

**UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOEXPERIMENTAÇÃO**

**ATRAZINA REDUZ A EXPRESSÃO DE GENES IMUNOLÓGICOS
EM PEIXES**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Karina Schreiner Kirsten

**PASSO FUNDO, RS, BRASIL
2016**

**ATRAZINA REDUZ A EXPRESSÃO DE GENES IMUNOLÓGICOS
EM PEIXES**

Karina Schreiner Kirsten

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Bioexperimentação, Área de Concentração em Bioexperimentação, da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Passo Fundo (UPF), como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre em Bioexperimentação**

Orientador: Prof. Luiz Carlos Kreutz

**Passo Fundo, RS, Brasil
2016**

**UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOEXPERIMENTAÇÃO**

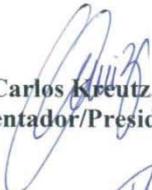
A comissão examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação de Mestrado

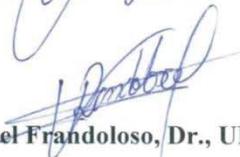
ATRAZINA REDUZ A EXPRESSÃO DE GENES IMUNOLÓGICOS EM PEIXES

Elaborada por
Karina Schreiner Kirsten

Como requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestra em Bioexperimentação

Comissão Examinadora


Luiz Carlos Kreutz, Dr., UPF
(Orientador/Presidente)


Rafael Frandoloso, Dr., UPF


Deniz Anziliero, Dr., IMED

**Passo Fundo, RS, Brasil
2016**

CIP – Catalogação na Publicação

K61a Kirsten, Karina Schreiner

Atrazina reduz a expressão de genes imunológicos em peixes / Karina Schreiner Kirsten. – 2016.

43 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Prof. Luiz Carlos Kreutz.

Dissertação (Mestrado em Bioexperimentação) –
Universidade de Passo Fundo, 2016.

Catálogo: Bibliotecário Luís Diego Dias de S. da
Silva - CRB 10/2241

AGRADECIMENTOS

Diversas pessoas colaboraram para que a realização deste trabalho fosse possível, e para cada uma delas eu envio os meus mais sinceros agradecimentos.

Primeiramente agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Luiz Carlos Kreutz, pelos ensinamentos, pela confiança e disponibilidade.

Ao Prof. Dr. Rafael Frandoloso pela sua colaboração inestimável para a realização deste trabalho.

Aos funcionários do setor de piscicultura do CEPAGRO, sempre muito prestativos.

Aos colegas do laboratório de microbiologia e imunologia avançada, pelos conhecimentos compartilhados e pela amizade.

Aos meus amigos, que sempre me incentivaram.

Agradeço imensamente a minha família pelo apoio incondicional.

Muito obrigada a todos!

A realização desse trabalho somente foi possível com o apoio financeiro do CNPq e pela concessão de bolsa da CAPES.

EPIÍGRAFE

É indispensável trabalhar, pois um mundo de criaturas passivas seria também triste e sem beleza. Precisamos, entretanto, dar um sentido humano às nossas construções. E quando o amor ao dinheiro, ao sucesso, nos estiver deixando cegos, saibamos fazer pausas para olhar os lírios do campo e as aves do céu.

Érico Veríssimo

ÍNDICE

LISTA DE FÍGURAS	viii
LISTA DE TAVBELAS	ix
LISTA DE AVBREVIATURAS	x
RESUMO	xi
ABSTRACT	xii
1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO DE LITERATURA	15
3. CAPÍTULO 1. Atrazina reduz a expressão de genes imunológicos em peixes	18
Resumo	19
1. Introdução	20
2. Material e métodos	21
2.1 Peixes	21
2.2 Desenho experimental	21
2.3 Isolamento de leucócitos mononucleares	22
2.4 Extração de RNA e síntese de cDNA	22
2.5 Seleção de primers	22
2.6 PCR convencional	23
2.7 Controle Positivo de Expressão Gênica	23
2.8 PCR em Tempo Real (qPCR)	23
2.9 Análise estatística	24
3. Resultados	24
3.1 Seleção de <i>primers</i>	24
3.2 Expressão gênica <i>in vivo</i>	25
3.3 Expressão gênica <i>in vitro</i>	25
4. Discussão	25
5. Agradecimentos	27
6. Referências bibliográficas	27
4. CONCLUSÕES	41
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	42
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43

LISTA DE FÍGURAS

3. CAPÍTULO 1

Figura 1.	Eletroforese em gel de agarose demonstrando os fragmentos dos genes amplificados por PCR. 1: Marcador 100pb (LUDWIG), 2: β -actina, 3: RNA18S, 4: Mieloperoxidase, 5: TNF- α ; 6: Mx, 7: iNOS, 8: IRAK4, 9: IL-1 β	32
Figura 2.	Alinhamento das sequências gênicas obtidas para o Jundiá, com as sequências do <i>I. punctatus</i> . Os <i>primers</i> de qPCR estão sublinhados e acompanhados de uma seta com a direção do <i>primer</i> : \blacktriangleright (<i>primer forward</i>) \blacktriangleleft (<i>primer reverse</i>).....	33
Figura 3.	Níveis de mRNA dos genes imunológicos após exposição de Jundiás a ATR (n=6). Os valores estão representados por média \pm EPM ($2^{-\Delta\Delta ct}$). * Diferença significativa (p<0.05) entre o grupo controle e grupo exposto a ATR.....	37
Figura 4.	Níveis de mRNA dos genes imunológicos após exposição de leucócitos mononucleares de Jundiás a ATR <i>in vitro</i> (n=3). Os valores estão representados por média \pm erro padrão da média ($2^{-\Delta\Delta ct}$). *Diferença significativa (p<0.05) entre o grupo controle e grupo exposto a ATR.....	38

