

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

**EFEITOS DO ORGANOFOSFORADO PARATIONATO
METÁLICO SOBRE O EIXO HIPOTÁLAMO-HIPÓFISE-
INTERRENAL EM PEIXE-ZEBRA (*Danio rerio*)**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

João Gabriel Santos da Rosa

**Santa Maria, RS, Brasil.
2013**

**EFEITOS DO ORGANOFOSFORADO PARATIONATO
METÍLICO SOBRE O EIXO HIPOTÁLAMO-HIPÓFISE-
INTERRENAL EM PEIXE-ZEBRA (*Danio rerio*)**

João Gabriel Santos da Rosa

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Área de Concentração Farmacologia Aplicada à Produção Animal, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre em Farmacologia.**

Orientador: Leonardo José Gil Barcellos

**Passo Fundo, RS, Brasil
2013**

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Santos da Rosa, João Gabriel
EFEITOS DO ORGANOFOSFORADO PARATIONATO METÁLICO SOBRE
O EIXO HIPOTÁLAMO-HIPÓFISE-INTERRENAL EM PEIXE-ZEBRA
(Danio rerio) / João Gabriel Santos da Rosa.-2013.
52 p.; 30cm

Orientador: Leonardo José Gil Barcellos
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-
Graduação em Farmacologia, RS, 2013

1. Estresse 2. Cortisol 3. Agroquímicos 4. StAR, BGR,
HSPs I. Gil Barcellos, Leonardo José II. Título.

© 2013

Todos os direitos autorais reservados ao autor. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita mediante a citação da fonte.

E-mail: joaogabriel.sr@hotmail.com

Universidade Federal De Santa Maria
Centro De Ciências Da Saúde
Programa De Pós-Graduação Em Farmacologia

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**EFEITOS DO ORGANOFOSFORADO PARATIONATO METÁLICO
SOBRE O EIXO HIPOTÁLAMO-HIPÓFISE-INTERRENAL EM PEIXE-
ZEBRA (*Danio rerio*)**


Elaborada por
João Gabriel Santos da Rosa

Como requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestre em Farmacologia.

COMISSÃO EXAMINADORA:



Leonardo José Gil Barcellos, Dr.
(Presidente/Orientador)



Michele Fagundes, Dra.
(Examinadora)



Angelo Piato, Dr.
(Examinador)

Luiz Carlos Kreutz, PhD.
(Examinador suplente)

Passo Fundo, 18 de abril de 2013.

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia
Universidade Federal de Santa Maria

EFEITOS DO ORGANOFOSFORADO PARATIONATO METÍLICO SOBRE O EIXO HIPOTÁLAMO-HIPÓFISE-INTERRENAL EM PEIXE- ZEBRA (*Danio rerio*)

AUTOR: João Gabriel Santos da Rosa

ORIENTADOR: Leonardo José Gil Barcellos

Data e Local da Defesa: Passo Fundo, 18 de abril de 2013.

Compostos organofosforados como o parationato metílico são utilizados nas diversas etapas de produção para controlar pragas tanto na atividade agrícola como na aquicultura. O mecanismo de ação desse tipo de composto é a inibição da enzima acetilcolinesterase. O peixe-zebra (*Danio rerio*) vem sendo cada vez mais usado como modelo experimental em variados campos, como desenvolvimento, genética e pesquisa farmacológica. O parationato metílico já foi caracterizado como interruptor endócrino do eixo hipotálamo-hipófise-interrenal (HHI). Foi realizado um experimento de 96 horas de exposição de peixes adultos à substância testada, na concentração de 5,2 mg/L. Foi avaliado o nível de cortisol de corpo inteiro, visando medir a resposta endócrina a um evento estressor. Também foram investigadas a expressão dos genes do receptor de glicocorticoide (GR), da proteína regulatória de esteroidogênese aguda (StAR) e a proteína do choque térmico 70 (HSP 70). Os peixes expostos que foram submetidos a um evento estressor demonstraram baixos níveis de cortisol de corpo inteiro. Além disso, os peixes estressados e expostos ao agroquímico apresentaram uma diminuição da expressão dos genes GR, StAR e HSP 70. Os dados indicam que a exposição ao parationato metílico provoca uma diminuição da capacidade de responder adequadamente a um evento estressor. Peixes que possuem uma incapacidade em produzir uma resposta satisfatória do eixo HHI, não são capazes de realizar os ajustes iônicos e metabólicos necessários à recuperação da homeostase, ficando vulneráveis ao estresse causado pelas práticas aquícolas ou por alterações ambientais.

Palavras-chave: *Danio rerio*. Parationato metílico. Cortisol. Proteína regulatória de esteroidogênese aguda. Receptor de glicocorticoide. Proteína do choque térmico 70. Expressão. Genes.

ABSTRACT

Dissertation
Post-graduate Program in Pharmacology
Federal University of Santa Maria

EFFECTS OF ORGANOPHOSPHATE METHYL-PARATHION ON THE HYPOTHALAMIC-PITUITARY-INTERRENAL AXIS IN ZEBRAFISH (DANIO RERIO)

AUTHOR: João Gabriel Santos da Rosa

ADVISOR: Leonardo José Gil Barcellos

Place and date of defense: Passo Fundo, April 18, 2013.

Organophosphorus compounds such as methyl-parathion are used in the various stages of production to control pests both in agricultural activity as in aquaculture. The mechanism of action of this type of compound is the inhibition of the enzyme acetylcholinesterase. The zebrafish (*Danio rerio*) has been increasingly used as an experimental model in varied fields such as development, genetics and pharmacological research. The methyl-parathion has been characterized as endocrine disruptor of the hypothalamic-pituitary-interrenal axis (HHI). An experiment was carried out of 96 hours of exposure of adult fish to the substance tested, at the concentration of 5.2 mg/L. Was evaluated the whole-body cortisol level in order to measure the endocrine response to a stressful event. Were also investigated the gene expression of glucocorticoid receptor (GR), steroidogenic acute regulatory protein (StAR) and heat shock protein 70 (HSP 70). Fish exposed that have undergone a stressor event demonstrated low levels of cortisol. In addition, the fish stressed and exposed to agro-chemical showed a decreased expression of the StAR, HSP 70 and GR genes. The data indicate that exposure to methyl-parathion causes a decrease in the ability to respond appropriately to a stressor. Fish that have an inability to produce a satisfactory answer by the HHI axis are not able to make the necessary metabolic and ion adjustments for recovery the homeostasis, getting vulnerable to stress caused by aquaculture practices or environmental changes.

Keywords: *Danio rerio*. Methyl-Parathion. Cortisol. Steroidogenic acute regulatory protein. Glucocorticoid receptor. Heat shock protein 70. Expression. Genes.

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1

Tabela 1 – Daily measured Methyl-parathion concentrations (mg) in water.....22

ARTIGO 2

Tabela 1 – Primer sequences and PCR amplification conditions.....32/34

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Comercialização de pesticidas no Brasil	11
Figura 2: Vias de contaminação de corpos aquáticos por agroquímicos.....	12
Figura 3: Mecanismo de ação de organofosforados.....	13
Figura 4: Principais órgãos. Zebrafish macho.....	14
Figura 5: Ativação do receptor de glicocorticoides.....	15
Figura 6: Conversão de colesterol em cortisol e aldosterona.....	16

ARTIGO 1

Figura 1 – Mean whole-body cortisol ($\text{ng.g}^{-1} \pm \text{SEM}$) level of zebrafish exposed to stress (S), Methyl-parathion (MP) or stress plus acute exposition to methyl-parathion (MP+S). Different letters above the standard error bars indicate a significant difference between treatment groups. (ANOVA followed by Tukey's multiple range test, $p < 0.01$; n-10.....	22
--	----

ARTIGO 2

Figura 1 – Effects of stress (S), acute exposition to methyl-parathion (MP) or stress plus acute exposition to methyl-parathion (MP+S) on StAR (A), hsp70 (B) and GR (C) expression in zebrafish brain.....	33/34
---	-------

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	10
Contaminação ambiental e Parationato metílico.....	10
Peixe-zebra como modelo.....	13
Resposta endócrina ao estresse e eixo HHI.....	15
Interrupção endócrina.....	17
Objetivos.....	18
ARTIGO 1 – IMPAIRMENT OF CORTISOL RESPONSE TO STRESS IN ZEBRAFISH ACUTELY EXPOSED TO METHYL-PARATHION.....	19
Abstract.....	
Introduction.....	
Materials and methods.....	
Results.....	
Discussion.....	
References.....	
ARTIGO 2 – EFFECTS OF METHYL PARATHION EXPOSURE ON ZEBRAFISH BRAIN <i>GR</i>, <i>STAR</i>, AND <i>HSP70</i> GENE EXPRESSION.....	26
Abstract.....	28
Introduction.....	29
Materials and methods.....	30
Fish, housing and experimental design.....	30
Gene expression.....	31
Statistics.....	32
Results.....	33
Discussion.....	34
References.....	37
DISCUSSÃO.....	41
CONCLUSÃO.....	44
PERSPECTIVAS FUTURAS.....	45
REFERÊNCIAS.....	46

INTRODUÇÃO

A população mundial cresce de forma constante e, com isso, surge a necessidade de uma produção cada vez maior de alimentos. Uma das principais fontes de alimentos é a agricultura, que precisa ser continuamente aprimorada a fim de garantir uma produção satisfatória. Essa garantia de produção é obtida através do uso de agroquímicos adicionados ao processo agrícola. Porém muitos agroquímicos são utilizados em excesso e de forma descontrolada.

Esse fato caracteriza um risco iminente de contaminação ambiental, pois muitas vezes são usados de forma errada, além de em alguns casos não haver fiscalização e o não atendimento às recomendações de uso. A introdução desses compostos em ambientes não alvo é considerada uma ameaça aos ecossistemas.

Contaminação ambiental e Parationato metílico

Com o rápido processo de industrialização e desenvolvimento, novos compostos químicos são introduzidos no mercado anualmente. Cada um desses compostos é considerado uma ameaça aos ecossistemas. A complexa natureza dessas substâncias torna muito difícil o processo de análise de toxicidade, tornando desconhecidos os efeitos dos poluentes e seus produtos de oxidação, que acabam acumulando no meio ambiente.

Durante as últimas décadas, o uso de produtos químicos aplicados na agricultura aumentou drasticamente, coincidindo com modificações nas práticas agrícolas e a intensificação da produção (Konstantinou et al., 2006). Aproximadamente 1-3% dos agroquímicos utilizados alcança seu local de ação (Plimmer, 1990), resultando na presença de resíduos desses compostos contaminando os componentes bióticos e abióticos, como plantas, solo e a rede hidrográfica local, aumentando as chances de atingir algum organismo não alvo, como peixes e outros. Além disso, muitos agroquímicos apresentam alta persistência ambiental, o que significa que estarão presentes no ambiente por muito tempo (Huang et al., 2011).

Brazil: Pesticide trade				
	Value [Millions of USD]			
	1996	2001	2006	2011
Imports	108.00	304.61	516.94	1958.81
Exports	146.07	143.89	242.24	471.73

Figura 1: Valores da comercialização de pesticidas no Brasil. Fonte: FAO

Em alguns casos, agroquímicos são utilizados diretamente na água. Isso acontece, por exemplo, na atividade piscícola. Muitas vezes, esses agroquímicos atuam no combate de insetos e parasitos de peixes. O uso descontrolado, utilizando o produto sem fiscalização, e, ainda não seguindo as recomendações técnicas, resulta em poluição ambiental, contaminação dos peixes de cultivo e de todos os organismos envolvidos no ecossistema aquático (Ranzani- Paiva et al., 1997 e Rodrigues et al., 1997).

Na aquicultura, compostos organofosforados (OP) são utilizados nas etapas de produção para controlar ectoparasitos e larvas de insetos, que causam mortalidade dos alevinos na fase inicial de produção.

São comumente encontrados em ambientes aquáticos como consequência do uso indiscriminado na atividade agrícola. Devido a constante presença dessas substâncias, esses compostos OP representam um grande risco para espécies não alvo. O parationato metílico (PM) destaca-se como o inseticida mais empregado para combater os predadores aquáticos (FIGUEIREDO e SENHORINI, 1990).

