrições de seu uso e a competição com novos herbicidas menos persistentes no ambiente. Os problemas de contaminações de águas subterrâneas e superficiais e as comprovações de que esse herbicida provoca distúrbios endócrinos em peixes e anfíbios, levaram ao seu banimento na Alemanha, Áustria, Dinamarca, Eslovênia e Itália, estando sob restrições em outros países europeus, incluindo a França e a Inglaterra (ATRAZINE, 2008). Atualmente, a ATZ continua sendo um dos herbicidas mais utilizados em todo o mundo, principalmente nos países produtores de grãos, como Argentina e Brasil, onde tem sido detectada em elevadas concentrações, tanto em águas superficiais quanto subterrâneas (LUDOVICE, ROSTON e FILHO, 2003).

A meia-vida da ATZ varia, dependendo das condições ambientais e das características do solo em questão, sendo os microrganismos os principais responsáveis por sua degradação. Os fatores que mais afetam a atividade microbiana e a degradação de um pesticida são a umidade e a temperatura (WOLF e MARTIN, 1975). De acordo com Walker (1996), a meia-vida deste herbicida em alguns solos variou de aproximadamente um mês no período quente e solo úmido (25°C) para cerca de um ano no período frio e solo úmido (5°C). Segundo Gaynor, Mactovish e Findlay (1992), a degradação do pesticida oscila entre 20 até mais de 100 dias, existindo casos superiores a 300 dias.

Mandelbaum, Allan e Wackett (1993) constataram que abaixo de 7°C a degradação da ATZ foi insignificante, mas se acelerou acima de 15°C, o que mostra que a temperatura ótima para ocorrer a degradação está dentro da faixa de atividade metabólica máxima dos microrganismos. Estudos de Andrea *et al.* (1996) demonstraram que a

degradação de ATZ é proporcional ao aumento de temperatura e, que quanto maior for seu valor comercial, menor quantidade de resíduos extraíveis e maior quantidade de resíduos ligados foram detectados. Embora persista na maioria dos solos durante apenas alguns meses, quando a ATZ e seus metabólitos alcançam os cursos d'água sua meia-vida é da ordem de anos (BAIRD, 2002).

Este herbicida é também classificado como um agente carcinogênico da classe C, na qual estão incluídos compostos potencialmente cancerígenos para o homem (BIRADAR e RAYBURN, 1995), tendo sido associada a um risco de maior incidência de diferentes tipos de câncer, como o linfoma não-Hodgkin, câncer de mama e de próstata (MACLENNAN *et al.*, 2002, ROULLAND *et al.*, 2004).

Também pode retardar o desenvolvimento das glândulas mamárias e induzir aborto em roedores de laboratório. Estudos epidemiológicos indicam que níveis muito baixos de exposição através da água contaminada durante períodos-chaves da gravidez podem interferir no desenvolvimento do feto (NAROTSKY *et al.*, 2001).

No Brasil, o padrão de potabilidade de ATZ em água, regulamentado pela Portaria do Ministério da Saúde n° 518/2004 estabelece como valor máximo permitido em 2 ug/L.

## 1.2 Biomarcadores

Em razão da necessidade de métodos mais precisos e sensíveis na avaliação do risco ambiental das atividades antrópicas, a *International Council for the Exploration of the Sea* aconselha que programas de biomonitoramento ambiental sejam realizados com o intuito de alertar e prevenir impactos irreversíveis nos ecossistemas. Nestes programas, recomenda-se: o uso de organismos sentinela, bioindicadores e monitores de contaminação (ICES, 2004).

Bioindicadores indicam se um grupo de organismos num dado ambiente está dentro de seus padrões fisiológicos normais. Se a resposta for negativa, investigações adicionais podem ser justificadas para determinar a natureza e o grau de contaminação (WALKER, 1996). Os efeitos de xenobióticos podem ser avaliados em diferentes níveis de organização biológica (HUGGETT *et al.*, 1992) através da análise de biomarcadores, que refletem o *status* de saúde dos organismos nos menores níveis de organização e podem ser utilizados como indicadores

precoces de alterações no ecossistema antes da ocorrência de danos irreversíveis (HUGGETT *et al.*, 1992).

Os biomarcadores atuam como sinalizadores da degradação ambiental causada pelos contaminantes (RAND, 1995), através de alterações biológicas em nível molecular, celular ou fisiológico que expressam os efeitos tóxicos causados pelos contaminantes nos organismos expostos (WALKER, 1996). Podem ser classificados como biomarcadores de exposição, indicando a exposição dos organismos aos contaminantes, como biomarcadores de efeito, mostrando a magnitude da perturbação causada em resposta a poluentes, fornecendo evidências do estado de poluição, como resultado de efeitos sinérgicos, de indução, antagonísticos ou repressão em um biomarcador específico (CAJARAVILLE *et al.*, 2000).

O uso de técnicas de biologia molecular na ecotoxicologia permitiu ampliar o conhecimento dos mecanismos de ação dos contaminantes nos organismos, pois os padrões de expressão gênica podem fornecer informações sobre a interação entre os estressores ambientais e o genoma (BRULLE *et al.*, 2008).

Com base em Bultelle *et al.* (2002) para se estudar alterações a nível molecular pode-se utilizar basicamente duas tecnologias: sistemas abertos e fechados. Para a utilização de sistemas fechados é necessário que seja conhecido o genoma, ou os genes de estudo da espécie em questão; já os sistemas abertos não há necessidade de saber o genoma. Como exemplos de sistema fechado temos a técnica dos microarranjos, já no aberto descantam-se as técnicas *differential display* e hibridização subtrativa supressiva (SSH).

Uma das técnicas de biologia molecular aplicada em organismos monitores, cujo genoma permanece desconhecido, é a de hibridização subtrativa supressiva (SSH). Essa técnica possibilita a construção de bibliotecas subtrativas de cDNAs que podem ser comparadas às disponíveis em bancos de genes (SEWALL, 1999).

Dessa forma, a análise da expressão do RNA mensageiro de diferentes genes em organismos expostos a um determinado contaminante pode ser utilizada em estudos mecanísticos e servir como um potencial marcador dos efeitos tóxicos (SEWALL, 1999).

Programas de biomonitoramento utilizam espécies animais escolhidas por apresentarem condições adequadas para o estudo, como: elevado nível trófico, autóctone, não migratória e presente nas áreas a serem avaliadas (ARIAS, VIANA e INÁCIO, 2002). Os peixes são muito utilizados como organismos sentinelas porque refletem rapidamente as alterações em seu ambiente e os efeitos da exposição a

xenobióticos podem ser quantificados em termos de respostas bioquímicas ou fisiológicas (MONDON, DUDA e NOWAK, 2001).

Uma vez no ambiente, os contaminantes entram em contato com os peixes através da pele, alimentação e brânquias, e quando incorporados por diferentes vias, podem ser bioacumulados. O fígado é indiretamente afetado por estar relacionado com o metabolismo e excreção de xenobióticos. Uma parte desses compostos pulvulentos são transferidos para o fígado para serem biotransformados em substâncias hidrossolúveis e depois, excretadas.

O peixe *Poecilia vivipara* (**Figura 2**), vulgarmente conhecido como barrigudinho, ocorre ao longo da costa brasileira. Esta espécie é resistente a variações ambientais, possui populações não migratórias e está amplamente distribuída em ambientes lênticos salinos na América do Sul, na Costa Atlântica, representando um modelo potencial para estudos ambientais como proposto por Zanette (2009) e Mattos *et al.* (2009). Trata-se de uma espécie que possui dimorfismo sexual, resistente a água poluída, que suporta ambientes com baixos teores de oxigênio e são tolerantes a variações de salinidade e temperatura da água (GOMES e MONTEIRO, 2008).



**Figura 2:** Fotografias de peixes da espécie *Poecilia vivipara*. Fêmea a esquerda e Macho na imagem a direita.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

O objetivo deste estudo foi identificar e analisar genes diferencialmente transcritos em *Poecilia vivipara* expostos a ATZ.

### 2.2 Objetivos Específicos

Identificar genes diferencialmente transcritos em fígado de *Poecilia vivipara* expostos a ATZ.

Construir uma biblioteca genômica subtrativa de *Poecilia vivipara* expostas a ATZ;

A partir das seqüências de cDNA identificadas, desenhar e validar o uso de pares de iniciadores, através da técnica de PCR quantitativo, para avaliar alterações na transcrição gênica no fígado de peixes *Poecilia vivipara* expostas à diferentes concentrações de ATZ

### 2.3 Revista escolhida para submissão do artigo científico

O presente estudo deverá ser submetido para ser publicado no periódico científico internacional *Ecotoxicology and Environmental Safety*, editado pela Editora Elsevier, que atualmente possui um Fator de Impacto equivalente a 2,34.

### 3. IDENTIFICAÇÃO E ANÁLISE DA TRANSCRIÇÃO DIFERENCIAL DE GENES EM PEIXES *Poecilia vivipara* EXPOSTOS AO HERBICIDA ATRAZINA

Elisa C. Ferreira<sup>1</sup>, Flávia L. Zacchi<sup>1</sup>, Guilherme Toledo-Silva<sup>2</sup>, Jacó J. Mattos<sup>1</sup>, Clei E. Piazza<sup>1</sup>, Abel Machado<sup>3</sup>, Talita Miguelão<sup>1</sup>, Adalto Bianchini<sup>3</sup>, Afonso C. D. Bairy<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática e Imunoquímica – Universidade Federal de Santa Catarina.

<sup>2</sup>Universidade Estadual de Campinas.

<sup>3</sup>Fundação Universidade Federal de Rio Grande

\*Autor para correspondência: ACD Bairy (e-mail bairy@mbox1.ufsc.br). Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, 88040-490.

