

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

Gessi Koakoski

**AGROQUÍMICOS INIBEM RESPOSTA DE CORTISOL E
COMUNICAÇÃO QUÍMICA DE ESTRESSE EM PEIXES**

Santa Maria, RS
2016

Gessi Koakoski

**AGROQUÍMICOS INIBEM RESPOSTA DE CORTISOL E COMUNICAÇÃO
QUÍMICA DE ESTRESSE EM PEIXES**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS) como requisito parcial para obtenção do Título de **Doutora em Farmacologia.**

Orientador: Prof^o. Dr Leonardo José Gil Barcellos

Santa Maria, RS.
2016

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

Koakoski, Gessi
AGROQUÍMICOS INIBEM RESPOSTA DE CORTISOL E
COMUNICAÇÃO QUÍMICA DE ESTRESSE EM PEIXES / Gessi
Koakoski.- 2016.
56 p.; 30 cm

Orientador: Leonardo José Gil Barcellos
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-
Graduação em Farmacologia, RS, 2016


1. Agroquímicos 2. Cortisol 3. Comunicação química 4.
Estresse 5. Metirapona I. Barcellos, Leonardo José Gil
II. Título.

Gessi Koakoski

**AGROQUÍMICOS INIBEM RESPOSTA DE CORTISOL E COMUNICAÇÃO
QUÍMICA DE ESTRESSE EM PEIXES**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS) como requisito parcial para obtenção do Título de **Doutora em Farmacologia**.

Aprovada em 10 de agosto de 2016:

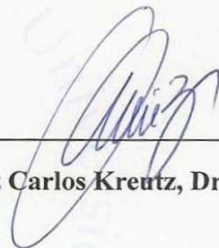


Leonardo José Gil Barcellos, Dr (UFSM)

Presidente/Orientador



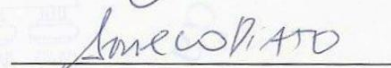
Bernardo Baldisserotto, Dr (UFSM)



Luiz Carlos Kreutz, Dr (UPF)



Denis Broock Rosemberg, Dr (UFSM)



Angelo Luis Stapassoli Piato, Dr (UFRGS)

Santa Maria, RS.

2016

DEDICATÓRIA

Ao meu marido Jhonatan, pelo apoio incondicional.
Ao Professor Leonardo José Gil Barcellos, pela sabedoria
e dedicação com a qual me orientou.

AGRADECIMENTOS

Ao meu marido Jhonatan, por me apoiar em tudo que eu precisa-se, como na confecção de estruturas experimentais, viagens a Santa Maria, conforto emocional, ... Sem dúvida nenhuma você foi essencial para que este sonho se tornar realidade, muito obrigada meu amor.

Ao meu orientador Prof. Dr. Leonardo José Gil Barcellos, pela oportunidade de fazer parte da sua equipe de pesquisa, pela compreensão, conselhos, apoio e carinho, muito obrigada pela orientação e principalmente pelos seus ensinamentos, que sempre foram muito enriquecedores.

A minha irmã Janete e a meu amigo Evandro, gostaria de lhes dizer que existem pessoas que não acrescentam coisas na vida de outras

pessoas e nem mesmo na vida dela própria. Vocês não são essas pessoas. Vocês são diferentes! Vocês são muito especiais! Vocês acrescentam e muito em minha vida. Me trazem força, alegria e inspiração para minha vida! Obrigado por tudo que fazem por mim!

A todos os colegas do laboratório, pelo companheirismo e ajuda sempre que me proporcionaram.

Aos meus amigos Jaqueline, Ronaldo e Pedro, por todas as vezes que me acolheram em sua casa, gratidão eterna.

Ao Programa de Pós Graduação em farmacologia da Universidade Federal de Santa Maria pela concessão da bolsa CAPES.

A Universidade de Passo Fundo pela disponibilização da estrutura laboratorial e de animais para experimento.

Enfim a todos que de uma forma ou outra contribuíram para realização deste trabalho, muito obrigado.

RESUMO

AGROQUÍMICOS INIBEM RESPOSTA DE CORTISOL E COMUNICAÇÃO QUÍMICA DE ESTRESSE EM PEIXES

AUTOR: Gessi Koakoski

ORIENTADOR: Leonardo José Gil Barcellos

Agroquímicos podem interferir na resposta ao estresse em peixes, comprometendo fisiologicamente respostas aos estressores comuns em seu ambiente. O objetivo do estudo foi avaliar a resposta ao estresse em peixes frente a exposições aguda a concentrações sub-letais de agroquímicos e a capacidade de comunicar quimicamente um evento estressante. Foram realizados 4 experimentos: 1. Teste de resposta ao estresse e da comunicação química de estresse; persistência e ou recuperação; sobrevivência e parâmetros de desempenho; após exposições agudas a concentrações sub-letais de agroquímicos; 2. Comunicação química de estresse; 3. Comunicação química de estresse com peixes doadores incapazes de aumentar cortisol. 4. Capacidade de comunicar quimicamente um evento estressante de peixes doadores com o eixo hipotálamo-hipófise-interrenal prejudicado por agroquímicos. Com os resultados obtidos observamos inibição crônica da resposta ao estresse, menor taxa de sobrevivência, inibição da resposta de cortisol e da comunicação química dos peixes expostos aos agroquímicos, mesmo com peixes doadores incapazes de elevar cortisol, os peixes doadores comunicaram o estresse aos peixes alvo, não dependendo do aumento de cortisol, mas precisando da ativação do eixo hipotálamo-hipófise-interrenal.

Palavras chave: Agroquímicos. Cortisol. Comunicação Química. Estresse. Metirapona.

ABSTRACT

AGROCHEMICAL INHIBIT CORTISOL RESPONSE AND CHEMICAL COMMUNICATION OF STRESS IN FISH

AUTHOR: Gessi Koakoski

ADVISOR: Leonardo José Gil Barcellos

Agrochemicals can interfere in the stress response in fish, physiologically compromising responses to common stressors in your environment. The objective of the study was to evaluate the stress response in fish against acute exposure to sublethal concentrations of chemicals and the ability to communicate chemically a stressful event. Four experiments were performed: 1. Test response to stress and chemical communication of stress; and persistence or recovery; survival and performance parameters; after acute exposure to sublethal concentrations of agrochemicals; 2. Chemical communication of stress; 3. Chemical communication with donors stress fish unable to increase cortisol. 4. Ability to communicate chemically a stressful event donors fish with the hypothalamus-pituitary-interrenal axis harmed by pesticides. With the results we observed chronic inhibition of the stress response, lower rate of survival, inhibition of cortisol response and chemical communication of fish exposed to agrochemicals, even with donors fish unable to raise cortisol, donors fish reported stress to target fish, not depending on the cortisol increase but need activation of the hypothalamus-pituitary-interrenal axis.

Keywords: Agrochemicals. Cortisol. Chemical. Communication. Stress. Metyrapone.

SUMÁRIO

1. APRESENTAÇÃO	9
1.2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	9
1.2.1. Agroquímicos como contaminantes ambientais	9
1.2.2. Ação dos agroquímicos sobre parâmetros relacionados ao estresse	11
1.2.2.1. <i>Metil-paration</i>	13
1.2.2.2. <i>Tebuconazole</i>	14
1.2.2.3. <i>Glifosato</i>	14
1.2.2.4. <i>Atrazine + Simazine</i>	14
1.2.3. Estresse em peixes	15
1.2.3.1. <i>Comunicação química de estresse</i>	16
1.2.3.2. <i>Cortisol</i>	17
1.2.3.3. <i>Metirapona</i>	17
1.2.4. Jundiá	18
1.3. PROPOSIÇÃO GERAL	19
1.3.1. Proposições específicas	19
1.4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	19
1.4.1 Animais e condições de manutenção	19
1.4.2 Aspectos éticos	20
1.4.3. Agroquímicos testados e tempo de exposição ...	20
1.4.4. Estudos desenvolvidos, delineamentos, procedimentos e análise estatística ...	20
2. ARTIGO 1 - AGRICHEMICALS CHRONICALLY INHIBIT THE CORTISOL RESPONSE TO STRESS IN FISH	20
3. MANUSCRITO SUBMETIDO 1 - CHEMICAL COMMUNICATION OF STRESS IN FISH DOES NOT DEPEND ON CORTISOL INCREASE BUT NEED HYPOTHALAMIC-PITUITARY-INTERRENAL AXIS ACTIVATION ...	36
4. DISCUSSÃO	46
5. CONCLUSÃO	48
REFERÊNCIAS	49
ANEXO A - PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS	

1. APRESENTAÇÃO

A produção de peixes representa uma importante fonte de renda alternativa para o produtor rural e também a possibilidade de produzir e consumir um alimento saudável. No entanto, por ainda ser uma produção alternativa, a construção ou localização da maioria dos açudes não obedecem as recomendações de localização estando próximos de lavouras utilizadas na produção de grãos ou utilizando água captada em bacia de captação constituída por lavouras. As práticas agrícolas intensivas dependem da aplicação de agroquímicos, que podem direta ou indiretamente contaminar as fontes de água, córregos e açudes, e mesmo lençóis freáticos, oferecendo risco à qualidade da água utilizada para o cultivo de peixes. Além desta evidência sabemos que a criação de peixes envolve inúmeros manejos, como a transferência para um tanque novo, biometrias, mudanças ambientais, falta de água e doenças, sendo estes os principais causadores de estresse. Essa situação pode comprometer a criação e manutenção da espécie no ecossistema aquático, tendo a resposta ao estresse como um importante mecanismo homeostático, podendo ser modulada pela contaminação ambiental por agroquímicos.

Apresento parte dos resultados de estudos realizados na linha de comunicação química de estresse e de efeitos de contaminantes sobre o eixo hipotálamo-hipófise-interrenal (HHI), do Laboratório de Peixes do Hospital Veterinário da Universidade de Passo Fundo. O trabalho está embasado na apresentação dos resultados finais sob a forma de um artigo publicado e um manuscrito submetido, para fins de defesa de tese de Doutorado, dispondo das seguintes seções: referencial teórico, objetivos, resultados, discussão e conclusão.

1.2. REFERENCIAL TEÓRICO

1.2.1. Agroquímicos como contaminantes ambientais

A contaminação da água por agroquímicos é de difícil avaliação, normalmente, se associa à contaminação com mortalidade de peixes. Constituindo uma intoxicação aguda com doses de agroquímico acima da sua Concentração Letal (CL50), este tipo de contaminação geralmente é provocada por um acidente com químicos de alta toxicidade.

Os recursos hídricos naturais ou construídos podem ser contaminados por pequenas concentrações de agroquímicos advindas principalmente da lixiviação, de áreas agrícolas adjacentes que fazem uso de agroquímico (FIOREZE et al., 2006). Desta maneira o uso

indiscriminado de agroquímicos, manuseio descuidado, derrames acidentais ou descarga de efluentes não tratados em cursos de água naturais, acarretando em efeitos nocivos sobre a população de peixes e outras formas de vida aquática, contribuindo com efeitos em longo prazo no ambiente (JIRAUNGKOORSKUL et al., 2002; HORI et al., 2008).

Entretanto, para a maioria dos agroquímicos a dose do princípio ativo necessário para o seu efeito desejado é menor do que a dose tóxica para animais terrestres e aquáticos, não impedindo a sobrevivência desses, mas causando alterações na sua fisiologia e bioquímica (KREUTZ et al., 2008). Por não causar a morte imediata dos peixes, na maioria das vezes, este tipo de intoxicação passa despercebido. Segundo Kreutz et al. (2008) e Fioreze et al. (2006), uma das alternativas para o estudo da contaminação de águas, é a contaminação da água com pequenas quantidades (sub-letais) de agroquímicos, com determinação de parâmetros orgânicos que podem ser utilizados como indicadores de uma agressão, entre eles os níveis hormonais, como os de cortisol.

Em um estudo feito na Alemanha para levantamento da contaminação das águas naturais, encontraram: metil-paration em 2 locais de amostragem nas concentrações de 0,2 e 0,3 µg/L; tebuconazole em 3 pontos diferentes nas concentrações de 1,7, 0,6 e 0,5 µg/L; os dois agroquímicos mostraram-se tóxicos para os macro invertebrados (*Daphnia*), mostrando o potencial prejudicial destas substâncias presentes em meio aquático (BERENZEM, et al., 2005).

Na Europa Ocidental o rio Dniester é rodeado por inúmeras atividades antrópicas, amostras de peixe foram coletadas e analisadas, e o agroquímico malation foi encontrado em concentrações extremamente elevadas 3 µg / g (músculos) e 46 µg / g (gônadas), indicando exposição recente, a detecção de altas concentrações de malation indicou o estresse antropogênico potencial para a biota aquática mais sensível (SAPOZHNIKOVA, Y., 2005)

Pesquisas recentes revelaram a presença de simazina nas concentrações de (0.01 a 0,018 µg/L) em sete rios do litoral da Martinica na França, local aonde predomina a cultura da banana, que requer o uso intensivo de agroquímicos, e maior monitorização deste composto é recomendado, especialmente em peixes (BOCQUENE, G. e FRANCO, A., 2005). Simazina e a atrizina também foram encontrados como um dos compostos mais identificados na bacia do rio Danúbio, em termos de frequência de detecção, persistência e níveis de concentração (maiores concentrações encontradas 2 µg/L - simazina 90 µg/l – atrizina) (LOOS, R. et al., 2010)

Uma pesquisa conduzida no Canadá para avaliar a presença e as concentrações de herbicidas em rios urbanos, o glifosato foi frequentemente detectado (até 40 µg/L), com as

maiores concentrações durante ou após eventos significativos de chuva (GLOZIER, et al., 2012).

E no sul do Brasil as pisciculturas encontram-se próximas a lavouras, oferecendo riscos à qualidade das águas utilizadas para o cultivo de peixes. Pequenas quantidades de tais produtos podem atingir os tanques utilizados na criação de peixes (VAN DER OOST, et al., 2003).

Moradores de regiões de predomínio do agronegócio, onde massivas quantidades de agroquímicos são usadas ao longo do ano, formam grupo de risco, pois na maioria das aplicações são feitas com pulverizações aéreas. Há estudos que indicam que, nestes casos, muitas vezes apenas 30% do veneno atingem o alvo (CHAIM, et al., 2003), o restante contamina solos, água, plantações de vizinhos, florestas e, muitas vezes, áreas residenciais. Outros estudos indicam também que águas subterrâneas estão sendo contaminadas, colocando em risco a saúde de populações que se abastecem de poços em regiões de grande produção agrícola (RIGOTTO et al, 2009).

Com a intensificação das práticas agrícolas, a segurança da produção depende, muitas vezes, da aplicação de defensivos, que podem direta ou indiretamente contaminar as fontes de água, córregos e açudes, e mesmo lençóis freáticos. O consumo de agroquímicos no Brasil em 2008 cresceu 190%, assumindo a liderança no mercado mundial, cujo crescimento foi de 93%. Em 2010, o mercado nacional movimentou cerca de U\$ 7,3 bilhões, representando 19% do mercado global de agroquímicos. Na última safra a comercialização de agrotóxicos movimentou 936 mil toneladas de produtos. Dentre eles 45% de herbicidas (glifosato e a atrazina), 14% de fungicidas (azol), 12% de inseticidas (derivados de pirazol) e 29% as demais categorias (ANVISA).

1.2.2. Ação dos agroquímicos sobre parâmetros relacionados ao estresse

Os herbicidas glifosato e atrazina + simazina são muito utilizados nas lavouras de milho, soja entre outros grãos. O fungicida tebuconazole é usado em culturas como a soja e o milho e também como conservador de madeiras. Já o inseticida metil-paration é usado na produção de peixes em tanques escavados para eliminar os estágios larvais aquáticos de insetos predadores. Todos estes agroquímicos provocaram bloqueio no eixo Hipotálamo Hipófise Interrenal em jundiá (HHI) (CERICATO et al., 2008; 2009).