LISTA DE TABELAS**3. CAPÍTULO 1**

Tabela 1.	Primers degenerados para realização de PCR convencional, bem como suas respectivas temperaturas de anelamento, tamanhos dos fragmentos obtidos e a homologia da sequência de cada fragmento com o a região respectiva do gene do <i>I. punctatus</i>	29
Tabela2.	<i>Primers</i> para qPCR e suas respectivas temperaturas de anelamento.....	30

LISTA DE ABREVIATURAS

ATR	Atrazina
cDNA	Ácido desoxirribonucleíco complementar
CL	Concentração letal
DNA	Ácido desoxirribonucleíco
EPM	Erro padrão da média
EROS	Espécies reativas de oxigênio
g	Gramma
GC	Citocina e guanina
IL-1 β	Interleucina um beta
IL-2	Interleucina dois
IL-4	Interleucina quatro
IL-10	Interleucina dez
INF- γ	Interferon gama
iNOS	Óxido nítrico sintetase induzível
<i>I. punctatus</i>	<i>Ictalurus punctatus</i>
IRAK4	Receptor de interleucina um associado a quinase 4
L	Litro
Mielo	Mieloperoxidase
mg	Miligrama
Min	Minuto
ml	mililitro
mRNA	Ácido ribonucleíco mensageiro
Mx	<i>Myxovirus Resistense</i> Gene 1
N	número
NK	Células <i>Natural Killer</i>
NTC	Controles negativos
OMS	Organização Mundial da Saúde
Pb	Pares de bases
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pH	Potencial de hidrogênio
qPCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real
<i>R. quelen</i>	<i>Rhamdia quelen</i>
RNA	Ácido ribonucleíco
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium
s	Segundo
Th1	Linfócito T <i>helper</i> um
Th2	Linfócito T <i>helper</i> dois
TLRs	<i>Toll like receptors</i>
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
UPF	Universidade de Passo Fundo
ng	Nanôgrama
nM	Nanomolar
μ g	Micrograma
μ l	Microlitro

RESUMO
Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Bioexperimentação
Universidade de Passo Fundo
ATRAZINA REDUZ A EXPRESSÃO DE GENES IMUNOLÓGICOS EM PEIXES

Autor: Karina Schreiner Kirsten
Orientador: Luiz Carlos Kreutz
Passo Fundo, 05 de julho de 2016

O Jundiá (*Rhamdia quelen*) é um peixe comumente encontrado em rios e lagos da América do Sul e possui diversas características favoráveis ao cultivo intensivo em mono ou policultivo. No sul do Brasil, em muitas áreas vicinais à piscicultura, ocorre um amplo uso de defensivos agrícolas, principalmente herbicidas, que contaminam as águas e prejudicam a produção de peixes. A exposição de peixes ao herbicida atrazina causa uma série de alterações, inclusive no sistema imune. O funcionamento do sistema imunológico depende da interação entre diversos tipos de células e é orquestrado por citocinas, as quais desempenham um papel primordial na resposta imune. Além disso, enzimas produzidas por células fagocíticas, como a mieloperoxidase, são fundamentais para a eliminação de diversos microrganismos. Nesse contexto, a análise da expressão de genes relacionados ao sistema imunológico é importante para estabelecer quais as vias moleculares envolvidas nas alterações observadas no sistema imune de peixes expostos a produtos químicos. Neste estudo, o principal objetivo foi avaliar a expressão de genes imunológicos, por meio da reação em cadeia da polimerase em tempo real quantitativa (RT-qPCR), em jundiás expostos a atrazina. Os *primers* foram selecionados a partir de comparações com espécies de peixes de maior similaridade filogenética com o *Rhamdia quelen*. Foram selecionados primers para os genes de expressão endógena β -actina e RNA18s e para os genes imunológicos Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α), Interleucina 1 beta (IL-1 β), IRAK4, Mieloperoxidase e Mx. Para a avaliação da expressão gênica *in vivo*, os peixes foram distribuídos em três tanques, um grupo controle sem adição de produtos químicos, e dois grupos contendo concentrações de 0,102 mg/L e 1,02 mg/L de atrazina, correspondente à 1% e 10% da CL_{50-96h}, respectivamente. Os peixes foram capturados após 48 h após para remoção do rim, purificação dos leucócitos mononucleares, extração de RNA e avaliação da expressão gênica. Para a avaliação da expressão gênica *in vitro*, os leucócitos mononucleares isolados do rim de três Jundiás saudáveis foram cultivados e expostos a concentrações de 1 e 10 μ g/ml de atrazina por 24 horas. Células não expostas a produtos químicos e expostas somente ao solvente foram utilizadas como controles. Na avaliação *in vivo*, os níveis de mRNA dos genes Mieloperoxidase e IL-1 β estavam significativamente reduzidos ($p < 0.05$) nos peixes expostos a 1,02 mg/L de atrazina. A expressão gênica do TNF- α estava reduzida nos dois grupos expostos a atrazina. Não houve alteração significativa dos níveis de mRNA dos genes Mx e IRAK4. Na avaliação *in vitro*, a expressão do gene da mieloperoxidase e IRAK4 encontraram-se significativamente reduzidos no grupo exposto a 10 μ g/ml de atrazina. A expressão gênica do TNF- α estava significativamente reduzida no grupo exposto a 1 μ g/ml de atrazina. Nos genes IL-1 β e Mx não houve alteração significativa dos níveis de mRNA. De forma geral, os resultados dos experimentos *in vivo* e *in vitro* foram similares. Com este estudo nós demonstramos que a atrazina causa redução da expressão de genes fundamentais para a regulação da resposta imune e que isso possivelmente está relacionado com a redução da capacidade de defesa dos peixes frente ao desafio com patógenos presentes no meio aquático.