#### RESUMO

A atrazina (ATZ) é o herbicida mais comumente utilizado para controlar o crescimento de ervas daninhas em áreas de cultivo e muito frequentemente detectados em solos, águas superficiais e subterrâneas. *Poecilia vivipara* é um peixe eurialino, encontrado em locais com diferentes graus de impacto antrópico. O objetivo deste estudo foi identificar genes diferencialmente transcritos no fígado de *Poecilia vivipara* após 24 horas de exposição à ATZ (100µg/L), empregando a técnica de hibridização subtrativa supressiva (SSH). De 451 clones sequenciados e analisados por homologia com o banco de dados NCBI (blastx), foram identificadas 34 sequências genicas que apresentaram uma diminuição na transcrição e 61 sequências que apresentaram um aumento em sua transcrição. Destes, foram selecionados 8 genes para validação dos resultados pela técnica de qPCR. Após uma nova exposição com níveis crescentes de ATZ (2, 10 e 100 ug/L), 4 genes apresentaram níveis de transcrição diferente no fígado dos animais tratados em relação ao grupo controle, sendo eles: *Inibidor de BAX*, *Fibrinogeno Beta*, *Complemento componente 9* e *Vitellogenina A*. Os três primeiros genes apresentaram resultados opostos ao utilizar estas duas metodologias. Tais discrepâncias podem ser atribuídas a possíveis alterações populacionais ou experimentais, uma vez que a exposição para a subtração foi realizada com populações de peixes de Rio Grande e os experimentos de validação com populações de animais de Florianópolis. Em termos experimentais, a principal diferença foi atribuída a utilização de anestésico benzocaína no experimento realizado em Rio Grande, o que poderia ter influenciado na resposta molecular

dos animais. Os genes *C9* e *Fibrinogênio Beta* aparentemente mostraram um aumento na transcrição nos tratamentos de 10 e 100 ug/L de ATZ em relação ao grupo controle; e *Vitelogenina A* apresentou um aumento na transcrição nos animais do tratamento de 10ug/L de ATZ em relação ao controle. Essas variações possivelmente indicam alterações no sistema imune e de defesa em peixes, visando controlar os efeitos causados pelo contaminante.

**Palavras-chave:** SSH, Atrazina, peixes, marcadores moleculares.

## Introdução

A atrazina (ATZ) é um herbicida mundialmente utilizado no controle de plantas infestantes de diversas culturas agrícolas. Devido ao uso extensivo, persistência, solubilidade em água e adsorção relativamente fraca ao solo, a ATZ está presente no ambiente aquático pela lixiviação do solo e drenagem durante e após a aplicação do herbicida (GFRERER *et al.*, 2002; CHUNG e GU, 2003). É considerado um agente potencialmente carcinogênico e desregulador endócrino para o homem (LUDOVICE, ROSTON e FILHO, 2003; GHISELLI e JARDIM, 2007) e animais aquáticos, com potencial de alterar processos fisiológicos, especialmente durante os estágios iniciais da vida. Em organismos aquáticos, a ATZ pode causar alterações comportamentais (SAGLIO e TRIJASSE, 1998), danos hematológicos (HUSSEIN, EL-NASSER e AHMED, 1996), distúrbios no metabolismo (PRASAD *et al.*, 1995), e afetar a reprodução (MOORE e WARING, 2001), particularmente interferindo no desenvolvimento gonadal de machos através da queda dos níveis de hormônios androgênicos, diminuição da produção de sêmen (MOORE e WARING, 1998).

As populações de peixes desempenham um papel cada vez mais importante no monitoramento da poluição da água, porque estes organismos respondem com grande sensibilidade a mudanças no ambiente aquático (SIROKA e DRASTICHOVA, 2004).

Biomarcadores são respostas bioquímicas, moleculares, celulares, fisiológicas ou comportamentais induzidas na presença de contaminantes que têm sido utilizados em diferentes áreas como farmacologia, toxicologia e ecotoxicologia (WALKER, 1996). A grande vantagem do uso de biomarcadores é o fornecimento de evidências dos efeitos tóxicos causados pelos poluentes, como resultado de efeitos sinérgicos de ativação ou inibição (CAJARAVILLE *et al.*, 2000).

Alterações no padrão de transcrição gênica são um reflexo da somatória dos efeitos a curto, médio e longo prazo nos animais expostos a misturas complexas de contaminantes ou a contaminantes específicos. Através da identificação dos genes transcritos diferencialmente em animais expostos a determinados contaminantes, diferentes mecanismos de toxicidade podem ser elucidados, assim como a caracterização de novos potenciais biomarcadores.

Portanto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a transcrição gênica diferencial em peixes *Poecilia vivipara*, identificada pela hibridização subtrativa supressiva (SSH), e avaliada através da análise

da transcrição de determinados genes através da técnica de PCR quantitativo

### 3.1 Materiais e Métodos

#### 3.1.1 *Delineamento experimental*

Os exemplares de *P. vivipara* foram coletados em duas localidades; no Biotério da Fundação Universidade Federal de Rio Grande – FURG e em uma lagoa próxima aos tanques de cultivo de peixes do Laboratório de Piscicultura Marinha (LAPMAR), Departamento de Aquicultura da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Armadilhas de captura tipo *Minnowtrap*<sup>TM</sup>, com ração para peixe como atrativo, foram utilizadas para a coleta dos peixes no LAPMAR.

Os animais do Biotério da FURG não precisaram de período de aclimação, pois foram produzidos no próprio laboratório. Os exemplares coletados no ambiente foram aclimatados no Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática e Imunoquímica (LABCAI), CCA/CCB, UFSC, por 10 dias em água do mar filtrada, utilizando-se filtros de 0,45µm, a 21°C e salinidade 24, com aeração constante. Durante esse período receberam alimentação peletizada e os aquários drenados diariamente.

Dois experimentos foram realizados. O primeiro foi a exposição á ATZ nos animais destinados a análise da transcrição diferencial de genes com os animais provenientes da FURG, e o segundo para a validação dos genes identificados no primeiro experimento com os animais coletados no ambiente e expostos a quantidades crescentes do herbicida.

A primeira exposição a ATZ foi realizada em 2 aquários de 15 litros, contendo 9 peixes em cada aquário, e foram mantidos por 24h a temperatura 25°C e salinidade 24. Ao primeiro aquário foi adicionado 100 µg/L de ATZ (Fluka Pestanal cod.45330) diluída em metanol absoluto (solução mãe de 10 mg/ml). No segundo aquário, os animais foram mantidos somente com água do mar filtrada, acrescido com a mesma quantidade de metanol utilizada para diluir a ATZ, grupo controle.

No experimento de validação dos genes diferencialmente transcritos, grupos de 14 animais foram colocados, respectivamente, em 4 aquários, a temperatura 25°C e salinidade 24. Um grupo controle foi mantido sem a adição de ATZ e outros três grupos foram expostos a concentrações crescentes do herbicida (2, 10 e 100 µg / L), durante 24h. A concentração de 2ug/L foi escolhida por ser a quantidade máxima permitida na água potável pelo Ministério da Saúde (N. 518/2004), 10 ug/L por ser um valor inferior ao indicado para a agricultura (25ug/L) e 100ug/L por ser superior ao utilizado a agricultura e que não leva o animal a óbito.

### 3.1.2 Transcrição diferencial de genes

Após o período de exposição, os animais (provenientes do biotério da FURG) foram anestesiados com Benzocaína, sacrificados e dissecados para a retirada do fígado. As amostras foram agrupadas em *pools* de 3 fígados (n=3), preservados em RNA later (Qiagen®) e armazenadas em freezer -80°C depois de 24h. Para a extração de RNA total do fígado foi utilizado o reagente TRIzol (Invitrogen®), de acordo com o protocolo do fabricante.

O RNA mensageiro foi isolado e purificado usando o kit *MicropolyA mRNA* (Ambion®), a partir do RNA total de acordo com instruções do fabricante. A concentração e pureza do RNA total e mRNA foram checadas em espectrofotômetro Nanodrop 2000 (Thermo Scientific) a 260nm e através da verificação da razão 260/280nm e 230/260nm.

Os fragmentos diferencialmente transcritos foram selecionados por Hibridização Supressiva Subtrativa utilizando o *kit Clontech PCR-Select cDNA Subtraction* (Clontech®). Primeiramente o mRNA foi reversamente transcrito seguindo as instruções do fabricante, depois os fragmentos diferencialmente transcritos foram selecionados por hibridização e amplificados por NESTED-PCR, utilizando iniciadores específicos e o produto final foi visualizado por eletroforese em gel de agarose 2%. O produto do NESTED-PCR foi purificado pelo *Kit DNA Clean & Concentrator* (Zymo Research®) de acordo com protocolo específico e o cDNA purificado foi ligado a vetores *pGEM-T Easy® kit Vector* (Promega, Madison) e inseridos em células DH5- $\alpha$  por choque térmico, plaqueadas em meio de cultura *Luria Bertani agar* (40g/L), contendo ampicilina (100mM). Logo após, as células contendo o vetor e

o inserto, foram selecionadas e transferidas para um meio líquido *Superbroth* e cultivadas em incubadora de bancada a 240rpm a 37°C por até 18 horas. Após esse período a purificação do DNA plasmidial foi realizada pelo método de lise alcalina, modificado de Sambrook (1989).

Os produtos foram sequenciados no sequenciador ABI 3130 *Genetic Analyzer* (Applied Biosystems®) para 4 capilares, utilizando o *Kit ET Dye Terminator DYEnamic*® com os iniciadores M13F ou M13R. A qualidade das sequências foram analisadas no *software BioEdit* (*Biological Sequence Alignment editor*). Para a identificação das sequências consensos, ou *contigs*, foi utilizado o programa CAP3 (*Sequence Assembler Program*) (<http://pbil.univ-lyon1.fr/cap3.php>) e a identificação das sequências foram comparadas ao banco de dados disponível (*Genebank*) com auxílio do *software* BLAST2Go (<http://www.blast2go.org/>).

### 3.1.3 *Análise dos genes diferencialmente transcritos*

Após a exposição, os animais foram mortos através de uma secção no cordão nervoso da medula espinhal (decapitação) e o fígado foi retirado. Neste experimento, não foi utilizado anestésico para evitar uma possível interferência a nível de transcrição gênica. As amostras de fígado foram agrupadas em *pool* de dois por microtubo (n=6), imediatamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados em freezer -80°C. A extração de RNA total foi realizada de acordo com o protocolo para o reagente *TRIzol* (Invitrogen®) e 2µg desse RNA total foram reversamente transcritos para cDNA pelo kit *Quantitect Reverse Transcription* (Qiagen®). Dos animais dissecados, foi observada hemorragia próxima a nadadeira ventral em 4 indivíduos.