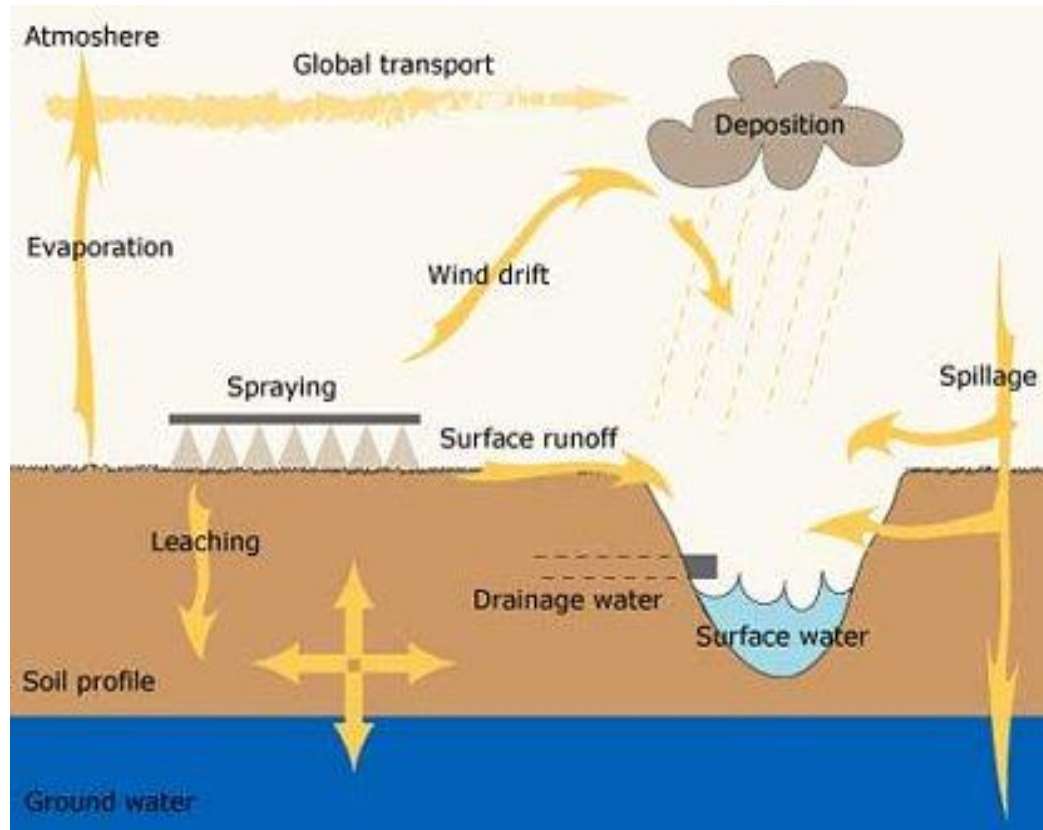


Figura 2: Vias de contaminação de corpos aquáticos por agroquímicos. Fonte: Swedish University of Agricultural Sciences

O mecanismo de ação desse tipo de composto é a inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE). A inibição dessa enzima impede a hidrólização do neurotransmissor acetilcolina (ACh) nas terminações nervosas e junções neuromusculares, levando a uma hiperexcitação dos tecidos musculares. Essa reação exacerbada provoca efeitos comportamentais, como hiperatividade, e efeitos físicos, como asfixia (Roex et al., 2003). Given et al (1997) encontraram uma diminuição da esteroidogênese em células adrenais expostas a parationato. A inibição dessa enzima em organismos vivos é amplamente usada como biomarcador da exposição ao OP bem como a outros compostos da mesma classe como inseticidas carbamatos (Walker, 2001).

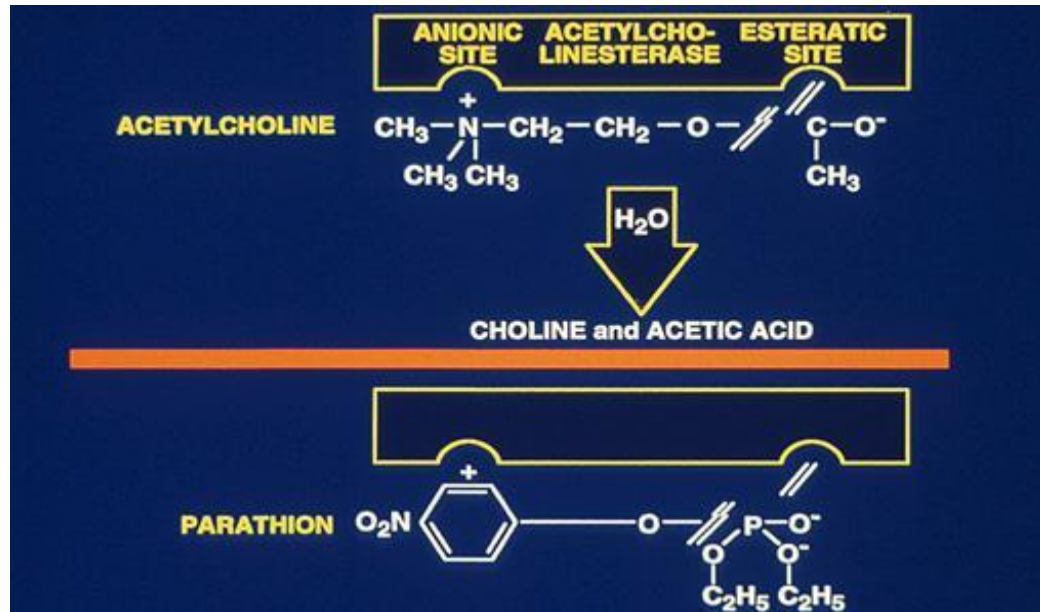


Figura 3: Mecanismo de ação de organofosforados. Fonte: Universidade do Porto, Faculdade de Farmácia, Monografias e teses.

Efeitos comportamentais podem ser observados mesmo em exposição a concentrações menores que aquelas que causam outros efeitos. Diminuição da atividade e de consumo de alimento foi observada em peixes expostos ao PM (Rand, 1977; Banas and Sprague, 1986). Vários estudos mostraram que a inibição da enzima acetilcolinesterase causa uma significativa mortalidade em espécies aquáticas, tanto em exposições agudas (Van der Wel and Welling, 1989; Zinkl et al., 1991; Legierse, 1998) como crônicas (Ansari and Kumar, 1984).

Peixe-zebra como modelo

O peixe-zebra (*Danio rerio*) vem sendo cada vez mais usado como modelo experimental em variados campos, como desenvolvimento, genética e pesquisa farmacológica. Essa espécie despertou nos últimos anos um grande interesse na pesquisa em neurociências. Sua conduta social ativa, facilidade de ambientação, baixo custo de manutenção, ciclo reprodutivo rápido e alta prolificidade, colaboram para a utilização do peixe-zebra como espécie modelo (Cachat e Stewart, 2010). Além disso, o tamanho pequeno (5-6 cm), a transparência óptica durante a embriogênese (que proporciona facilidade na detecção de anormalidades morfológicas) e a facilidade de traçabilidade de perfis genéticos favoreceu a utilização dessa espécie como modelo experimental. Nos últimos anos, uma série de artigos sobre o estudo da fisiologia do estresse bem como a cronologia da resposta em peixe zebra foram publicados (Chandrasekar et al., 2007; To et al., 2007; Alsop e Vijayan, 2008; Alderman e Bernier, 2009; Alsop e Vijayan, 2009; Barcellos et al., 2007, 2010; Ramsay et al., 2009).

Possuindo uma significativa homologia genética e fisiológica com outros vertebrados, o peixe-zebra (*Danio rerio*) tem se tornado muito popular em pesquisas neuro-comportamentais e construção de fenótipos cognitivos e afetivos. Além disso, a espécie tem demonstrado ser um bom modelo em estudos de comportamento, devido à possibilidade de modulação através de fatores endógenos e exógenos (Goldsmith, 2004). Até recentemente, assumia-se que o comportamento de peixes possuía um caráter apenas instintivo, com pouca capacidade cognitiva. No entanto, já é conhecida a habilidade dos peixes de formar memórias espaciais e mapas cognitivos, e com isso a possibilidade de exploração ambiental (Burt de Perera, 2004).

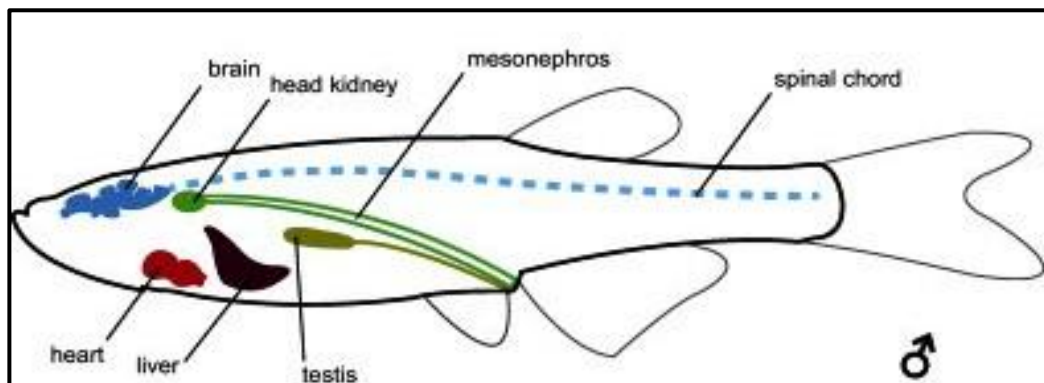


Figura 4: Principais órgãos. Zebrafish macho. Adaptado de Tokarz et al., 2013

O peixe-zebra apresenta resultados muito úteis em testes utilizados em análise comportamental. Essas características demonstram a sensibilidade da espécie à manipulação experimental e confirma sua aplicabilidade como modelo de estresse e fenômenos comportamentais (Stewart et al, 2013). Estudos baseados na exposição a ambientes novos são comumente usados em neurociências e ciência do comportamento para estudar tanto fenômenos afetivos, como medo e ansiedade, quanto cognitivos como habituação (Wong et al, 2010), além de parâmetros bioquímicos (Barcellos et al., 2007).

Resposta endócrina ao estresse e eixo Hipotálamo-Hipófise-Interrenal

Todos os animais, vertebrados ou não, passam por situações em que ocorre desequilíbrio da homeostase. Esse desequilíbrio é conhecido como estresse, e os fatores que levam a esse quadro são chamados fatores estressantes ou estressores (Barton, 2002). Quando um fator estressante interage com um organismo vivo, essa interação provoca o desencadeamento de uma reação chamada resposta ao estresse. Essa resposta deve ser produzida de forma que o organismo seja capaz de recuperar o estado de homeostase inicial. O principal componente da resposta ao estresse é o aspecto endócrino, que consiste na síntese de hormônios glicocorticoides circulantes. Nos teleósteos, o principal glicocorticoide atuante é o cortisol (Barton, 2002). O cortisol possui função glicemiante, que proporciona aos peixes estressados a recuperação da homeostase inicial provendo um aumento no aporte de energia disponível (Wendelaar Bonga, 1997), além de ser um fator essencial à adaptação em situações de estresse.

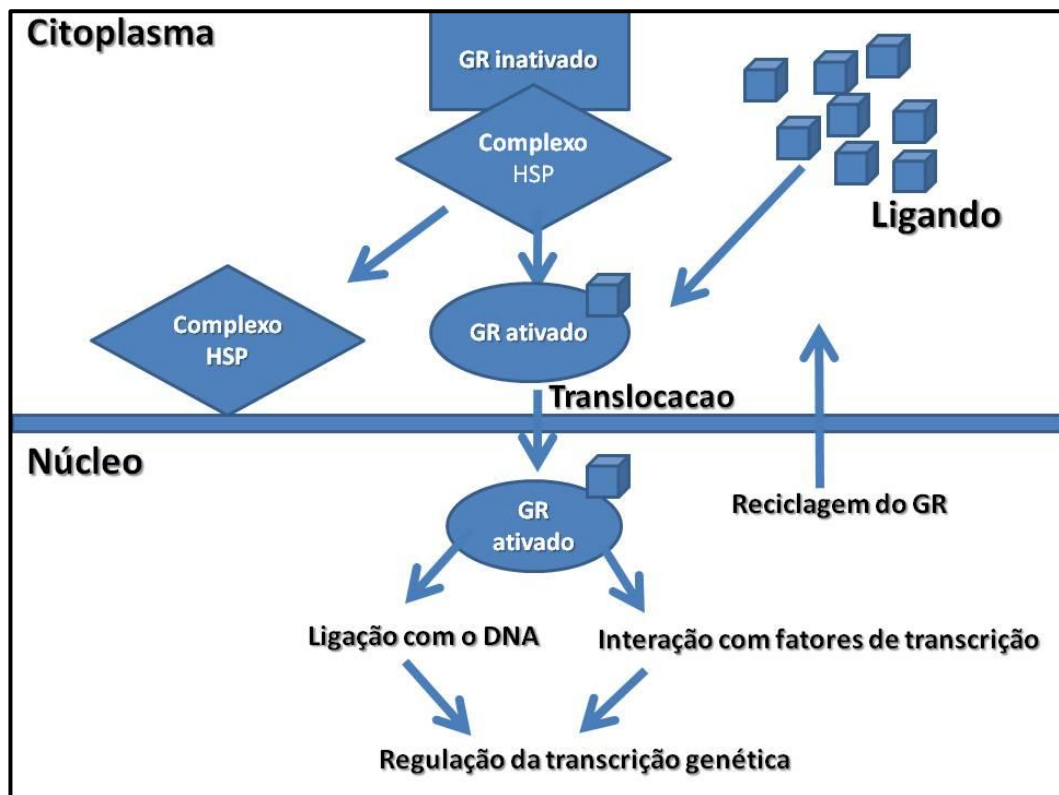


Figura 5: Ativação do receptor de glicocorticoides. Fonte: Autor.