Palavras-chave: Jundiá, herbicida, sistema imune, citocinas, expressão gênica.

ABSTRACT
Master's Dissertation
Programa de Pós-Graduação em Bioexperimentação
Universidade de Passo Fundo
ATRAZINE REDUCES THE EXPRESSION OF IMMUNE GENES IN FISHS

Author: Karina Schreiner Kirsten

Advisor: Luiz Carlos Kreutz

Passo Fundo, 05 July, 2016.

Silver catfish (*Rhamdia quelen*) is ubiquitously distributed in South American rivers and lakes and adapts easily to intensive farming either alone or comingled to other fish species. In South Brazil, fish farming ponds are vicinal to agricultural areas where intensive agrichemical usage, mainly herbicides, supports crop production but ends up as water and soil contaminant. Fish exposure to atrazine-based herbicides might cause deleterious effect on several physiological and biochemical pathways including those related to the immune system. The functioning of immune system relies on cell-to-cell interactions that are mainly orchestrated by cytokines which, in turn, are major players of the immune response. In addition, enzymes produced by phagocytic cells, such as myeloperoxidase, are fundamental to get rid of invading microorganisms. In this scenario, the capability to evaluate the expression of immune system related genes is needed mainly to establish molecular pathways related to the alterations observed in the immune system of agrichemicals-exposed fish. Thus, in this study, our main goal was to evaluate the expression of selected immunological genes, by real time polymerase chain reaction (RT-qPCR), in fish exposed to atrazine. Primers for the immune related genes were designed by comparing the target genes from several fish species phylogenetically related to *Rhamdia quelen*. We selected primers for β -actin and 18s RNA gene, that were used as control genes, and for Tumor Necrosis Factor alfa (TNF- α), Interleukin 1 beta (IL-1 β), IRAK4, myeloperoxidase and Mx genes. To evaluate gene expression *in vivo*, fish were equally distributed in three tanks, a control group without any chemical, and two additional tanks containing each 0,102 mg/L and 1,02 mg/L of atrazine that corresponded to 1% and 10% of the atrazine CL_{50-96h}, respectively. Fish were captured 48h post-exposure to remove the cranial kidney from which mononuclear leukocytes were isolated and submitted to total RNA extraction. *In vitro* gene expression was evaluated in mononuclear leukocytes, isolated from three healthy fish, cultivated for 24h with media containing 1 and 10 μ g/ml of atrazine. Leukocytes exposed only to the agrichemical solvent, cultivated under the same conditions, were used as controls. In the *in vivo* experiment, the expression of myeloperoxidase and IL-1 β genes were significantly reduced ($p < 0.05$) in fish exposed to 1,02 mg/L of atrazine but the expression of TNF- α was reduced in both atrazine-exposed groups. The expressions of Mx and IRAK4 genes were not altered. In the *in vitro* experiment, however, the expression of mieloperoxidase and IRAK4 were significantly reduced ($p < 0.05$) in leukocytes exposed to 10 μ g/ml of atrazine and the expression of TNF- α was significantly reduced in cells exposed to 1 μ g/ml of atrazine. The expression of IL-1 β and Mx was not altered in the *in vitro* experiment. In general, the result obtained from the *in vivo* and *in vitro* experiments were similar. With this study we demonstrated that atrazine causes reduction in the expression of several genes fundamental to immune response regulation which, in turn, could possible explain the reduction of fish defense mechanisms toward challenging pathogens commonly found on the aquatic environment.

Keywords: Silver catfish, herbicide, immune system, cytokines, gene expression.

1. INTRODUÇÃO

O jundiá (*Rhamdia quelen*, Heptapteridae) é um peixe comumente encontrado no continente Americano, encontrado comumente em rios e lagos no sul do Brasil (1). Trata-se de uma espécie que tolera bem o frio e tem alta taxa de reprodução e ganho de peso nos meses quentes, mesmo quando criados em tanques artificiais ou juntamente com outras espécies (1). Devido a estas características favoráveis, o jundiá tem sido amplamente utilizado na piscicultura e como modelo animal para estudos toxicológicos (2).

Na região Sul do país, a produção de peixes muitas vezes se apresenta como uma fonte de renda alternativa para o produtor rural; e, nesses casos, a maioria dos reservatórios hídricos que abastecem os tanques de criação encontram-se em regiões agrícolas (2). Esta localização nem sempre atende aos critérios para a produção de peixes saudáveis. A proximidade com lavouras de produção de grãos, nas quais são utilizados diversos tipos de defensivos agrícolas, permite a contaminação da água com produtos químicos que são prejudiciais a diversas espécies aquáticas (3,4).

Os herbicidas são defensivos agrícolas amplamente utilizados, que atuam no combate ao crescimento de plantas invasoras, visando melhorar a produção e o rendimento na agricultura (5). Atualmente, os herbicidas mais utilizados são a atrazina e o glifosato, ambos altamente solúveis na água e com potencial de causar efeitos adversos em uma ampla gama de organismos, incluindo os peixes (4,6)

Estudos recentes realizados com Jundiás demonstraram que a exposição a herbicidas causam alterações hormonais (4), aumento do estresse oxidativo (7), danos renais e hepáticos (8), efeitos deletérios no sistema imune inato, com redução do índice fagocitário e da taxa de sobrevivência após o desafio com *Aeromonas hydrophila* (2,9,10). Em contraste, induzem o aumento da produção de imunoglobulinas em peixes inoculados com *Aeromonas hydrophila* (11). Estas alterações observadas no sistema imune podem estar relacionadas com variações na expressão de citocinas pró-inflamatórias e de outros genes envolvidos na regulação da resposta imunológica.