Os iniciadores específicos para cada gene selecionado, baseado nos genes identificados na biblioteca de cDNA diferencialmente transcrita no experimento 1 (**Tabela 1** e **Tabela 2**). Os iniciadores foram desenhados com o auxílio do programa *Primer Quest* (Integrated DNA Technology, IDT) e *FASTPCR*, analisando os resultados de *hairpin* e a formação de dímeros. Para normalizar os dados da qPCR em tempo real foram desenhados iniciadores para os genes constitutivos *s2 ribosomal protein* e *elongation factor 2*.

Entre a lista dos genes induzidos (*up-regulated*), selecionamos *bax inhibitor 1*, *fibrinogen gamma chain precursor*, *vitellogenin A* e *complement component c3*. Dentre os reprimidos (*down-regulated*)

selecionamos: - *Liver-type fatty acid-binding protein*, *glutathione s-transferase a*, - *fibrinogen beta chain precursor*, *complement component c9*. Os iniciadores utilizados estão mostrados na Tabela 3.

Os experimentos foram realizados no aparelho *Rotor Gene™* 6000 (Corbett Lifesciences®) com rotor de 72 poços seguindo parâmetros padronizados para cada gene estudado. O kit utilizado foi o *Rotor-Gene SYBR Green Kit* (Qiagen®), garantindo o mínimo de óptica e variações de temperatura entre os tubos e alta precisão na quantificação de PCR em tempo real.

Para a amplificação dos produtos da qPCR foram utilizados 20uM de cada iniciador e 100ng de amostra. As condições da PCR foram: 95°C por 5 min, 40 ciclos de 10s a 95°C e 30s a 60°C, fase onde ocorreu a aquisição da fluorescência. Todas as amostras foram analisadas em duplicatas e através da curva de dissociação (*Melting*) foi possível confirmar a amplificação de um único produto.

Para a definição do *threshold* utilizado para cada par de iniciadores específicos foi realizada uma curva padrão. O *threshold* foi definido como a menor fluorescência em que a reação apresentou uma eficiência de amplificação de 100% e a curva com linearidade ( $r^2$ ) superior a 98%. A curva padrão foi montada usando-se um *pool* das amostras de todos os grupos diluídas de forma seriadas: 2, 10, 100 e 1000 vezes.

Os dados foram analisados no *software Rotor Gene 6000 Analysis version 1.7* (Corbett Research®) e encontrado o valor de Ct (*ciclo Threshold*) que representa o número do ciclo no qual a fluorescência passa o *Threshold*.

Para análise da eficiência da curva, o *software* correlacionou a quantidade de cDNA predita na reação com o Ct da amostra. A partir dos pontos gerados foi feita a regressão linear e a eficiência da curva foi analisada através dos dados da equação como linearidade ( $R^2$ ) e do coeficiente angular (M).

#### 3.1.4 Análises Estatísticas

O cálculo da transcrição dos genes e a análise estatística foram realizadas utilizando o *software REST* através dos dados de Ct de cada gene e os gráficos confeccionados pelo programa estatístico *GraphPad.Prism* versão 5.01

## 3.2 Resultados

### 3.2.1 *Genes diferencialmente transcritos identificados através da metodologia da SSHs*

Duas bibliotecas foram geradas através da técnica da SSH em fígado de peixes *Poecilia vivipara*, uma de genes induzidos em resposta ao contaminante ATZ e outra dos genes reprimidos.

Através do software CAP3, de 451 clones seqüenciados, foram formados 85 *Contigs* e 69 seqüências únicas. Por meio do Blastx no banco de dados do NCBI, 95 genes foram identificados, 61 genes que tiveram a sua transcrição aumentada (**Tabela 1**) e 34 genes que tiveram sua transcrição reprimida (**Tabela 2**). As seqüências restantes (59) não tiveram similaridade com genes conhecidos.

Cinco genes apareceram em ambas bibliotecas: *complement c4*, *complement component c3*, *cytochrome c oxidase subunit i*, *nadh dehydrogenase subunit 1* e *vitellogenin a*.

Das sequencias identificadas, somente três não tiveram similariedade com seqüências gênicas de outros peixes.

As atividades biológicas daqueles genes identificados como ativados pela técnica de SSH estão associadas ao alongamento na tradução, cadeia respiratória, cascata de coagulação, desenvolvimento do fígado, homeostase do colesterol, ligação proteína-cromóforo, metabolismo de lipídios, metabolismo de lipoproteínas, morfogênese do vaso sanguíneo, oxi-redução, formação de corpos cetônicos, metabolismo de carboidratos, proteólise, apoptose, estresse, sistema imunológico, síntese protéica, transporte de hexoses, transporte de lipídios, transporte de proteínas, vasodilatação (**Tabela 1**).

Os genes identificados como reprimidos pela técnica de SSH apresentaram as atividades biológicas relacionadas com a adesão celular, cascata de coagulação, fase II de biotransformação, metabolismo de lipídios, metabolismo de lipoproteínas, metabolismo de carboidratos, reações de oxidação, regulação da transcrição, regulação negativa da atividade das peptidases, resposta a danos no DNA, respiração aeróbica, resposta ao estímulo químico, sistema imune, síntese de proteínas, transdução de sinal, transporte de lipídios, vasodilatação e via de sinalização de neuropeptídeo (**Tabela 2**).

**Tabela 1:** Lista dos genes identificados como induzidos através da técnica de hibridização subtrativa supressiva.

Atividade Biológica	Descrição	Espécie	Contig	N	Tamanho	e-Value
	<i>fc receptor-like protein 5-like</i>	<u>Oreochromis niloticus</u>		1	194	3,66E-03
	<i>sc:d0144 protein</i>	<u>Tetraodon nigroviridis</u>	1	4	334	2,00E-29
	<i>d-serine deaminase activator</i>	<u>Oreochromis niloticus</u>		1	870	4,54E-18
Alongamento da tradução	<i>eukaryotic translation elongation factor 2</i>	<u>Fundulus heteroclitus</u>		1	920	6,30E-98
Cadeia respiratória	<i>cytochrome oxidase subunit I</i>	<u>Cyprinodontiformes sp</u>	1	14	219	2,54E-32
		<u>Fundulus heteroclitus</u>	1	3	310	3,00E-57
	<i>cytochrome c oxidase subunit iii</i>	<u>Xiphophorus maculatus</u>	1	3	223	1,97E-28
Cascata de coagulação	<i>fibrinogen gamma chain precursor</i>			1	904	1,41E-115
	<i>fgg protein</i>	<u>Oreochromis niloticus</u>		1	884	1,27E-86
	<i>c1 inhibitor</i>	<u>Oreochromis niloticus</u>		1	242	9,49E-09
	<i>coagulation factor ii precursor</i>		1	4	610	1,46E-86
	<i>heparin cofactor ii</i>	<u>Oplegnathus fasciatus</u>	1	2	910	9,30E-129
Desenvolvimento do fígado	<i>alpha-2-macroglobulin-like protein 1-like</i>	<u>Oreochromis niloticus</u>		1	698	6,16E-55
		<u>Oreochromis niloticus</u>	1	5	370	1,07E-54
Homeostase do colesterol	<i>transmembrane protein 97</i>	<u>Oreochromis niloticus</u>	1	2	620	7,98E-66
Ligação Proteína-cromóforo	<i>protein ambp-like</i>	<u>Oreochromis niloticus</u>	1	3	468	1,36E-45
		<u>Tetraodon nigroviridis</u>	1	5	225	2,44E-36
Metabolismo de lipídios	<i>lipoprotein lipase</i>	<u>Siniperca chuatsi</u>	1	3	114	8,15E-09
Metabolismo de lipoproteínas	<i>apolipoprotein b-100-like</i>	<u>Oreochromis niloticus</u>	1	2	549	1,65E-18
Morfogênese do vaso sanguíneo	<i>complement c1q tumor necrosis factor-related protein 3-like</i>	<u>Tetraodon nigroviridis</u>	1	3	374	1,27E-15
Oxidação e redução	<i>homogentisate - dioxygenase</i>	<u>Oreochromis niloticus</u>	1	2	368	7,23E-16
Metabolismo de corpos-cetônicos	<i>3-oxoacid transferase 1</i>	<u>Danio rerio</u>	1	4	327	6,85E-53

Continuação...

Metabolismo de carboidratos	<i>Fructose-bisphosphate aldolase b</i>	<u>Poecilia reticulata</u>	1	7	601	5,54E-121	
	<i>fructose-bisphosphate aldolase b</i>	<u>Poecilia reticulata</u>			1	820	3,30E-69
Estabilização da matriz extra-celular	<i>inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain h3-like</i>	<u>Oreochromis niloticus</u>			1	906	6,39E-33
Processo metabólico hialurônico	<i>novel protein (zgc:56119)</i>	<u>Oreochromis niloticus</u>			1	938	5,27E-11
Proteólise	<i>elastase 1 precursor</i>	<u>Epinephelus coioides</u>	1	2	516	7,17E-82	
Regulação negativa da apoptose	<i>bax inhibitor 1</i>	<u>Oreochromis niloticus</u>			1	225	9,29E-25
Resposta ao estresse	<i>7-alpha-hydroxycholest-4-en-3-one 12-alpha-hydroxylase-like</i>	<u>Oreochromis niloticus</u>			1	259	5,98E-32
Sistema Imune	<i>complement factor partial</i>	<u>Xiphophorus hellerii</u>	1		366	2,47E-70	
		<u>Fundulus heteroclitus</u>	1		154	9,86E-22	
	<i>complement component c3</i>	<u>Xiphophorus hellerii</u>	1		771	3,64E-79	
		<u>Epinephelus bruneus</u>	1		909	7,21E-100	
		<u>Fundulus heteroclitus</u>	1	3	201	3,07E-06	
		<u>Tetraodon nigroviridis</u>	1		271	4,99E-27	
Sistema Imune	<i>complement component c3</i>	<u>Oryzias latipes</u>	1	2	695	1,40E-79	
		<u>Oreochromis niloticus</u>			1	727	1,44E-51
	<i>complement c4</i>	<u>Oryzias latipes</u>	1		265	6,80E-23	
		<u>Fundulus heteroclitus</u>	1	9	612	1,18E-58	
	<i>apolipoprotein a-i</i>	<u>Oreochromis niloticus</u>			1	465	1,89E-41
	<u>Morone saxatilis</u>	1	4	991	4,82E-10		
Síntese protéica	<i>elongation factor 2</i>	<u>Fundulus heteroclitus</u>	1	2	329	3,07E-64	
Transporte de hexoses	<i>solute carrier family 37 (glucose-6-phosphate transporter)</i>	<u>Oreochromis niloticus</u>			1	919	1,01E-63
		<u>Oreochromis niloticus</u>			1	732	5,57E-52

Continuação...