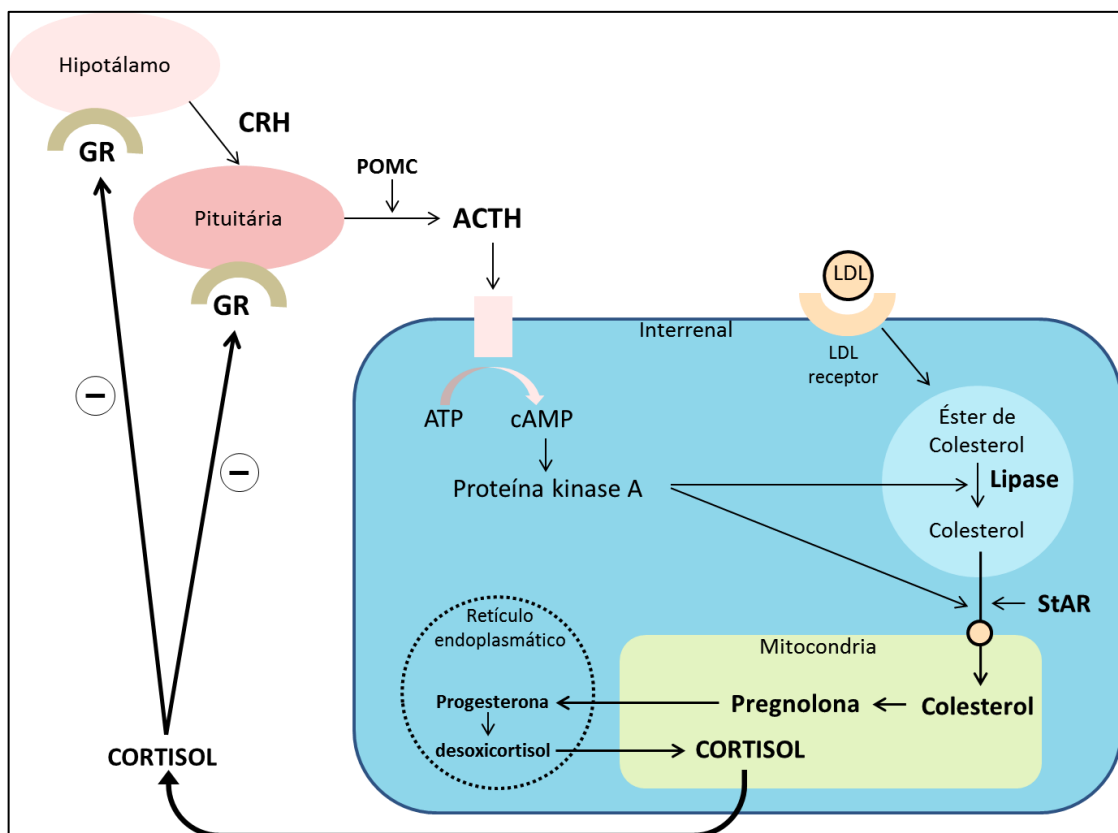
A interrupção endócrina do eixo HHI tem sido estudada associada a exposições crônicas dos peixes aos agroquímicos em ambiente natural (*Perca flavescens*, BRODEUR et

al., 1997, LEVESQUE et al., 2003 e GRAVEL et al., 2005; *Catostomus commersoni*, DORVAL et al., 2005) e em condições de laboratório (LAPPIVAARA, 2001). Até pouco tempo atrás, considerava-se que apenas exposições prolongadas aos agroquímicos poderiam causar impacto neste eixo (HONTELA, 1998; JOBLING & TYLER, 2003; POTTINGER, 2003).

Entretanto, Pacheco & Santos (1996) e Santos & Pacheco (2001) demonstraram que a função interrenal pode também ser afetada adversamente por exposições agudas aos agroquímicos. Esta interrupção endócrina causada por exposições agudas já foi verificada em jundiás (CERICATO et al., 2008) expostos ao metil-paration, a combinação de atrazina + simazina e ao glifosato, com capacidade diminuída de responder ao estressor agudo imposto, demonstrando claramente que exercem efeitos negativos sobre o eixo HHI. Utilizando testes de sensibilidade ao Hormônio Adrenocorticotrófico (ACTH - mimetizando a função da hipófise), verificou-se que o local de ação de alguns destes tóxicos é na interrenal, uma vez que não elevaram cortisol em resposta ao ACTH exógeno (metil-paration e tebuconazole), por outro lado, outros compostos (atrazina mais simazina e glifosato) atuam em pontos superiores do eixo HHI uma vez que a elevação de cortisol foi re-estabelecida após a injeção de ACTH (CERICATO et al., 2009).

Este efeito deletério dos agroquímicos sobre a resposta ao estresse pode ser classificado como interrupção endócrina (Figura 1). Um peixe com sua resposta ao estresse prejudicada fica fisiologicamente comprometido, não respondendo adequadamente aos estressores comuns (HONTELA, 1998). Esta incapacidade de responder aos estressores torna o animal muito mais susceptível (PACHECO and SANTOS, 2001), o que, em nível populacional, pode diminuir a taxa de sobrevivência (HONTELA, 1998).

Figura 1. Via de liberação de cortisol: iniciando no núcleo paraventricular hipotalâmico liberando corticotropina (CRH), este estimula na pituitária a produzir o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) a partir da pró-opiomelanocortina (POMC). O ACTH circulante estimula as células interrenais no rim cefálico dos peixes a sintetizar e liberar os corticosteroides, a partir de um éster de colesterol convertido em colesterol pela lipase. O colesterol é transferido para a mitocôndria pela ação da Proteína aguda de regulação esteroidogênica (StAR). Por ação da enzima de clivagem da cadeia lateral o colesterol é então convertido em pregnenolona que, no retículo endoplasmático, sofre uma série de isomerações e hidroxilações, resultando na produção do cortisol. Por ser um esteróide lipossolúvel, entra nas células através de difusão passiva sendo ativado ou metabolizado e inativado. Receptores de glicocorticóides (GR) promovem a transativação ou a transrepressão de genes que codificam proteínas envolvidas no metabolismo, reprodução e função imune.



1.2.2.1. Metil-paration

Inseticida e acaricida de contato e ingestão, comercialmente encontrado como Folisuper 600™, 600 g/L (O,O-dimethyl O-4-nitrophenyl phosphorothioate). Classificação toxicológica: I (extremamente tóxico), classe de periculosidade ambiental II (muito perigoso ao meio ambiente), solubilidade em água de 24 mg / L. Utilizado nas culturas de algodão, feijão, milho, soja e trigo. Fórmula molecular C₁₀H₁₄NO₅PS. Pouco persistente com moderada

solubilidade em água e com diversos relatos de toxicidade aguda para peixes (WALTON et al., 1997).

1.2.2.2. *Tebuconazole*

Fungicida sistêmico, vendido comercialmente como Folicur™ 200 CE 200 g/L (RS – 1 - p - chlorophenyl - 4, 4 – dimethyl – 3 - (1 H - 1, 2, 4 – triazol – 1 - ylmethyl) pentan – 3 - o). Classificação toxicológica: III (medianamente tóxico). Classificação do potencial de periculosidade ambiental: II (produto muito perigoso ao meio ambiente). Utilizado em diversas cultivares. Fórmula molecular $C_{16}H_{22}C_1N_3O$. Rapidamente se degrada apresentando curta persistência no ambiente não apresentado bioacumulação significativa (www.milenia.com.br).

1.2.2.3. *Glifosato*

Herbicida não seletivo de ação sistêmica, comercialmente encontrada como Roundup Original™, 360 g/L de (N-fosfometilglicina). Classificação toxicológica: IV (pouco tóxico). Classificação do potencial de periculosidade ambiental: III (produto perigoso ao meio ambiente). Fórmula molecular $C_3H_8NO_5P$. As formulações com glifosato rapidamente se dissipam nas águas de superfície se degradando pela microflora do solo (GLUSCZAK et al., 2007).

1.2.2.4. *Atrazine + Simazine*

Herbicida seletivo para a cultura do milho, podendo ser aplicado antes ou após e emergência da cultura e das plantas infestantes, comercialmente encontrado como Herbimix 450 g/L (6-chloro-N2,N4-diethyl-1,3,5-triazine-2,4-diamine (simazina); 6-chloro-N2-ethyl-N4-isopropyl-1,3,5-triazine-2,4-diamine (atrazina)). Classificação toxicológica: IV (pouco tóxico). Classificação do potencial de periculosidade ambiental: III (produto perigoso ao meio ambiente), produto altamente persistente no meio ambiente. Fórmula química da atrazina $C_8H_{14}ClN_5$ e simazina $C_7H_{12}ClN_5$. A atrazina e a simazina são pouco afetadas pelos processos naturais de degradação, resultando numa contaminação quase permanente das águas de superfície e de lençóis freáticos (SAGLIO & TRIJASSE, 1998).

1.2.3. Estresse em peixes

A ocorrência de estresse é praticamente inevitável, na produção de peixes, uma vez que os peixes são submetidos a inúmeros manejos e a condições ambientais muitas vezes adversas. A resposta ao estresse é uma reação do organismo a uma variedade de fatores adversos, chamados estressores, e compreende uma série de processos fisiológicos coordenados pelo eixo HHI (BARTON, 2002).

Em ambiente aquático os peixes enfrentam os mais diversos estressores, como os de natureza química: variação na concentração de oxigênio dissolvido, concentração elevada de amônia e nitrito (COSTA et al., 2004), presença de poluentes orgânicos e inorgânicos (JORGENSEN et al., 2002; CARVALHO E FERNADES, 2006); física: manuseio, alta densidade populacional, confinamento, captura, transporte (URBINATI et al., 2004), redução de nível de água (CADAVID GARCIA, 1984).

Os fatores estressantes têm sido a principal causa de perdas na piscicultura, pois afetam o metabolismo e conseqüentemente o crescimento, por ser uma resposta adaptativa, ao promover uma melhor chance de sobrevivência frente a uma situação de medo ou ansiedade, permitindo uma divisão de recursos (crescimento, reprodução), favorecendo a sobrevivência nessas situações (OBA et al., 2009).

De forma geral, a resposta ao estresse apresenta 3 níveis (primário, secundário e terciário) (Figura 2). A resposta primária é coordenada pelo sistema neuroendócrino, com liberação de catecolaminas pelas células cromafins e cortisol secretado quando o hipotálamo produz hormônio liberador de corticotrofina (CRH) agindo na hipófise, estimulando a produção e a liberação do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), este age na interrenal, promovendo a liberação de cortisol (BARTON, 2002; WENDELAAR BONGA, 1997). A resposta secundária (metabolismo; osmorregulação; imunossupressão) por ação destes hormônios em diversos órgãos-alvo, resulta em modificações bioquímicas e fisiológicas nos peixes, induzindo a alterações patológicas como: problemas reprodutivos; diminuição da taxa de crescimento e da resistência a doenças; caracterizando a resposta terciária do estresse (BARTON, 2002; OBA et al., 2009).

O cortisol é o principal produto final deste eixo em peixes teleósteos, exercendo uma variada gama de ações fisiológicas (revisado por BARTON & IWAMA, 1991; WENDELAAR BONGA, 1997). Por esta razão sua concentração tem sido determinada no sangue de diversos peixes como fator avaliador de resposta ao estresse a diversos estímulos estressantes.

Figura 2. Estressores físicos, químicos e perceptivos, promovem efeitos fisiológicos com respostas primária, secundária e terciária. Em alguns casos, as respostas primárias e secundárias, por sua vez pode afetar diretamente as respostas secundárias e terciárias, respectivamente, como indicado pelas setas (Adaptado de Barton, 2002).



1.2.3.1. Comunicação química de estresse

Os peixes possuem diversos tipos de comunicação, podendo ser química, sonora, mecânica, quando expostos a risco eminente em indivíduos da mesma espécie (BARCELLOS et al., 2007; 2010; 2011; BARRETO et al., 2013). A comunicação química é um mecanismo adaptativo que promove elevação de cortisol em peixes teleósteos, antecipando e amplificando a consciência do animal em relação as ameaças do ambiente (BARCELLOS et al., 2014).

Um estudo prévio (BARCELLOS *et al.*, 2011) mostrou que a ocorrência de estresse nos peixes de um dos tanques de um sistema fechado de recirculação provocou a generalização dessa resposta em todos os demais peixes dos demais tanques, ainda que os mesmos não tivessem sido expostos a um estressor, evidenciando que essa informação de estresse foi conduzida pela água, por fatores químicos liberados pelos peixes estressados.

Essa substância, nos peixes, ainda não é conhecida e, por conseguinte, os sistemas atuais de filtragem não são capazes de retê-la, que retorna aos tanques, disparando a resposta nos demais peixes estocados no sistema, esse fenômeno da comunicação química de estresse nos jundiás pode ser responsável pelos problemas de desempenho zootécnico dos peixes (BARCELLOS et al., 2011).

Do ponto de vista ambiental, a presença de agroquímicos na água podem causar interrupção endócrina (CERICATO et al., 2008; 2009; KOAKOSKI et al., 2014), podendo haver o comprometimento da comunicação, modificando respostas comportamentais e endócrinas necessárias para a sobrevivência e equilíbrio dos ecossistemas aquáticos.

1.2.3.2. Cortisol

O cortisol é o principal hormônio do estresse em peixes e que desempenha um papel na mobilização de combustíveis, mantendo o metabolismo e homeostase (VAN DER BOON et al., 1991). A elevação dos níveis plasmáticos de cortisol em resposta a estressores é bem conhecida, em jundiás (BARCELLOS et al., 2001a, 2003, 2004a e 2004b) e é considerada uma resposta adaptativa, importante para os ajustes necessários para manter a homeostase (ALURU & VIJAYAN, 2006). Nos peixes, o tecido corticosteroidogênico está distribuído no rim cefálico e é chamado tecido inter-renal. Assim como a adrenal dos mamíferos este tecido é controlado pelo eixo hipotálamo-hipófise (WENDELAAR BONGA, 1997). A síntese do cortisol no tecido inter-renal envolve uma série de etapas iniciadas pela estimulação pelo ACTH e a consequente conversão do colesterol, através de uma série de passos enzimáticos, a esteroides (PAYNE & HALES, 2004).

Esta resposta pode ser bloqueada ou diminuída por ação de tóxicos que diminuem a capacidade do tecido inter-renal de produzir cortisol, ou afetam outros pontos do eixo HHI deixando o tecido inter-renal sem o estímulo necessário para a síntese deste hormônio (ALURU & VIJAYAN, 2006). Assim, como os corticosteróides possuem importante papel nos processos homeostáticos como, crescimento, metabolismo, balanço hidromineral, reprodução e função imune, qualquer impacto no seu eixo neuroendócrino de controle pode potencialmente afetar o desempenho do animal (revisado por ALURU et al., 2005). Devido a esta grande relevância fisiológica, alterações neste eixo são consideradas importantes biomarcadores de poluição ambiental (PACHECO & SANTOS, 2001).

1.2.3.3. Metirapona

A metirapona pertence a um grupo de agentes farmacológicos considerados inibidores da biossíntese de esteróides adrenocorticais, reduz a síntese de corticóides, inibindo a enzima P-450-esteróide-hidroxilase, que converte a 11-desoxicorticosterona e o 11-desoxicortisol em corticosterona e cortisol, respectivamente. Esta droga é um inibidor da síntese de

corticosterona, não afetando os níveis basais (SCHIMMER, B. P. e PARKER, K. L., 1996). Atua sobre a enzima citocromo P₄₅₀, responsável pela 11 β - hidroxilação, inibindo assim a conversão do 11 - desoxicortisol em cortisol (e WILLIAMSON O'DONNELL 1969). A metirapona bloqueia a elevação de cortisol plasmático em peixes (MILLIGAN, C. L., 2003; TRIPATHI, G. e VERMA, P. 2003).

1.2.4. Jundiá

O jundiá (*Rhamdia quelen*), pertencente à família Siluridae espécie da família *Heptapteridae* (Figura 1), nativo da região sul da América do Sul (BARCELLOS et al., 2003), é considerado rústico, devido sua capacidade de suportar o frio intenso da região Sul do Brasil durante o inverno, bem como ter seu crescimento potencializado durante o verão.

É caracterizado como um peixe onívoro de leve tendência carnívora, mas também se alimenta de plâncton e bento, com preferência por proteína de origem animal (GOMES et al., 2000). De fácil criação, boa aceitação pelo mercado consumidor, especialmente por ter uma carne branca, de sabor suave e possuir filés ausente de espinhas (LAZZARI et al., 2006).