A resposta endócrina ao estresse é regulada pelo eixo neuroendócrino hipotálamo-hipófise-interrenal (HHI). Quando um estressor é percebido, a informação é interpretada pelo hipotálamo onde uma série de neurônios inicia um processo de produção e liberação de neuropeptídios como o hormônio liberador de corticotrofina (CRH) e urotensinogênio tipo I (UI). Quando o CRH é liberado, ele age nos receptores próprios localizados na hipófise anterior, e promovem a produção de pro-

opiomelanocortina (POMC), um precursor do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH). O ACTH é então liberado na corrente sanguínea e atinge a porção cranial dos rins, agindo nos receptores 2-melanocortina (MCR2R). Essa reação inicia o processo de esteroidogênese e secreção de cortisol (Bernier et al., 2009).

A metabolização do colesterol dá origem à pregnenolona, que em seguida é convertida através de uma série de reações enzimáticas até a formação de 11-deoxycortisol. Por fim a enzima 11 β -hidroxilase faz a conversão de 11-deoxycortisol em cortisol. O cortisol é então liberado para a corrente sanguínea, não sendo armazenado no rim cefálico (Wendelaar Bonga, 1997).

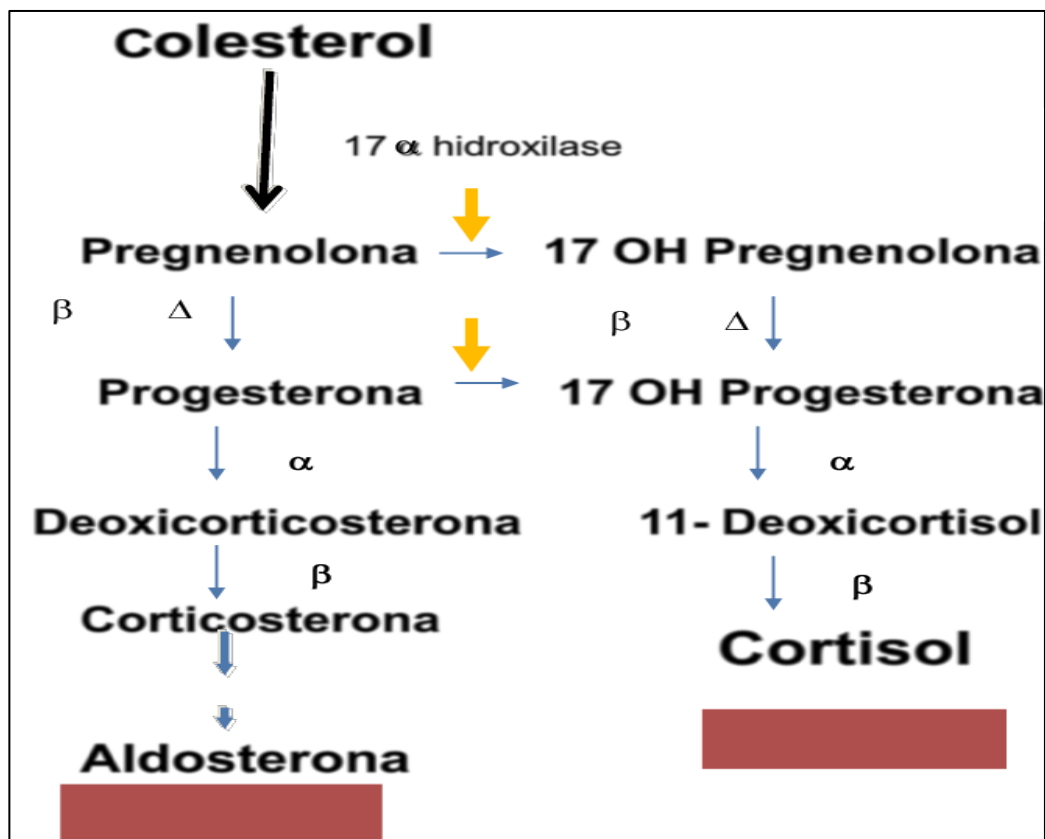


Figura 6: Conversão de colesterol em cortisol e aldosterona. Fonte: Autor

O feedback negativo do cortisol pode ocorrer em todos os níveis do eixo neuroendócrino, atuando em receptores de glicocorticoides (GR) ou receptores de mineralocorticoides (MR) localizados em várias células-alvo em vários tecidos. Os hormônios esteroides também podem alterar a estabilidade de ácido ribonucleicos mensageiros (mRNA) interferindo na quantidade de proteínas ou receptores responsivos aos glicocorticoides (Tsigos e Chrousos, 2002).

Interrupção endócrina

Existem diversas formas de os resíduos de agroquímicos atingirem os corpos d'água, como lixiviação, armazenamento inadequado de embalagens e recipientes, e até mesmo a lavagem em local impróprio de equipamentos utilizados na aplicação (Konstantinou et al., 2006; Huskes and Levsen, 1997). Esses resíduos representam um risco em potencial para as espécies aquáticas não alvo.

A maior parte das pisciculturas está localizada próxima a áreas agrícolas, e por vezes até sendo supridas com a mesma água utilizada na atividade agrícola. A contaminação, mesmo em doses consideradas aparentemente inócuas, pode causar um efeito deletério nos organismos aquáticos. Este efeito deletério dos agroquímicos sobre os organismos pode ser classificado como interrupção endócrina (Colborn 2010). A interrupção endócrina afeta um eixo neuroendócrino, que geralmente possui a função de coordenar e manter a homeostase em determinado sistema no organismo.

A interrupção do eixo neuroendócrino Hipotálamo-Hipófise-Interrenal (HHI), que é responsável, entre outras funções, por coordenar a resposta ao estresse, impede os animais de produzirem uma reação efetiva às situações de estresse. A resposta ao estresse, proporcionada pela ação do hormônio cortisol, é uma reação do organismo a uma variedade de fatores adversos, chamados estressores, que iniciam uma série de processos fisiológicos adaptativos coordenados pelo eixo HHI. Um peixe com resposta ao estresse prejudicada apresenta uma redução significativa da sua capacidade de elevar o cortisol plasmático, tornando-se fisiologicamente comprometido e não respondendo adequadamente aos estressores comuns em seu ambiente.

Vários mecanismos de ação têm sido estudados e propostos como causadores de bloqueio no eixo HHI. Efeito na hipófise, mais especificamente no receptor de glicocorticóide cerebral (BGR), onde se liga o CRH (hormônio liberador de corticotrofina) foi observada por Hontela (2006) e Gravel & Vijayan (2006). Especificamente no tecido interrenal, vários efeitos foram descritos em diversos estudos. O bloqueio da expressão de uma proteína chave na cascata de síntese do cortisol, a StAR (steroidogenic acute regulatory protein) foi relatada por Hontela (2006), Gravel & Vijayan (2006) e Aluru et al. (2005). A StAR que promove a entrada do colesterol na mitocôndria e a sua transferência para o sítio ativo da P450 "side chain cleavage" (P450_{scc}) com a consequente conversão do colesterol em pregnenolona que, depois da ação de mais algumas hidroxilases, dará finalmente origem ao cortisol (Mommsen et al., 1999).

Objetivos

Frente à necessidade de um melhor entendimento da fisiopatologia da interrupção endócrina causada pela exposição a agroquímicos, e as consequências deletérias aos animais no que tange à interação entre homeostase e os eventos estressores no ambiente, esse trabalho pretende identificar os mecanismos de interação entre a substância e os componentes do eixo HHI.

Objetivos específicos

Como objetivos específicos, o trabalho avaliará o efeito do parationato metílico sobre os seguintes componentes do eixo HHI:

1. Resposta do eixo hipotálamo-hipófise-interrenal;
2. A proteína regulatória de esteroidogênese aguda – StAR;
3. O receptor de glicocorticoide;
4. As proteínas do choque térmico (HSPs).

ARTIGO 1

IMPAIRMENT OF CORTISOL RESPONSE TO STRESS IN ZEBRAFISH ACUTELY EXPOSED TO METHYL-PARATHION

Este capítulo foi escrito de acordo com as normas da Revista *Journal of Environmental Science and Technology*, onde foi publicado sob o DOI **10.3923/jest.2013.57.62**

Journal of Environmental Science and Technology 6 (1): 57-62, 2013

ISSN 1994-7887 / DOI: 10.3923/jest.2013.57.62

© 2013 Asian Network for Scientific Information

Impairment of Cortisol Response to Stress in Zebrafish Acutely Exposed to Methyl-parathion

¹Joao Gabriel Santos da Rosa, ¹Gessi Koakoski, ²Angelo L. Piato, ³Luiz Carlos Kreutz, ³Michele Fagundes, ⁴Alessandra Marqueze and ³Leonardo Jose Gil Barcellos

¹Programa de Pos-Graduacao em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brazil

²Laboratorio de Psicofarmacologia e Comportamento, Unochapeco, Chapeco, SC, Brazil

³Universidade de Passo Fundo, Curso de Medicina Veterinaria, Passo Fundo, RS, Brazil

⁴Mestrado em Avaliacao de Impactos Ambientais em Mineracao. Centro Universitario La Salle, Canoas, RS, Brazil

*Corresponding Author: L.J.G. Barcellos, Universidade de Passo Fundo (UPF) Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinaria Campus I Bairro Sao Jose, Caixa Postal 611, CEP 99001-970, Passo Fundo RS, Brazil
Tel: +55 54-316-8100 Fax: +55 54-316-8487*

ABSTRACT

The current uses of the organophosphorous methyl-parathion (MP) easily allow the pesticide to reach non-target organisms like fish. This substance was previously found as an endocrine disruptor of the Hypothalamus-Pituitary-Interrenal (HPI) axis. Thus, the cortisol response has been investigated in waterborne MP (5.2 mg L⁻¹) exposed adult zebrafish (*Danio rerio*) sampled 96 h after exposure. Stressed fish exposed to MP contaminated water showed lower levels of whole-body cortisol. Data demonstrated that MP produced impairment in the cortisol response to stress in zebrafish. This impairment may reduce the ability of the organism to promote metabolic and ionic adjustments necessary for the stress response. Fish that are incapable of mounting a normal cortisol response are likely to have a reduced ability to respond to the continuous challenges imposed on their homeostatic systems, either by aquaculture practices or by environmental changes.

Key words: Methyl-parathion, HPI disrupten, cortisol response daniorerio, metabolic disturbance

INTRODUCTION

Zebrafish is a good model system to research stress response and its Hypothalamus-Pituitary-Interrenal (HPI) axis has already been characterized (Alsop and Vijayan, 2009; Fuzzen *et al.*, 2010). Considering this, it is also useful to aquatic toxicology studies on endocrine disruption of this axis, which coordinates the stress response in fish (Wendelaar Bonga, 1997). HPI and its peripheral product, cortisol, play a key role in the metabolic, ionic and physiologic adjustments necessary for coping with stress. Consequently, any adverse effect on the functioning of the HPI axis would compromise the ability of the animal to mount an adequate response to stressors (Hontela, 1998, 2005).

Methyl-Parathion (MP) is an organophosphorous pesticide largely used in Brazil to avoid agriculture losses due to insect attacks. In addition, MP has also been used in fish-culture ponds to kill the aquatic larvae of the predatory insects (Szarek *et al.*, 2000; Luvizotto-Santos *et al.*, 2009). MP, commercially named as Folidol 600[®] is a "less-persistent" organophosphate insecticide which

J. Environ. Sci. Technol., 6 (1): 57-62, 2013

is moderately soluble in water and acutely toxic to fishes (Walton *et al.*, 1997). MP has been shown to interfere with and disrupt the functioning of the HPI axis in fish such as *Rhamdia quelen* (Cericato *et al.*, 2008).

Thus, the aim of the present work was to verify the effects of an acute exposure to sublethal concentrations of methyl-parathion on the cortisol response to an acute stressor in adult zebrafish.

MATERIALS AND METHODS

Fish and housing conditions: Two hundred and forty adult male “wild type” zebrafish (*Danio rerio*) were obtained from a commercial supplier (Delphis, Porto Alegre, RS) and acclimated for three days before the tests in the experimental aquaria (40 L, with constant aerated dechlorinated tap water), housed in groups of 20 fish, kept under 14-10 h day/night cycle and fed three times a day with commercial flakes (TetraMin®). All protocols were approved by the Institutional Animal Care Committee (CEUA-UPF, number 03/2011). Throughout the experiment, the water temperature was 28 ± 2 °C, pH ranged from 6.6 to 7.2 and dissolved oxygen from 5.2 to 7.1 mg L⁻¹. Total ammonia was lower than 0.5 mg L⁻¹.

Experimental design: After acclimation, fish were divided into four experimental groups, each one housed in six aquaria in a static test design. In the first group fish were kept without any stressor or Contaminant (C). In the second group (MP) fish were exposed to 5.2 mg L⁻¹ of methyl-parathion (concentration based on previous results by Bellavere and Gorbi (1984) and on the most commonly used concentrations in aquaculture stated Luvizotto-Santos *et al.* (2009) in the third group (S) fish were exposed to a stressor (60 sec of chasing with a net) and in the last group (MP+S) zebrafish were exposed to both the stressor and the contaminant. The stressor was applied after 96 h of exposure, and fish sampled at hour 97, cryoanaesthetized and euthanized (Wilson *et al.*, 2009) for whole-body cortisol determination (n = 10).

The concentration of MP in water was monitored daily from the moment of the inoculation to until 96 h of exposure period. MP was analyzed by High-Pressure Liquid Chromatography (HPLC) using the method described specifically for MP by Sabharwal and Belsare (1986) and for other compounds general by Zanella *et al.* (2003).