		<u>Poecilia latipinna</u>	1	2	213	1,24E-15
	<i>vitellogenin a</i>			1	163	1,14E-07
		<u>Poecilia reticulata</u>	1	2	428	3,66E-70
			1	7	657	9,62E-137
Transporte de lipídio		<u>Poecilia reticulata</u>		1	381	3,42E-79
	<i>vitellogenin b</i>			1	617	4,26E-109
		<u>Gambusia affinis</u>	1	2	346	9,18E-50
		<u>Gambusia affinis</u>		1	895	8,33E-42
	<i>vitellogenin c</i>			1	274	3,77E-22
		<u>Poecilia reticulata</u>	1	3	312	1,95E-55
Transporte de proteínas	<i>nascent polypeptide-associated complex subunit alpha</i>	<u>Pagrus major</u>	1	5	626	3,38E-68
Transporte mitocondrial.	<i>mitochondrial uncoupling protein 1</i>	<u>Oreochromis niloticus</u>	1	3	871	6,26E-62
			1	3	176	1,22E-15
Transporte de elétrons	<i>nadh dehydrogenase subunit 1</i>	<u>Poecilia caucana</u>	1	3	320	3,72E-53
Transporte transmembrana	<i>solute carrier family 37 (glucose-6-phosphate transporter)</i>	<u>Oreochromis niloticus</u>		1	732	5,57E-52
vasodilatação	<i>kininogen-1 isoform 1</i>	<u>Oreochromis niloticus</u>		1	290	1,37E-24

*Legenda:* Primeira coluna está a atividade biológica, 2<sup>o</sup> coluna é a descrição do gene no Genbank, 3<sup>o</sup> a espécie ao qual foi relatada, 4<sup>o</sup> indica a quantidade de contigs, 5<sup>o</sup> indica o número de clones, 6<sup>o</sup> é o tamanho do fragmento (pb) e na última coluna indica o índice de e-Value.

**Tabela 2:** Lista dos genes identificados como reprimidos através da técnica de hibridização subtrativa supressiva.

Atividade Biológica	Descrição	Espécie	Contigs	N	Tamanho	e-Value
	<i>hypothetical loc792613</i>	<u>Epinephelus bruneus</u>	1	2	652	1,08E-23
Adesão celular	<i>f-type lectin</i>	<u>Oreochromis niloticus</u>	1	2	623	2,27E-32
Cascata de coagulação	<i>fibrinogen beta chain precursor</i>	<u>Epinephelus coioides</u>	1	4	165	1,47E-24
Fase II de Biotransformação	<i>glutathione s-transferase a</i>	<u>Atherina boyeri</u>	1	3	627	7,13E-21
Processo metabólico	<i>alanine-glyoxylate aminotransferase</i>			2	462	1,68E-78
	<i>4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase</i>	<u>Oreochromis niloticus</u>	1	3	637	4,52E-38
	<i>inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain h2-like</i>		1	2	637	1,22E-27
	<i>alanine-glyoxylate aminotransferase</i>		1	2	578	4,83E-30
Processo metabólico lipídico	<i>2-acylglycerol o-acyltransferase 1</i>	<u>Oreochromis niloticus</u>	1	5	658	5,54E-93
Processos metabólicos de carboidratos	<i>fructose-1,6-bisphosphatase</i>	<u>Cyprinus carpio</u>	1	3	625	7,70E-26
Reação de oxidação	<i>aldehyde oxidase-like nadh dehydrogenase subunit 1</i>	<u>Poecilia reticulata</u>	1	8	641	4,72E-23
		<u>Poecilia caucana</u>	1	2	655	2,72E-51
	<i>a chain thermodynamic and structure guided design of statin hmg-coa reductase inhibitors</i>	<u>Fundulus heteroclitus</u>	1	2	663	3,69E-58
Regulação da transcrição	<i>tripartite motif-containing 33</i>	<u>Oreochromis niloticus</u>	1	4	668	5,83E-62
Regulação negativa da atividade catalítica	<i>si:ch73- protein</i>	<u>Danio rerio</u>		1	627	5,48E-37
Síntese de proteínas	<i>cystatin precursor</i>	<u>Esox lucius</u>	1	4	634	5,76E-13
		<u>Burkholderia cepacia</u>		1	654	9,61E-04

Continuação...

Resposta a danos no DNA	<i>replication protein a 70 kda dna-binding subunit</i>	<u>Tetraodon nigroviridis</u>	1	5	659	6,78E-80
Respiração aeróbica	<i>cytochrome c oxidase subunit i</i>	<u>Epinephelus bruneus</u>	1	3	665	1,24E-26
Resposta ao estímulo químico	<i>warm temperature acclimation-related 65 kda protein</i>	<u>Fundulus heteroclitus</u>	1	7	936	2,20E-19
Sistema Imune	<i>acyl- desaturase</i>	<u>Dicentrarchus labrax</u>		1	620	8,41E-84
	<i>complement component c9</i>	<u>Xiphophorus hellerii</u>		1	618	2,44E-94
	<i>complement component c3</i>	<u>Platichthys flesus</u>	1	5	664	3,00E-46
	<i>complement component c4</i>	<u>Fundulus heteroclitus</u>	1	17	613	1,66E-68
	<i>complement component alpha polypeptide</i>	<u>Epinephelus bruneus</u>		1	574	9,66E-50
	<i>apolipoprotein c-i</i>	<u>Oreochromis niloticus</u>	1	4	643	2,16E-11
Transdução de sinal	<i>microfibril-associated glycoprotein 4-like</i>	<u>Epinephelus coioides</u>		1	267	1,12E-25
Transporte de lipídios	<i>liver-type fatty acid-binding protein</i>	<u>Fundulus heteroclitus</u>	1	2	629	3,34E-67
	<i>vitellogenin a</i>	<u>Pocilia latipinna</u>		1	612	6,23E-123
Vasodilatação	<i>kininogen 1</i>	<u>Oreochromis niloticus</u>		1	582	6,21E-34
			1	2	653	2,70E-33
Via de sinalização de neuropeptídeo	<i>allatotropin neuropeptide precursor</i>	<u>Spodoptera frugiperda</u>	1	2	632	7,38E-02

*Legenda:* Primeira coluna está a atividade biológica, 2<sup>o</sup> coluna é a descrição do gene no Genbank, 3<sup>o</sup> a espécie ao qual foi relatada, 4<sup>o</sup> indica a quantidade de contigs, 5<sup>o</sup> indica o número de clones, 6<sup>o</sup> é o tamanho do fragmento (pb) e na última coluna indica o índice de e-Value.

### 3.2.2 Transcrição de genes de *Poecilia vivipara* exposto a ATZ por 24h

Oito genes foram selecionados a partir dos dados obtidos através da técnica de SSH, 4 da biblioteca dos genes induzidos e 4 entre os reprimidos. Esses genes foram selecionados de acordo com suas funções biológicas e moleculares. Os níveis na transcrição diferencial foram avaliados por PCR quantitativo em fígados de peixes *Poecilia vivipara* expostos a ATZ, mantidos sob condições experimentais similares. Os iniciadores específicos de cada sequência estão mostrados na Tabela 3.

As sequências selecionadas estão envolvidas em processos, como: cascata de coagulação, resposta inflamatória, transporte de lipídios, apoptose, sistema imune e fase II de biotransformação de xenobióticos.

A eficiência das reações se manteve entre 96 a 110%, permitindo o uso do método de comparação por CT ou Delta Delta CT (LIVAK, 2001).

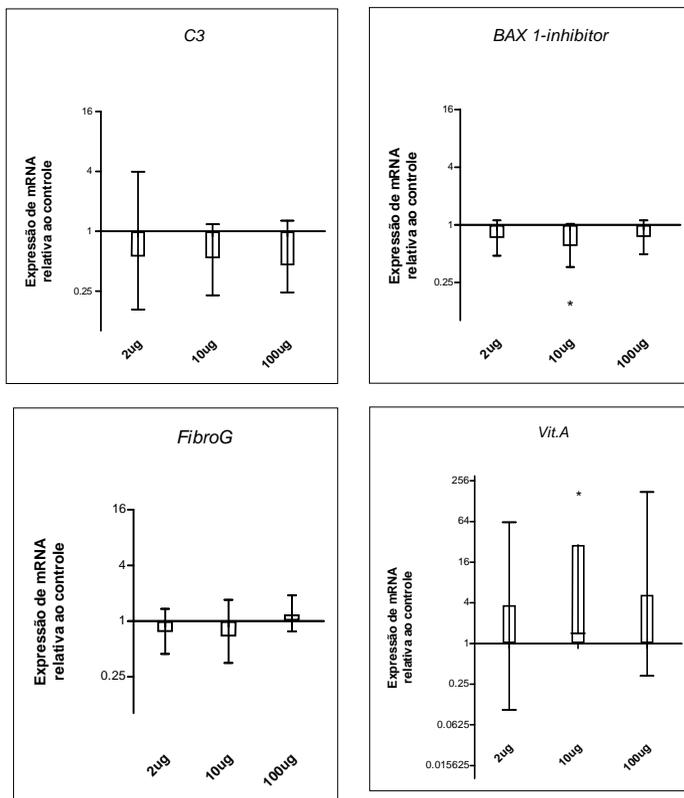
Nenhuma diferença nas transcrições dos genes *S2 ribosomal protein (S2)* e *Elongation Factor 2 (EF2)* foram observadas no fígado dos peixes expostos a ATZ, sendo ambos utilizados como genes normalizadores da expressão.

A transcrição dos genes *complement component c9 (C9)*, *liver-type fatty acid-binding protein (FABP)*, *fibrinogen beta chain precursor (FibroB)* e *vitellogenin a (VitA)* (**Figura 1**) apresentaram diferenças significativas com relação ao controle, possivelmente aumentando o nível de transcrição. O gene *bax inhibitor 1 (BAX)* apresentou uma diminuição significativa em sua transcrição no fígado dos animais expostos ao herbicida.