Devido a sua prolificidade, robustez e bom ganho em peso, a espécie tem sido intensivamente pesquisada, tanto em pesquisa aplicada como, alternativa de produção de peixes (BARCELLOS et al., 2004b; SILVA et al., 2006; 2008), quanto em pesquisa básica avaliando perfis hormonais reprodutivos (BARCELLOS et al., 2001b; 2002), resposta ao estresse (BARCELLOS et al., 2001a; 2003; 2004a; 2006a e 2006b), efeito de agroquímicos sobre sua fisiologia, inclusive sobre a interrupção endócrina da reprodução e toxicologia (SOSO et al, 2007; KREUTZ et al, 2008) e fisiologia geral (BELLO et al., 2000). Pelas características zootécnicas e pela considerável quantidade de conhecimento é que o jundiá é considerado organismo modelo para estudos de interrupção endócrina por agroquímicos e comunicação química.

Figura 3. Exemplar de jundiá (*Rhamdia quelen*). Fonte: Koakoski (2012)



1.3. PROPOSIÇÃO GERAL

Verificar a persistência e/ou recuperação, dos efeitos provocados pelos agroquímicos nos peixes expostos agudamente a concentrações sub-letais, e o potencial interferente endócrino sobre a resposta ao estresse em alevinos de jundiá.

1.3.1. Proposições específicos

Verificar se a deficiência da resposta ao estresse (cortisol) em peixes ocorre após exposições agudas a concentrações sub-letais de agroquímicos.

Determinar a persistência e ou recuperação frente a resposta do cortisol os efeitos causados pela exposição aguda a doses sub-letais de agroquímicos em peixes.

Quantificar a sobrevivência e os parâmetros de desempenho em peixes expostos agudamente a concentrações sub-letais de agroquímicos.

Analisar o papel do aumento de cortisol na comunicação química do estresse nos peixes.

Investigar se a comunicação química do estresse é mantida quando os peixes doadores não são capazes de aumentar o cortisol.

Avaliar se os peixes doadores com o eixo hipotálamo hipófise inter-renal prejudicado por disruptores endócrinos (agroquímicos) mantém a capacidade de comunicar quimicamente um evento estressante.

1.4. MATERIASI E MÉTODOS

1.4.1. Animais e condições de manutenção

O estudo foi desenvolvido no Laboratório de Fisiologia de Peixes do Hospital Veterinário, da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária (FAMV) da Universidade de Passo Fundo (UPF). Foram utilizados 1790 peixes (jundiá, *Siluridae* catfish *Rhamdia quelen*), de ambos os sexos com peso entre 11,2 a 11,7 g. Os peixes permaneceram na densidade de 1 a 2 g de peixe por litro de água, um exemplar para cada dois litros de água, em tanques de 100 L de capacidade, sob fotoperíodo natural e aeração constante, abastecidos com água proveniente de poço artesiano. Inicialmente os animais foram mantidos em uma sala de bioensaio com

temperatura de 26°C durante 7 dias recebendo alimentação duas vezes ao dia com ração comercial extrusada (42% de proteína).

1.4.2. Aspectos éticos

Os estudos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade de Passo Fundo, registro nº 012/2012 (Anexos A).

1.4.3. Agroquímicos testados e tempo de exposição

Os agroquímicos utilizados foram, tebuconazole (fungicida), parationato metílico, (inseticida), atrazina+simazina (herbicida) e glifosato (herbicida) nas menores concentrações onde se verificou efeito bloqueador sobre o eixo HHI em experimentos anteriores (CERICATO et al., 2008; 2009) da concentração letal para 50% dos animais em exposição aguda (96h), expressa em mg/L de acordo com Kreutz et al. (2008).

1.4.4. Estudos desenvolvidos, delineamento e análise estatística

Os detalhes referentes aos delineamentos experimentais de cada estudo desenvolvido, bem como os procedimentos específicos e análise estatística estão descritos nos respectivos artigos.

2. ARTIGO 1 - AGRICHEMICALS CHRONICALLY INHIBIT THE CORTISOL RESPONSE TO STRESS IN FISH

Chemosphere 112 (2014) 85–9



ELSEVIER

Contents lists available at [ScienceDirect](http://www.sciencedirect.com)

Chemosphere

journal homepage: www.elsevier.com/locate/chemosphere



Agrichemicals chronically inhibit the cortisol response to stress in fish

Gessi Koakoski ^a, Rosmari Mezzalira Quevedo ^b, Daiane Ferreira ^a, Thiago Acosta Oliveira ^a, João Gabriel Santos da Rosa ^a, Murilo Sander de Abreu ^a, Darlan Gusso ^b, Alessandra Marqueze ^c, Luiz Carlos Kreutz ^b, Ana Cristina Vendrameto Giacomini ^b, Michele Fagundes ^b, Leonardo José Gil Barcellos ^{b,†}

^a Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Campus Universitário, Camobi, Santa Maria, RS, Brazil

^b Universidade de Passo Fundo (UPF), Programa de Pós-Graduação em Bioexperimentação, Campus I, Bairro São José, Caixa Postal 611, Passo Fundo, RS, Brazil

^c Centro Universitário La Salle – Unilasalle, Programa de Pós-Graduação em Avaliação de Impactos Ambientais em Mineração, Canoas, RS, Brazil

HIGHLIGHTS

- We studied the stress response of *Rhamdia quelen* fingerlings following exposure to agrichemicals.
- Acute exposure of fingerling-aged fish to agrichemicals chronic inhibits stress response.
- The stress axis of fish exposed to MPBI and to TBF were fully recovered after a 180 d.
- The acute exposure to the tested agrichemicals impairs fish growth and survival.

ARTICLE INFO

Article history:

Received 18 October 2013

Received in revised form 24 February 2014

Accepted 25 February 2014

Handling Editor: A. Gies

ABSTRACT

We studied the stress response of *Rhamdia quelen* fingerlings at 45, 90, 135 and 180 d following acute exposure to agrichemicals. Herein, we report the novel observation that acute exposure of fingerling-aged fish to a methyl parathion-based insecticide (MPBI) and to a tebuconazole-based fungicide (TBF) induced chronic inhibition of the stress response. In contrast, fish exposed to an atrazine–simazine-based herbicide (ASBH) recovered the stress response on day 45, and fish exposed to a glyphosate-based herbicide (GBH) did not present stress response inhibition. Additionally, fish exposed to MPBI, GBH and ASBH showed lower survival rates and attained lower final weights. In the case of TBF, the presence of the stressful stimulus more strongly influenced the changes in the performance parameters than did the agrichemical exposure itself. An impairment of the cortisol response may seriously hamper the adaptive response and the ability to promote the necessary metabolic and ionic adjustments to respond to environmental stress.

2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords:

Tebuconazole

Methyl-parathion

Glyphosate
Atrazine–simazine
HPI axis
Endocrine disruption

* Corresponding author. Tel.: +55 54 316 8100; fax: +55 54 316 8487.

E-mail addresses: gessikoakoski@yahoo.com.br (G. Koakoski), piscicultura@upf.br (R.M. Quevedo), daianeferreira0904@gmail.com (D. Ferreira), thiago_a.oliveira@hotmail.com (T.A. Oliveira), joaogabriel.sr@hotmail.com (J.G.S. da Rosa), alessandra@unilasalle.com.br (M.S. de Abreu), gusso.d@hotmail.com (D. Gusso), abreu.murilo@hotmail.com (A. Marqueze), lckreutz@upf.br (L.C. Kreutz), anacvg@upf.br (A.C.V. Giacomini), michelefagundes@upf.br (M. Fagundes), lbarcellos@upf.br (L.J.G. Barcellos), lbarcellos@upf.br (L.J.G. Barcellos).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.02.083> 0045-6535/ 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Exposing fish to various stressful situations, such as environmental changes, prey-predator interactions and, in the case of aquaculture, several different management procedures (such as the transfer of fish to a different tank or biometrics measurements), triggers a cascade of adaptive alterations. These events have been classified as a stress response (Barton and Iwama, 1991; Wendelaar Bonga, 1997) and are coordinated by the hypothalamus–pituitary–interrenal (HPI) axis (Barton, 2002). The end product of activation of the HPI axis is the glucocorticoid cortisol, which is a regulator of the necessary metabolic and ionic adjustments for coping with stress (Mommsen et al., 1999). Thus, an impairment of the cortisol response may seriously hamper the overall adaptive response and the ability to maintain metabolic and osmoionic homeostasis.

Both chronic and acute exposures to environmental contaminants might disrupt the stress axis and consequently affect stress reactivity in fish (Hontela et al., 1997; Girard et al., 1998; Norris et al., 1999; Pacheco and Santos, 2001; Dorval et al., 2005; Gravel and Vijayan, 2007; Hori et al., 2008), including in jundiá (Cericato et al., 2008, 2009). However, the long-term effects on fish lifespan and stress reactivity after acute exposure to agrichemicals during an early life stage have not been reported in the literature. This type of exposure is plausible because most natural and constructed water bodies are located near agricultural areas or have been filled with water that ran through cultivated soil. Significant amounts of the products used in crop production, such as herbicides, pesticides and fungicides, could reach these water bodies and affect non-target organisms (van der Oost et al., 2003).

To address this potential exposure scenario, we posed three questions. First, does an impairment of the cortisol stress response occur following exposure to the test agrichemicals? Second, can the fish restore their ability to trigger the response? Third, could this initial

exposure affect survival rates and performance parameters? To answer these questions, fingerlings were acutely exposed to agrichemicals and then monitored for 6 months to assess the long-term effects on both the cortisol response to new stressors and growth performance parameters. This exposure and recovery paradigm was evaluated with fish fingerlings that were stocked in aquaculture ponds at the time of agrichemical application to nearby agricultural fields.

2. Material and methods

2.1. Ethical note

This study was approved by the Ethics Commission for Animal Use (CEUA) of Universidade de Passo Fundo, UPF, Passo Fundo, RS, Brazil (Protocol#3/2011-CEUA, July 2009) and met the guidelines of the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA; <http://www.cobea.org.br>).

Stress response evaluation based on only peak cortisol measurements (Koakoski et al., 2012; Barcellos et al., 2012a) is derived from established animal welfare science. Several previous studies have used this methodology to evaluate the stress response in *Rhamdia quelen* (Cericato et al., 2008, 2009). Thus, we selected this single point evaluation methodology to prevent the use and sacrifice of more experimental fish than necessary to draw conclusions regarding agrichemical effects on cortisol profiles.

2.2. Location and study subjects

Experiments were conducted from September 2011 to March 2012 at the facilities of the Universidade de Passo Fundo in Rio Grande do Sul, Brazil. We used 90-day-old, mixed-sex *R. quelen* (Heptapteridae, Teleostei) juveniles from Jundiá municipality with an average weight of 11.2 ± 0.32 g (mean \pm SEM, $n = 1440$, 360 exposed to agrichemicals). The fish were kept in a 6200-L plastic tank prior to being transferred into experimental tanks under a natural photoperiod. The fish were fed twice a day, at 10:00 and 16:00 h, with commercial extruded food provided at 5% of body weight (42% crude protein, 3400 kcal kg⁻¹ digestive energy, DE).

The mean water temperature in all of the tanks was maintained at 24 ± 2 °C, and the

dissolved oxygen concentrations varied from 5.6 to 7.2 mg L⁻¹ (both measured using a YSI model 550A oxygen meter; Yellow Springs Instruments, USA). The pH values ranged from 6.2 to 7.4 (measured using a Bernauer pH meter). The total ammonia–nitrogen concentration was less than 0.5 mg L⁻¹ in each of the tanks (measured using a colorimetric test), the total alkalinity was 60 mg L⁻¹ of CaCO₃, and the hardness was 65 mg L⁻¹ of CaCO₃ (both measured using colorimetric tests).

2.3. Agrichemicals tested

Four experiments were conducted, each with one specific agrichemical used to expose the fish. The agrichemicals used were a methyl-parathion-based insecticide (MPBI, Folisuper 600™, 600 g L⁻¹ of O,O-dimethyl O-4-nitrophenyl phosphorothioate), a tebuconazole-based fungicide (TBF, Folicur 200CE™, 200 g L⁻¹ of RS-1-p-chlorophenyl-4,4-dimethyl-3-(1H-1,2,4-triazol-1-ylmethyl)pentan-3-ol), a glyphosate-based herbicide (GBH, Roundup Original™, 360 g L⁻¹ of N-phosphonomethylglycine) and an atrazine–simazine-based herbicide (ASBH, Herbimix™ 450 g L⁻¹ of 6-chloro-N2-ethyl-N4-isopropyl-1,3,5-triazine-2,4-diamine + 450 g L⁻¹ of 6-chloro-N2, N4-diethyl-1,3,5-triazine-2,4 diamine). The exposure concentration used for each agrichemical was based on previously reported results (Cericato et al., 2008, 2009; Kreutz et al., 2008; Ferreira et al., 2010), and corresponded to 16.6% of the calculated lethal concentration for 50% of 96 animals (LC50) 96 h (MPBI = 0.8 mg L⁻¹; TBF = 0.88 mg L⁻¹, GBH = 1.21 mg L⁻¹ and ASBH = 1.74 mg L⁻¹). All chemicals were obtained from commercial sources.

2.4. Study design

In each experiment, fish were divided into four treatment groups with three replicates per group, i.e., a total of 12 tanks. Each tank contained 900 L of chlorine-free, well-aerated tap water and 30 fish. Treatment 1 was the control (C) group, in which the fish were kept in water without agrichemical exposure and were not subjected to stress. In treatment 2, the stressed (St) group, the fish were kept in water without agrichemical exposure but were subjected to an acute stress stimulus after 96 h. In treatment 3, the fish were kept in water containing a sub-lethal concentration of the specific agrichemical for 96 h. Finally, in treatment 4, the fish were kept in water contaminated with the same sub-lethal concentration of an agrichemical for 96 h and were subjected to an acute stress stimulus, i.e., being chased with a pen net for 60 s

(Barcellos et al., 2004). The elapsed time between the stress application and sampling for all fish was 30 min because previous results indicated that cortisol peaks at this time in fingerling *R. quelen* (Koakoski et al., 2012; Barcellos et al., 2012a).

After this initial sampling, the fish in all treatment groups were maintained in water for a 180-d recuperation period, in the absence of exposure. During this period, fish from treatment groups 2 and 4 were subjected to a stress test on days 45, 90, 135 and 180, and all of the fish were sampled at these times. A schematic representation of the experimental design is depicted in Fig.1.

All experiments were conducted using a static-test design during the exposure period. Because cortisol is a glucocorticoid that might be influenced by starvation (Barcellos et al., 2010), the fish were fed daily during the 96 h exposure (24, 48, and 72 h after the beginning of exposure) at a rate of 0.75% of their biomass. During the 180-d recuperation period, the fish were fed twice daily at 5% of their biomass. Food residues and feces were not removed during the exposure period to prevent any stress caused by introducing a cleaning siphon. During the recuperation period, a water change rate of 100% per day (in open circulation system) helped keep the tanks clean, as the tanks had a conical bottom. To ensure optimal conditions for viability, water quality parameters were accessed daily to verify whether parameters ranged within normal concentrations.

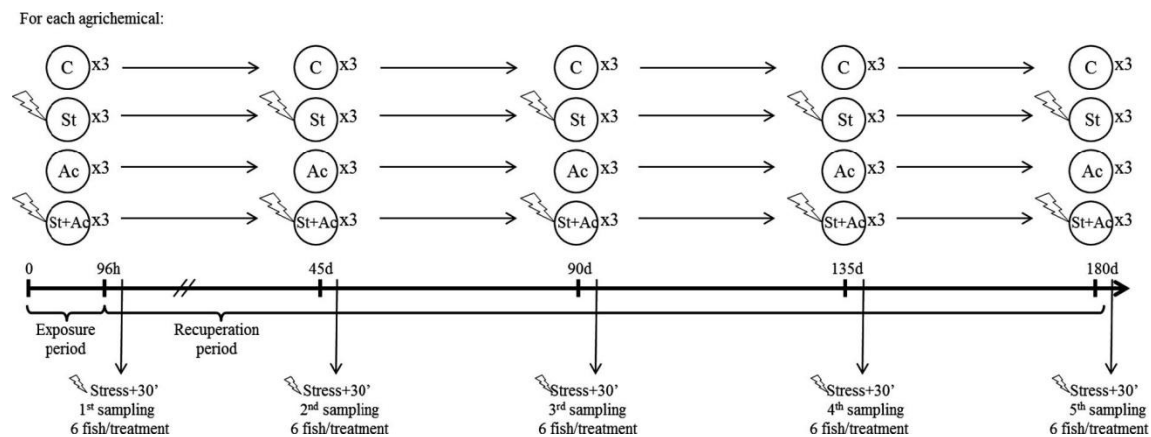


Fig. 1. Schematic view of the experimental design.