Analytical methods: The extraction and measurement of cortisol was fully described by Barcellos *et al.* (2007). Briefly, fish were captured and immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C until the cortisol extraction. Each zebrafish was weighed and a pool of three fish were minced and placed into a disposable stomacher bag with 2 mL of Phosphate Buffered Saline (PBS, pH 7.4) for 6 min. The contents were transferred to a 10-mL screw top disposable test tube and 5 mL of laboratory grade ethyl ether was added. The tube was vortexed for 1 min and centrifuged for 10 min at 3000 rpm. The tube was then immediately frozen at liquid nitrogen and the unfrozen portion (ethyl ether containing cortisol) was decanted. The ethyl ether was transferred to a new tube and completely evaporated under a gentle stream of nitrogen for 2 h, yielding a lipid extract containing the cortisol. The extract was stored at -20 °C until the ELISA was conducted on the samples suspended with 1 mL of PBS buffer. In order to prevent a possible stress response induced by manipulation, the time elapsed between capture and killing was less than 10 sec. Whole body cortisol was measured in duplicate samples of tissue extract with a commercially available

EIAgen™ CORTISOL test (BioChem Immuno Systems). The specificity of the test was evaluated by comparing the parallelism between the standard curve and serial dilutions in PBS (pH 7.4) of the tissue extracts. The standard curve constructed with the human standards ran parallel to that obtained using serial dilutions of zebrafish tissue extracts. In the linear regression test, high positive correlation ($R_2 = 0.9818$) was found between the curves. The intra-assay coefficient of variation was 3.33-3.65%.

Statistical analysis: Data were expressed as Mean±S.E.M. and analyzed with Graph Pad InStat 3.00 statistical package (GraphPad Software, San Diego, California USA), by analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's multiple range tests. Statistical significance was accepted at $p < 0.05$.

RESULTS

The main result of the present work was the attenuation of whole-body cortisol levels in fish from MP+S group with values of 21.1 ± 2.33 ng g⁻¹ tissue, statically lower than stressed zebrafish in clear water (34.67 ± 6.25 ng g⁻¹ tissue). The mean whole-body cortisol levels are indicated in Fig. 1. No mortality was observed in all groups.

Immediately after inoculation the concentration of MP measured in the water (5.044 mg L⁻¹) was extremely close to the nominal concentration. After 96 h, MP was detected at a concentration 45% lower than inoculated (2.808 mg L⁻¹, Table 1).

Table 1: Daily measured Methyl-parathion concentrations (mg) in water

Measurement moment	Measured concentration (mg L ⁻¹)
Immediately after inoculation	5.044
24 h after inoculation	4.368
48 h after inoculation	3.692
72 h after inoculation	3.016
96 h after inoculation	2.808

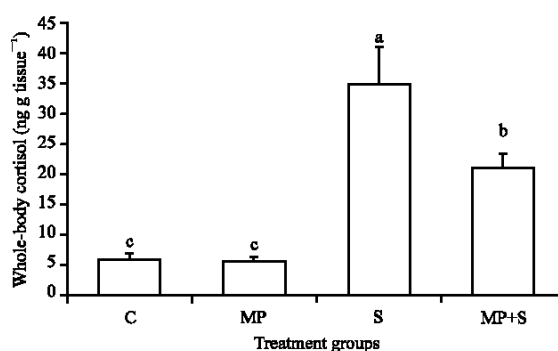


Fig. 1: Mean whole-body cortisol (ng g⁻¹ ±SEM) levels of zebrafish exposed to stress (S), Methyl-Parathion (MP) or stress plus acute exposition to methyl-parathion (MP+S). Different letters above the standard error bars indicate a significant difference between treatment groups (ANOVA followed by Tukey's multiple range test, $p < 0.01$; $n = 10$)

DISCUSSION

The main result of the present work was the attenuation of whole-body cortisol levels in fish from MP+S group. A weakened cortisol response to stress is a well-documented phenomenon that occurs in several fish species following prolonged (Hontela *et al.*, 1992, 1995, 1997) and acute exposure to xenobiotics (Gravel and Vijayan, 2007; Cericato *et al.*, 2008; Hori *et al.*, 2008). In general, whole-body cortisol levels measured in the present study were similar to levels previously determined in this species (Ramsay *et al.*, 2006; Barcellos *et al.*, 2007, 2010).

HPI axis disruption provoked by MP exposure was also verified in the teleost *Rhamdia quelen* (Cericato *et al.*, 2008), but the mechanisms involved were not studied. HPI axis disruption is a well known phenomenon in fish (Aluru *et al.*, 2004; Gravel and Vijayan, 2006; Gravel and Vijayan, 2007). According to our knowledge, the results presented herein are the first reporting impaired whole-body cortisol levels in zebrafish exposed to MP.

The possibility that MP impairs the HPI axis in zebrafish by acting directly on the interrenal tissue cannot be discarded since we previously found a nonresponsive interrenal tissue in *R. quelen* when challenged with adrenocorticotrophic hormone (ACTH) (Cericato *et al.*, 2009). Also, we cannot discard the possibility that this disrupting effect may occur elsewhere within the HPI axis. Despite the exact mechanism by which MP blocked the cortisol response, biologically, the fish lost their capacity to mount an adequate response to cope with a standard stressor and maintain homeostasis. This attenuation may reduce the ability of the organism to promote metabolic and ionic adjustments necessary for the stress response. As outlined by Brodeur *et al.* (1997), fish that are incapable of mounting a normal cortisol response are likely to have a reduced ability to respond to the continuous challenges imposed on their homeostatic systems, either by aquaculture practices or by environmental changes.

Regarding the substance tested, the organophosphorous methyl-parathion (Folidol600®, 600 g L⁻¹ of MP) is widely used as an insecticide in food storage and agriculture, as well as in fish farms to eliminate predatory aquatic insects. Thus, the current uses and practices easily allow MP to reach non-target organisms like fish (Cericato *et al.*, 2008). When we put our results into an environmental context, we perceive that they are very relevant since the concentration used in fish farms to eliminate predatory aquatic insects ranges from 4 to 6 mg L⁻¹ (Luvizotto-Santos *et al.*, 2009), very close to the concentration used in the present work.

MP was degraded reducing the real concentration to about 55% of nominal inoculated concentration after 96 h of exposure, as verified by Sabharwal and Belsare (1986). Thus, fish were really exposed to sub lethal concentrations for 96 h.

The results presented herein show that MP produced impairment in the cortisol response to stress in zebrafish at a commonly used concentration. Thus, whole-body cortisol measurement might serve as sensitive diagnostic tools for acute exposure of fish to methyl-parathion.

REFERENCES

- Alsop, D. and M.M. Vijayan, 2009. Molecular programming of the corticosteroid stress axis during zebrafish development. *Comp. Biochem. Physiol. Part A: Mol. Integr. Physiol.*, 153: 49-54.
- Aluru, N., E.H. Jorgensen, A. Maule and M.M. Vijayan, 2004. PCB disruption of the hypothalamus-pituitary-interrenal axis involves brain glucocorticoid receptor down regulation in anadromous *Arctic charr*. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 287: 787-793.
- Barcellos, L.J.G., F. Ritter, L.C. Kreutz, R.M. Quevedo and L.B. da Silva *et al.*, 2007. Whole-body cortisol increases after direct and visual contact with a predator in zebrafish, *Danio rerio*. *Aquaculture*, 272: 774-778.

J. Environ. Sci. Technol., 6 (1): 57-62, 2013

- Barcellos, L.J.G., F. Ritter, L.C. Kreutz and L. Cericato, 2010. Can zebrafish *Danio rerio* learn about predation risk? The effect of a previous experience on the cortisol response in subsequent encounters with a predator. *J. Fish Biol.*, 76: 1032-1038.
- Bellavere, C. and G. Gorbi, 1984. Biological variability and acute toxicity of parathion, dichlobenil and TPBS to *Biomphalaria glabrata* and *Brachydanio rerio*. *Environ. Technol. Lett.*, 5: 389-396.
- Brodeur, J.C., G. Sherwood, J.B. Rasmussen and A. Hontela, 1997. Impaired cortisol secretion in yellow perch (*Perca flavescens*) from lakes contaminated by heavy metals: *In vivo* and *in vitro* assessment. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 54: 2752-2758.
- Cericato, L., J.G.M. Neto, L.C. Kreutz, R.M. Quevedo and J.G.S. da Rosa *et al.*, 2009. Responsiveness of the interrenal tissue of Jundia (*Rhamdia quelen*) to an *in vivo* ACTH test following acute exposure to sublethal concentrations of agrichemicals. *Comp. Biochem. Physiol. Part C: Toxicol. Pharmacol.*, 149: 363-367.
- Cericato, L., J.G.M. Neto, M. Fagundes, L.C. Kreutz and R.M. Quevedo *et al.*, 2008. Cortisol response to acute stress in jundia *Rhamdia quelen* acutely exposed to sub-lethal concentrations of agrichemicals. *Comp. Biochem. Physiol. Part C: Toxicol. Pharmacol.*, 148: 281-286.
- Fuzzen, M.L.M., G. Van Der Kraak and N.J. Bernier, 2010. Stirring up new ideas about the regulation of the hypothalamic-pituitary-interrenal axis in zebrafish (*Danio rerio*). *Zebrafish*, 7: 349-358.
- Gravel, A. and M.M. Vijayan, 2006. Salicylate disrupts interrenal steroidogenesis and brain glucocorticoid receptor expression in rainbow trout. *Toxicol. Sci.*, 93: 41-49.
- Gravel, A. and M.M. Vijayan, 2007. Salicylate impacts the physiological responses to an acute handling disturbance in rainbow trout. *Aquat. Toxicol.*, 82: 87-95.
- Hontela, A., 1998. Interrenal dysfunction in fish from contaminated sites: *In vivo* and *in vitro* assessment. *Environ. Toxicol. Chem.*, 17: 44-48.
- Hontela, A., 2005. Stress and the Hypothalamo-Pituitary-Interrenal Axis: Adrenal Toxicology-Effects of Environmental Pollutants on the Structure and Function of the HPI Axis. In: *Biochemical and Molecular Biology of Fishes, Volume 6, Environmental Toxicology*, Moon, T.W. and T.P. Mommsen (Eds.). Elsevier, Amsterdam, pp: 331-363.
- Hontela, A., C. Daniel and J.B. Rasmussen, 1997. Structural and functional impairment of the hypothalamo-pituitary-interrenal axes in fish exposed to bleached craft mill effluent in the St Maurice River. *Quebec. J. Ecotoxicol.*, 6: 1-12.
- Hontela, A., J.B. Rasmussen, C. Audet and G. Chevalier, 1992. Impaired cortisol stress response in fish from environments polluted by PAHs, PCBs and mercury. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 22: 278-283.
- Hontela, A., P. Dumont, D. Duclos and R. Fortin, 1995. Endocrine and metabolic dysfunction in yellow perch, *Perca flavescens*, exposed to organic contaminants and heavy metals in the St. Lawrence river. *Environ. Toxicol. Chem.*, 14: 725-731.
- Hori, T.S.F., I.M. Avilez, G.K. Iwama, S.C. Johnson, G. Moraes and L.O.B. Afonso, 2008. Impairment of the stress response in matrinxã juveniles (*Brycon amazonicus*) exposed to low concentrations of phenol. *Comp. Biochem. Physiol. Part C: Toxicol. Pharmacol.*, 147: 416-423.
- Luvizotto-Santos, R., M.N. Eller, E.L.G. Espindola and E.M. Vieira, 2009. O uso de praguicidas nas pisciculturas e pesqueiros situados na bacia do rio Mogi-Guaçu [The use of pesticides on fish farms and fishing grounds situated in the basin of the Mogi-Guaçu]. *Bull. Inst. Fish.*, 35: 343-358.

J. Environ. Sci. Technol., 6 (1): 57-62, 2013

- Ramsay, J.M., G.W. Feist, Z.M. Varga, M. Westerfield, M.L. Kent and C.B. Schreck, 2006. Whole-body cortisol is an indicator of crowding stress in adult zebrafish, *Danio rerio*. *Aquaculture*, 258: 565-574.
- Sabharwal, A.K. and D.K. Belsare, 1986. Persistence of methyl parathion in a carp rearing pond. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 37: 705-709.
- Szarek, J., A. Siwicki, A. Andrzejewska, E. Terech-Majewska and T. Banaszkiwickz, 2000. Effects of the herbicide Roundup™ on the ultrastructural pattern of hepatocytes in carp (*Cyprinus carpio*). *Mar. Environ. Res.*, 50: 263-266.
- Walton, W.J., K.L. Brown and M.J. Lydy, 1997. Diurnal fluctuations in toxicity in two fish species: *Gambusia affinis* and *Notropis ludibundis*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 59: 414-421.
- Wendelaar Bonga, S.E., 1997. The stress response in fish. *Physiol. Rev.*, 77: 591-625.
- Wilson, J.M., R.M. Bunte and A.J. Carty, 2009. Evaluation of rapid cooling and tricaine methanesulfonate (MS222) as methods of euthanasia in zebrafish (*Danio rerio*). *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.*, 48: 785-789.
- Zanella, R., E.G. Primel, F.F. Goncalves, M.H.S. Kurtz and C.M. Mistura, 2003. Development and validation of a high-performance liquid chromatographic procedure for the determination of herbicide residues in surface and agriculture waters. *J. Sep. Sci.*, 26: 935-938.