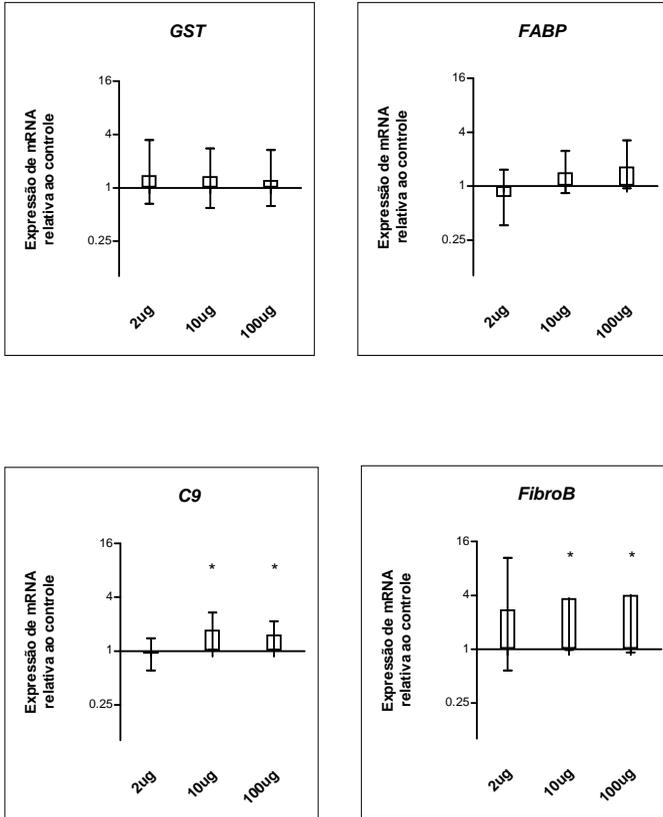
Os demais genes não apresentaram diferenças significativas em na transcrição gênica quando comparadas ao grupo controle, podendo se enquadrar possivelmente como falsos positivos da técnica.

**Tabela 3:** Sequência dos iniciadores senso (F) e anti-senso (R) dos genes de *Poecilia vivipara* selecionados para a validação da técnica de SSH.

Gene	Iniciador	Sequências
<i>Liver-type fatty acid binding protein</i>	REV	GGAGTTTGTACAGTCTTTCCAGGCGTC
	FWD	ACTACGAAGCGTTCCTCCGAGCCAT
<i>glutathione s-transferase a</i>	REV	ACCAGCGCATGATGGAGGGTCTTT
	FWD	ACGTTCTCCAGGTAGCTCTCCAGA
<i>fibrinogen beta chain precursor</i>	REV	TCAGACCACCCAGAATGGAGGATG
	FWD	GCTGGACTTGAAGGCGATGTTTCC
<i>complement component c9</i>	REV	CGTCTCAACCAGAACACCATCAG
	FWD	GCCTTCCCATCAGCTAACTGTC
<i>Complement component c3</i>	REV	TGGCACGGGAECTACACACC
	FWD	GCAACACTTGGCAGAGAAGGAACC
<i>bax inhibitor 1</i>	REV	GAACAAGTCCACACAGTGCCACAC
	FWD	GCTTCGTCTCTTTGACACTCAGC
<i>fibrinogen gamma chain precursor</i>	REV	ATCCAGCCTACCACAGGAACAGAC
	FWD	AGTGAAGCCACGACCGAAGTTGTC
<i>vitellogenin a-</i>	REV	GTCCACAGGTCTTTCCTTTCATCCAGTC
	FWD	TGCCTTACCGCCACCCAACA
<i>elongation factor 2</i>	REV	TACTTGTCAGCGAGGTAACGGG
	FWD	ACTGTAAGCGAGGAATCAGAGGTG
<i>s2 ribosomal protein</i>	REV	GCGAATGTCTTTGGATGAGCCC
	FWD	GGAAGGAACAGATGAGCAGGTAGAAG



**Figura 3:** Transcrição dos genes *complement component C3 (C3)*, *BAX 1-inhibitor*, *fibrinogen gamma chain precursor (FibroG)* e *vitellogenin a (VitA)*, por PCR quantitativo no grupo de peixes *Poecilia vivipara* expostos a diferentes concentrações de Atrazina (2µg/L, 10µg/L e 100µg/L) após 24h. O asterisco (\*) representa diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo controle. O eixo Y demonstra a variação da expressão do grupo em relação ao controle. Os dados estão mostrados na forma de média e erro padrão.



**Figura 4:** Transcrição dos genes *complement component c9* (*C9*), *liver-type fatty acid-binding protein* (*FABP*), *glutathione S-transferase* (*GST*), *fibrinogen beta chain precursor* (*FibroB*) por PCR quantitativo no grupo de peixes *Poecilia vivipara* expostos a diferentes concentrações de Atrazina (2µg/L, 10µg/L e 100µg/L) após 24h. O asterisco (\*) representa diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo controle. O eixo Y demonstra a variação da expressão do grupo em relação ao controle. Os dados estão mostrados na forma de média e erro padrão.

### 3.3 Discussão

Vários estudos realizados com peixes, anfíbios, répteis e mamíferos (humanos e cobaias), sugerem que a ATZ pode alterar o sistema endócrino, as respostas neuroendócrinas e também afetar as respostas imunes. Em mamíferos, os efeitos incluem encurtamento do ciclo estral, a atenuação do pico de LH (hormônio luteinizante), diminuição dos níveis de hormônios da hipófise, alterações no tecido do ovário, alterações hepáticas, incluindo aumento na deposição de lipídios e enzimas hepáticas, e modificações na histopatologia hepática (ATSDR, 2003). Estudos em camundongos mostram que a ATZ provoca efeitos tóxicos em tecidos hematopoiéticos e sistema imunológico e pode induzir a produção de citoquinas, tais como o interferon  $\gamma$  ou fator de necrose tumoral (MENCOBONI *et al.*, 1992).

Exposição de anfíbios a ATZ causou uma maior incidência de sapos hermafroditas (HAYES *et al.*, 2002) e deficiências no desenvolvimento gonadal (TAVERA-MENDONZA *et al.*, 2002). Em peixes a ATZ pode ser acumulada no fígado onde é observado um aumento no tamanho de inclusões lipídicas seguido pela degeneração lipóide, aumento do volume dos lisossomas secundários, malformação mitocondrial, vacuolização e uma redução no teor de glicogênio (BIAGIANTI-RISBOURG e BASTIDE, 1995), além de alterações no comportamento natatório (STEINBERG, LORENZ E LORENZ, 1995), distúrbios no sistema reprodutivo (THIBAUT E PORTE, 2004), e ainda alterações no desenvolvimento fisiológico e morfológico de embriões (WIEGAND *et al.*, 2001).

Das sequências identificadas no atual trabalho, poucas estavam relacionadas com a detoxificação de xenobióticos, sendo uma delas aquela que codifica a GST. Muitos dos poluentes ambientais são detoxificados por isoenzimas das GSTs, incluindo os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, pesticidas e intermediários reativos produzidos na fase I da biotransformação (RICHARDSON *et al.*, 2009). A biotransformação da ATZ envolve diferentes sistemas enzimáticos, que incluem a GST, a qual é determinante para sua eliminação do organismo (THOM *et al.*, 2001). Apesar de ter sido identificado um transcrito da GST na biblioteca subtrativa, a transcrição deste gene não variou no fígado dos peixes expostos a concentrações crescentes de ATZ por um período de 24h. Por outro lado, a ausência de diferença na transcrição do gene nesse período não significa que este nível não seja diferente após períodos maiores de exposição. Além disso, deve ser considerada a

possibilidade de que apesar de não ter havido um aumento na transcrição, a atividade da GST no momento poderia estar sendo suficiente para conjugar a glutathiona com ATZ ou seus metabólitos e posterior eliminação. No entanto não foi quantificada a atividade desta enzima neste experimento.

Os lipídios são essenciais para o funcionamento celular, como fontes de combustível, moléculas sinalizadoras e componentes de membrana. Deficiências no processamento de lipídios e de transporte acarretam em muitas doenças metabólicas (CARTEN, BRADFORD e FARBER, 2011). O gene *liver type fatty acid binding protein (FABP)* codifica proteínas que tem a capacidade de se ligar ao colesterol, alterando a concentração de colesterol hepático (MCINTOSH *et al.*, 2012), atuando na absorção, metabolismo e excreção intracelular de ácidos graxos de cadeia longa (ZIMMERMAN e VEERKAMP, 2002). No presente estudo não foram observadas alterações significativas na transcrição do gene da *FABP* nos animais tratados, apesar de haver um pequeno aumento não significativo entre os tratamentos.

Experimentos realizados em animais coletados no campo e expostos em laboratório revelam que contaminantes orgânicos são capazes de reduzir a concentração plasmática de estradiol e assim reduzir a expressão do gene vitelogenina via receptor de estrógeno -ER (NICOLAS, 1999). Tanaka *et al.* (2004) sugere que a ATZ pode ser um “agente estrogênico” ou agir como “estrogênio ambiental”. Outros estudos toxicológicos sugerem que a ATZ pode ser um agente anti-estrogênico e inibir as respostas estimuladas por estrógeno (COOPER *et al.*, 2007). Alvos potenciais da ATZ podem estar no sítio de ligação aos receptores, também podendo interagir com outros fatores, menos específicos, que são necessários para a realização da resposta mediada por estrogênio (ELDRIDGE, STEVENS e BRECKENRIDGE, 2008).

A indução da vitelogenina (VTG) ou a supressão da mesma vem sendo muito estudada já que a sua produção nos hepatócitos é regulada por  $\beta$ -estradiol, e sofre influência de outras substâncias com ação estrogênica e antiestrogênicas. Geralmente só é encontrada nas fêmeas, porém os peixes machos podem apresentar a expressão hepática da vitelogenina induzida, quando expostos a ambientes contaminados com substâncias estrogênicas. (KRAMER *et al.* 1998). Pinto *et al.* (2006) em experimento com machos de *Sparus auratus* expostos a doses de estrógeno – E2, identificou o aumento da expressão das vitelogeninas (VgA, VgB, VgC), sendo totalmente ausente esta expressão nos animais controle. No presente estudo a transcrição de VgA nos peixes tratados com ATZ apresentou um aumento em relação ao grupo controle, porém

este gene foi identificado nas duas bibliotecas subtrativas. Na validação, para esse gene, foram utilizadas somente fêmeas de *P. vivipara*. O aumento na expressão sugere que a ATZ pode estar afetando a produção da vitelogenina, ou a quantidade de estrogênio circulante, que regula essa produção.