The fish were closely observed to identify potential declines in individual and/or group health over the entire exposure period. Abnormal swimming behavior, skin darkening, anorexia and body lesions were observed to detect fish at a moribund stage. Fish in this situation were immediately captured, anesthetized with buffered (NaH_2CO_3) MS222 (300 mg L^{-1}) and euthanized by spinal section.

2.5. Blood sampling and cortisol analysis

For blood sampling, two fish from each tank ($n = 6$) were captured and anesthetized with buffered (NaH_2CO_3) MS222 (300 mg L^{-1}). After a loss of orientation and complete immobilization, blood samples ($0.1\text{--}0.30 \text{ mL}$) were drawn from the caudal peduncle using sterile syringes. For the initial sampling, when the fish were very small, the blood collection was drawn from the severed caudal peduncle using heparinized microhematocrit tubes. Fish were euthanized immediately after blood collection by spinal section and discarded in a biological waste collector. The elapsed time from anesthesia to blood collection never exceeded 1 min. Blood was then transferred to 1.5-mL microcentrifuge tubes that were centrifuged at 3000 g for 10 min, and the resultant plasma was stored at $25 \text{ }^\circ\text{C}$ until analysis. Following blood withdrawal, the remaining fish were transferred to pure water and returned to their original tank after recuperation.

Cortisol was measured in duplicate in the unextracted plasma samples, using fully validated, commercially available EIA kits (EIAgenTM Cortisol, Adaltis Italy S.p.A).

2.6. Performance parameters

During the 180-d experimental period, we evaluated the survival rates and the final weight of the fish in order to calculate the final biomass of each tank. Performance parameters were used to assess the effects of acute exposure to agrichemicals on the growth and performance of fingerling fish.

2.7. Agrichemical concentrations in the water

The water concentration of each tested agrichemical was monitored immediately after application, as well as at 48 and 96 h after application. The agrichemical concentration in the water was analyzed by high-pressure liquid chromatography (HPLC) using the general methodology described by Zanella et al. (2003), along with specific methodologies for MPBI (Sabharwal and Belsare, 1986), TBF (Tang et al., 2010) and GBH (Hidalgo et al., 2004). The water concentration of ASBH was not measured because a determination methodology is currently unavailable.

2.8. Statistics

Data are presented as the mean \pm SEM values for each group, calculated using the GraphPad InStat 3.00 statistical package (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). The cortisol concentration in each stress test, survival rates and performance parameters were compared using an analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey's test. The homogeneity of variance was determined using Hartley's test, and normality was determined using the Kolmogorov–Smirnov test. Differences with p values <0.05 were considered statistically significant.

3. Results

All of the agrichemicals tested were persistent in the water after 96 h after inoculation, with the percentages of the inoculated nominal concentration varying from 55% to 101% (Table 1).

Table 1

Agrichemical concentrations (mg L^{-1}) measured in the water immediately after the inoculation and after 48 h and 96 h post agrichemical inoculation.

Agrichemical	Nominal concentration (mg L^{-1})	Concentrations measured (% , mg L^{-1})		
		After inoculation	48 h After	96 h After
MPBI ^a	0.80	97%, 0.776	71%, 0.568	55%, 0.440
TEB ^a	0.88	97.3%, 0.856	79%, 0.695	50%, 0.439
GBH ^a	1.21	101%, 1.222	95%, 1.150	95%, 1.150

^a MPBI = methyl-parathion-based insecticide; TBF = tebuconazole-based fungicide; GBH = glyphosate-based herbicide

3.1. Cortisol concentrations and performance parameters

3.1.1. MPBI-exposed fish

In the first stress test, after a 96 h exposure to MPBI (Fig. 2), the cortisol levels increased only in the stressed group (St), whereas the St + MPBI group demonstrated cortisol values similar to the control (C) and to the MPBI-exposed fish ($P < 0.0001$). Similar results were

observed following stress tests conducted on day 45 ($P < 0.0001$). In tests conducted on days 90 and 135, the cortisol concentrations of the St + MPBI group were higher than the concentrations of the C group, but lower than those of the St group ($P < 0.0001$). In the stress test conducted on day 180, the cortisol concentrations measured in the St + MPBI group were similar to those of the St group, and both group means for cortisol concentrations were higher than those of the C and MPBI groups ($P < 0.0001$).

Treatment of fish with St or MPBI resulted in lower survival rates than those observed in the C group or the St + MPBI group (Fig. 3A1). Fish treated with St, MPBI or St + MPBI attained lower final weights (Fig. 3A2). A similar pattern was observed for the final tank biomass (Fig. 3A3).

3.1.2. TBF-exposed fish

After 96 h of TBF exposure (Fig. 2), the cortisol concentrations of the St and St + TBF groups were similar; both group mean cortisol concentrations increased in relation to the C and TBF groups ($P < 0.0001$). Curiously, in the stress tests at days 45, 90 and 135, the cortisol levels of the St + TBF group were higher than the C and TBF groups, but not as elevated as the concentrations detected in the St group ($P < 0.0001$). After 180 d, fish from the St + TBF group responded in a similar manner to the fish from the St group, and both group mean cortisol responses were higher than those of the C and TBF groups ($P < 0.0001$).

The C- and TBF-exposed fish demonstrated higher survival rates than those of the St- or the St + TBF-exposed fish (Fig. 3B1). Fish in the C group attained a higher final weight, whereas the St groups showed decreased final weights (Fig. 3B2). The final tank biomass varied by group (Fig. 3B3).

3.1.3. GBH-exposed fish

The presence of GBH (Fig. 2) in the water did not influence the cortisol response to stress. When sampled, the St and St + GBH groups presented similar cortisol peaks; both group means were increased in relation to the C and GBH groups ($P < 0.0001$).

The survival rates of the fish in the groups treated with St, GBH or St + GBH were lower than the survival rate of the fish in the C group (Fig. 3C1). The GBH and St + GBH groups demonstrated greater mean growth than the St group, but these fish were still smaller than the C fish (Fig. 3C2). The final tank biomass displayed a similar pattern (Fig. 3C3).

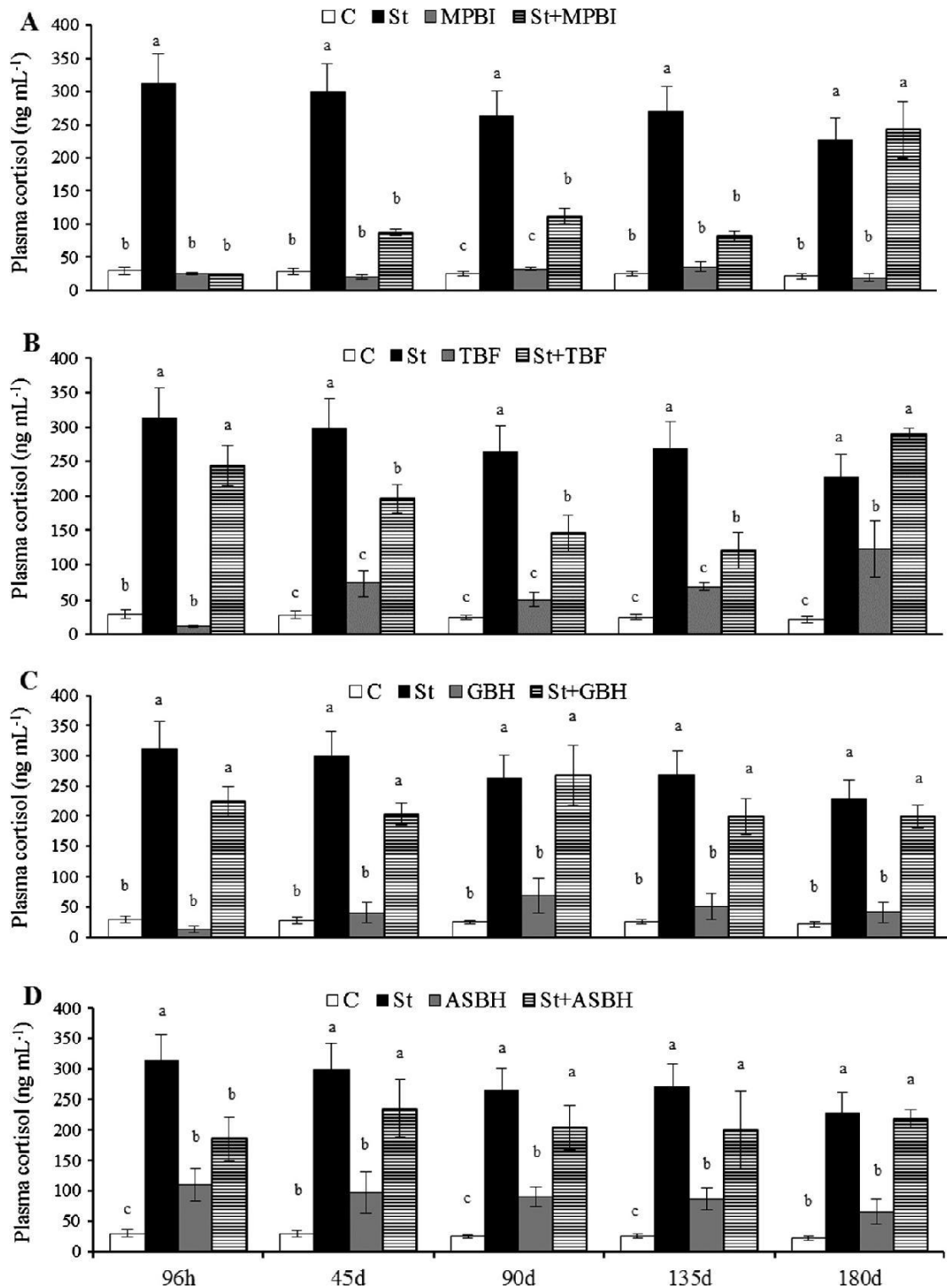


Fig. 2. Plasma levels of cortisol in *Rhamdia quelen* acutely exposed to a methyl-parathion-based insecticide (MPBI, A), a tebuconazole-based fungicide (TBF, B), a glyphosate-based herbicide (GBH, C) or to an atrazine-simazine-based herbicide (ASBH, D), immediately after exposure and at 45, 90, 135 and 180 d of recuperation in uncontaminated water. Small letters above the bars indicate significant differences between the treatment means for that sampling event, as determined by an ANOVA followed by Tukey's range test.

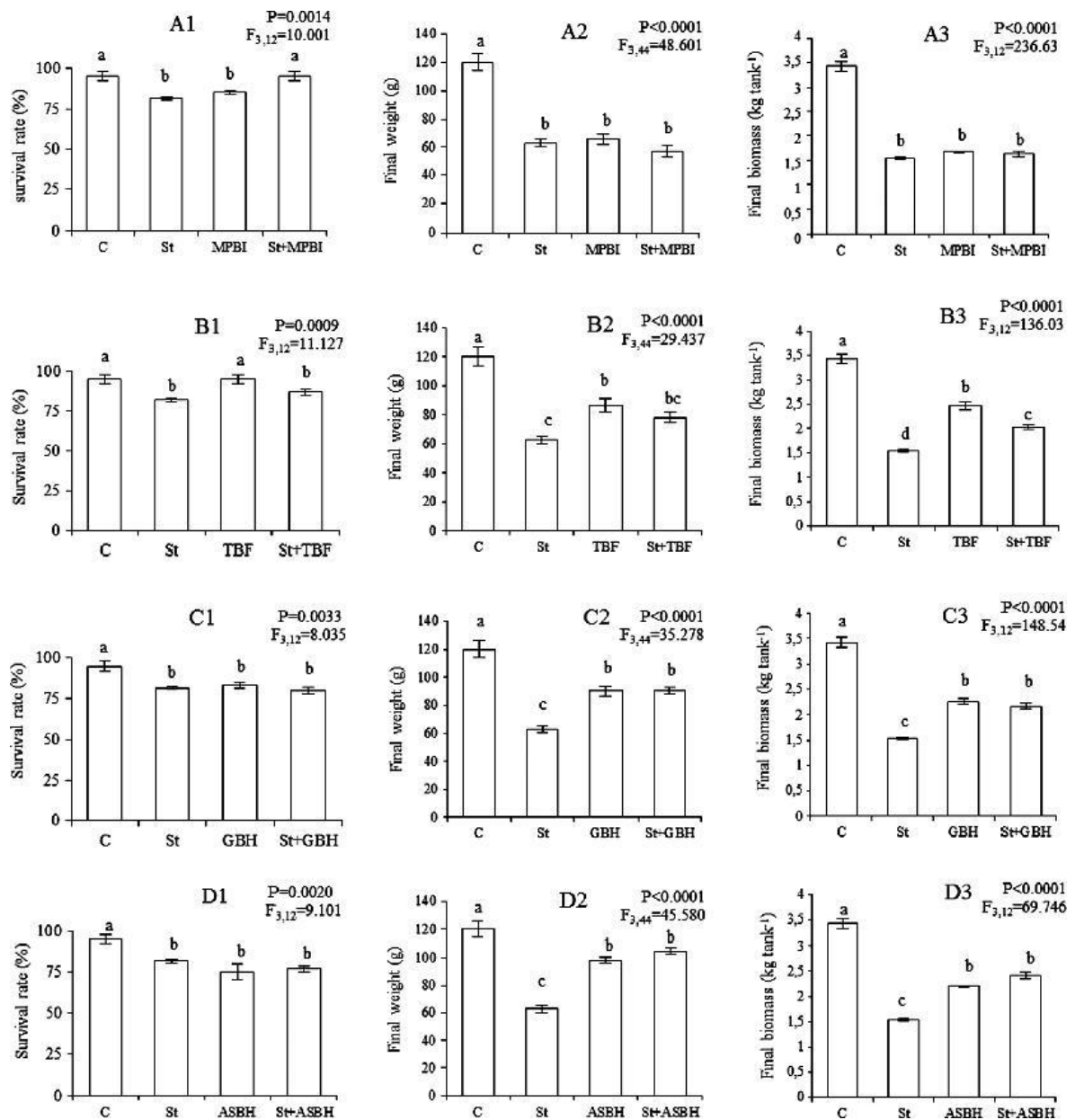


Fig. 3. Survival rate, final weight and tank biomass of acutely exposed fish after 180 d of recuperation. Methyl-parathion-based insecticide (MPBI, A), tebuconazole-based fungicide (TBF, B), glyphosate-based herbicide (GBH, C) and atrazine-simazine-based herbicide (ASBH, D). Bars represents the mean of the survival rate, final weight or tank biomass of the four replicate tanks for each treatment. Small letters above the histograms indicate significant differences between the means, as determined by an ANOVA followed by Tukey's range test.

3.1.4. ASBH-exposed fish

After 96 h of exposure, cortisol concentrations of fish exposed to ASBH (Fig. 2) were increased compared to fish in the C group. The fish in the St + ASBH group also demonstrated increased cortisol concentrations, but not to the same extent as the St group ($P < 0.0001$). The results of the stress tests performed at days 45, 90, 135 and 180 demonstrated that the cortisol values of fish from the St + ASBH group were similar to the concentrations measured in the St group and that both group means were higher than those of the C and ASBH groups ($P < 0.0001$). The measurements conducted on days 90 and 135 revealed higher cortisol values for the ASBH group than those measured in the C group.

The C group presented a higher survival rate than the St, ASBH or St + ASBH groups (Fig. 3D1). The lowest final mean weight was obtained for the St group, but the ASBH and St + ASBH group mean weights showed decreases relative to the C group weight (Fig. 3D2). A similar pattern was observed for the final tank biomass.

4. Discussion

We demonstrate for the first time that an acute contaminant exposure during the fingerling stage induced chronic inhibition of cortisol release in response to stress in fish. The stress axis returns to a fully responsive state only after a minimum recovery period of 135 d in fish exposed to MPBI or to TBF. We also show that stress exposures during the juvenile fingerling stage impaired fish growth and survival because all of the exposed fish, independent of the agrichemical, presented worse growth in relation to the control, contaminant-free fish.