As citocinas são mediadores biológicos solúveis que possuem um papel chave na regulação da resposta imune (12). As células do sistema imune de peixes produzem citocinas com funções biológicas muito similares as dos mamíferos (13). O fator de necrose tumoral (TNF- α) e a interleucina 1 beta (IL-1 β), por exemplo, são as primeiras citocinas pró-inflamatórias secretadas após um estímulo das células de defesa, e possuem um papel central no início da resposta imune (14). Após sua estimulação, o papel das células fagocíticas é

eliminar os agentes agressores por diferentes mecanismos. Na fagocitose por macrófagos e neutrófilos, por exemplo, os microorganismos são destruídos principalmente pelo processo de explosão respiratória, que envolve a produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) (15). As principais enzimas envolvidas neste processo são a mieloperoxidase e a óxido nítrico sintetase induzível (iNOS), que origina o óxido nítrico. Ambas geram agentes oxidantes com potente atividade bactericida (16). A fagocitose se constitui em um dos principais mecanismos de defesa da maioria dos seres vivos e alterações na capacidade fagocítica, ou nos mecanismos inerentes ao processo fagocítico, representam uma ameaça à sobrevivência do indivíduo (15).

Diversos estudos já demonstram que a presença de herbicidas como contaminante das águas causam alterações no sistema imune dos peixes, porém sem demonstrar o mecanismo pelo qual estas alterações ocorrem. Nesse contexto, o objetivo deste estudo foi avaliar a expressão de genes imunológicos em peixes expostos ao atrazina para estabelecer quais as vias moleculares envolvidas nas alterações observadas no sistema imune.

Esta dissertação compreende, além da introdução, uma revisão da literatura que aborda os temas piscicultura, contaminação do ambiente aquático por herbicidas, sistema imune e efeitos de herbicidas no sistema imune de peixes. Os resultados encontrados nesta pesquisa estão apresentados no capítulo 1 em forma de artigo científico intitulado **Atrazina reduz a expressão de genes imunológicos em peixes**, que relata os efeitos do herbicida atrazina na expressão de genes imunológicos de Jundiá e será, após tradução para o inglês, submetido ao periódico *Fish and ShellFish Immunology*

2. REVISÃO DE LITERATURA

O consumo de pescado tem aumentado significativamente nas últimas décadas, e representa uma fonte de nutrientes saudável e de alta palatabilidade (17). A Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda o consumo anual de pelo menos 12 quilos de peixe por habitante/ano. O Brasil produz aproximadamente 2 milhões de toneladas de pescado; destes, 40% provém de peixes cultivados. O potencial hídrico brasileiro é enorme e o país tem potencial para se tornar um dos maiores produtores mundiais de pescado (18).

Dentre as espécies cultivadas no Sul do Brasil destaca-se o jundiá (*Rhamdia quelen*), um peixe onívoro, de hábitos noturnos, encontrado em locais profundos de rios e lagos (19). O jundiá é uma espécie de fácil manejo, que tem boa adaptação às variações de temperatura e a criação em tanques artificiais juntamente com outras espécies (1). Também possui uma carne de excelente qualidade, com grande aceitação pelo consumidor. Por estas características favoráveis, o cultivo de Jundiá está aumentando progressivamente (19).

Em contraste ao crescimento da piscicultura no Brasil, observa-se que muitos reservatórios hídricos utilizados para cultura de peixes estão localizados em áreas agrícolas e, devido ao amplo uso de defensivos agrícolas, é possível que ocorra contaminação das águas por mecanismos diretos e indiretos (20,21). A contaminação direta resulta comumente de falhas na aplicação, principalmente quando se utilizam aplicações aéreas com aviões agrícolas, pelo descarte inadequado das embalagens, e também pela aplicação direta para o controle de plantas aquáticas ou insetos predatórios. Por outro lado, a contaminação indireta ocorre quando o defensivo é aplicado de forma correta, porém chega até o reservatório hídrico pela água da chuva ou pela contaminação dos lençóis freáticos. Uma vez na água, o defensivo pode se ligar a partículas em suspensão ou se depositar no sedimento, em ambos os casos entrando em contato com organismos aquáticos (22)

Os herbicidas são defensivos agrícolas que agem no controle de ervas daninhas, visando melhorar a produção agrícola. No entanto, o uso indiscriminado destes produtos pode causar impacto em diversas espécies animais, principalmente as aquáticas (5). Os herbicidas mais utilizados na região são a atrazina (2-chloro-4-thylamino-6-isopropylamino-s-triazine) e o glifosato (N-phosphonomethyl glycine) ambos considerados moderadamente tóxicos mas, por serem relativamente persistentes no solo e altamente solúveis na água, a contaminação ambiental por esses produtos aumentou nos últimos anos, o que pode causar impactos negativos na piscicultura (23,24).

Vários estudos já demonstraram a toxicidade dos herbicidas em diversas espécies de peixes. Estas pesquisas relatam alterações nos parâmetros hematológicos (9), estresse oxidativo (7), danos renais e hepáticos (8), entre outros. Além disso, o glifosato e/ou atrazina tem um efeito deletério ao sistema imune inato, e em contraste aumentam a produção de imunoglobulinas em Jundiás (2,9,11). Estas alterações podem estar relacionadas a um possível efeito dos herbicidas na expressão de genes moduladores da resposta imune.

As citocinas são proteínas produzidas em resposta à estimulação das células imunológicas, a qual pode ser causada por patógenos ou agentes químicos e físicos (12). As citocinas possuem um papel primordial na regulação da resposta imune inata e adquirida e podem atuar de forma local ou sistêmica. Além disso, algumas citocinas influenciam a atividade de diversos tipos celulares e são denominadas pleiotrópicas; por outro lado a ação sobre as células alvos pode ser redundante, quando diferentes citocinas possuem os mesmos efeitos funcionais (25). Os peixes produzem citocinas muito similares a dos mamíferos (26).