Os níveis de fibrinogênio são um reflexo da capacidade de ativação da coagulação no organismo. São principalmente expressa em hepatócitos e secretada na circulação. O fibrinogênio (Fb) é um dímero, composto por duas partes iguais cada uma contendo três proteínas distintas (alfa-A, beta-B e gama-G). Em condições normais, o Fb só é liberado na corrente sanguínea na forma de hexâmero, e não há indicações de fibrinogênio livre ou outras formas precursoras (BLOMBACK, 1996). Excessiva geração de fibrina devido à ativação da cascata de coagulação leva a trombose, enquanto a falta da fibrina, ou formação ineficaz leva a uma predisposição para a hemorragia (MOSESSON, SIEBENLIST e MEH, 2001). Xie. *et al.* (2009), citam que um aumento na transcrição do gene *FbB* sugere uma existência de uma resposta inflamatória sistêmica. Neste contexto, Zhang e Loker (2004) identificaram um aumento na transcrição de fibrinogênio no molusco de água doce, *Biomphalaria glabrata*, quando desafiado com trematóides digenéticos. No presente estudo, foram observadas lesões hemorrágicas em alguns animais expostos a ATZ, sugerindo uma maior pré-disposição a hemorragia nestes peixes, seja pela não formação ou formação ineficaz da fibrina. Os níveis de transcrição de *FbB* apresentaram um aumento nos peixes expostos a ATZ com relação ao grupo controle, o que não foi visto para a sequência referente ao *FbG*, sugerindo a existência de um mecanismo de ativação da transcrição diferencial entre os dois genes, que permanece por ser elucidado em estudos posteriores.

Outros genes envolvidos em mecanismos de inflamação e com sistema imune inato, são os genes do sistema complemento, C3 e C9. O C3 desempenha um papel central na ativação das vias clássica do complemento e pertence às proteínas de fase aguda, cuja síntese aumenta devido a estímulos inflamatórios (KATAGIRI, HINDRA e AOKI, 1999 apud KINOSHITA, 1991). Estudos anteriores realizados por Mattos *et al.* (2008) mostraram que a transcrição deste gene foi ativada em fígado de *Poecilia vivipara* expostas à fração acomodada em óleo diesel.

Os resultados do PCR quantitativo mostram que a transcrição do *componente C3* não apresentou diferença estatística entre os grupos, além de ter sido identificado nas duas bibliotecas subtrativas. A ausência

de resposta no experimento de validação pode estar associada a pequenas alterações nas condições em que foram realizados os tratamentos dos peixes para a realização da biblioteca subtrativa e validação dos genes identificados. Enquanto o primeiro foi realizado em laboratório na FURG em que, antes de serem mortos, os animais eram anestesiados com benzocaína, no segundo experimento realizado no Labcai, optou-se pela técnica de decapitação a fim de evitar possíveis interferências do anestésico na resposta moleculares dos animais.

Desreguladores do sistema imunológico podem agir tanto sobre a imunidade inata, quanto na adquirida. Um desregulador pode suprimir a imunidade inata, diminuindo a resposta inflamatória, reduzindo a atividade fagocítica, e interromper as redes de citocina. Em anfíbios *Rana pipiens* a ATZ se mostrou como um desregulador imune mesmo em baixas concentrações (BRODKIN *et al.*, 2007). Segundo Gilbertson *et al.* (2003), os pesticidas podem estimular ou suprimir diferentes fatores resposta imune. O complemento C9 é muito importante na formação do complexo de ataque a membrana (MAC), desencadeado pela via alternativa do sistema complemento. É montado por adição sequencial de uma única molécula de cada componente C5, C6, C7, C8 e, várias moléculas de C9, com a finalidade de formar canais transmembranas na célula alvo, perturbando a bicamada fosfolipídica e levando a célula a lise e morte. (LICHTENHELD *et al.*, 1988). Neste trabalho, observamos um aumento na transcrição do gene C9 em dois grupos de peixes tratados com ATZ, apesar do gene estar entre a biblioteca subtrativa de genes reprimidos. Esse aumento pode estar relacionado a uma resposta imune desencadeada pelo herbicida ATZ, ou alguma condição externa, como a presença de patógenos.

Danos ao DNA podem ativar mecanismos de reparo e induzir várias vias de sinalização. Um certo número de genes e enzimas envolvidos nos mecanismos de reparo de DNA, têm importantes papéis celulares para manter a estabilidade genômica e estes genes são normalmente induzidos, em consequência da exposição a agentes prejudiciais (LEREBOURS *et al.*, 2009). Conhecido como a morte celular programada, a apoptose pode ocorrer na sequência da disfunção da maquinaria celular normal para remover a célula danificadas e proteger o funcionamento celular normal (DELONG, 1998). O inibidor Bax (BAX-I) é uma proteína anti-apoptótica bem conservada em diferentes espécies localizada na membrana do retículo endoplasmático e atua na proteção das células contra a apoptose induzida pelo estresse (LEE *et al.*, 2007). No presente estudo, a transcrição do gene *BAX-I* apresentou uma diminuição no fígado dos animais tratados com ATZ

em relação ao grupo controle, indicando um possível aumento na atividade apoptótica neste animais. Um estudo realizado por Zhu *et al* (2010) mostrou que peixes zebra tratados com concentrações e tempo de exposição crescentes a ATZ apresentaram uma maior taxa de danos no DNA avaliado pelo teste do cometa, o que comprova a genotoxicidade deste herbicida.

Os genes que não mostraram diferenças estatísticas na qPCR podem representar falsos positivos da técnica. O sucesso parcial da técnica da SSH foi relatada por Reyes, Salazar e Granja (2007), quando avaliaram as sequencias transcritas (EST) por qRT-PCR e identificaram falsos positivos neste procedimento. Hansen (2007) em estudo com *Calanus finmarchicus* exposto a uma mistura de estressores e selecionando as EST através da SSH, identificou sequências comuns, nas duas bibliotecas subtrativas, ressaltando que a técnica não tem 100% de eficiência.

O sucesso da metodologia da SSH é limitada por fatores como a necessidade de uma grande quantidade de mRNA para realizar as hibridizações, a pequena quantidade de cDNA após a segunda hibridização, a dificuldade da clonagem (JI *et al*, 2002) e o número de diferenças entre as amostras alvos de cDNA (REBRIKOV *et al.*, 2000).

A escolha de anestésicos em experimentos pode ter importância crítica no resultado experimental, mesmo que as alterações não sejam aparentes. A benzocaína é um anestésico local que, embora atue de forma sistêmica em peixes, também age no sistema nervoso central, bloqueando os canais de sódio e reduzindo os potenciais de ação dos nervos (ARIAS, 1999). Os efeitos do anestésico vão desde leve sedação até colapso medular, dose e tempo dependente (HOLLOWAY *et al.*, 2004). Estudos indicam que quanto mais breve for a exposição menor é a liberação dos corticosteroides e catecolaminas, relacionada à ação do anestésico (ROTHWELL *et al.*, 2005). Davis, Greenfield e Brewer (1993) verificaram que a utilização do anestésico benzocaína de uso tópico em algumas espécies de mamíferos está associado com uma deficiência nas hemoglobinas, a metemoglobinemia. Em condições normais, a metemoglobina é convertida novamente em hemoglobina, em condições adversas a conversão não acontece, o que acarreta em falta de oxigenação nos tecidos, alterando substancialmente as funções sistêmicas.

No presente experimento o tempo de exposição à benzocaína foi de até 15 minutos. Okamura *et al* (2010) verificaram que tilápias anestesiadas com benzocaína demoraram até 2,5 minutos para o mínimo de movimento opercular (estado de anestesia), prolongando esse período

o organismo atingiria o colapso total. Portanto, estudos mais específicos sobre a alteração da expressão gênica por benzocaína devem ser realizados em peixes da espécie *P.vivipara*, a fim de elucidar os efeitos a nível molecular, verificando as possíveis alterações sobre os resultados obtidos nesse trabalho, e sobre estudos ecotoxicológicos.

Outro ponto importante a se considerar é que peixes, assim como em outras espécies animais, apresentam diferenças significativas no metabolismo entre os indivíduos dentro de uma população, bem como entre as populações, relacionadas a fatores como sexo, dieta, estação do ano e exposição pretérita a contaminantes (PERKINS e SCHLENK, 1998). Então, as respostas aos xenobióticos em peixes podem diferir entre outras populações. Este fato evidencia uma possível limitação no uso de técnicas moleculares para comparações interpopulacionais. Por outro lado, abre uma linha de investigação muito interessante e necessária que vise avaliar diferenças na susceptibilidade à presença de misturas complexas de contaminantes, e identificar uma variabilidade genética em possíveis estratégias adaptativas de sobrevivência entre populações de indivíduos mais resistentes e mais sensíveis a contaminação ambiental. A compreensão de tais mecanismos poderia auxiliar na elucidação de possíveis fatores que estão contribuindo para a diminuição da biodiversidade ictiológica dos ecossistemas aquáticos.

### 3.4 Conclusões

Com base nos resultados obtidos neste trabalho podemos concluir:

- Os peixes *Poecilia vivipara* responderam bem às condições experimentais corroborando sua utilização como organismo-modelo para estudos que visem avaliar os efeitos tóxicos causados pela ATZ, bem como outros contaminantes.
- O aumento nos níveis de expressão dos genes *FibroB* e *C9* e a diminuição de *BAX inhibitor* indicam uma alteração no sistema imune e de defesa em peixes, provavelmente visando controlar os efeitos causados pela ação do contaminante no organismo.
- As diferenças nas respostas observadas entre as bibliotecas subtrativas de cDNA e os dados da qPCR podem ser atribuídas à pequenas diferenças nos protocolos de exposição da atrazina, ao “n” amostral pequeno, às falhas inerentes da própria técnica da SSH, à utilização ou não de Benzocaína durante a morte dos animais, ou à utilização de populações de *P.vivipara* que apresentem diferentes níveis de sensibilidades ao contaminante.