We hypothesize that MPBI and TBF damaged the HPI axis, perhaps at hypothalamic or pituitary regulatory levels or the interrenal tissue directly, resulting in long-term impairment of stress-induced cortisol release by MPBI and TBF exposure. Previous studies conducted in our laboratory showed that impairment of the cortisol release by MPBI was not reversed by an injection of adrenocorticotrophic hormone (ACTH) (Cericato et al., 2009), suggesting that the disruptive effect occurs in the hypothalamus and/or the pituitary gland. Additionally, we recently showed that MPBI impairs the zebrafish (*Danio rerio*) HPI axis (Rosa et al., 2013), most likely by inhibiting the gene expression of steroidogenic acute regulatory protein (StAR) and heat shock protein 70 (hsp70) (Rosa et al., in preparation).

Similar results were found with TBF exposure (Cericato et al., 2009), but the HPI impairment caused by this compound was likely also related to its strong oxidative potential,

both in *R. quelen* (Ferreira et al., 2010) and *Cyprinus carpio* tissues (Toni et al., 2011).

Despite uncertainty regarding the exact mechanism by which MPBI and TBF exert their deleterious effects on the HPI axis, fish exposed to these agrichemicals recovered their HPI-responsivity only in stress tests performed 180 d after the acute exposure. The affected parts of the HPI axis likely regenerate this functioning capacity via growth compensation. At this time, we do not have an alternate hypothesis for this intriguing finding, and it will be the focus of our subsequent research.

Chronic impairment of cortisol release by the HPI axis, which was observed for fish exposed to MPBI or TBF, may indicate serious obstruction of the adaptive function of the neuroendocrine stress axis in promoting restoration of homeostasis following stress (Hontela, 1998), which was reflected in the lower survival rates we observed.

Unlike fish exposed to MPBI or TBF, fish exposed to GBH or ASBH did not demonstrate impairment of cortisol release (except after 96 h of recovery from ASBH exposure). However, these chemicals did exert effects on fish survival and growth parameters. Both GBH and ASBH have been proven to induce oxidative stress in fish liver (Ferreira et al., 2010). This effect appears to be a plausible mechanism of lethality for fish exposed to these agrichemicals (Ferreira et al., 2010; Toni et al., 2011). Because the liver is the primary organ involved in metabolism, prolonged damage in the liver cells might have caused the observed poor growth and survival of the fish. Independent of the cause and mechanisms, our data demonstrated that both GBH and ASBH negatively affected fish survival and growth. Thus, the four agrichemicals tested, exert adverse effects in fish, under both environmental and aquaculture conditions.

The exposure to MPBI produces lower survival rates than those observed in the control fish. Surprisingly, the survival rates of fish exposed to a combination of MPBI and stress were similar to those of control fish. In contrast, the survival rates of fish exposed to the combination of stress and TBF, GBH or ASBH were at least as low as those found in exposure to the agrichemical alone. In terms of final weight, except for MPBI – where the fish exposed to the agrichemical showed lower weights similar to those found in the MPBI + St and St groups – the occurrence of stress was a stronger influence on weight impairment than the exposure to the agrichemical per se. As expected, the survival rate of control fish in laboratory conditions was greater than that obtained for pond-reared *R. quelen*, whereas the final weight of laboratory fish was lower than that of the pond-reared fish (Silva et al., 2006, 2008; Barcellos et al., 2012b).

Finally, three important aspects underscore the environmental relevance of our data: one,

the concentrations to which the fish were exposed are low (less than 20% of the LC 50), two MPBI (0.25-12.5 mg L⁻¹, Williams and Jones, 1994) and GBH (100 mg L⁻¹, Monsanto, 2003) are used directly in water bodies to control predatory insects and aquatic macrophytes, respectively. Even TBF and ASBH, which are not used directly in water, can easily enter water bodies in small concentrations as a result of leaching by rain or as a result of accidents (as postulated by Soumis et al. (2003)). Thus, the concentrations used in the present study were very plausible in terms of the potential entry of the agrichemicals into natural water bodies and fish ponds; and three, all of the tested agrichemicals reduced the survival rates as well as growth parameters.

These intriguing results demonstrated for the first time that an acute sub-lethal exposure to an agrichemical during juvenile development, which might not be perceived or detected, may impair the long-term function of the HPI axis, at least in terms of cortisol release. A fish with an impaired HPI axis capacity to increase cortisol may lose the ability to stimulate the metabolic and ionic adjustments necessary to cope with stress.

Acknowledgements

The study was funded by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (470850/2010-8) and Universidade de Passo Fundo. L.J.G.B. was supported by a CNPq research fellowship (302073/2011-6).

References

- Barcellos, L.J.G., Kreutz, L.C., Koakoski, G., Oliveira, T.A., Rosa, J.G.S., Fagundes, M., 2012a. Fish age, instead of weight and size, as a determining factor for time course differences in cortisol response to stress. *Physiol. Behav.* 107, 397–400.
- Barcellos, L.J.G., Quevedo, R.M., Kreutz, L.C., Ritter, F., Pandolfo, A., Hemkemeier, M., Colla, L., Silva, L.B., Koakoski, G., Rosa, J.G.S., 2012b. Comparative analysis of different fish polyculture systems. *J. World Aquat. Soc.* 43, 778–789.
- Barcellos, L.J.G., Kreutz, L.C., Souza, C., Rodrigues, L.B., Fioreze, I., Quevedo, R.M., Cericato, L., Soso, A.B., Fagundes, M., Conrad, J., Lacerda, L.A., Terra, S., 2004. Hematological changes in jundiá (*Rhamdia quelen* Quoy and Gaimard Pimelodidae) after acute and chronic stress caused by usual aquacultural
- Barcellos, L.J.G., Marqueze, A., Trapp, M., Quevedo, R.M., Ferreira, D., 2010. The effects of fasting on cortisol, blood glucose and liver and muscle glycogen in adult jundiá *Rhamdia quelen*. *Aquaculture* 300, 231–236.
- Barton, B.A., 2002. Stress in fishes: a diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. *Integr. Comp. Biol.* 42, 517–525.
- Barton, B.A., Iwama, G.K., 1991. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with

- emphasis on the response and effects of corticosteroids. *Annu. Rev. Fish. Dis.* 10, 3–26.
- Cericato, L., Neto, J.G.M., Fagundes, M., Kreutz, L.C., Quevedo, R.M., 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 sublethal concentrations of agrichemicals. *Comp. Biochem. Physiol. C* 148, 281–286.
- Cericato, L., Neto, J.G.M., Kreutz, L.C., Quevedo, R.M., Rosa, J.G.S., Koakoski, G., Centenaro, L., Pottker, E., Marqueze, A., Barcellos, L.J.G., 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. C* 149, 363–367.
- Dorval, J., Leblond, V., Deblois, C., Hontela, A., 2005. Oxidative stress and endocrine endpoints in white sucker (*Catostomus commersoni*) from a river impacted by agricultural chemicals. *Environ. Toxicol. Chem.* 24, 1273–1280.
- Ferreira, D., Motta, A.C., Kreutz, L.C., Toni, C., Loro, V.L., Barcellos, L.J.G., 2010. Assessment of oxidative stress in *Rhamdia quelen* exposed to agrichemicals. *Chem.* 79, 914–921.
- Girard, C., Brodeur, J.C., Hontela, A., 1998. Responsiveness of the interrenal tissue of yellow perch (*Perca flavescens*) from contaminated sites to an ACTH challenge test in vivo. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 55, 438–450.
- Gravel, A., Vijayan, M.M., 2007. Salicylate impacts the physiological responses to an acute handling disturbance in rainbow trout. *Aquat. Toxicol.* 82, 87–95.
- Hidalgo, C., Rios, C., Hidalgo, M., Salvado, V., Sancho, J.V., Hernández, F., 2004. Improved coupled-column liquid chromatographic method for the determination of glyphosate and aminomethyl-phosphonic acid residues in environmental waters. *J. Chromatogr. A* 1035, 153–157.
- Hontela, A., 1998. Interrenal dysfunction in fish from contaminated sites: in vivo and in vitro assessment. *Environ. Toxicol. Chem.* 17, 44–48.
- Hontela, A., Daniel, C., Rasmussen, J.B., 1997. Structural and functional impairment of the hypothalamus–pituitary–interrenal axis in fish exposed to bleached kraft mill effluent in St. Maurice River, Quebec. *Ecotoxicology* 6, 1–12.
- Hori, T.S.F., Avilez, I.M., Iwama, G.K., Johnson, S.C., Moraes, G., Afonso, L.O.B., 2008. Impairment of the stress response in matrinxã juveniles (*Brycon amazonicus*) exposed to low concentrations of phenol. *Comp. Biochem. Physiol. C* 147, 416–423.
- Koakoski, G., Oliveira, T.A., Rosa, J.G.S., Fagundes, M., Kreutz, L.C., Barcellos, L.J.G., 2012. Divergent time course of cortisol response to stress in fish of different ages. *Physiol. Behav.* 106, 129–132.
- Kreutz, L.C., Barcellos, L.J.G., Silva, T.O., Anziliero, D., Martins, D., Lorenson, M., Marteninghe, A., Silva, L.B., 2008. Acute toxicity testing of agricultural pesticides on silver catfishes (*Rhamdia quelen*), fingerlings. *Ciência Rural* 38, 1050–1055.
- 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.
- Monsanto, 2003. Background: Aquatic Use of Glyphosate Herbicides in Australia. <http://www.monsanto.com/monsanto/content/products/productivity/roundup/gly_austfrog_bkg.pdf> (downloaded 22.10.09).
- Norris, D.O., Donahue, S., Dores, R.M., Lee, J.K., Maldonado, T.A., Ruth, T., Woodling, J.D., 1999. Impaired adrenocortical response to stress by brown trout, *Salmo trutta*, living in metal-contaminated waters of the Eagle River, Colorado. *Gen. Comp. Endocrinol.* 113, 1–8.
- Pacheco, M., Santos, M.A., 2001. Biotransformation, endocrine, and genetic responses of *Anguilla anguilla* L. to petroleum distillate products and environmentally contaminated waters. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 49, 64–75.

- Rosa, J.G.S., Koakoski, G., Piato, A.L., Bogo, M.R., Bonan, C.D., Kreutz, L.C., Fagundes, M., Barcellos, L.J.G. Impaired Brain StAR and hsp70 Gene expression in methyl-parathion exposed Zebrafish. *Environm. Toxicol.* (in preparation).
- Rosa, J.G.S., Koakoski, G., Piato, A.L., Kreutz, L.C., Fagundes, M., Marqueze, A., Barcellos, L.J.G., 2013. Impairment of cortisol response to stress in zebrafish acutely exposed to methyl-parathion. *J. Environ. Sci. Technol.* 6, 57–62.
- Sabharwal, A.K., Belsare, D.K., 1986. Persistence of methyl parathion in a carp rearing Pond. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 37, 705–709.
- Silva, L.B., Barcellos, L.J.G., Quevedo, R.M., Souza, S.M.G., Kreutz, L.C., Ritter, F., Finco, J.A., Bedin, A.C., 2006. Alternative species for traditional carp polyculture in southern South America: initial growing period. *Aquaculture* 255, 417–428.
- Silva, L.B., Barcellos, L.J.G., Quevedo, R.M., Souza, S.M.G., Kessler, A.M., Kreutz, L.C., Ritter, F., Finco, J.A., Bedin, A.C., 2008. Introduction of jundia *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard) and Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (Linnaeus) increases the productivity of carp polyculture in southern Brazil. *Aqua. Res.* 39, 542–551.
- Soumis, N., Lucotte, M., Sampaio, D., Almeida, D.C., Giroux, D., Morais, S., Pichet, P., 2003. Presence of organophosphate insecticides in fish of the Amazon river. *Acta Amazon* 33, 325–338.
- Tang, T., Qian, K., Shi, T., Wang, F., Li, J., Cao, Y., 2010. Determination of triazole fungicides in environmental water samples by high performance liquid chromatography with cloud point extraction using polyethylene glycol 600 monooleate. *Anal. Chimica Acta* 680, 26–31.
- Toni, C., Ferreira, D., Kreutz, L.C., Loro, V.L., Barcellos, L.J.G., 2011. Assessment of oxidative stress and metabolic changes in common carp (*Cyprinus carpio*) acutely exposed to different concentrations of the fungicide tebuconazole. *Chem.* 83, 579–584.
- van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N.P.E., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 13, 57–149.
- Wendelaar Bonga, S.E., 1997. The stress response in fish. *Physiol. Rev.* 77, 591– 625.
- Willians, H.H., Jones, A. (Eds.), 1994. *Parasitic Worms of Fish.* Taylor and Francis, London. 593p.
- Zanella, R., Primel, E.G., Goncalves, F.F., Kurtz, M.H.S., Mistura, C.M., 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.

3. MANUSCRITO SUBMETIDO - CHEMICAL COMMUNICATION OF STRESS IN FISH DOES NOT DEPEND ON CORTISOL INCREASE BUT NEEDS HYPOTHALAMIC-PITUITARY-INTERRENAL AXIS ACTIVATION

Periódico: Scientific: Journal: physiology & behavior

Chemical communication of stress in fish does not depend on cortisol increase but needs hypothalamic-pituitary-interrenal axis activation

Gessi Koakoski¹, João Gabriel Santos da Rosa¹, Darlan Gusso², Rosmari Mezzalira Quevedo², Thiago Acosta Oliveira¹, Murilo Sander de Abreu¹, Lucas Centenaro³, Michele Fagundes², Rodrigo Egydio Barreto⁴, Leonardo José Gil Barcellos^{1,2}

¹ Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Campus Universitário, Camobi, Santa Maria, RS, Brazil

² Universidade de Passo Fundo (UPF), Programa de Pós-Graduação em Bioexperimentação, Campus I, Bairro São José, Caixa Postal 611, Passo Fundo, RS, Brazil

³ Programa de Pós-Graduação em Bioexperimentação, Universidade de Passo Fundo(UPF), BR 285, São José, Passo Fundo, RS, Brazil, 99052-900

⁴ Research Center on Animal Welfare (RECAW). Department of Physiology, Bioscience Institute, Caunesp, Unesp, CEP 18618-970, Botucau, SP, Brazil.

* Please address correspondence to lbarcellos@upf.br

Tel: +55 54 3316.8100

Fax: +55 54 3316.8487

Abstract

We previously demonstrate that fish reared in multitank recirculating water systems chemically communicates stress to fish of other tanks generalizing the activation of hypothalamic-pituitary-interrenal (HPI) axis for the entire system. After, we demonstrate that fish stressed by the presence of a predator, elevated cortisol and communicate to conspecifics the risky situation. In sequence, we found that this risk communication occurred including if the donor fish no elevate his own cortisol level. Based on these former studies, one of the plausible sequences is to study the role of cortisol increase in the chemical communication of stress in fish. Here we confirm that stressed fish chemically communicate this stressful situation to undisturbed fish housed in another tank. We also show that Metirapone-treated donor fish did not increase their cortisol levels, but maintain the communication to target fish and that fish exposed to endocrine disruptor agrichemicals not communicate stress to target fish. Taken together the present and previous results we are secure to propose that the chemical communication of stress is not related to cortisol increase, but depends on the HPI axis activation.

Keywords: chemical communication, cortisol, agrichemicals, metirapone.

1. Introduction

Chemical communication of stress in fish is an important adaptive mechanism that increases cortisol in anticipation of a potential threat, amplifying the animal's awareness of its environment [1]. Chemical cues overcome visual barriers to communicating stressful conditions to conspecifics in other place [2].

A recent study in our laboratory showed that fish reared in multitank recirculating water systems chemically communicates stress to fish of other tanks [3] generalizing the activation of hypothalamic-pituitary-interrenal (HPI) axis for the entire system in 60 minutes. Aquaria based studies in sequence, confirms that fish communicates stress for conspecifics via water. However, take in account two sequential studies, a question about the cortisol (and/or its metabolites) excretion arose. First, we demonstrating that fish stressed by the presence of a predator, elevated cortisol and communicate to conspecifics the risky situation [4] and after, we verify that this risk communication occurred including if the donor fish no elevate his own

cortisolemia [2]. Based on these three studies, one of the plausible sequences is to study the role of cortisol increase in the chemical communication of stress in fish.

Operationally, we reproduce the study by Barcellos et al. [3] blocking the cortisol elevation through metyrapone pre-stress treatment, aiming to verify if the chemical communication was maintained when donor fish were not able to increase cortisol. In addition to this metyrapone intervention, which acts directly in the enzymatic cascade that culminates in cortisol production [5-6], we also tested if donor fish with the HPI axis impaired by endocrine disruptors agricultural chemicals [7-8-9] is capable to communicate stressful situations.