As citocinas atuam em diferentes fases da resposta imune. Para o início do processo inflamatório, as mais importantes são o TNF- α e IL-1 β (27). Suas principais ações são o recrutamento de leucócitos para os locais de inflamação, através da estimulação da produção de quimiocinas e da expressão de moléculas de adesão nos leucócitos (integrinas) e no endotélio (selectinas), promovendo a migração dos leucócitos da circulação sanguínea para o tecido inflamado (14). Também possuem efeitos sistêmicos, como no hipotálamo, causando febre, e no fígado, estimulando a produção de proteínas de fase aguda (28). As citocinas atuam por ligação a receptores específicos presentes na membrana celular, a IL-1 β por exemplo, age por ligação ao receptor de interleucina 1 (IL1-R). Esta ligação causa uma série de reações intracelulares, que envolvem várias moléculas sinalizadoras, dentre eles o receptor de interleucina 1 associado a quinase 4 (IRAK4) que possui um papel chave nas vias de sinalização em resposta a esta citocina, e também a TLRs ativados por antígenos (29).

Os interferons tipo I (α/β) são citocinas que atuam inibindo a replicação viral. Além disso, promovem a diferenciação de linfócitos T CD4⁺ naives em linfócitos T helper 1 (Th1) e aumentam a citotoxicidade de células *Natural Killer* (NK), potencializando a resposta imune celular antiviral (28). Outra importante função dos interferons é a indução da expressão do gene *Myxovirus Resistense Gene 1* (Mx), que codifica a proteína Mx1. Esta proteína, por sua vez, atua como mediadora da imunidade inata, com amplo espectro de atividade antiviral, capaz de reconhecer e inibir vírus de replicação citoplasmática e celular (28).

Na resposta imune adquirida, as citocinas medeiam à proliferação e a diferenciação de linfócitos após o reconhecimento do antígeno, sendo que a produção de citocinas é uma das

principais respostas do linfócito Th após ativado. Dentre as citocinas envolvidas na resposta imune adquirida, a interleucina 2 (IL-2) é secretada por linfócitos Th1 ativados, estimulando a proliferação e a diferenciação destas células, exercendo também um papel central sobre as células T reguladoras. Já a interleucina 4 (IL-4), produzida pelo linfócito Th2, atua sobre os linfócitos B, com ação reguladora na secreção de anticorpos (14).

Por outro lado, após a ativação do sistema imune, os mecanismos efetores para eliminação de microrganismos pelas células fagocíticas (ex: macrófagos e neutrófilos), envolvem principalmente a produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) (16). Após ativação, os neutrófilos produzem a enzima mieloperoxidase, que está diretamente relacionada com mecanismos bactericidas dependentes de oxigênio, sendo catalisadora do processo de formação de radicais altamente reativos, como o ácido hipocloroso (29). Já nos macrófagos a destruição de patógenos envolve a produção de óxido nítrico, que é produzido pela enzima óxido nítrico sintetase induzível (iNOS), é capaz de reagir com vários intermediários de oxigênio, gerando agentes oxidantes com potente atividade bactericida (30). Tanto a mieloperoxidase quanto a iNOS já foram identificadas em diversas espécies de peixe (16).

Estudos anteriores apresentaram alguns dados sobre os efeitos de defensivos agrícolas na expressão de genes imunológicos de peixes. A presença de atrazina e clorpirifós na água aumentou a expressão de IL-1 β nos órgãos imunes de carpas, enquanto a expressão INF- γ não sofreu alterações (31). Na presença de glifosato como contaminante da água, houve uma redução da expressão de IL-1 e IL-10 nas guelras e um pequeno aumento da IL-1 no baço de Robalos (32). Estes resultados evidenciam que os níveis de expressão podem ser diferentes, dependendo do órgão imunológico analisado. Na presença de endosulfan, um inseticida, ocorreu aumento dos níveis de IL-2 em tilápias, corroborando com a possibilidade de uma ativação inespecífica do sistema imune causada por defensivos agrícolas (13).

Dessa forma, devido à importância econômica crescente da piscicultura e o potencial de contaminação das águas por defensivos agrícolas é importante identificar fatores que desencadeiam alterações fisiológicas deletérias à produtividade de pescados. O bom funcionamento do sistema imune é essencial para a saúde dos peixes, porém a presença de herbicidas na água afeta a resposta imunológica. Nesse contexto, em razão da intensa utilização de produtos químicos nas lavouras e da inexistência de estudos sobre os efeitos de pesticidas sobre a expressão gênica em espécies nativas, o presente estudo se propõe analisar o possível efeito da exposição a herbicidas na expressão de alguns genes do sistema imune de Jundiás.

3. CAPÍTULO 1

Atrazina reduz a expressão de genes imunológicos em peixes

Karina Schreiner Kirsten¹, Lucas Soveral², Maria Tereza Friedrich³, Rafael Frandoloso¹, Luiz Carlos Kreutz¹

Artigo submetido ao periódico *Fish and Shellfish Immunology* -2016

¹ Programa de Pós-Graduação em Bioexperimentação, Universidade de Passo Fundo.

² Curso de Medicina Veterinária, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Passo Fundo.

³ Laboratório de Cromatografia, Centro de Pesquisa em Alimentos, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Passo Fundo.

*Autor correspondente: Luiz Carlos Kreutz, Universidade de Passo Fundo, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Campus I, Bairro São José. CEP 99052-100.

Telefone +55 54 3316 8444; Fax +55 54 3316 8163. E-mail: lckreutz@upf.br.