### 3.5 Referências Bibliográficas

ARIAS, H.R.. Role of local anesthetics on both cholinergic and serotonergic ionotropic. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, 23: 817-843, 1999.

AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY (ATSDR). Toxicological Profile for Atrazine. **U.S. Centers for Disease Control**, 2003.

BIAGIANTI-RISBOURG, S.; BASTIDE, J. Hepatic perturbations induced by an herbicide (atrazine) in juvenile grey mullet *Liza ramada* (Mugilidae, teleostei): an ultrastructural study. **Aquatic Toxicology**, 31: 217–229, 1995.

BLOMBACK, B. Fibrinogen and fibrin—proteins with complex roles in hemostasis and thrombosis. **Thrombosis Research**, 83: 1–75, 1996.

BRODKIN, M.A.; MADHOUN, H.; RAMESWARAN, M.; VATNICK, I. Atrazine is an Immune Disruptor in Adult Northern Leopard Frogs (*Rana Pipiens*). **Environmental Toxicology and Chemistry**, 26, 2007.

CAJARAVILLE, M.P. *et al.* The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. **Science of the Total Environment**, 247: 295-311, 2000.

CARTEN, J.D.; BRADFORD, M.K.; FARBER, S.A. The Carnegie Institution for Science, **Department of. Developmental Biology**, 360: 276–285, 2011.

CHUNG, S.; GU, R.R.. Estimating time-variable transformation rate of atrazine in a reservoir. **Advances in Environmental Research**, 7: 933–947, 2003.

COOPER, R.L.; LAWS, S.C.; DAS, P.C.; NAROTSKY, M.G.; GOLDMAN, J.M.; TYREY, E.L.; STOKER, T.E. Atrazine and Reproductive Function: Mode and Mechanism of Action Studies. **Birth Defects Research**, 80: 98–112, 2007.

DAVIS, J.A., GREENFIELD, R.E.; BREWER, T.G.. Benzocaine-induced methemoglobinemia attributed to topical application of the anesthetic in several laboratory animal species. **American Journal of Veterinary Research**, 54: 1322-1326, 1993.

DELONG, M.J.. Apoptosis: A Modulator of Cellular Homeostasis and Disease States. **Salivary Gland Biogenesis And Function**, 82–90, 1998.

ELDRIDGE, J.C.; STEVENS, J.T.; BRECKENRIDGE, C.B.. Atrazine Interaction with Estrogen Expression Systems. **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**, 196, 2008.

GFRERER, M.; WENZL, T.; QUAN, X.; PLATZER, B.; LANKMAYR, E.. Occurrence of triazines in surface and drinking water of Liaoning Province in Eastern China. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, 53: 217–228, 2002.

- GHISELLI, G.; JARDIM, W.F.. Interferentes endócrinos no ambiente. **Química Nova**, 30: 3, 695-706, 2007.
- GILBERTSON, M.K.; HAFFNER, G.D.; DOUILLARD, K.G.; ALBERT, A.; DIXON B.. Immunosuppression in the Northern Leopard frog (*Rana pipiens*) induced by pesticide exposure. **Environmental Toxicology and Chemistry**, 22: 101–110, 2003.
- HANSEN, B.H.; ALTIN, D.; NORDTUG, T.; OLSEN, A.J.. Suppression subtractive hybridization library prepared from the copepod *Calanus finmarchicus* (Gunn.) exposed to a sublethal mixture of environmental stressors. **Comparative Biochemistry and Physiology**, 250-256, 2007.
- HAYES, T.; HASTON, K.; TSUI, M.; HOANG, A.; HAEFFELE, C.. Herbicides: feminization of male frogs in the wild. **Nature**, 419: 895–896, 2002.
- HOLLOWAY, A.C.; KEENE, J.L.; NOAKES, D.G. *et al.* Effects of clove oil and MS-222 on blood hormone profiles in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*, Walbaum. **Aquaculture Research**, 35: 1025-1030, 2004.
- HUSSEIN, S.Y.; EL-NASSER, M.A.; AHMED, S.M.. Comparative studies on the effects of herbicide atrazine on freshwater fish *Oreochromis niloticus* and *Chrysichthyes auratus* at Assiut, Egypt. **Bulletin of Environmental Contamination Toxicology**, 57: 503–510, 1996.
- JI, W.; WRIGHT, M.B.; CAI, L.; FLAMENT, A.; LINDPAINETNER, K.. Efficacy of SSH PCR in isolating differentially expressed genes. **BMC Genomics**, 2002.
- LEE, G.H.; KIM, H.K.; CHAE, S.W.; KIM, D.S.; HA, K.C.; CUDDY, M.; KRESS, C.; REED, J.C.; KIM, H.R.; CHAE, H.J.. Bax Inhibitor-1 Regulates Endoplasmic Reticulum Stress-associated Reactive Oxygen Species and Heme Oxygenase-1 Expression. **The Journal of Biological Chemistry**, 282 (30): 21618–21628, 2007.
- LEREBOURS, A.; GONZALEZ, P.; ADAM, C.; CAMILLERI, V., BOURDINEAUD, J.P.; GARNIER-LAPLACE, J.. Comparative analysis of gene expression in brain, liver, skeletal muscles, and gills of zebrafish (*Danio rerio*) exposed to environmentally relevant waterborne uranium concentrations. **Environmental Toxicology and Chemistry**, 28, 1271–1278, 2009.
- LICHTENHELD, M.G.; OLSEN, K.J.; LU, P.; LOWREY, D.M.; HAMEED, A.; HENGARTNER, H.; PODACK, E.R.. Structure and function of human perforin. **Nature**, 335, 448–451, 1988.
- LIVAK, K.J., SCHMITTGENT, D.. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-ΔΔC<sub>T</sub></sup> method. **Methods**, 25: 402–408, 2001.

LUDOVICE, M.T.F.; ROSTON, D.M.; FILHO, J.T. Efeito da faixa-filtro na retenção de atrazina em escoamento superficial. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, 7 (2): 323-328, 2003.

KATAGIRI, T.; HIRONO, I.; AOKI, T.. Molecular analysis of complement component C8b and C9 cDNAs of Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. **Immunogenetics**, 50: 43–48, 1999.

KNIEWALD, J.; *et al.*, Disorders of male rat reproductive tract under the influence of atrazine. **Journal Applied Toxicology**, 20: 61–68. 2000.

KRAMER, V.J.; MILES-RICHARDSON, S.; PIERENS, S.L.; GIESY, J.P.. Reproductive impairment and induction of alkaline-labile phosphate, a biomarker of estrogen exposure, in fathead minnows (*Pimephales promelas*) exposed to waterborne 17 $\beta$ -estradiol. **Aquatic Toxicology**, 40: 335-360, 1998.

MCINTOSH, A.L.; ATSHAVES, B.P.; STOREY, S.M.; LANDROCK, K.K.; LANDROCK, D.; MARTIN, G.G.; KIER, A.B. e SCHROEDER, F.. Loss of liver FA binding protein significantly alters hepatocyte plasma membrane microdomains. **The Journal of Lipid Research**, 53: 467-480, 2012.

MENCOBONI, M.; LERZA, R.; BOGLIOLO, G.; FLEGO, G. e PANNACCIULLI, I.. Effect of atrazine on hemopoietic system. **In Vivo** 1: 41–44, 1992.

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

MOORE, A.; WARING, C.P.. The effects of a synthetic pyrethroid pesticide on some aspects of reproduction in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). **Aquatic Toxicology**, 52: 1–12, 2001.

MOSESSON, M.W.; SIEBENLIST, K.R.; MEH, D.A.. The structure and biological features of fibrinogen and fibrin. **Annals of the New York Academy of Sciences**, 936: 11–30, 2001.

NICOLAS, J.M.. Vitellogenesis in fish and the effects of polycyclic aromatic hydrocarbon contaminants. **Aquatic Toxicology**, 45: 77–90, 1999.

OKAMURA, D.; ARAUJO, F.G.; VIEIRA E ROSA, P.; FREITAS, R.T.F.; MURGAS, L.D.S.; CESAR, M. P.. Effect of benzocaine concentration and fish size on anesthesia and recovery in Nile tilapia. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 39, 2010.

PRASAD, T.A.V.; SRINIVAS, T.; REDDY, J.S. e REDDY, D.C. Atrazine toxicity on transport properties of hemocyanin in the crab (*Oziotelphusa senex*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 30,:124–126, 1995.

- PERKINS, E. J.; D. SCHLENK. Immunochemical characterization of hepatic cytochrome P450 isozymes in the channel catfish: assessment of sexual, developmental and treatment-related effects. **Comparative Biochemistry and Physiology C-Pharmacology, Toxicology & Endocrinology**, 121: 305-310, 1998.
- PINTO, P.I.S.; TEODOSIO, H.R.; GALAY-BURGOS, M.; POWER, D.M.; SWEENEY, G.E. Identification of Estrogen-Responsive Genes in the Testis of Sea Bream (*Sparus auratus*) Using Suppression Subtractive Hybridization. **Molecular Reproduction and Development** 73: 318–329, 2006.
- REBRIKOV, D.V.; BRITANOVA, O.V.; GURSKAYA, N.G.; LUKYANOV, K.A.; TARABYKIN, V.S. e LUKYANOV, S.A. Mirror orientation selection (MOS): a method for eliminating false positive clones from libraries generated by suppression subtractive hybridization. **Nucleic. Acids Research**, 28 (90), 2000.
- REYES, A.; SALAZAR, M.; GRANJA, C.. Temperature modifies gene expression in subcuticular epithelial cells of white spot syndrome virus-infected *Litopenaeus vannamei*. **Developmental and Comparative Immunology**, 31: 23–9, 2007.
- RICHARDSON, K.L.; GOLD-BOUCHOT, G.; SCHLENK, D.. The characterization of cytosolic glutathione transferase from four species of sea turtles: Loggerhead (*Caretta caretta*), green (*Chelonia mydas*), olive ridley (*Lepidochelys olivacea*), and hawksbill (*Eretmochelys imbricata*). **Toxicology. Pharmacology**. 150: 279–284, 2009.
- ROTHWELL, S.E.; BLACK, S.E.; JERRETT, A.R.. Cardiovascular changes and catecholamine release following anaesthesia in Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) and snapper (*Pagrus auratus*). **Comparative Biochemistry and Physiology**, 140: 289-298, 2005.
- SAGLIO, P.; TRIJASSE, S.. Behavioral responses to atrazine and diuron in goldfish. **Archives of Environment Contamination and Toxicology**, 35: 484-491, 1988.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T.. Molecular Cloning - A Laboratory Manual (2<sup>a</sup> ed.). **Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press**; 1989.
- STEINBERG, C.E.W.; LORENZ, R.; SPIESER, O.H.. Effects of atrazine on swimming behavior of zebrafish, *Brachydanio rerio*. **Water Research**, 29: 981–985, 1995.
- SIROKA, Z.; DRASTICHOVA, D.. Biochemical markers of aquatic environment contamination-Cytochrome P450 in Fish. **Journal Acta Veterinaria Brno**, 73:123–132, 2004.
- TANAKA, T.; KOHNO, H.; SUZUKI, R.; SUGIE, S.. Lack of modifying effects of an estrogenic compound atrazine on 7,12-dimethylbenz(a) anthracene-induced ovarian carcinogenesis in rats. **Cancer Letter**, 210: 129–137, 2004.