2. Material and Methods

2.1. Ethical note

This study was approved by Ethics Commission for Animal Use (CEUA) (Protocol 003/2011-CEUA, July 2009) of the University of Passo Fundo (UPF), Passo Fundo, RS, Brazil, and the guidelines of the Brazilian College for Animal experimentation (COBEA; <http://www.cobea.org.br>).

2.2. Fish

We used 350 mixed sex (50:50) 90-day old jundiá, a *Siluridae* catfish *Rhamdia quelen*, weighing 11.72 ± 2.12 g. Fish were fed twice a day (10:00 / 16:00h) at a rate of 5% of body weight, extruded feed (42 % crude protein, 3400 Kcal Kg⁻¹ digestive energy, DE), during the period of adaptation and experimentation.

The fish were distributed in 12 fiberglass boxes (50 L⁻¹ water) interconnected in closed water recirculation system with constant aeration and natural photoperiod (Fig. 1 A). Water parameters were maintained at: temperature 25 ± 2 °C; pH 6.9 ± 0.2 ; dissolved oxygen 6.5 ± 0.6 mg L⁻¹; total ammonia 0 mg L⁻¹.

2.3. Experimental design

Based on our previous results on stress generalization recirculating water systems [3], the 1st experiment aimed to answer the question: Do chemical communication of handling

stress occurs in fish reared in recirculating water systems? (Fig. 1B). In this experiment, we stressed donor fish and 15, 30, 60, 120 and 240 minutes after measured whole-body cortisol in donor and target fish (see scheme in Figure 1A). The standard stressor was the persecution with pen net, previous validated for jundiá [10].

Based on the results of the 1st experiment and previous data [3-4], the 2nd experiment aimed to answer the question: What is the role of cortisol in the chemical communication of stress in fish reared in recirculating water systems? For this purpose, we blocked cortisol increase with 8h pre-stress Metyrapone injection (30 μ l 100 g⁻¹ [11-12]) comparing with the saline injected group 0.9% (30 μ l 0.9 % saline solution).

In the 3rd experiment, fish were exposed to agrochemicals for 96 h and subjected to stress. The agrochemicals tested were previously pointed as disruptors of the fish stress response [7-8-9]. We exposed jundiá to the insecticide Methyl Parathion 0.80 mg L⁻¹ (MPBI, Folisuper 600 TM, 600 g L⁻¹), to fungicide Tebuconazole 0.88 mg L⁻¹ (TBF Folicur 200 CE TM, 200 g L⁻¹), to 1.21 mg L⁻¹ of a Glyphosate-based herbicide (GBH, Roundup Original TM, 360 g L⁻¹) and to an Atrazine + simazine based herbicide (1.74 mg L⁻¹, ASBH, Herbimix TM, 450 g L⁻¹). The concentration of each agrochemical in water was performed in the previous study [9] showing the persistence of agrochemicals in water.

Blood collection for later cortisol analysis was performed 30 minutes after stressor stimuli in all samplings.

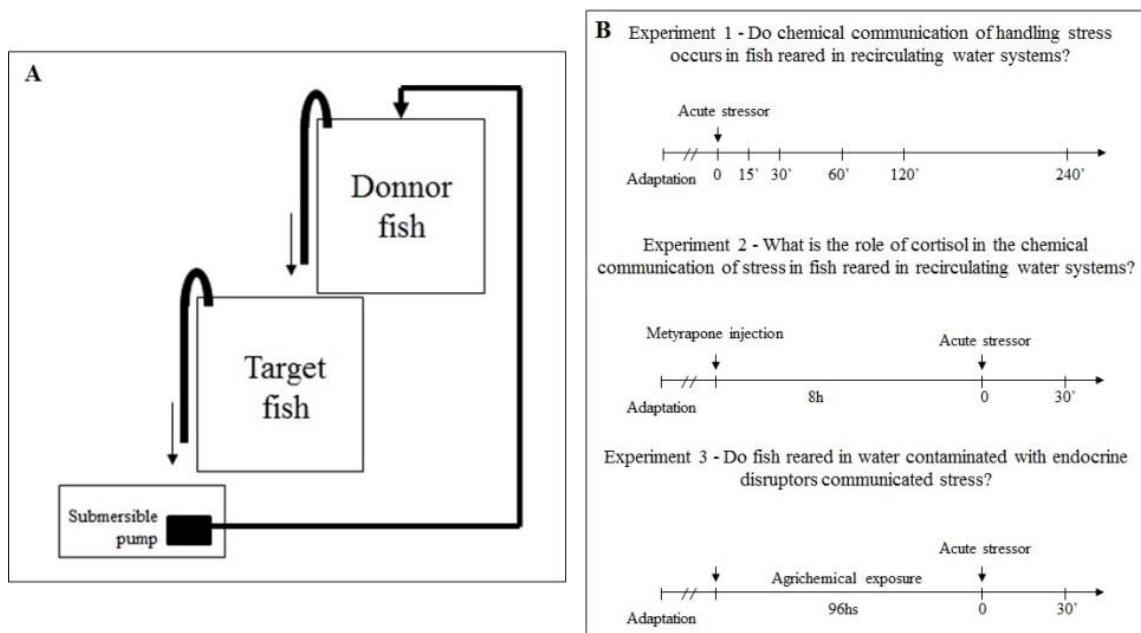


Fig. 1. (A) Schematic representation of experimental setup and (B) experimental design of the three experiments.

2.4. Blood sampling and cortisol

For analysis of cortisol levels fish were captured and anesthetized with buffered (NaH₂CO₃) MS 222 (30 mg L⁻¹). After complete immobilization, blood samples (0.1-0.30 mL) were taken from the caudal peduncle with sterile syringes. Fish were killed by spinal section, performed immediately after blood collection. The blood was placed in microcentrifuge tubes and centrifuged at 3000 rpm for a min for 10 min, the resulting plasma was stored at -25 °C until analysis. With validated ELISA's kit (EIAgen™ Cortisol Adaltis Italy S.p.A.) with measured in duplicate the blood plasma cortisol.

2.5 Statistics

Data are presented as the mean ± SEM values for each group, calculated using the GraphPad InStat 3.00 statistical package (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). The cortisol concentration in each stress test were compared using an analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey's test. The homogeneity of variance was determined using Hartley's test, and normality was determined using the Kolmogorov–Smirnov test. Differences with p values <0.05 were considered statistically significant.

3. Results

Experiment 1: Do chemical communication of handling stress occurs in fish reared in recirculating water systems?

Yes, fish chemically communicates stressful situations to their conspecifics through the water. Donnor fish increased cortisol 15 minutes after the stress stimulus, remaining elevated until 30 min (Fig. 2). Target fish elevates cortisol at 30 min (P <0.05). In the both 15 and 30 minutes sampling, the cortisol concentration of target fish was lower than ones from donnor group (P <0.05). After 60 min both donnor and target fish presented decreases cortisol concentrations similar to prestress values. These baseline values remained for 120 and 240 min (P <0.05).

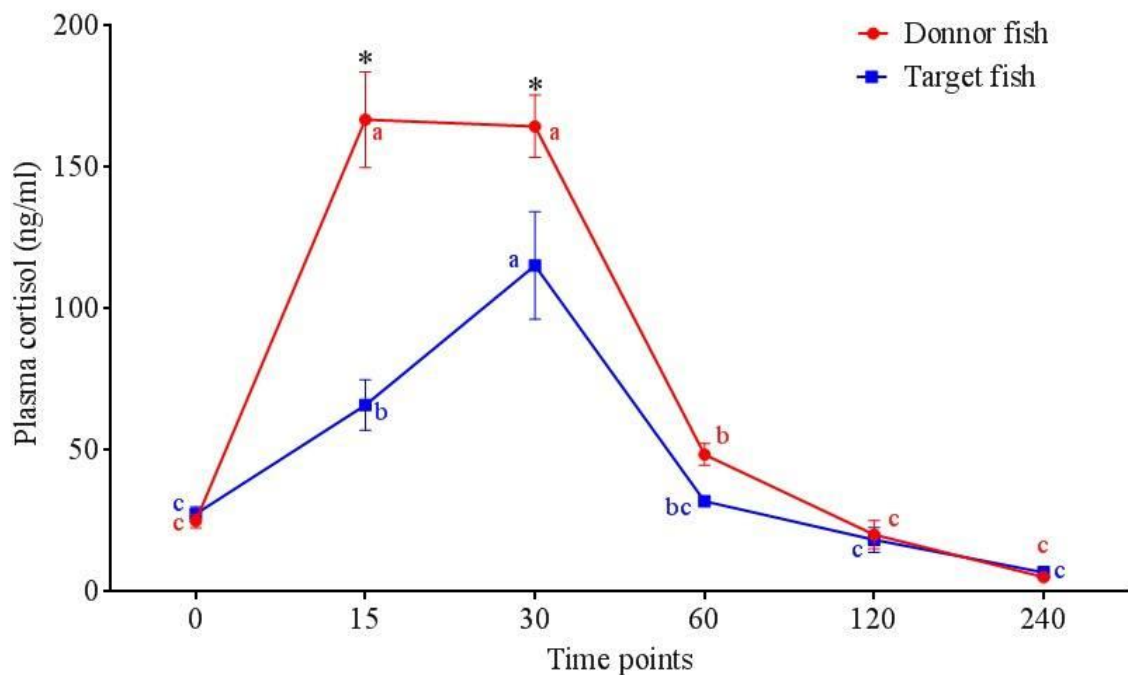


Figure 2. Plasmatic levels of cortisol in *Rhamdia quelen* submitted to an acute stress (donor) and that receive water from the stressed fish (target). Data were expressed as mean \pm SEM of 12 fish and compared by two-way ANOVA followed by Tukey's multiple range test. The asterisks indicate statistic differences between Donnor and Target fish in the specific time points. Different red and blue letters indicate the time course differences within Donnor and Target cortisol curves. $P < 0.05$.

Experiment 2: What is the role of cortisol in the chemical communication of stress in fish reared in recirculating water systems?

Based on data from donor and target fish, the communication of the stress event does not depend on cortisol increase. In Metyrapone treated donor fish, cortisol values were lower than ones measured in stressed and saline injected fish. This pattern did not occur in target fish indicating that chemical communication of stress occurred in a similar manner.

Experiment 3 - Do fish reared in water contaminated with hypothalamus-pituitary-interrenal endocrine disruptors (HPI-ED) communicated stress?

No. When challenged with agrochemicals fish no elevates cortisol (TBF and MPBI) or presented a blunted cortisol response, higher than control values but lower than stressed non-exposed fish (GBH and ASBH) (Figure 4). In target fish, only those that receive water from ASBH-exposed donors remained with the ability to communicate the stress occurrence ($P < 0.05$).

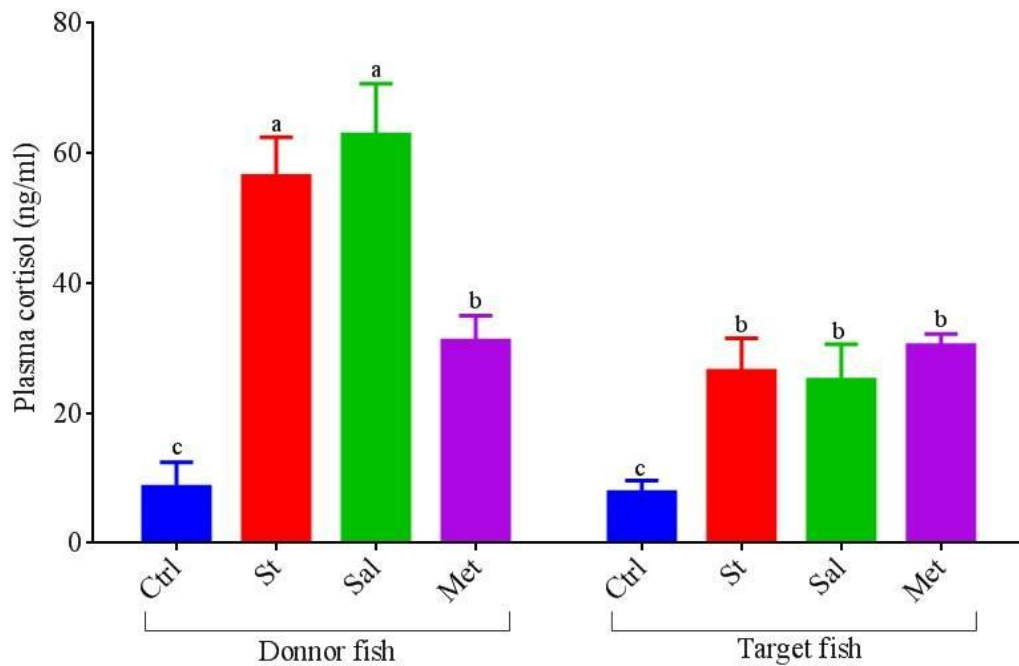


Figure 3. Plasmatic levels of cortisol of stressed *Rhamdia quelen* treated with metyrapone (Donnor fish) and fish receiving water from stressed ones (Target fish). Data were expressed as mean \pm SEM of 12 fish and compared by two-way ANOVA followed by Tukey's multiple range test. Different letters indicate statistic differences between means. $P < 0.05$

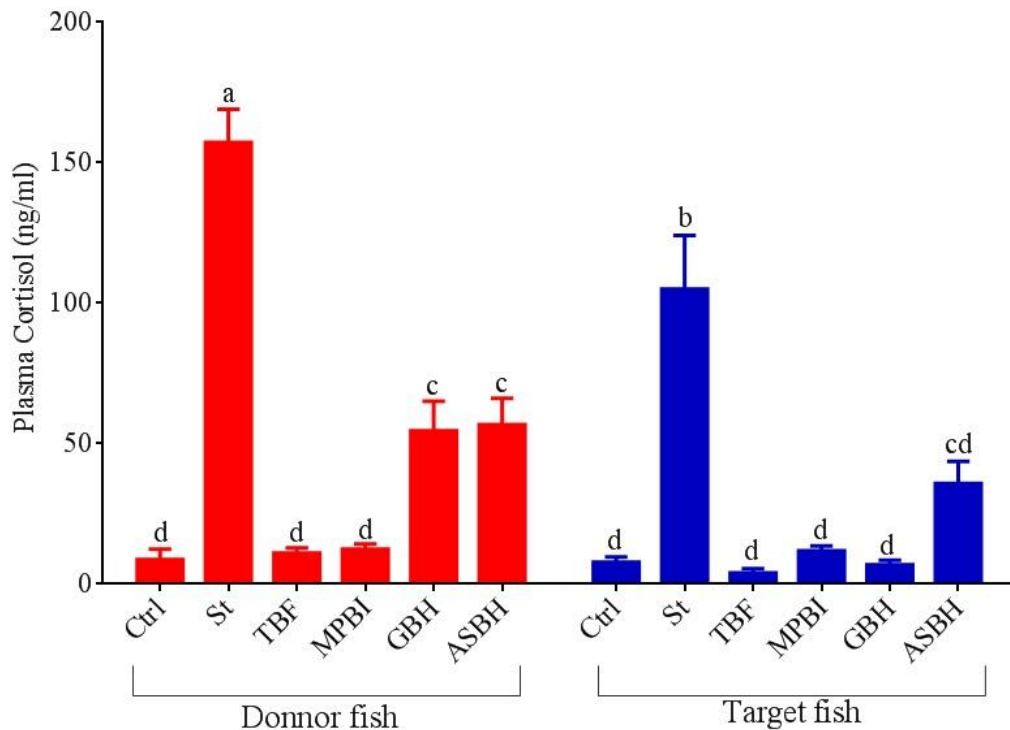


Figure 4. Plasmatic levels of cortisol of stressed *Rhamdia quelen* exposed to different agricultural chemicals (Donnor fish) and fish receiving water from stressed ones (Target fish). Data were expressed as mean \pm SEM of 12 fish and compared by two-way ANOVA followed by Tukey's multiple range test. Different letters indicate statistic differences between means. $P < 0.05$.

4. Discussion

Here we show that stressed fish (Donor) chemically communicate this stressful situation to undisturbed fish housed in another tank (Target) as we found in our previous study (Barcellos et al., 2011). This communication seems to be an adaptive mechanism aiming to anticipate risky situations [3-4-13].