Resumo

O uso de defensivos agrícolas aumentou muito nas últimas décadas, o que levou a contaminação de reservatórios hídricos por estes produtos e seus resíduos, prejudicando a saúde de animais aquáticos. Estudos anteriores realizados com Jundiá (*Rhamdia quelen*) demonstraram que o herbicida atrazina (ATR) causa efeitos deletérios no sistema imune, porém o mecanismo pelo qual estas alterações ocorrem não foi esclarecido. Desta forma, nosso objetivo foi avaliar a expressão de genes reguladores da resposta imunológica após a exposição à ATR. Para tanto, foram selecionados *primers* a partir de comparações com espécies de peixes de maior similaridade filogenética com o *Rhamdia quelen*. Foram selecionados *primers* para os genes: β -actina, RNA18s, TNF- α , IL-1 β , IRAK4, Mieloperoxidase e Mx. Para a avaliação da expressão gênica *in vivo* seis peixes foram distribuídos em três tanques, sendo um grupo controle, e dois grupos expostos a concentrações de 0,102 mg/L e 1,02 mg/L de ATR por 48 horas. Para a avaliação da expressão gênica *in vitro* leucócitos mononucleares de Jundiás foram cultivados e expostos a concentrações de 1 e 10 μ g/ml de ATR por 24 horas. Os níveis de mRNA dos genes Mieloperoxidase e TNF- α estavam reduzidos na avaliação *in vivo* e *in vitro*, os de IL-1 β *in vivo* e os de IRAK-4 *in vitro*. A expressão do gene Mx não sofreu variações. Assim, nós demonstramos que a ATR reduz a expressão de genes fundamentais para a regulação da resposta imune. Os resultados foram similares nos experimentos *in vivo* e *in vitro*. A redução da expressão destes genes possivelmente leva imunossupressão causada pela ATR.

Palavras-chave: Jundiá, herbicida, sistema imune, citocinas, expressão gênica.

1. Introdução

O uso de pesticidas agrícolas aumentou significativamente nas últimas décadas em virtude do aumento da produtividade na agricultura (1). O herbicida Atrazina (ATR) (2-cloro-4-etilamino-6-isopropil-amino-striazine) é um dos defensivos agrícolas mais utilizados no mundo (2), pois age no controle de ervas daninhas em culturas de milho, sorgo e cana de açúcar, interferindo na fotossíntese das plantas invasoras (3). A ATR é considerada moderadamente tóxica, possui grande mobilidade ambiental e é frequentemente encontrada como contaminante do solo e de águas superficiais e subterrâneas (4,5), mesmo em regiões onde seu uso foi proibido a mais de 20 anos (6). Portanto, existe uma crescente preocupação do impacto causado pela contaminação ambiental por ATR na saúde de animais aquáticos e terrestres, bem como de seres humanos (3,7,8).

Estudos anteriores realizados com Jundiás (*Rhamdia quelen*), um peixe comumente encontrado no continente americano e muito utilizado na piscicultura no Brasil (9), demonstraram que a ATR causa diversos efeitos adversos, como alterações hormonais (10), aumento do estresse oxidativo (11,12), danos renais e hepáticos (13) e alterações imunológicas como redução do índice fagocitário e da taxa de sobrevivência após o desafio com *Aeromonas hydrophila* (14). Estas alterações observadas no sistema imune podem estar relacionadas com modificações na expressão de genes moduladores da resposta imunológica (15).

As citocinas atuam na regulação da resposta imune inata e adquirida ligando-se à receptores específicos encontrados principalmente nas células do sistema imunológico (16). O fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e a interleucina 1 beta (IL-1 β), por exemplo, são importantes na resposta imune contra bactérias, pois estimulam a produção de quimiocinas que irão atrair os leucócitos ao tecido inflamado, e induzem a expressão de moléculas de adesão nos leucócitos e nas células endoteliais. promovendo a migração dos leucócitos da circulação sanguínea para o tecido inflamado (17). Nas infecções virais, a produção de interferons (IFNs) tipo I é de extrema importância, pois medeia a expressão de genes que interferem na replicação viral (16), como o gene que codifica a proteína Mx, a qual possui amplo espectro de atividade antiviral (18). Além disso, a eliminação de patógenos pelas células fagocíticas depende da produção de enzimas como a mieloperoxidase e a óxido nítrico sintetase induzível (iNOS), que tem o potencial de destruir os microrganismos após a fagocitose a partir da formação de espécies reativas de oxigênio (EROS) (19,20). Conseqüentemente, alterações na expressão destes e outros genes podem comprometer a

capacidade de defesa dos peixes que se encontram em um ambiente geralmente propício para a disseminação de diversos patógenos (21).

Nesse contexto, devido a intensa utilização da ATR na agricultura e a consequente contaminação das águas, é importante identificar fatores que desencadeiam alterações fisiológicas deletérias em espécies aquáticas. Embora estudos anteriores demonstrem que a presença de herbicidas na água causa alterações no sistema imune dos peixes, o mecanismo pelo qual estas alterações ocorrem ainda não foi esclarecido. Então, neste estudo, o objetivo foi avaliar a expressão de genes imunológicos específicos em jundiás expostos a ATR para estabelecer quais as vias moleculares envolvidas nas alterações observadas no sistema imune.

2. Material e métodos

2.1 Peixes

Para a realização do estudo foram utilizados juvenis de Jundiás (peso corporal médio 200 ± 20 g) provenientes do Setor de Piscicultura do Cepagro da Universidade de Passo Fundo. Os peixes foram aclimatados por sete dias em tanques de 1000L abrigados da luz solar, sob fotoperíodismo natural e alimentados com ração comercial peletizada (3% peso corporal, 42% proteína). Os tanques foram limpos diariamente com substituição de pelo menos 20% da água. A água foi monitorada para os parâmetros temperatura 23°C , pH $7,7 \pm 0,4$, oxigênio $5,2 \pm 0,5$ mg/L e amônia total $0,06$ mg/L. Após o início do experimento, verificou-se também a concentração de ATR na água.