ARTIGO 2

EFFECTS OF METHYL PARATHION EXPOSURE ON ZEBRAFISH BRAIN *GR*, *STAR*, AND *HSP70* GENE EXPRESSION

Este capítulo foi escrito de acordo com as normas da Revista Environmental Toxicology, onde foi submetido para publicação.

14-Mar-2013

Dear Dr. Barcellos,

Your manuscript entitled "Impaired Brain StAR and hsp70 Gene Expression in Methyl-parathion Exposed Zebrafish." has been successfully submitted online and is presently being given full consideration for publication in Environmental Toxicology. Your manuscript number is TOX-13-088. Please mention this number in all future correspondence regarding this submission. You can view the status of your manuscript at any time by checking your Author Center after logging into <http://mc.manuscriptcentral.com/tox> . If you have difficulty using this site, please click the 'Get Help Now' link at the top right corner of the site. Thank you for submitting your manuscript to Environmental Toxicology.

Sincerely,

Environmental Toxicology Editorial Office

Effects of methyl parathion exposure on zebrafish brain *GR*, *StAR*, and *hsp70* gene expression

João Gabriel Santos da Rosa^{a1}, Gessi Koakoski^{a2}, Daiane Ferreira^{a3}, Ângelo Luis Piato^{b4}, Anna Maria Siebel^b, Maurício Reis Bogó^b, Carla Denise Bonan^b, Luiz Carlos Kreutz^{c5}, and Leonardo José Gil Barcellos^{c*}

^aPrograma de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Faixa de Camobi, Km 9 Campus Universitário, 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil;

¹Gabbriel_mv@hotmail.com; ²gessikoakoski@yahoo.com.br; ³daianeferri@yahoo.com.br

^bPrograma de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Av. Ipiranga, 6681 Bairro Partenon, Porto Alegre 91530-000, RS, Brazil; ⁴angelopiato@gmail.com

^cUniversidade de Passo Fundo, Curso de Medicina Veterinária, Campus Universitário do Bairro São José, Caixa Postal 611, CEP 99001-970, RS, Brazil; ⁵lckreutz@upf.br

*Corresponding author: Dr. LJG Barcellos

Universidade de Passo Fundo, Vice-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Campus I, Cx. Postal 611, Bairro São José, CEP 99001-970 Passo Fundo, RS, Brazil

Telephone/Fax: +55 54 33168487

E-mail: lbarcellos@upf.br

Abstract

Gene expression patterns of the brain glucocorticoid receptor (*GR*), steroidogenic acute regulatory protein (*StAR*), and heat shock protein 70 (*hsp70*) have been investigated in waterborne methyl parathion (MP, 5.2 mg/L)-exposed adult zebrafish (*Danio rerio*), sampled 96 h after exposure. Stressed fish exposed to MP-contaminated water showed an inhibition of the brain *StAR* and *hsp70* gene expression. Data demonstrated that MP produced brain *StAR* and *hsp70* inhibition.

Keywords: methyl parathion, zebrafish, steroidogenic acute regulatory protein, heat shock protein 70, glucocorticoid receptor

1. Introduction

Since the zebrafish is a good model system to research stress response and its hypothalamic-pituitary-interrenal (HPI) axis has already been characterized (Alsop and Vijayan, 2009; Fuzzen et al., 2010), it might also be useful for aquatic toxicology studies on this axis, which coordinates the stress response in fish (Wendelaar Bonga, 1997). HPI and its peripheral product, cortisol, play a key role in the metabolic, ionic, and physiologic adjustments necessary for coping with stress. Cortisol is secreted and binds to glucocorticoid receptor (GR), a ligand-activated nuclear transcription factor. GR regulates transcription of the target genes related to glucose metabolism, immune function, and behavior (Mommsen et al., 1999). Consequently, any adverse effect on the functioning of the HPI axis would compromise the ability of the animal to mount an adequate response to stressors (Hontela, 1998, 2005).

In cortisol synthesis, the steroidogenic acute regulatory protein (StAR), which shuttles cholesterol from the outer to the inner mitochondrial membrane, is a key rate-limiting protein in steroid synthesis (Stocco et al., 2005).

The brain is not only a target but also a steroid-producing organ, and the steroid concentrations in the brain fluctuate independently of the plasma cortisol concentrations (Sierra, 2004). The co-localization of StAR in the brain cells that also express P450_{scc} demonstrates a similar importance in the production of neurosteroids (King et al., 2002; Sierra, 2004). These neurosteroids are thought to possess important roles in neuroprotection, modulation of brain function, and neuronal development (King et al., 2004).

Heat shock proteins (hsps), the other indicators of stress response in fish, represent a cellular response to stressors (Iwama et al., 2004), whose function is to stabilize protein structures under stress conditions (Willer et al., 2000). Thus, the inhibition of hsp70 might cause cellular stress with a consequent loss of function. The hsp70 occurs particularly in the brain regions that coordinate the neuroendocrine response to stress (Blake et al., 1990).

Interrenal StAR protein and hsp70 might be the targets for toxicants and possible mechanisms causing disruption on the production of steroids (Aluru et al., 2005; Aluru and Vijayan, 2006; Gravel and Vijayan, 2006). However, very little is known about the involvement of brain StAR and hsp70 as the targets for xenobiotics.

Methyl parathion (MP) is an organophosphorus pesticide largely used in Brazil for avoiding agricultural losses due to insect attacks. In addition, MP has also been used in fish culture ponds for killing the aquatic larvae of predatory insects (Szarek et al., 2000). MP, commercially named as Folidol 600[®], is a less-persistent organophosphate insecticide, which is moderately soluble in water and acutely toxic to fishes (Walton et al., 1997).

Thus, the aim of the present work was to verify the effects of an acute exposure to the sublethal concentrations of methyl parathion (MP) on the expression of brain StAR protein, hsp70, and GR as the possible targets of this compound in adult zebrafish.

2. Materials and Methods

2.1 Fish, housing, and experimental design

Adult male wild-type zebrafish (*Danio rerio*) were obtained from a commercial supplier (Delphis, Porto Alegre, RS) and acclimated for 3 days before the tests in the experimental aquaria (40 L, with constantly aerated dechlorinated tap water), housed in groups of 20 fish, kept under 14–10 h day/night cycle, and fed 3 times a day with commercial flakes (TetraMin[®]). All the protocols were approved by the Institutional Animal Care Committee (CEUA-UPF). Throughout the experiment, the water temperature was 28 ± 2 °C, the pH ranged from 6.6 to 7.2, and the dissolved oxygen from 5.2 to 7.1 mg/L. Total ammonia was lower than 0.5 mg/L.

After acclimation, the fish were divided into 4 experimental groups, each housed in 6 aquaria in a static test design. In the first group, the fish were kept without any stressor or

contaminant (C). In the second group (MP), the fish were exposed to 5.2 mg/L of methyl parathion (concentration based on previous results by Bellavere and Gorbi, 1984); in the third group (S), the fish were exposed to a stressor (60 s of chasing with a pen net), and in the last group (MP + S), the zebrafish were exposed to both the stressor and the contaminant. Acute handling stress was applied after 96 h of exposure, and the fish were sampled at hour 97, cryoanesthetized, and euthanized (Wilson et al., 2009) for brain dissection and gene expression analysis (n = 6).

2.2 Gene expression

The expression of *GR*, *StAR*, and *hsp70* genes was analyzed by a semiquantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) assay. Zebrafish DNA sequences encoding for *GR*, *StAR*, and *hsp70* were retrieved from the GenBank database and used for searching specific primers, which were designed using the Oligos 9.6 program (Table 1). The β -actin primers were designed as described previously (Chen et al., 2004). TRIzol[®] reagent (Invitrogen) was employed for isolating total zebrafish brain RNA, and its purity was quantified by spectrophotometry. Afterwards, all the samples were adjusted to 160 ng/ μ L, and cDNA species were synthesized using SuperScript[™] III First-Strand Synthesis SuperMix (Invitrogen). RT-PCR conditions were optimized in order to determine the number of cycles that would allow product detection within the linear phase of mRNA transcript amplification (Table 1). The PCR reactions were performed using 0.1 μ M primers, 0.2 μ M dNTP, 2 mM MgCl₂, and 0.5 U Platinum[®] *Taq* DNA polymerase (Invitrogen). The PCR products were submitted to electrophoresis using a 1% agarose gel. The fragment length of the PCR reactions was confirmed with a low DNA mass ladder (Invitrogen, USA), and β -actin was carried out as an internal standard. The relative abundance of each mRNA versus β -actin was determined in the organs studied by densitometry using the freeware ImageJ 1.37 for Windows.

2.3 Statistics

Data were expressed as mean \pm SEM and analyzed with the Graph Pad InStat 3.00 statistical package (GraphPad Software, San Diego, California, USA) by a two-way analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey's multiple range tests. Statistical significance was accepted at $p < 0.05$.

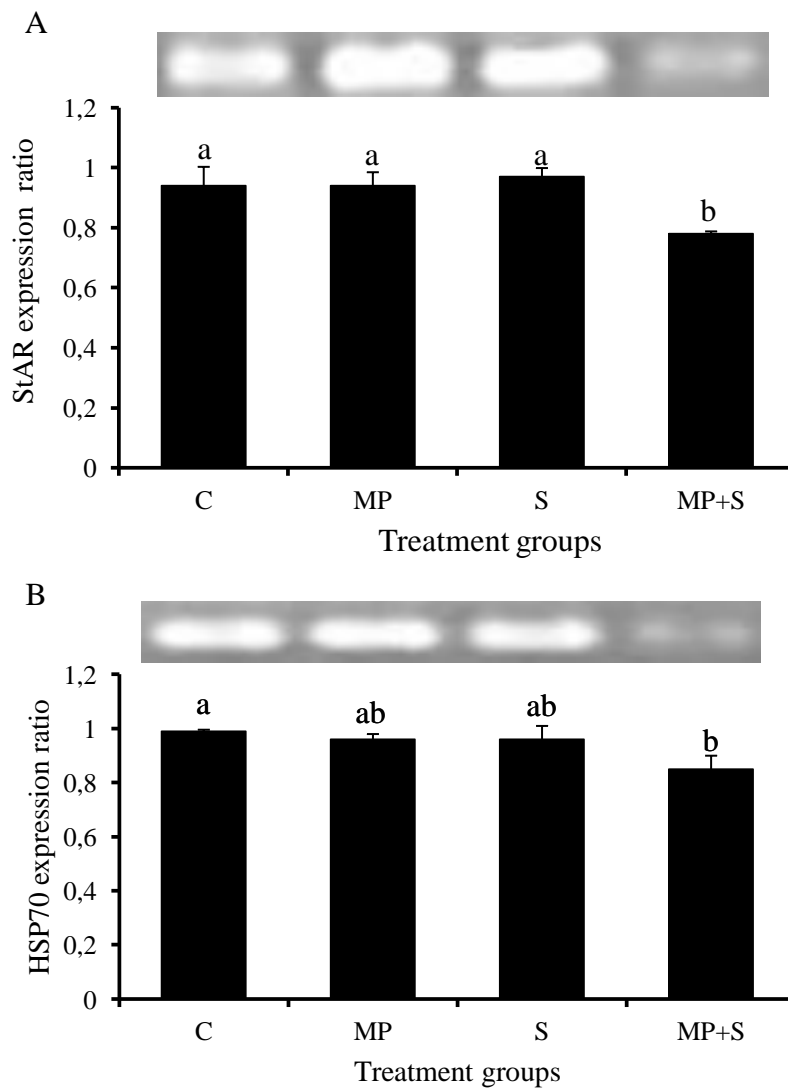
Table 1: Primer sequences and PCR amplification conditions

Gene	GenBank accession number	Primer sequences (5-3')	PCR fragment (bp)	Anneling T_m ($^{\circ}$ C)	Cycles
GR	EF_436284	AACATGCTGTGTTTCGCTCC (forward) CTGCAAGCATTTCGGGAAAC (reverse)	401	62	35
StAR	BC_075967	TGCTATGTGCAACAAGGGCAAGAAGC (forward) GGACATTTACAAAGTCTCTTGGGC (reverse)	304	62	35
Hsp70	NM_131397	CCACCTGCGCCACGTGGCGTC (forward) CCTCCTCGCTGATCTTGCCTTTCAGG (reverse)	343	62	30
β -actin		GTCCCTGTACGCCTCTGGTCG (forward)	678	54	35
*	AAC13314	GCCGGACTCATCGTACTCCTG (reverse)			

* PCR primer sequences previously described (Chen et al., 2004). Chen, W.-Y., John, J.A.C., Lin, C.-H., Lin, H.-F., Wu, S.-C., Lin, C.-H., Chang, C.-Y., 2004. Expression of metallothionein gene during embryonic and early larval development in zebrafish. *Aquat. Toxicol.* 69, 215–227.

3. Results

No mortality was observed in all the groups. The expression of the brain *StAR*, *hsp70*, and *GR* genes is depicted in Figure 1. Brain *StAR* (Fig. 1A) and *hsp70* (Fig. 1B) expression in MP + S zebrafish was statistically lower than in the other treatments ($p < 0.05$). Concerning brain *GR* (Fig. 1C), no differences were found between the MP, S, and MP + S groups, but these treatments showed high expression ratios when compared to C ($p < 0.05$).