We also show that Metyrapone-treated donor fish did not increase their cortisol levels, but maintain the communication to target fish, reinforcing our previous findings that chemical communication of stress does not depend on cortisol increase [2]. The similarity of the present results with the nocturnal *Siluridae* fish *Rhamdia quelen* with those obtained in the active and diurnal *Cyprinidae* fish *Danio rerio* also points to the importance of this phenomena since it occurred in two phylogenetically distant species reinforcing the adaptive value of such a strategy and conservation of a complex mechanism.

Another interesting finding is that when donor fish were exposed to endocrine disruptor agrichemicals [7-8-9], the communication of stress to target fish was blocked.

When we examine the results obtained in these both situations (Metyrapone-treated and agrichemical-exposed fish), we hypothesized the involvement of HPI axis but not directly via cortisol. In fact, the most plausible hypothesis is that Metyrapone-treated fish triggers its HPI reaction to stress but not elevated cortisol since this step was prevented by the Metyrapone administration. This suggests that other steps or substances involved in the HPI activation were responsible for the chemical communication of stress. Probably, some signaling substances are released acting as disturbance cues, including those involved in brain steps as the immediate release of catecholamines after stress events [14]. In addition, the Metyrapone blockage of cortisol synthesis occurs due to inhibition of the enzyme 11 β hydroxylase of P450 cytochrome [6] responsible for converting the 11-deoxycortisol in cortisol [5]. The Metyrapone did not affect the expression of several key genes in the steroidogenic pathway as the steroidogenic acute regulatory protein (StAR), the precursor pro-opiomelanocortin POMC, the brain glucocorticoid receptor (BGR) and the corticotrophin releasing factor (CRF).

This hypothesis is reinforced by the results from agrichemical-exposed fish that seems to be not trigger the stress reaction due to the impaired HPI axis [4-7-8-9-15-16-17]. In fact, exposure to the endocrine disruptor agrichemical methyl-parathion blocks the activation of these genes [17].

Taken together the present and previous results [2-3-9] we secure to propose that the chemical communication of stress is not related to cortisol increase, but depends on the HPI axis activation.

After this disposition, a new question arose: What is the impact of the impaired chemical communication of stress situations? Considering that the fish communication is very important in some biological processes as reproduction [18-19-20-21], prey-predator relationship [22-23-24] and also to communicate stressful conditions [3], the blockage of this communication did not permit that fish anticipate these situations.

Specifically in the case of stress communication, since the corticosteroids play key role in the homeostatic processes (14; Aluru et al., 2005), a fish with an impaired HPI axis responsiveness and, consequently, with no capacity to increase cortisol may lose the ability to stimulate the metabolic and ionic adjustments necessary to cope with stress (Hontela, 1998).

References

- [1] R. E. BARRETO, C. A. Miyai, F.H.C. Sanches, P.C. Giaquinto, H. C. Delicio, G.L. Volpato, 2013. Blood cues induce antipredator behavior in Nile tilapia conspecifics. PLoS ONE, 8 (2013) e54642.
- [2] L. J. G. Barcellos, G. Koakoski, J. G. S. Rosa, D. Ferreira, R. E. Barreto, P. C. Giaquinto, G. Volpato, Chemical communication of predation risk in zebrafish does not depend on cortisol increase. Scientific Reports, 4 (2014) 50-76.
- [3] L. J. G. Barcello, G. L. Volpato, R. E. Barreto, I. Coldebella, D. Ferreira, Chemical communication of handling stress in fish. Physiology & Behavior, 103 (2011) 372-375.
- [4] T. A. Oliveira, G. Koakoski, L. C. Kreutz, D. Ferreira, J. G. S. Rosa, M. S. Abreu, A. C. V. Giacomini, R. P. Oliveira, M. Fagundes, A. L. Piato, R. E. Barreto, L. J. G. Barcellos, Alcohol impairs predation risk response and communication in zebrafish. PLoS One, 8 (2013) e 75780.
- [5] D.G. Williamson and V. J. O'Donnell, Interaction of metopyrone with adrenal mitochondrial cytochrome P-450. Mechanism for the inhibition of adrenal steroid 11.beta.-hydroxylation. Biochemistry, 8 (1969) 1306-1311.
- [6] B.P. Schimmer and K. L. Parker. Adrenocorticotrophic hormone; adrenocortical steroids and their synthetic analogs; inhibitors of the synthesis and actions of adrenocortical hormones. The Pharmacological Basis of Therapeutics, (1996) 1459-1485.
- [7] L. Cericato, R. M. Quevedo, J. Finco, J. G. S. Rosa, G. Koakoski, L. Centenaro, E. Pottker, D. Anziliero, L. J. G. Barcellos, Cortisol response to acute stress in jundiá *Rhamdia quelen* acutely exposed to sub-lethal concentrations of agrichemicals. Comp Biochem Physiol, 148 (2008) 281-286.
- [8] L. Cericato, J. G. M. Neto, L. C. Kreutz, R. M. Quevedo, J. G. S. Rosa, G. Koakoski, L. Centenaro, E. Pottker, A. Marqueze, L. J. G. Barcellos, 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. C 149 (2009) 363-367.

- [9] G. Koakoski, R. M. Quevedo, D. Ferreira, T. A. Oliveira, J. G. S. Rosa, M. S. Abreu, D. Gusso, A. Marqueze, L. C. Kreutz, A. C. V. Giacomini, M. Fagundes, L. J. G. Barcellos, Agrochemicals chronically inhibit the cortisol response to stress in fish. *Chemosphere*, 112 (2014) 85-91.
- [10] L. J. G. BARCELLOS, L. C. Kreutz, R. M. Quevedo, I. Fioreze, L. Cericato, A. B. Soso, M. Fagundes, J. Conrad, R. K. Baldissera, A. Bruschi, F. Ritter, Nursery rearing of jundiá, *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard) in cages: cage type, stocking density and stress response to confinement. *Aquaculture*, 232 (2004) 383-394.
- [11] S. K. Eros and C. L. Milligan, The Effect of Cortisol on Recovery from Exhaustive Exercise in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*): Potential Mechanisms of Action. *Physiological Zoology*, 69 (1996) 1196-1214.
- [12] G. Tripathi and P. Verma, Pathway-specific response to cortisol in the metabolism of catfish. *Comparative Biochemistry and Physiology* 136 (2003) 463-471.
- [13] I. Olivotto, G. Mosconi, F. Maradonna, M. Cardinali, O. Carnevali, *Diplodus sargus* interrenal-pituitary response: chemical communication in stressed fish. *General and Comparative Endocrinology*, 127 (2003) 66-70.
- [14] S. E. Wendelaar Bonga, The stress response in fish. *Physiol. Rev.* 77 (1997) 591-625.
- [15] A. Lister, C. Regan, J. Van Zwol, G. Van Der Kraak, Inhibition of egg production in zebrafish by fluoxetine and municipal effluents: a mechanistic evaluation. *Aquat Toxicol*, 4 (2009) 320-329.
- [16] L. Rocco, A. Izzo, G. Zito, C. Peluso, V. Stingo, Genotoxicity in Zebrafish (*Danio rerio*) Exposed to two Pharmacological Products from an Impacted Italian River. *Journal of Environment and Analytical Toxicology*, Open access (2011)
- [17] J. G. S. Rosa, G. Koakoski, A. L. Piato, L. C. Kreutz, M. Fagundes, A. Marqueze, L. J. G. Barcellos, Impairment of cortisol response to stress in zebrafish acutely exposed to methylparathion. *J. Environ. Sci. Technol.* 6 (2013) 57-62.
- [18] C. Smadja, R. K. Butlin, On the scent of speciation: the chemosensory system and its role in premating isolation. *Heredity*, 102 (2009) 77-97.
- [19] P. W. Sorensen and N. E. Stacey, Brief review of fish pheromones and discussion of their possible uses in the control of non-indigenous teleost fishes. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 38 (2010) 399-417.
- [20] K. Wong, M. Elegante, B. Bartels, S. Elkhayat, D. Tien, S. Roy, J. Goodspeed, C. Suci, J. Tan, C. Grimes, A. Chung, M. Rosenberg, S. Gaikwad, A. Denmark, A. Jackson, F. Kadri, K. M. Chung, A. Stewart, T. Gilder, E. Beeson, I. Zapolsky, N. Wu, J. Cachat, A. V. Kalueff, Analyzing habituation responses to novelty in zebrafish (*Danio rerio*), 208 (2010) 450-457.
- [21] M. Milinski, The Major Histocompatibility Complex, Sexual Selection, and Mate Choice *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 37 (2006) 159-186.
- [22] R. E. Blaser, R. Gerlai, Behavioral phenotyping in zebrafish: Comparison of three behavioral quantification methods. *Behavior Research Met.*, 38 (2006) 456-469.
- [23] R. J. Egan, C. L. Bergner, P. C. Hart, J. M. Cachat, P. R. Canavello, M. F. Elegante, S. I. Elkhayat, B. K. Bartels, A. K. Tien, D. H. Tien, S. Mohnot, E. Beeson, E. Glasgow, H. Amri, Z. Zukowska, A. V. Kalueff, Understanding behavioral and physiological phenotypes of stress and anxiety in zebrafish. *Behav Brain Res*, 205 (2009) 38-44.
- [24] B. B. Griffiths, P. J. Schoonheim, L. Ziv, L. Voelker, H. Baier, E. Gahtan, A zebrafish model of glucocorticoid resistance shows serotonergic modulation of the stress response. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 6 (2012) 1-10.
- [25] N. Aluru, Ah receptor-mediated impairment of interrenal steroidogenesis involves StAR protein and P450scc gene attenuation in rainbow trout. *Toxicol. Sci.*, 84, (2005) 260-269.
- [26] Hontela, A., 1998. Interrenal dysfunction in fish from contaminated sites: in vivo and in-vitro assessment. *Environ. Toxicol. Chem.* 17, 44-48.

3. DISCUSSÃO

A função da interrenal é afetada adversamente por exposições agudas aos agroquímicos (PACHECO & SANTOS, 1996; SANTOS & PACHECO, 2001). Esta interrupção endócrina causada por exposições agudas foi verificada (CERICATO et al., 2008) em jundiás expostos ao metil-paration, à combinação de atrazina/simazina e ao glifosato. Utilizando teste de sensibilidade ao ACTH, Cericato et al (2009) verificou que o local de ação de alguns destes tóxicos é na interrenal (metil-paration e tebuconazole) e de outros (atrazina/simazina e glifosato) é em pontos superiores do eixo HHI. Nós constatamos que a exposição aos agroquímicos durante a fase juvenil induziu inibição crônica da liberação de cortisol em resposta ao estresse. Após 96 hs de exposição aos agroquímicos os peixes não apresentaram resposta de estresse e conseqüentemente não comunicaram quimicamente o evento estressante, evidenciando que a presença de contaminantes na água pode ocasionar uma interrupção endócrina (CERICATO et al., 2008; 2009; LISTER et al., 2009; ROCCO et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2013; ROSA et al . 2013; KOAKOSKI et al., 2014), modificando respostas necessárias para o equilíbrio e sobrevivência das espécies do sistema aquático.

A comunicação química dos peixes, entre coespecíficos é de extrema relevância ambiental, tanto na reprodução (WONG et al., 2005; MILINSKI, 2006; SMADJA E BUTLIN, 2009; SORENSEN E STACEY, 2004), quanto na presença de risco de predação (BARCELLOS et al., 2007; 2010; 2011; 2014; BARRETO et al., 2013), ampliando está informação ao grupo em relação ameaça eminente, para manutenção da espécie.

As substâncias químicas liberadas na água pelos peixes, ainda não são conhecidas, mas provocam generalização de estresse em sistemas de recirculação fechado (BARCELLOS et al., 2011). Nós verificamos que o efeito destas substâncias químicas na água foi de 120 min, período suficiente para reconhecer o estímulo estressor e restabelecer a homeostase do organismo em níveis basais de cortisol plasmático (ALURU & VIJAYAN, 2006; ALURU et al., 2005).

Quando os peixes foram desafiados com metirapona (atua sobre a enzima citocromo P₄₅₀, responsável pela 11 β -hidroxilação, inibindo assim a conversão do 11-desoxicortisol em cortisol) bloqueando o eixo HHI, os peixes doadores não elevaram cortisol plasmático após estímulo estressor, mas comunicaram estresse a peixes alvo, indicando que a situação leva a liberação de substâncias distúrbio na água por peixes doadores, não dependo da liberação de cortisol para comunicar quimicamente o evento estressante, mas precisando da ativação do eixo hipotálamo-hipófise-interrenal. Supondo que a liberação de substâncias distúrbio

antecede o aumento do cortisol, podendo estar relacionado com processos cerebrais hipotalâmicos e ou hipofisários, sem precisar do estímulo na inter-renal (BARCELLOS et al., 2014).

Mecanismos de ação têm sido estudados, e propostos como causadores de bloqueio no eixo HHI, tendo como consequência final a inabilidade do organismo em elevar cortisol em resposta a estressores. Especificamente no tecido interrenal, alguns autores demonstraram o bloqueio da expressão de uma proteína chave na cascata de síntese do cortisol, a StAR (*steroidogenic acute regulatory protein*) (HONTELA, 2006; GRAVEL e VIJAYAN, 2006; ALURU, et al., 2005). Essa proteína promove a entrada do colesterol na mitocôndria e sua transferência para o sítio ativo da P450 *side chain cleavage* (P450scc) com a consequente conversão do colesterol em pregnenolona e posteriormente conversão em cortisol via hidroxilases (MOMMSEN et al., 1999). Efeitos na hipófise, mais especificamente no receptor de glicocorticóide cerebral (BGR), onde se liga o CRH (hormônio liberador de corticotrofina) foram relatados por Hontela (2006) e Gravel; Vijayan (2006). Descrições de efeitos no hipotálamo não foram encontrados na literatura revisada.

Destaco que os agroquímicos na água interferem na fisiologia natural dos peixes frente à estressores. A metirapona bloqueou a última enzima da cascata de síntese do cortisol, evidenciando que a comunicação de estresse não depende da elevação de cortisol, mas sim da ativação do eixo que coordena sua síntese. Com estes resultados direcionamos nossos estudos futuros para ação dos agroquímicos sobre o tecido inter-renal e a substância responsável pela comunicação de estresse na água.

4. CONCLUSÃO

Todos os agroquímicos testados causaram inibição da resposta de cortisol e da comunicação química de estresse nos peixes.

A exposição aguda a concentração sub-letal do inseticida metil-paration e do fungicida tebuconazole, provocou uma inibição crônica da resposta ao estresse em peixes.

Os peixes expostos ao inseticida metil-paration, herbicida atrazine+simazine e glifosato, apresentaram menor taxa de sobrevivência e menor do ganho de peso.

Os agroquímicos na água interferem na fisiologia natural dos peixes frente à estressores.

Mesmo com o eixo hipotálamo-hipófise-interrenal bloqueado pela metirapona os peixes doadores comunicaram o estresse aos peixes alvo, não dependendo do aumento de cortisol, mas precisando da ativação do eixo hipotálamo-hipófise-interrenal.

A metirapona bloqueou a última enzima da cascata de síntese do cortisol, evidenciando que a comunicação de estresse não depende da elevação de cortisol, mas sim da ativação do eixo que coordena sua síntese.

A exposição aguda a concentração sub-letal do inseticida metil-paration e do fungicida tebuconazole, provocou uma inibição crônica da resposta ao estresse em peixes. E os peixes expostos ao inseticida metil-paration, herbicida atrazine+simazine e glifosato, apresentaram menor taxa de sobrevivência e menor do ganho de peso. Todos os agroquímicos testados causaram inibição da resposta de cortisol e da comunicação química de estresse nos peixes. Mesmo com o eixo hipotálamo-hipófise-interrenal bloqueado pela metirapona os peixes doadores comunicaram o estresse aos peixes alvo, não dependendo do aumento de cortisol, mas precisando da ativação do eixo hipotálamo-hipófise-interrenal.

Com estes resultados estudos futuros serão direcionados para ação dos agroquímicos sobre o tecido inter-renal e a substância responsável pela comunicação de estresse na água.