TANGUY, A.; BOUTET, I.; LAROCHE, J.; MORAGA, D.. Molecular identification and expression study of differentially regulated genes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* in response to pesticide exposure. **FEBS Journal**, 272: 390–403, 2005.

TAVERA-MENDOZA, L.; RUBY, S.; BROUSSEAU, P.; FOURNIER, M.; CYR, D.. Response of the amphibian tadpole *Xenopus laevis* to atrazine during sexual differentiation of the ovary. **Environmental Toxicology Chemistry**, 21: 1264–1267, 2002.

THIBAU, R.T.; PORTE, C.. Effects of endocrine disrupters on sex steroid synthesis and metabolism pathways in fish. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, 92: 485–494, 2004

THOM, R.; DIXON, D.P.; EDWARDS, R.; COLE, D.L.; LAPTHORN, A.J.. The structure of a zeta class glutathione S-transferase from *Arabidopsis thaliana*: Characterisation of a GST with novel active site tyrosine catabolism. **Journal of Molecular Biology**, 308: 949–962, 2001.

XIE, F.J.; ZHANG, Z.P.; LIN, P.; WANG, S.H.; ZOU, Z.H.; WANG, Y.L. Identification of immune responsible fibrinogen beta chain in the liver of large yellow croaker using a modified annealing control primer system. **Fish & Shellfish Immunology**, 27: 202–209, 2009.

WALKER, C.H.; *et al.* **Principles of Ecotoxicology**. Londres: Taylor & Francis, 321p., 1996.

WIEGAND, C.; KRAUSE, E.; STEINBERG, C.; PFLUGMACHER, S.. Toxicokinetics of Atrazine in Embryos of the Zebrafish (*Danio rerio*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 49: 199–205, 2001.

ZHANG, S.M.; LOKER, E.S.. Representation of an immune responsive gene family encoding fibrinogen-related proteins in the freshwater mollusk *Biomphalaria glabrata*, an intermediate host for *Schistosoma mansoni*. **Gene**, 341: 255–266, 2004.

ZIMMERMAN A.W.; VEERKAMP J.H.. New insights into the structure and function of fatty acid-binding proteins. **Cellular and Molecular Life Sciences**, 59: 1096–1116, 2002.

ZHU, L.; DONG, X.; XIE, H.; WANG, J.; WANG, J.; SU, J.; YU, C.. DNA Damage and Effects on Glutathione-S-Transferase Activity Induced by Atrazine. Exposure in Zebrafish (*Danio rerio*). **Environmental Toxicology**, 2010.

#### 4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA INTRODUÇÃO

- AMARANTE JUNIOR, O.P.; SANTOS, T.C.R.; BRITO, N.M.; RIBEIRO, M.L.. Glifosato: propriedades, toxicidade, usos e legislação. **Química Nova (online)**, 25 (4): 589-59, 2002.
- ANDREA, M.M.; MATALLO, M.B.; TOMITA, R.Y.; LUCHINI, L.C. Effect of temperature on dissipation of (14C)-atrazine in Brazilian soil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 32 (1): 95-100, 1996.
- ARIAS, A.R.L.; VIANA, T.A.P.; INÁCIO, A.F. **Utilização de Bioindicadores como ferramentas de monitoramento e avaliação ambiental: o caso de recursos hídricos**. Manguinhos: 2002.
- ATRAZINE FEET SHEET (Atrazine), 2008.
- BAIRD, C. **Química Ambiental**. Porto Alegre, 2002.
- BIRADAR, D.P.; RAYBURN, A.L. Chromosomal damage induced by herbicide contaminations at concentrations observed in public water supplies. **Journal of Environmental Qualit**, 24: 1222–1225, 1995.
- BRASIL. Regulamenta o artigo 10 do Código de Pesca, baixado com o Decreto-Lei Nº 794, de 19 de outubro de 1938, que dispõe sobre o lançamento de resíduos tóxicos ou oleosos nas águas interiores ou litorâneas do País e dá outras providências. Brasília (DF). **Decreto nº 50.887**, de 26 de junho de 1961.
- BRULLE, F. *et al.* Identification and expression profile of gene transcripts differentially expressed during metallic exposure in *Eisenia fetida* coelomocytes. **Developmental and Comparative Immunology**, 32: 1441-1453, 2008.
- BULTELE, F. *et al.* Identification of differentially expressed genes in *Dreissena polymorpha* exposed to contaminants. **Marine environmental research**, 54: 385-389, 2002.
- CAJARAVILLE, M. P. *et al.* The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. **Science of the Total Environment**, 247: 295-311, 2000.
- GAYNOR, J.D.; MACTAVISH, D.C. & FINDLAY, W.I.. Surface and sub-surface transport of atrazine and alachlor from a Brookston clay loam under continuous corn production. **Archives of Environmental Contamination of Toxicology**, 23: 240-245, 1992.
- GHISELLI, G.; JARDIM, W.F. Interferentes endócrinos no ambiente. **Química Nova**, 30 (3): 695-706, 2007.

GOMES, J.L.; MONTEIRO, L.R. Morphological divergence patterns among populations of *Poecilia vivipara* (Teleostei Poeciliidae): test of an ecomorphological paradigm. **Biological Journal of the Linnean Society**, 93(4): 799-812, 2008.

HUGGETT, R.J.; KIMERIE, R.A.; MEHRIE Jr., P.M.; BERGMAN, H.L.. Biomarkers: biochemical, physiological and histological markers of anthropogenic stress. **Boca Raton: Lewis Publishers**, 1992.

ICES - Report of the ICES Advisory Committee on Fishery Management and Advisory Committee on Ecosystems, 2004. **ICES Advice**, 1: 1544, 2004.

LUDOVICE, M.T.F.; ROSTON, D.M.; FILHO, J.T. Efeito da faixa-filtro na retenção de atrazina em escoamento superficial. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, 7(2): 323-328, 2003.

MACLENNAN, P.A. *et al.* Cancer incidence among triazine herbicide manufacturing workers. **Journal Occupational and Environmental Medicine**, 44(11): 1.048-1.058, 2002.

MANDELBAUM, R.T.; ALLAN D.L.; WACKETT L.P. Isolation and Characterization of a *Pseudomonas* sp. That Mineralizes the s-Triazine Herbicide Atrazine. **Applied Environmental Microbiology**, 61(4): 1451-1457, 1993.

MARASCHIN, L. **Avaliação do grau de contaminação por pesticidas na água dos principais rios formadores do pantanal mato-grossense**. Dissertação (Mestrado em Saúde e Ambiente)-Universidade Federal do Mato Grosso, Cuiabá, 2003.

MATTOS, J.J.; SIEBERT, M.N.; LUCHMANN, K.H.; GRANUCCI, N.; DORRINGTON, T.; STOCO, P.H.; GRISARD, E.C.; BAINY, A.C.D. Differential gene expression in *Poecilia vivipara* exposed to diesel oil water accommodated fraction. **Marine Environmental Research**, 2009.

MIDIO, A.F.; MARTINS, D.I. **Herbicidas em alimentos** , 1997.

MONDON, J.A.; DUDA, S. E NOWAK, B.F.. Histological, growth and 7-ethoxyresorufin *O*-deethylase (EROD) activity responses of greenback flounder *Rhombosolea tapirina* to contaminated marine sediment and diet. **Aquatic Toxicology**, 54: 231-247, 2001.

NAROTSKY, M.G.; BEST, D.S.; GUIDICI, D.L.; COOPER, R.L.. Strain comparisons of atrazine-induced pregnancy loss in the rat. **Reproductive Toxicology**, 15: 61-69, 2001.

RAND, G.M.. Effects, environmental fate, and risk assessment. **Washington: Taylor & Francis**, 1125p., 1995.

ROULLAND, S.; LEBAILLY, P.; LECLUSE, Y.; BRIAND, M.; POTTIER, D.; GAUDUCHON, P.. Characterization of the t(14;18) *BCL2-IGH* Translocation in Farmers Occupationally Exposed to Pesticides. **Cancer Res**, 15, 2004.

SANCHES, S.M. *et al.* Pesticidas e seus respectivos riscos associados à contaminação da água. Pesticidas: **Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, Curitiba, 13: 53-58, 2003.

SCHNURSTEIN, A.; BRAUNBECK, T.. 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*). **Ecotoxicology Environmental Safety** 49: 187–196, 2001.

SEWALL, L. The skill of ecological perception. Molecular approaches to identify exposure and risk to specific environmental pollutants. **Biomarkers**, 4: 93-103, 1999.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY - USEPA. **About Pesticides**. Pesticides Home. 2009.

WALKER, C.H. *et al.* **Principles of Ecotoxicology**. Londres: Taylor e Francis, 321p., 1996.

WOLF, D.C. & MARTIN, J.P. Microbial decomposition of ring 14C-atrazina, cyanuric acid and 2-chloro-4,6-diaminas-s-triazina. **Journal of Environmental Quality**, 4: 134-135, 1975.

ZANETTE, J. **Identificação e caracterização de marcadores moleculares para estudos ecotoxicológicos em moluscos bivalves e peixes**. 172 f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Florianópolis, 2009.