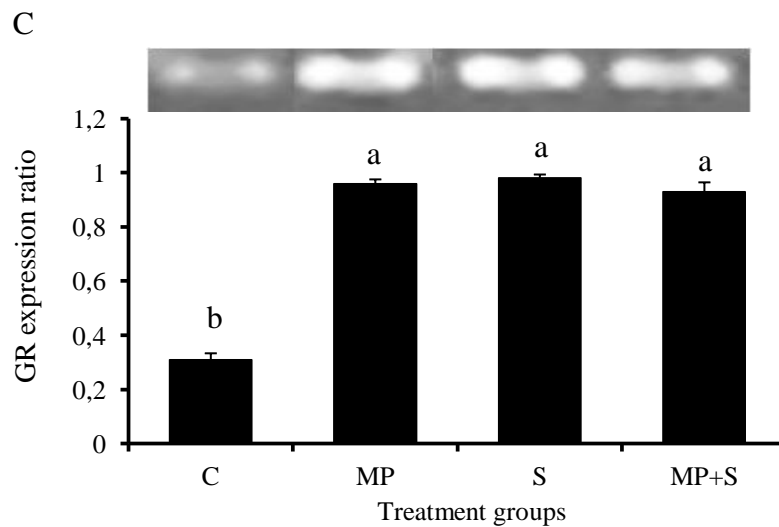


Fig. 1. Effects of stress (S), acute exposition to methyl-parathion (MP) or stress plus acute exposition to methyl-parathion (MP+S) on *StAR* (A), *hsp70* (B) and GR (C) expression in zebrafish brain. Data expressed as mean \pm S.E.M. Different letters above the standard error bars indicate a significant difference between treatment groups (ANOVA followed by Tukey's multiple range test, $p < 0.01$; $n = 6$).

4. Discussion

The main result found in the present work was the inhibited expression of the brain *StAR* protein gene in zebrafish from the MP + S group. The role of the *StAR* protein in the brain is not fully described, but the significant decrease in its expression in the MP + S fish suggests a possible involvement in the HPI axis activation or signaling, pointing to brain *StAR* as a possible mechanism of the impairment of steroid synthesis (Arukwe et al., 2008).

Since the brain is a steroid-producing organ (Sierra, 2004) and since neurosteroids are thought to possess important roles in brain function and neuronal development (King et al., 2002; King et al., 2004; Sierra, 2004), the verified inhibition of the brain *StAR* gene expression in fish exposed to MP (according to our knowledge, the first published results) is a very instigating result.

The brain *StAR* expression was also altered in Atlantic salmon exposed to ethynylestradiol (Lyssimachou and Arukwe, 2007) and nonylphenol (Arukwe, 2005).

In fact, studies on steroidogenesis disruption focused mainly on the levels of the steroids and receptor-mediated effects, but little is known about the effects and mechanisms of endocrine modulators on neural steroid-mediated effects. The current research on endocrine disruption provoked by chemicals has omitted the examination of the neural steroids and does not fully cover the process of steroidogenesis (Lyssimachou et al., 2006).

The diminished *hsp70* expression in zebrafish in the MP + S group might be an indicator of cellular stress in the brain, provoked when stress occurs concomitantly to contamination. As verified in the Arctic char (Aluru et al., 2004), *hsp70* inhibition may point to a loss of neurons, especially those involved in the HPI axis, in response to MP exposure in zebrafish. Reinforcing this argument, *hsp70* occurs in the brain, particularly in regions that coordinate the neuroendocrine response to stress (Blake et al., 1990).

The brain *GR* expression in fish from the MP, S, and MP + S groups did not differ. Similar results were found by Gravel and Vijayan (2006), who exposed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to salicylate and reported that brain *GR* mRNA levels were not affected. On the other hand, inhibition of *GR* expression occurred in *Salvelinus alpinus* exposed to polychlorinated biphenyls (PCBs) (Aluru et al., 2004). The difference between these results could be related to different exposure intervals, pharmacological differences of the contaminants, and/or variations in the protocols employed.

Regarding the substance tested, organophosphorus methyl parathion (Folidol 600[®], 600 g/L of MP), it is widely used as an insecticide in food storage and agriculture as well as in fish farms for eliminating predatory aquatic insects. Thus, the current uses and practices easily allow MP to reach non-target organisms like fish (Cericato et al., 2008).

Finally, since we did not measure the expression of StAR and *hsp70* in the interrenal tissue, our data did not fully support nor deny the relationship between a possible impairing

on cortisol levels and the inhibited brain StAR and hsp70. However, the inhibition of *StAR* and *hsp70* genes in stressed fish exposed to MP is a very instigating result.

Altogether, the results presented herein show that MP produced impairment in brain *StAR* and *hsp70* gene expression. Thus, the expression of these proteins in the brain might serve as sensitive diagnostic tools for the acute exposure of fish to methyl parathion and as an initial point for studying the effects of MP on neurosteroid production.

5. References

- Alsop D, Vijayan MM (2009) Molecular programming of the corticosteroid stress axis during zebrafish development. *Comp Biochem Physiol A. Mol Integr Physiol* 153: 49–54.
- Aluru N, Jorgensen EH, Maule AG, Vijayan MM (2004) PCB disruption of the hypothalamus-pituitary-interrenal axis involves brain glucocorticoid receptor downregulation in anadromous Arctic charr. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 287: R787–R793.
- Aluru N, Vijayan MM (2006) Aryl hydrocarbon receptor activation impairs cortisol response to stress in rainbow trout by disrupting the rate limiting steps in steroidogenesis. *Endocrinology* 147:1895–1903.
- Aluru N, Renaud R, Leatherland JF, Vijayan MM (2005) Ah receptor-mediated impairment of interrenal steroidogenesis involves StAR protein and *P450_{scc}* gene attenuation in rainbow trout. *Toxicol Sci* 84:260–269.
- Arukwe A, Nordtug T, Kortner TM, Mortensen AS, Brakstad OG (2008) Modulation of steroidogenesis and xenobiotic biotransformation responses in zebrafish (*Danio rerio*) exposed to water-soluble fraction of crude oil. *Environm Res* 107:362–370.
- Arukwe A (2005) Modulation of brain steroidogenesis by affecting transcriptional changes of steroidogenic acute regulatory (StAR) protein and cholesterol side chain cleavage (*P450_{scc}*) in juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*) is a novel aspect of nonylphenol toxicity. *Environ Sci Technol* 39:9791–9798.
- Bellavere C, Gorbi G (1984) Biological variability and acute toxicity of parathion, dichlorobenil and TBPS to *Biompharia glabrata* and *Brachydanio rerio*. *Environ Technol Lett* 5:389–396.

- Blake MJ, Nowak TS, Holbrook NJ (1990) In vivo hyperthermia induces expression of HSP70 mRNA in brain regions controlling the neuroendocrine response to stress. *Mol Brain Res* 8:89–92.
- Cericato L, Neto JGM, Fagundes M, Kreutz LC, Quevedo RM, Finco J, Rosa JGS, Koakoski G, Centenaro L, Pottker E, Anziliero D, Barcellos LJG (2008) Cortisol response to acute stress in jundiá *Rhamdia quelen* acutely exposed to sublethal concentrations of agrichemicals. *Comp Biochem Physiol C* 148:281–286.
- Chen W, John J, Lin C, Lin H, Wu S, Chang C (2004) Expression of metallothionein gene during embryonic and early larval development in zebrafish. *Aquat Toxicol* 69:215–227.
- Fuzzen MLM, Van Der Kraak G, Bernier NJ (2010) Stirring up new ideas about the regulation of the hypothalamic-pituitary-interrenal axis in zebrafish (*Danio rerio*). *Zebrafish* 7:1–10.
- Gravel A, Vijayan MM (2006) Salicylate disrupts interrenal steroidogenesis and brain glucocorticoid receptor expression in rainbow trout. *Toxicol Sci* 93:41–49.
- Hontela A (1998) Interrenal dysfunction in fish from contaminated sites: in vivo and in vitro assessment. *Environ Toxicol Chem* 17:44–48.
- Hontela A (2005) Stress and the hypothalamo-pituitary-interrenal axis: Adrenal toxicology—Effects of environmental pollutants on the structure and function of the HPI axis. In *Biochemical and Molecular Biology of Fishes, Vol. 6, Environmental Toxicology* (T. W. Moon and T. P. Mommsen, Eds.), pp. 331–363. Elsevier, Amsterdam.
- Iwama GK, Afonso LOB, Todgham A, Ackerman P, Nakano K (2004) Are hsps suitable for indicating stressed states in fish? *J Experim Biol* 207:15–19.
- King SR, Manna PR, Ishii T, Syapin PJ, Ginsberg SD, Wilson K, Walsh LP, Parker KL, Stocco DM, Smith RG, Lamb DJ (2002) An essential component in steroid synthesis, the

- steroidogenic acute regulatory (StAR) protein, is expressed in discrete regions of the brain. *J Neurosci* 22:10613–10620.
- King SR, Ginsberg SD, Ishii T, Smith RG, Parker KL, Lamb DJ (2004) The steroidogenic acute regulatory protein is expressed in steroidogenic cells of the day-old brain. *Endocrinology* 145:4775–4780.
- Lyssimachou A, Arukwe A (2007) Alteration of brain and interrenal StAR protein, P450*scc*, and Cyp11b mRNA levels in Atlantic salmon after nominal waterborne exposure to the synthetic pharmaceutical estrogen ethynylestradiol. *J Toxicol Environ Health Part A* 70:606–613.
- Lyssimachou A, Jenssen BM, Arukwe A (2006) Brain cytochrome P450 aromatase gene isoforms and activity levels in Atlantic salmon after waterborne exposure to nominal environmental concentrations of the pharmaceutical ethynylestradiol and antifoulant tributyltin. *Toxicol Sci* 91:82–92.
- Mommsen TP, Vijayan MM, Moon TW (1999) Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. *Rev Fish Biol Fish* 9:211–268.
- Sierra A (2004) Neurosteroids: The StAR protein in the brain. *J Neuroendocrinol* 16:787–793.
- Stocco DM, Wang X, Jo Y, Manna PR (2005) Multiple signaling pathways regulating steroidogenesis and steroidogenic acute regulatory protein expression: more complicated than we thought. *Mol Endocrinol* 19:2647–2659.
- Szarek J, Siwicki A, Andrzejewska A, Terech-Majewska E, Banaszkiwickz T (2000) Effects of the herbicide Roundup on the ultrastructural pattern of hepatocytes in carp (*Cyprinus carpio*). *Mar Environ Res* 50:263–266.
- Walton WJ, Brown KL, Lydy MJ (1997) Diurnal fluctuations in toxicity in two fish species: *Gambusia affinis* and *Notropis ludibundis*. *Bull Environ Contam Toxicol* 59:414–421.
- Wendelaar Bonga SE (1997) The stress response in fish. *Physiol Rev* 77:591–625.

Willer P, Stone G, Johnson I (2000) *Environmental Physiology of Animal*, Academic Press, Great Britain.

Wilson JM, Bunte RM, Carty AJ (2009) Evaluation of rapid cooling and tricaine methanesulfonate (MS222) as methods of euthanasia in zebrafish (*Danio rerio*). *J Am Assoc Lab Anim Sci* 48:785–789.

DISCUSSÃO

Em relação à substância testada, o organofosforado parationato metílico (Folidol600®), apresenta alta persistência ambiental (Huang et al., 2011), sendo bastante grande a chance desses resíduos atingirem organismos não alvo como peixes (Cericato et al., 2008). Além do MP ser um inseticida utilizado na agricultura, também é aplicado em tanques de piscicultura com o objetivo de eliminar a fase larval aquática de insetos predadores. A contaminação acidental de animais do ecossistema aquático, ou a exposição proposital dos peixes, pode reduzir sua habilidade em responder adequadamente a algum estímulo estressor.

Esse efeito pode ser devido à interrupção endócrina do eixo HHI. Uma resposta ao estresse enfraquecida, caracterizada pela diminuição dos níveis de cortisol, é um fenômeno bem documentado que ocorre em várias espécies de peixes, tanto em exposição prolongada quanto exposição aguda a xenobióticos. Uma resposta de cortisol reduzida, após um evento agudo de estresse, é um fenômeno que ocorre em várias espécies de peixes expostos a xenobióticos. Outras evidências do bloqueio do eixo HHI após a exposição aguda a agrotóxicos foram relatadas por Gravel e Vijayan (2007), que observaram uma inibição adaptativa do cortisol plasmático em trutas alimentadas com ração artificialmente contaminada com salicilato. Em geral, os níveis de cortisol de corpo inteiro medidos nesse estudo foram semelhantes aos níveis previamente determinados nesta espécie (Ramsay et al., 2006; Barcellos et al., 2007). Os resultados desse trabalho, evidenciados no artigo 1, demonstra que os peixes expostos ao parationato metílico não responderam de forma satisfatória ao estresse agudo a que foram submetidos.