Os experimentos foram realizados de acordo com as diretrizes do "Colégio Brasileiro de Experimentação Animal" e aprovados pelo Comitê de Ética para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais (CEUA) da Universidade de Passo Fundo, sob o registro 008/2015.

2.2 Desenho experimental

O efeito da ATR na expressão de genes imunológicos foi avaliado *in vivo* e *in vitro*. No experimento *in vivo* foram utilizados 18 jundiás distribuídos igualmente em três grupos: um grupo controle, sem adição de produtos químicos; e dois grupos experimentais com concentrações de $0,102$ mg/L e $1,02$ mg/L, correspondentes a 1% e 10% da CL_{50-96h} da ATR (6-chloro- N^2 -ethyl- N^4 -isopropyl-1,3,5-triazine-2,4-diamine; Sigma, Brasil) (22). Após 48h de exposição, os peixes foram capturados para coleta do rim cranial e obtenção de leucócitos mononucleares para extração de RNA. Durante este período não houve troca de água e a quantidade de ATR na água foi confirmada por cromatografia.

A expressão gênica *in vitro* foi avaliada a partir de cultura celular de leucócitos mononucleares extraídos de rins de três Jundiás saudáveis. Os leucócitos foram cultivados em placas de 24 cavidades (5×10^6 células por cavidade) em meio RPMI (livre de antibióticos), e expostos a concentrações de 1 e 10 $\mu\text{g/ml}$ de ATR por 24 horas. Células não expostas a produto químico e expostas somente ao solvente (etanol 99,8%, Sigma) foram utilizadas como controle.

2.3 Isolamento de leucócitos mononucleares

Os peixes foram anestesiados com Eugenol 50 mg/L por 3 minutos, eutanasiados e o rim foi removido sob condições assépticas. Para a obtenção dos leucócitos, o rim foi macerado em uma peneira de nylon (100 μM) e as células obtidas foram lavadas em meio RPMI contendo 1% de heparina e isoladas por gradiente de Percoll, utilizando as densidades de 1,02 g/ml e 1,077 g/ml. Após centrifugação por 25 minutos a 4°C, os leucócitos mononucleares foram coletados na interface entre o gradiente 1,02 g/ml e 1,07 g/ml para extração de RNA. Para o experimento *in vitro*, os leucócitos isolados foram colocados em cultivo celular conforme descrito no item 2.2.

2.4 Extração de RNA e síntese de cDNA

O RNA total foi extraído utilizando-se o kit comercial RNeasy® Mini Kit (QIAGEN, Holanda), com o passo adicional de digestão por DNase com o kit RNase-Free DNase Set (QIAGEN) de acordo com as instruções do fabricante. A concentração e a qualidade do RNA extraído foram verificadas no nanofotômetro Pearl® (IMPLEN, Alemanha).

A reação de transcrição reversa para obtenção de cDNA foi realizada com o SuperScript® III Reverse Transcriptase (INVITROGEN, EUA), utilizando-se 500 ng de RNA e *primers* aleatórios.

2.5 Seleção de *primers*

Para a seleção dos *primers* dos genes imunológicos, fez-se uma comparação entre as sequências dos genes de interesse em diversas espécies de peixes. A escolha das espécies foi feita pela proximidade filogenética, a partir das sequências gênicas disponíveis para o Jundiá (42). *Primers* degenerados foram selecionados na região de maior consenso dos genes alvo e encontram-se descritos na Tabela 1.

O programa OligoAnalyser 3.1 (<http://www.idtdna.com/calc/analyzer>) foi utilizado para verificar a temperatura de anelamento e a porcentagem de citosina e guanina (%GC) dos

primers selecionados. O gene da β -actina (nº Genbank KC195970.1) foi utilizado como normalizador da expressão gênica.

2.6 PCR convencional

Para a reação de PCR convencional foi utilizado um mix contendo: 12,5 μ l de GoTaq® Green master mix (PROMEGA, EUA) , 1 μ l de *primer forward* e 1 μ l de *primer reverse* (concentração 400 nM), 1 μ l do cDNA e 9,5 μ l de água para PCR (SIGMA-ALDRICH, Alemanha), para uma reação final de 25 μ l. O PCR foi realizado no equipamento MiniCycler™ (MJ Research, Canadá), com ciclos de (94°C, 5 min; [94°C, 30 s; 42-60° C 30 s; 72°C, 1 min] \times 35 ciclos; 72°C, 10 min). A temperatura de anelamento para cada par de *primers* está indicada na tabela 1.

Os produtos do PCR foram analisados em gel de agarose 2%, corados com *Blue/Orange loading dye* (PROMEGA). Após, os fragmentos foram purificados a partir do gel de agarose utilizando o kit Wizard® Gel and PCR Clean-Up System (PROMEGA) e sequenciados. Para a confirmação da identidade dos genes foram feitas comparações filogenéticas utilizando a ferramenta Blast, do Genbank®. Por fim, foram desenhados os *primers* para a PCR em tempo real (qPCR) os quais encontram-se discriminados na Tabela 2.