REFERÊNCIAS

- ALURU, N.; VIJAYAN, M.M. Aryl hydrocarbon receptor activation impairs cortisol response to stress in rainbow trout by disrupting the rate-limited steps in steroidogenesis. **Endocrinology**, v. 147, p. 1895 - 1903, 2006.
- ALURU, N. et al. Ah receptor-media ted impairment of interrenal steroidogenesis involves StAR protein and P450_{scc} gene attenuation in rainbow trout. **Toxicol. Sci.**, v. 84, p. 260 - 269, 2005.
- BARCELLOS, L. J. G. et al. Chemical communication of predation risk in zebrafish does not depend on cortisol increase. **Scientific Reports**, v. 4, p. 50 - 76, 2014.
- BARCELLOS, L. J. G. et al. Chemical communication of handling stress in fish. **Physiology & Behavior**, v. 103, p. 372 - 375, 2011.
- BARCELLOS, L. J. G. et al. Can Zebrafish *Danio rerio* learn about predation risk? The effect of a previous experience on the cortisol response in subsequent encounters with a predator. **Journal of Fish Biology**, v. 76, p. 1032 - 1038, 2010.
- BARCELLOS, L. J. G. et al. Whole-body cortisol increases after direct and visual contact with the predator in zebrafish, *Danio rerio*. **Aquaculture**, v. 272, p. 774 - 778, 2007.
- BARCELLOS, L. J. G. et al. The effect of color illumination on jundiá (*Rhamdia quelen*, Quoy & Gaimard, Heptapteridae) stress response. **Ciê. Rural**, v. 36, p. 1249 - 1252, 2006 b.
- BARCELLOS, L. J. G. et al. Previous chronic stress does not alter the cortisol response to an additional acute stressor in jundiá (*Rhamdia quelen*, Quoy & Gaimard) fingerlings. **Aquaculture**, v. 253, p. 317 - 321, 2006 a.
- BARCELLOS, L. J. G. et al. Hematological changes in jundiá (*Rhamdia quelen* Quoy & Gaimard Pimelodidae) provoked by usual aquaculture practices, with emphasis on immunosuppressive effects. **Aquaculture**, v. 237, p. 229 - 236, 2004 b.
- BARCELLOS, L. J. G. et al. Nursery rearing of jundiá, *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard) in cages: cage type, stocking density and stress response to confinement. **Aquaculture**, v. 232, p. 383 - 394, 2004 a.
- BARCELLOS, L. J. G. et al. Haematological and biochemical characteristics of male jundiá (*Rhamdia quelen* Quoy & Gaimard Pimelodidae) and hormonal and biochemical changes after acute stress. **Aquac.Res.**, v. 34, p. 1465 - 1469, 2003.
- BARCELLOS, L. J. G. et al. Plasma steroid concentrations in relation to the reproductive cycle of cultured male *Rhamdia quelen*. **J.Fish Biol.**, v. 61, p. 751 - 763, 2002.
- BARCELLOS, L. J. G. et al. Steroid profiles of cultured female jundiá, the Siluridae *Rhamdia quelen* (Quoy and Gaimard, Pisces, Teleostei) during the first reproductive cycle. **Gen.Comp. Endocrinol.**, v. 121, p. 325 - 332, 2001 b.

- BARCELLOS, L. J. G. et al. Plasma levels of cortisol and glucose in response to capture and tank transference in *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard), a South American Catfish. **Aqua. Res.**, v. 32, p. 123 - 125, 2001 a.
- BARRETO, R. E. et al. Blood cues induce antipredator behavior in Nile tilapia conspecifics. **PLoS ONE**, v. 8, p. e54642, 2013.
- BARTON, B. A. Stress in fishes: a diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. **Integr. Comp. Biol.**, v. 42, p. 517 – 525, 2002.
- BARTON, B. A.; IWAMA, G.K. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. **Ann. Rev. Fish Diseases**, v. 10, p. 3-26, 1991.
- BELLO, A. R. et al. Lipid peroxidation induced by *Clinostomum detrunctum* in muscle of the freshwater fish *Rhamdia quelen*. **Dis. Aquat. Org.**, v. 42, p. 233 – 236, 2000.
- BERENZEN. N.; KUMKE, T.; SCHULZ, H.K.; SCHULZ. R. Macroinvertebrate community structure in agricultural streams: impact of runoff-related pesticide contamination. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 60, p. 37 – 46, 2005.
- BLANC-LAPIERRE, A. et al. Cognitive Disorders and Occupational Exposure to Organophosphates: Results From the PHYTONER Study. **American Journal of Epidemiology**, v. 177, p. 1086–1096, 2013.
- BOCQUENE, G. e FRANCO, A. Pesticide contamination of the coastline of Martinique. **Marine Pollution Bulletin**, v. 51, p. 612 – 619, 2005.
- BRODEUR, J.C., SHERWOOD, G., RASMUSSEN, J.B., HONTELA, A. Impaired cortisol secretion in yellow perch (*Perca flavescens*) from lakes contaminated by heavy metals: in vivo and in vitro assessment. **Canadian Journal of Aquatic Sciences**, v. 54, p. 2752 - 2758, 1997.
- CARVALHO, C. S., FERNANDES, M. N. Effect of temperature on copper toxicity and hematological responses in the neotropical fish *Prochilodus scrofa* at low and high pH. **Aquaculture**, v. 251, p. 109 - 117, 2006.
- CERICATO, L. et al. Cortisol response to acute stress in jundiá *Rhamdia quelen* acutely exposed to sublethal concentrations of agrichemicals. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. p. 148, 281 – 286, 2008.
- CERICATO, L. et al. Responsiveness of the interrenal tissue of Jundiá (*Rhamdia quelen*) to an in vivo ACTH test following acute exposure to sublethal concentrations of agrichemicals. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 149, p. 363 – 367, 2009.
- CHAIM, A. et al. Deposição de agrotóxicos pulverizados na cultura da maçã. **Pesq. Agropec. bras.** v. 38, n. 7, 2003.
- COSTA, O. F. T. et al. Susceptibility of the Amazonian fish, colossoma macropomum (serrasalminae) to short-term exposure to nitrite. **Aquaculture**, v. 232, p. 627 - 636, 2004.

- DORVAL, J. et al. Oxidative stress and endocrine endpoints in white sucker (*Catostomus commersoni*) from a river impacted by agricultural chemicals. **Environ. Toxicol. Chem.**, v. 24, p. 1273 - 1280, 2005.
- FIGLIARO, I. et al. Instalações para o policultivo. In: Barcellos, L.J.G. (ed.) *Policultivo de Jundiás, Tilápias e Carpas: uma alternativa para a piscicultura Rio-grandense*. **Passo Fundo: Editora da UPF**, v. 1, p. 127, 2006.
- GLOZIER, N. E. et al. Occurrence of glyphosate and acidic herbicides in select urban rivers and streams in Canada, 2007. **Environ Sci Pollut Res**, v. 19, p. 821 – 834, 2012
- GLUSCZAK, L. et al. Acute effects of glyphosate herbicide on metabolic and enzymatic parameters of silver catfish (*Rhamdia quelen*). **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 146, p. 519 - 524, 2007.
- GRAVEL, A. et al. Disruption of the hypothalamo-pituitary-interrenal axis in 1 + yellow perch (*Perca flavescens*) chronically exposed to metals in the environment. **Can. J. Fish. Aquat. Sci.**, v. 62, p. 982 - 990, 2005.
- GRAVEL, A.; VIJAYAN, M. M. Salicylate disrupts interrenal steroidogenesis and brain glucocorticoid receptor expression in rainbow trout. **Toxicol. Sci.** V. 93, p. 41 - 49, 2006.
- GOMES, L.C. et al. *Biologia do jundiá Rhamdia quelen (Teleostei, Pimelodidae)*. **Ciência Rural**, v.30, p.179 - 185, 2000.
- HONTELA A. Corticosteroidogenesis and StAR protein of rainbow trout disrupted by human-use pharmaceuticals: data for use in risk assessment. **Toxicological Science**, v. 37, p. 356, 2006.
- HONTELA, A. Interrenal dysfunction in fish from contaminated sites: in vivo and in vitro assessment. **Environ. Toxicol. Chem.**, v. 17, p. 44 - 48, 1998.
- JIRAUNGKOORSKUL, W. et al. Histopathological Effects of Roundup, a Glyphosate Herbicide, on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Science Asia**, v. 28, p. 121 - 127, 2002.
- JOBLING, S.; TYLER, C. R. Endocrine disruption in wild freshwater fish. **Pure Appl. Chem.**, v. 75, p. 2219 - 2234, 2003.
- JORGENSEN. E. H., VIJAYAN, M. M., ALURU, N., MAULE, A. G. Fasting modifies Aroclor 1254 impact on plasma cortisol glucose, and lactate response to a handling disturbance in Arctic charr. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 132, p. 235 - 245, 2002.
- KOAKOSKI, G., et al. Agrochemicals chronically inhibit the cortisol response to stress in fish. **Chemosphere**, v. 112, p. 85 - 91, 2014.
- KREUTZ, L. C. et al. Acute toxicity testing of agricultural pesticides on silver catfish (*Rhamdia quelen*), fingerlings. **Ciência Rural**, v. 38, p. 1050 – 1055, 2008.

LAPPIVAARA, J. Effects of acute handling stress on whitefish *Coregonus lavaretus* after prolonged exposure to biologically treated and untreated bleached kraft mill effluent. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 41, p. 55 - 64, 2001.

LAZZARI, R. et al. Diferentes fontes protéicas para a alimentação do jundiá (*Rhamdia quelen*). **Ciência Rural**, v. 36, p. 240 - 246, 2006.

LEVESQUE, H. M. et al. Hormonal, morphological, and physiological responses of yellow perch (*Perca flavescens*) to chronic environmental metal exposure. **J. Toxicol. Environ. Health.**, v. 66, p. 657 - 676, 2003.

LOOS, R., LOCORO, G., CONTINI, S. Occurrence of polar organic contaminants in the dissolved water phase of the Danube River and its major tributaries using SPE-LC-MS2 analysis. **Water Research**, v. 44, p. 2325 - 2335, 2010.

MILINSKI, M. The Major Histocompatibility Complex, Sexual Selection, and Mate Choice Annual Review of Ecology. **Evolution, and Systematics**, v. 37, p. 159 - 186, 2006.

MILLIGAN, C. L. A regulatory role for cortisol in muscle glycogen metabolism in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. **Walbaum The Journal of Experimental Biology** v. 206, p. 3167 - 3173, 2003.

MOMMSEN, T. P. et al. Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. **Rev. Fish Biol. Fish.**, v. 9, p. 211 - 268, 1999.

OBA, E. T., MARIANO, W. S., SANTOS, L. R. B. Estresse em peixes cultivados: agravantes e atenuantes para o manejo rentável. **Embrapa Amapá, Macapá**, cap. 8, 2009.

OLIVEIRA, T. A. et al. Alcohol impairs predation risk response and communication in zebrafish. **PLoS One**, v. 8, p. 75 - 80, 2013.

PACHECO, M.; SANTOS, M.A. Biotransformation, endocrine, and genetic responses of *Anguilla anguilla* L. to petroleum distillate products and environmentally contaminated waters. **Ecotox. Environ. Saf.**, v. 49, p. 64 - 75, 2001.

PACHECO, M.; SANTOS, M. A. Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in the erythrocytes of *Anguilla anguilla* L. exposed either to cyclophosphamide or to bleached kraft pulp mill effluent. **Fresenius Environ. Bull.**, v. 5, p. 746 - 751, 1996.

PAYNE, A. H.; HALES, D. B. Overview of steroidogenic enzymes in the pathway, from cholesterol to active steroid hormones. **Endocr. Rev.**, v. 25, p. 947 - 970, 2004.

POTTINGER, T. J. Interaction of endocrine-disrupting chemicals with stress responses in wildlife. **Pure Appl. Chem.**, v. 75, p. 2321 - 2333, 2003.

RIGOTTO, R. M. et al. Estudo epidemiológico da população da região do baixo Jaguaribe exposta à contaminação ambiental em área de uso de agrotóxicos. **Tempus. Actas em Saúde Coletiva**, vol. 4, p. 142 - 143, 2009.

ROSA, J. G. S. et al. Impairment of cortisol response to stress in zebrafish acutely exposed to methyl-parathion. **J. Environ. Sci. Technol.** v. 6, p. 57 – 62, 2013.

SAGLIO, P., TRIJASSE, S. Behavioral Responses to Atrazine and Diuron in Goldfish. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 35, p. 484 - 491, 1998.

SAPOZHNIKOVA, Y., et al. Evaluation of pesticides and metals in fish of the Dniester River, Moldova. **Chemosphere**, v. 60, p. 196 – 205, 2005.

SCHIMMER, B. P.; PARKER, K. L. Hormônio Adrenocorticotrófico, esteróides adrenocorticais e seus análogos sintéticos, inibidores da síntese e das ações dos hormônios adrenocorticais. As Bases Farmacológicas da Terapêutica. 9 ed. **Mc Graw Hill Interamericana**, p. 1082 - 1102, 1996.

SILVA, L.B. et al. Alternative species for traditional carp polyculture in southern South. **Aquaculture**, v. 255, p. 417 - 428, 2006.

SILVA, L. B. et al. Introduction of jundia *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard) and Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (Linnaeus) increases the productivity of carp polyculture in southern. **Aqua. Res.**, v. 39, p. 542 - 551, 2008.

SMADJA, C., BUTLIN, R. K. On the scent of speciation: the chemosensory system and its role in premating isolation. **Heredity**, v. 102, p. 77 - 97, 2009.

SORENSEN, P. W. E STACEY, N. E. Brief review of fish pheromones and discussion of their possible uses in the control of non-indigenous teleost fishes. **New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research**, v. 38, p. 399 – 417, 2010.

SOSO, A. B. et al. Chronic exposure to sub-lethal concentration of a glyphosate-based herbicide alters hormones profiles and affects reproduction of female Jundiá (*Rhamdia quelen*). **Environ. Toxicol. Pharmacol.**, v. 23, p. 308 - 313, 2007.

SZAREK, J. et al. Effects of the herbicide Roundup on the ultrastructural pattern of hepatocytes in carp (*Cyprinus carpio*). **Mar. Environ. Res.**, v. 50, p. 263 – 266, 2000.

URBINATI, E. C., ABREU, J. S., CAMARGO, A. C. S., LANDINES, M. A. Loading and transport stress in juvenile matrinxã (*Brycon cephalus*) at various densities. **Aquaculture**, v. 229, p. 389 - 400, 2004.

VAN DER OOST, R. et al. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **J. Environ. Toxicol. Pharmacol.**, v. 13, p. 57 – 149, 2003.

WALTON, W.J. et al. Diurnal Fluctuations in Toxicity in Two Fish Species: *Gambusia affinis* and *Notropis ludibundis*. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.** v. 59, p. 414 - 421, 1997.

WENDELAAR BONGA, S.E. The stress response in fish. **Physiol. Rev.** v. 77, p. 591-625, 1997.

WILLIAMSON D.G. and V.J. O'DONNELL. The interaction of metopirone with adrenal mitochondrial cytochrome p - 450: a mechanism for the inhibition of adrenal steroid 1113 - hydroxylation. **Biochemistry**, v. 8, p. 1306 - 1311, 1969.

WONG, K. et al. Analyzing habituation responses to novelty in zebrafish (*Danio rerio*). **Behav Brain res**, v.208, p. 450 - 457, 2010.

ANEXO A



UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO
VICE-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA

PARECER Nº 012/2012

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade de Passo Fundo, em reunião no dia 20/04/12, analisou o projeto de pesquisa “**Alterações endócrinas e oxidativas sobre o eixo hipotálmo-hipofise-interrenal em jundiás: mecanismos de ação de defensivos agrícolas e persistência/recuperação destas alterações sobre a resposta ao estresse**”, registro na CEUA Nº 005/2012, de responsabilidade do pesquisador **Leonardo José Gil Barcellos**.

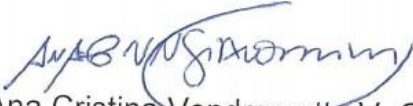
Em relação aos aspectos éticos, a Comissão considerou o estudo relevante e com relação custo-benefício adequada. O pesquisador e seus colaboradores estão comprometidos com a observância dos procedimentos para o uso científico de animais estabelecidos na Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008 e dos “*Princípios Éticos para o Uso de Animais de Laboratório*” preconizados pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL).

Diante do exposto, a Comissão, de acordo com suas atribuições definidas na Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa na forma como foi proposto.

O pesquisador deverá apresentar relatório à CEUA ao final do estudo.

Situação: PROTOCOLO APROVADO

Passo Fundo, 23 de abril de 2012.


Profa. Me. Ana Cristina Vendrametto V. Giacomini
Coordenadora – CEUA – UPF