Vários mecanismos de ação têm sido estudados e propostos como causadores de bloqueio no eixo HHI. Efeito na hipófise, no receptor de glicocorticoide cerebral (BGR), onde se liga o CRH (hormônio liberador de corticotrofina), foi observada por Hontela (2006) e Gravel & Vijayan (2006). Given et al (1977) encontraram uma diminuição da esteroidogênese em células adrenais expostas a parationato. O bloqueio da expressão de uma proteína chave na cascata de síntese do cortisol, a proteína reguladora de esteroidogênese aguda (*steroidogenic acute regulatory protein* - StAR) foi relatada por Hontela (2006), Gravel & Vijayan (2006) e Aluru et al. (2005). A inibição da transcrição/tradução da StAR resulta em queda da biossíntese de esteróides. Gravel and Vijayan (2007) sugerem que o mecanismo de ação do

salicilato envolve a inibição da proteína StAR e o do GR, que são proteínas essenciais para a produção de cortisol e para a resposta do tecido-alvo a esse esteróide, respectivamente.

A proteína StAR já foi reconhecida como alvo de interrupção endócrina mediada por xenobióticos em animais, incluindo peixes (Aluru and Vijayan, 2006; Aluru et al., 2005). A expressão do gene da proteína StAR no cérebro foi inibida em peixes do tratamento de MP + S. O papel da proteína StAR no cérebro não foi totalmente descrito, mas a diminuição significativa na sua expressão em peixes do grupo MP + S sugere um possível envolvimento na ativação ou sinalização do eixo HPI, contribuindo para a resposta de cortisol prejudicada verificada. Uma vez que estes peixes apresentaram um menor aumento dos níveis de cortisol, a inibição da StAR no cérebro pode ser um mecanismo de interrupção endócrina eixo HPI. A Ruptura do eixo HPI provocada pela exposição do MP verificou-se também no teleósteo *Rhamdia quelen* (Cericato et al., 2008), mas os mecanismos envolvidos não foram estudados. Em apoio esta hipótese, peixes expostos a fração solúvel do petróleo demonstraram diminuição da expressão de StAR no cérebro concomitante a alterações nos esteroides testosterona e 17 β -estradiol, apontando para a proteína StAR no cérebro como sendo um potencial alvo no mecanismo de comprometimento do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal (Arukwe et al., 2008). A expressão da StAR no cérebro também apresentou alteração em salmão do Atlântico expostos a etinilestradiol (Lyssimachou e Arukwe, 2007) e nonilfenol (Arukwe, 2005). Apesar do fato de que o envolvimento da proteína StAR na desregulação do eixo HPI é um fenômeno já conhecido em peixes (Aluru et al., 2005), os resultados aqui apresentados são o primeiro relato da diminuição concomitante de níveis da proteína StAR no cérebro e níveis de cortisol de corpo inteiro em peixes expostos ao MP.

Normalmente, os estudos sobre a interferência na esteroidogênese são focados principalmente nos efeitos mediados por diferentes níveis de esteroides, porém pouco se sabe sobre os efeitos mediados por mecanismos moduladores de esteroides neurais. Os níveis de expressão de GR no cérebro dos peixes dos grupos MP, S e MP + S não apresentaram diferenças significativa. Resultados semelhantes foram encontrados por Gravel and Vijayan (2006), em truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) expostas a salicilato, onde relatou que os níveis de RNAm para GR no cérebro não foram afetados. Por outro lado, a inibição da expressão de GR ocorreu em *Salvelinus alpinus* expostos a bifenilos policlorados (PCB) (Aluru et al., 2004). A diferença entre estes resultados poderia estar relacionada com intervalos de exposição diferentes, diferenças farmacológicas entre contaminantes e/ou variações nos protocolos empregados.

A expressão diminuída de hsp70 no grupo MP + S pode ser um indicador de estresse celular no cérebro provocado na ocorrência concomitante do estímulo estressor e a contaminação, em resposta à exposição de MP no zebrafish. Como verificado em Aluru et al. (2004), em salmão do Ártico, a inibição de hsp70 pode indicar uma perda de neurônios, especialmente os envolvidos no eixo HHI. Reforçando esse argumento, Blake et al. (1990) afirma que a hsp70 ocorre também no cérebro, particularmente nas regiões que coordenam a resposta neuroendócrina ao estresse. O aumento da expressão de chaperonas auxilia no reparo de proteínas danificadas pelo desafio de estresse e também regula a síntese de novas proteínas em substituição daquelas degradadas (Fishelson, 2001). A capacidade de adaptação através do mecanismo das HSPs representa um grande sucesso na adaptação dos seres vivos ao ambiente a que estão expostos, sendo esse um indício de seu grande valor evolutivo (Peetermans, 1995). Em todos os organismos, a indução das HSPs é muito rápida e intensa, mantendo o caráter emergencial da resposta (Minowada & Welch, 1995). A habilidade de responder com sucesso a adaptação em um novo ambiente é crítica para a sobrevivência, e representa uma estratégia evolutiva muito importante.

Com estas informações, percebe-se que o agroquímico parationato metílico aparentemente exerce um efeito deletério aos peixes expostos, agindo em nível de síntese de proteínas essenciais ao correto funcionamento do eixo HHI, mais especificamente na síntese da proteína StAR. Esse efeito deletério sugere uma inibição da síntese dessa proteína, já que os grupos tratados apresentaram níveis inferiores.

CONCLUSÃO

- 1 – O principal resultado no que diz respeito ao eixo hipotálamo-hipófise-interrenal é a atenuação do mesmo, respaldada pela diminuição dos níveis de cortisol de corpo inteiro, observada no grupo MP+S.
- 2 – Em relação à proteína StAR, foi observada a inibição da expressão do gene que codifica essa proteína no cérebro. Essa inibição foi observada no grupo MP+S.
- 3 – Os níveis de expressão de GR no cérebro dos peixes dos grupos MP, S e MP + S não apresentaram diferenças significativas.
- 4 – Em relação à HSP70, foi observada uma diminuição da concentração dessas proteínas no cérebro no grupo MP+S, causada pelo princípio ativo.

PERSPECTIVAS FUTURAS

A partir dos resultados encontrados nos estudos apresentados, será possível elucidar os exatos mecanismos de ação desses agroquímicos a nível celular. Através da pesquisa com os agroquímicos, dos complexos processos que causam danos às células, é possível avaliar os danos das contaminações ambientais em nível de organismo.

REFERÊNCIAS

- ALDERMAN, S. L., BERNIER, N. J., 2007. **Localization of corticotropin-releasing factor, urotensin I, and CRF-binding protein gene expression in the brain of the zebrafish, *Danio rerio*.** *J Comp Neurol.* 502, 783-793.
- ALDERMAN, S. L., BERNIER, N. J., 2009. **Ontogeny of the corticotropin-releasing factor system in zebrafish.** *Gen Comp Endocrinol.* 164, 61-69.
- ALSOP, D., VIJAYAN, M. M., 2008. **Development of the corticosteroid stress axis and receptor expression in zebrafish.** *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 294, R711-719.
- ALSOP, D., VIJAYAN, M. M., 2009. **Molecular programming of the corticosteroid stress axis during zebrafish development.** *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 153, 49-54.
- ALURU, N., JORGENSEN, E. H., MAULE, A. G., AND VIJAYAN, M. M. 2004. **PCB disruption of the hypothalamus-pituitary-interrenal axis involves brain glucocorticoid receptor Downregulation in anadromous arctic charr.** *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 287, R787–R793.
- ALURU, N., RENAUD, R., LEATHERLAND, J. F., AND VIJAYAN, M. M. (2005). **Ah receptor-mediated impairment of interrenal steroidogenesis involves StAR protein and P450scc gene attenuation in rainbow trout.** *Toxicol. Sci.* 84, 260–269.
- ANSARI, B.A., KUMAR, K., 1984. **Malathion toxicity: in vivo inhibition of acetylcholinesterase in the fish *Brachydanio rerio* (Cyprinidae).** *Toxicol. Lett.* 20, 283_/287.
- ARUKWE, A., NORDTUG, T., KORTNER, T.M., MORTENSEN, A.S., AND BRAKSTAD, O.G. 2008. **Modulation of steroidogenesis and xenobiotic biotransformation responses in zebrafish (*Danio rerio*) exposed to water-soluble fraction of crude oil.** *Environ. Res.* 107(3):362-370
- ARUKWE, A. 2005. **Modulation of brain steroidogenesis by affecting transcriptional changes of steroidogenic acute regulatory (StAR) protein and cholesterol side chain cleavage (P450scc) in juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*) is a novel aspect of nonylphenol toxicity.** *Environ Sci Technol* 39: 24.9791-9798
- BANAS, W.P., SPRAGUE, J.B., 1986. **Absence of acclimation to parathion by rainbow trout during sublethal exposure.** *Water Res.* 20, 1229-1132.
- BANAS, W.P., SPRAGUE, J.B., 1986. **Absence of acclimation to parathion by rainbow trout during sublethal exposure.** *Water Res.* 20, 1229_/11232.
- BARCELLOS, L. J. G., RITTER, F., KREUTZ, L. C., QUEVEDO, R. M., DA SILVA, L. B., BEDIN, A. C., FINCO, J., CERICATO, L., 2007. **Whole-body cortisol increases after direct and visual contact with a predator in zebrafish, *Danio rerio*.** *Aquaculture.* 272, 774-778.

- BARCELLOS, L.J.G., WOHL, V.M., WASSERMANN, G.F., KRIEGER, M.H., QUEVEDO, R.M., LULHIER, F., 2001. **Plasma levels of cortisol and glucose in response to capture and tank transference in *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard), a South American catfish.** *Aquac. Res.* 32, 123–125.
- BARTON BA. 2002. **Stress in fishes:** A diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. *Integ Comp Biol* 42:517-525.
- BEGUM, G., VIJARAYARAGHAVAN, S., 1999. **Effect of acute exposure to the organophosphate insecticide Rogor† on some biochemical aspects of *Clarias batrachus* (Linnaeus).** *Environ. Res. A* 80, 80-83.
- BERNIER, N. J., FLIK, G., KLAREN, P. H. M. 2009. **Regulation and contribution of the corticotropic, melanotropic and thyrotropic axes to the stress response in fishes.** In: N. J. Bernier, et al., (Eds.), *Fish Neuroendocrinology*. Elsevier Inc., London, UK. pp. 235-311.
- BLAKE, M.J., NOWAK, T.S. AND HOLBROOK, N.J. 1990. **In vivo hyperthermia induces expression of HSP70 mRNA in brain regions controlling the neuroendocrine response to stress.** *Mol. Brain Res.* 8, 89-92.
- BLASER R, GERLAI R. **Behavioral phenotyping in zebrafish:** comparison of three behavioral quantification methods. *Behav Res Methods* 2006;38: 456–69.
- BOVERHOF ,D.R., BURGOON ,L.D., WILLIAMS, K.O., ZACHAREWSKI ,T.R. 2008. **Inhibition of estrogen-mediated uterine gene expression responses by dioxin.** *Mol. Pharmacol.*;73:82-93.
- BRADBURY, J., 2004. **Small fish, big science.** *plos biol.* 2, e148.
- BURT DE PERERA T. **Fish can encode order in their spatial map.** *Proc R Soc Lond B* 2004;272:p4.
- CERICATO, L., MACHADO NETO, J., FAGUNDES, M., KREUTZ, L. C., QUEVEDO, R., FINCO, J., ROSA, J.G.S., KOAKOSKI ,G., CENTENARO, L.,POTTKER, E.,ANZILIERO, D., BARCELLOS, L.J.G. 2008. **Cortisol response to acute stress in jundiá *Rhamdia quelen* acutely exposed to sub-lethal concentrations of agrichemicals.** *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 148(3):281–286
- CHANDRASEKAR, G., LAUTER, G., HAUPTMANN, G., 2007. **Distribution of corticotropin-releasing hormone in the developing zebrafish brain.** *J Comp Neurol.* 505, 337-351.
- CHEN, W.-Y., JOHN, J.A.C., LIN, C.-H., LIN, H.-F., WU, S.-C., LIN, C.-H., CHANG, C.-Y., 2004. **Expression of metallothionein gene during embryonic and early larval development in zebrafish.** *Aquat. Toxicol.* 69, 215–227.
- COLBORN T., VOM SAAL, F.S., SOTO, A.M. 1993. **Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans.** *Environ. Health Perspect.*;101:378-384.
- DANIELS, C. J . , MCKEE, A. H. Z . , DOOLITTLE, W. F. 1984. **Archaeobacterial heat shock proteins.** *EMBO J.* 3:745-49

DETRA, R.L., COLLINS, W.J., 1991. **The relationship of parathion concentration, exposure time, cholinesterase inhibition and symptoms of toxicity in midge larvae (Chironomidae: Diptera).** Environ. Toxicol. Chem. 10, 1089_/1095.

ENZO LIFE SCIENCES, INC. 2010 **International Edition**, © Copyright. ZZ-C0210-1002

EPSTEIN, L.F. & ORME-JOHNSON, N.R. 1991. **Regulation of steroid hormone biosynthesis: Identification of precursors of a phosphoprotein targeted to the mitochondrion in stimulated rat adrenal cortex cells.** Journal of Biological Chemistry 266 19739–19745.

FIGUEIREDO, G.M. de; SENHORINI, J.A. **Influência de biocidas no desenvolvimento da carpa comum (*Cyprinus carpio* LINNAEUS, 1758) e sobre o zooplâncton, durante o período de larvicultura.** Boletim Técnico do CEPTA, Pirassununga, v.3, p. 5-21, 1990.

FISHELSON Z, HOCHMAN I, GREENE LE, EISENBERG E. **Contribution of heat shock proteins to cell protection from complement-mediated lysis.** International Immunology 2001, 13:983-991.

GIVEN, M., LIFRAK, E. AND BROWN, C.B. 1977 **Studies on the mechanism of inhibition of adrenal steroidogenesis by organophosphate and carbamate compounds.** Pesticide Biochemistry and Physiology 7, 169-182.

GOLDSMITH P. **Zebrafish as a pharmacological tool: the how, why and when.** Curr Opin Pharmacol 2004;4(5):504–12.

GRAVEL, A.,VIJAYAN, M.M. . 2006 **Salicylate Disrupts Interrenal Steroidogenesis and Brain Glucocorticoid Receptor Expression in Rainbow Trout Toxicol.** Sci. 93(1): 41-49

HONTELA A. 1998. **Interrenal dysfunction in fish from contaminated sites: in vivo and in vitro assessment.** Env. Toxicol. Chem. 17:44-48.

HONTELA A. 2006. **Corticosteroidogenesis and StAR protein of rainbow trout disrupted by human-use pharmaceuticals: data for use in risk assessment.** Toxicological Science 93: 1-2.

HONTELA A., LACROIX A. 2006. **Chap. 13 - Heavy metals.** In: Endocrine Disruptors: Biological basis for health effects in wildlife and humans, eds. J. Carr and D.O. Norris, Oxford University Press pp. 356-374

HUANG, Q., HUANG, L., HUANG, H. 2011. **Proteomic analysis of methyl parathion-responsive proteins in zebrafish (*Danio rerio*) brain.** Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol. 153(1):67-74

HUSKES, R., LEVSEN, K.1997. **Pesticides in rain.** Chemosphere 35, 3013–3024.

KONSTANTINOOU, I.K., HELA, D.G., ALBANIS, T.A., 2006. **The status of pesticide pollution in surface waters (rivers and lakes) of Greece.** Part I. Review on occurrence and levels. Environ. Pollut. 141, 555–570.

- KRASNOV A., KOSKINEN, H., PEHKONEN, P., REXROAD III, C.E., AFANASYEV, S., MÖLSÄ, H. 2005. **Gene expression in the brain and kidney of rainbow trout in response to handling stress.** BMC Genomics 2005, 6:3
- KRUEGER, R.J. & ORME-JOHNSON, N.R. 1983 **Acute adrenocorticotrophic hormone stimulation of adrenal corticosteroidogenesis.** Journal of Biological Chemistry 258 10159–10167.
- LEGIERSE, K.C.H.M., 1998. **Differences in sensitivity of aquatic organisms to organophosphorus pesticides.** Ph.D. thesis, University of Utrecht, Utrecht, Netherlands.
- LEVIN, E.D., BENCAN, Z., CERUTTI, D.T. **Anxiolytic effects of nicotine in zebrafish.** Physiol Behav 2007;90:54–8.
- LEWIS, M. J . , PELHAM, H . R . B. 1985. **Involvement of A TP in the nuclear and nucleolar functions of the 70 kd heat shock protein.** EMBO J. 4 : 3 1 37-43
- LINDQUIST, S. 1 980. **Varying patterns of protein synthesis during heat shock: implications for regulation.** Dev. Bioi. 77:463-79
- LYSSIMACHOU A, ARUKWE A. 2007. Alteration of brain and interrenal StAR protein, P450scc, and Cyp11beta mRNA levels in atlantic salmon after nominal waterborne exposure to the synthetic pharmaceutical estrogen ethynylestradiol. J Toxicol Environ Health A. 1;70(7):606-13.
- MINOWADA G, WELCH WI. **Clinical implications of the stress response.** J Clin Invest 1995; 95:3-12.
- MOMMSEN, T. P., VIJAYAN, M. M., MOON, T. W., 1999. **Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation.** Rev Fish Biol Fish. 9, 211-268.
- NACIFF ,J.M., JUMP, M.L., TORONTALI, S.M., CARR, G.J., TIESMAN, J.P., OVERMANN, G.J., DASTON, G.P. 2002. . **Gene expression profile induced by 17a-ethinyl estradiol, bisphenol A, and genistein in the developing female reproductive system of the rat.** Toxicol. Sci.;68:184-199.
- NACIFF, J.M., OVERMANN, G.J., TORONTALI, S.M., CARR, G.J., KHAMBATTA, Z.S., TIESMAN, J.P., RICHARDSON, B.D., DASTON, G.P. 2007. . **Uterine temporal responses to acute exposurto 17alpha-ethinyl estradiol in the immature rat.** Toxicol. Sci.;97:467-490
- NUWAYSIR, E. F., BITTNER, M., TRENT, J., BARRET, J. C., AFSHARI, C.A.1999. **Microarrays and Toxicology: The advent of toxicogenomics.** Mol. Carcinogen. 24, 153 – 159.
- PARMENTIER, C., HAMEURY, E., LIHRMANN, I., TAXI, J., HARDIN-POUZET, H., VAUDRY, H., CALAS, A., TOSTIVINT, H., 2008. **Comparative distribution of the mRNAs encoding urotensin I and urotensin II in zebrafish.** Peptides. 29, 820-829.
- PEETERMANS WE. **Heat shock proteins in medicine.** Acta Clin Belg 1995; 50:131-6.
- PLIMMER, J.R., 1990. **Pesticide loss to the atmosphere.** Am. J. Ind. Med. 18, 461–466.

- PON, L.A. & ORME-JOHNSON, N.R. 1988 **Acute stimulation of corpus luteum cells by gonadotropin or adenosine 3',5'-monophosphate causes accumulation of a phosphoprotein concurrent with acceleration of steroid synthesis.** *Endocrinology* 123 1942–1948.
- PON, L.A., HARTIGAN, J.A. & ORME-JOHNSON, N.R. 1986 **Acute ACTH regulation of adrenal corticosteroid biosynthesis: rapid accumulation of a phosphoprotein.** *Journal of Biological Chemistry* 261 13309–13316.
- RAMSAY, J. M., FEIST, G. W., VARGA, Z. M., WESTERFIELD, M., KENT, M. L., SCHRECK, C. B., 2006. **Whole-body cortisol is an indicator of crowding stress in adult zebrafish, *Danio rerio*.** *Aquaculture*. 258, 565-574.
- RAMSAY, J. M., FEIST, G. W., VARGA, Z. M., WESTERFIELD, M., KENT, M. L., SCHRECK, C. B., 2009. **Whole-body cortisol response of zebrafish to acute net handling stress.** *Aquaculture*. 297, 157-162.
- RAND, G.M., 1977. **The effect of exposure to a subacute concentration of parathion on the general locomotor behavior of the goldfish.** *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 18, 259-266.
- RAND, G.M., 1977. **The effect of exposure to a subacute concentration of parathion on the general locomotor behavior of the goldfish.** *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 18, 259_/266.
- RANZANI-PAIVA, M.J.T., et al. **Alterações hematológicas em curimatá, *Prochilodus scrofa* STEINDACHNER, 1881, exposto ao Dipterex 500 (trichlorfon).** *Boletim do Instituto de Pesca, São Paulo*, v.24, p.187-196, 1997.
- RIBEIRO, S., SOUSA, J.P., NOGUEIRA, A.J.A., SOARES, A.M.V.M., 2001. **Effect of Endosulfan and parathion on energy reserves and physiological parameters of the terrestrial isopod *Porcellio dilatatus*.** *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 49, 131_/138.
- RODRIGUES, E. de L., et al. **Efeito agudo do organofosforado Dipterex 500 (Trichlorfon) em baço de curimatá *Prochilodus scrofa* (STEINDACHNER, 1881).** *Boletim do Instituto de Pesca, São Paulo*, v. 24, p.197-203, 1997.
- ROEX, E.W.M., KEIJZERS ,R., VAN GESTEL, C.A.M. 2003. **Acetylcholinesterase inhibition and increased food consumption rate in the zebrafish, *Danio rerio*, after chronic exposure to parathion.** *Aquatic Toxicology* 64, 451-460
- RUPERT J. EGANA, CARISA L. BERGNERA, PETER C. HARTA, JONATHAN M. CACHAT, PETER R. CANAVELLO, MARCO F. ELEGANTE, SALEM I. ELKHAYAT, BRETT K. BARTELS, ANNA K. TIENB, DAVID H. TIENB, SOPAN MOHNOT , ESTHER BEESON, ERIC GLASGOWA, HAKIMA AMRIA, ZOFIA ZUKOWSKA, ALLAN V. KALUEFF. **Understanding behavioral and physiological phenotypes of stress and anxiety in zebrafish Behavioural.** *Brain Research* 205 (2009) 38–44.
- SANCHO, E., FERRANDO, M.D., ANDREU, E., 1996. **Physiological stress responses of *Anguilla anguilla* to fenitrothion.** *J. Environ. Sci. Health B* 31, 87_/98.

- SANCHO, E., FERRANDO, M.D., ANDREU, E., 1997a. **Sublethal effects of an organophosphate insecticide on the European eel, *Anguilla anguilla*** . *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 36, 57_/65.
- SINK, T.D., LOCHMANN, R.T., FECTEAU, K.A., 2007b. **Validation, use, and disadvantages of enzyme-linked immunosorbent assay kits for detection of cortisol in channel catfish, largemouth bass, red pacu and golden shiners.** *Fish Physiol. Biochem.*
- SREENIVASULA REDDY, P., BHAGYALAKSHMI, A., RAMAMURTHI, R., 1986. **Carbohydrate metabolism in tissue of freshwater crab (*Oziotelphusa senex senex*) exposed to methyl parathion.** *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 36, 204_/210.
- SRIVASTAVA, A.K., SINGH, N.N., 1981. **Effects of acute exposure to methyl parathion on carbohydrate metabolism of Indian catfish (*Heteropneustes fossilis*)** . *Acta Pharmacol. Toxicol.* 48, 26_/31.
- STEWART, A.M., CACHATA, J., GREENA, J., GAIKWADA, S., KYZARA, E., ROTH, A., DAVISA, A., COLLINS, C., EL-OUNSIA, M., PHAMA, KALUEFF, A.V. 2013. **Constructing the habitume for phenotype-driven zebrafish research.** *Behavioural Brain Research* 236, 110-117
- STOCCO, D.M. & KILGORE, M.W. 1988. **Induction of mitochondrial proteins in MA-10 Leydig tumour cells with human choriogonadotropin.** *Biochemical Journal* 249 95–103.
- STOCCO, D.M. & SODEMAN, T.C. 1991. **The 30-kDa mitochondrial proteins induced by hormone stimulation in MA-10 mouse Leydig tumor cells are processed from larger precursors.** *Journal of Biological Chemistry* 266 19731–19738.
- TO, T. T., HAHNER, S., NICA, G., ROHR, K. B., HAMMERSCHMIDT, M., WINKLER, C., ALLOLIO, B., 2007. **Pituitary-interrenal interaction in zebrafish interrenal organ development.** *Mol Endocrinol.* 21, 472-485.
- TSIGOS, C., CHROUSOS, G. P., 2002. **Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress.** *J Psychosomatic Res.* 53, 865-871.
- VAN DER WEL, H., WELLING, W., 1989. **Inhibition of acetylcholinesterase in guppies (*Poecilia reticulata*) by chlorpyrifos at sublethal concentrations: methodological aspects.** *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 17, 205-215.
- VAN DER WEL, H., WELLING, W., 1989. **Inhibition of acetylcholinesterase in guppies (*Poecilia reticulata*) by chlorpyrifos at sublethal concentrations: methodological aspects.** *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 17, 205_/215.
- WALKER, C.H., 2001. **Organophosphorous and carbamate insecticides.** In: Walker, C.H. (Ed.), *Organic Pollutants. Na Ecotoxicological Perspective.* Taylor & Francis, New York, USA.
- WARING, R.H., HARRIS, R.M. 2005. **Endocrine disrupters: A human risk?** *Mol. Cell. Endocrinol.*;244:2-9.
- WONG, K., ELEGANTE, M., BARTELS, B., ELKHAYAT, S., TIEN, D., ROY, S., GOODSPEED, J., SUCIU, C., TAN, J., GRIMES, C., CHUNG, A., ROSENBERG, M.,

GAIKWAD, S., DENMARK, A., JACKSON, A., KADRI, F., MIN CHUNG, K., STEWART, A., GILDER, T., BEESON, E., ZAPOLSKY, I., WU, N., CACHAT, J., KALUEFF A.V. **Analyzing habituation responses to novelty in zebrafish (*Danio rerio*)** Behavioural Brain Research 208 (2010) 450–457

ZINKL, J.G., LOCKHART, W.L., KENNY, S.A., WARD, F.J., 1991. **The effects of cholinesterase inhibiting insecticides on fish.** In: Mineau, P. (Ed.), Cholinesterase-Inhibiting Insecticides. Their Impact on Wildlife and the Environment. Chemicals in Agriculture, 2. Elsevier, Amsterdam, Netherlands, pp. 233-254.