2.7 Controle positivo de expressão gênica

Para realização de curvas de calibração e utilização como controle positivo de expressão gênica, cada um dos genes foi clonado pelo pGEM®-T and pGEM®-TEasy Vector Systems (PROMEGA®), onde o fragmento do gene de interesse foi inserido no vetor pGEM easy vector (PROMEGA®) e transformados em células competentes One Shot® TOP10 *Chemically Competent E. coli* (PROMEGA®) cultivadas em meio LB com ampicilina. Após o período de incubação, a clonagem foi confirmada por PCR para cada gene. Por fim, foi feita a extração de DNA plasmidial pelo kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (PROMEGA®).

2.8 PCR em Tempo Real (qPCR)

A qPCR foi realizada em placas de 48 orifícios (MicroAmp® Fast optical 48 well reaction plate 0,1ml, APPLIED BIOSYSTEMS, USA) num volume final de 10 μ l, contendo 400 nM de cada *primer*, 5 μ l de SYBR® Select Master Mix (APPLIED BIOSYSTEMS) e 1 μ l de cDNA (diluído 10 vezes). As placas foram seladas com um filme adesivos (MicroAmp® 48 well optical adhesive film, APPLIED BIOSYSTEMS) e analisadas no equipamento Step One

(APPLIED BIOSYSTEMS) utilizando as seguintes condições de termociclagem: desnaturalização inicial (95°C, 10 min), seguido de 40 ciclos de 95°C por 30 s (desnaturalização), 55-60°C por 30 s (anelamento) e 72°C por 30 s (extensão). Ao final, foi incluída uma curva standard de *melting*, que confirmou a especificidade das reações. A eficiência de cada reação está descrita na Tabela 2. Controles negativos (NTC) da retrotranscrição e da qPCR foram incluídos. As curvas de calibração de todas as moléculas e dos genes de referência foram obtidas utilizando diluições decimais (1:10) dos DNAs plasmidiais linearizados obtidos pelo método de clonagem descrito no item 2.7, contendo as sequências específicas de cada gene (controles internos). Para melhor comparação dos resultados dos diferentes grupos, utilizou-se um mesmo valor de *threshold* (0.081). A quantificação relativa de cada gene foi realizada utilizando a fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (22).

2.9 Análise estatística

Os resultados estão expressos em média \pm erro padrão da média (EPM). Para realização da análise estatística as variáveis foram convertidas ao seu logaritmo natural. A verificação da distribuição normal das amostras foi feita através dos testes Brown-Forsythe e Barlett's. Todos os dados tiveram distribuição normal (paramétricos), então o efeito da ATR nos níveis de mRNA dos genes testados foi analisada por Anova de uma via, seguida de pós teste de Dunnett, $p < 0.05$ foi considerado significativo.

3. Resultados

3.1 Seleção dos primers

Devido à escassez de sequências gênicas da espécie *Rhamdia quelen* disponíveis no *Genbank*, a seleção de *primers* somente foi possível através de uma comparação entre as sequências dos genes alvo em espécies de peixes com proximidade filogenética com o *Rhamdia quelen* (42). As espécies selecionadas para comparação foram: *Ictalurus punctatus*, *Cyprinus carpio*, *Carassius carassius*, *Carassius auratus*, *Hemibagrus macropterus*, *Danio rerio*, *Astyanax mexicanus*, *Salmo salar*.

Após a seleção dos *primers*, foi realizada a PCR convencional, na qual foram amplificados fragmentos que variaram de 283 a 1081 pb de acordo com o gene alvo (Figura 1, Tabela 1). Os fragmentos amplificados foram sequenciados e, a partir de comparações filogenéticas, verificou-se que possuíam alta homologia com os respectivos genes das espécies citadas acima, confirmando a identidade de cada gene. A espécie que apresentou maior similaridade gênica com o *Rhamdia quelen* foi o *Ictalurus punctatus* (Tabela 1). Assim,

após o alinhamento das sequências obtidas para o Jundiá, com as sequências do *I. punctatus* (Figura 2), fez-se a seleção de *primers* para qPCR, específicos para cada gene (Tabela 2). Ocorreu a formação de dímeros de *primers* no gene iNOS, o que impossibilitou a avaliação dos níveis de mRNA por qPCR deste gene.

3.2 Expressão gênica *in vivo*

Os resultados das alterações na expressão gênica em peixes expostos a ATR estão demonstrados na Figura 3. O grupo não exposto foi utilizado como controle. Os níveis de mRNA dos genes Mieloperoxidase e IL-1 β estavam significativamente reduzidos ($p < 0.05$) nos peixes expostos a 0,102 mg/L de ATR. A expressão gênica do TNF- α estava reduzida nos dois grupos expostos a ATR. Nos genes Mx e IRAK4 não houve alteração significativa dos níveis de mRNA.

3.3 Expressão gênica *in vitro*

Os níveis de mRNA dos genes Mieloperoxidase e IRAK4 encontraram-se significativamente reduzidos ($p < 0.05$) no grupo exposto a 10 $\mu\text{g/ml}$ de ATR (Figura 4), enquanto a expressão do TNF- α estava significativamente reduzida no grupo exposto a 1 $\mu\text{g/ml}$ de ATR. Para os genes IL-1 β e Mx não houve alteração significativa dos níveis de mRNA. Células expostas somente ao solvente foram utilizadas como controle.

4. Discussão

As alterações no sistema imune causadas por produtos químicos reduzem a capacidade de proteção contra infecções (25). Os peixes são considerados organismos em situação de alto risco para a modulação da resposta imunológica por produtos químicos no ambiente aquático, pois estão direta e constantemente expostos a estes produtos (21). Assim, o sistema imune de peixes é um indicador sensível da presença de poluentes ambientais (26). Com este estudo nós demonstramos que a ATR causa redução da expressão de genes fundamentais para a regulação da resposta imune. Os resultados obtidos com peixes expostos a ATR *in vivo* foram similares àqueles obtidos de leucócitos mononucleares isolados do rim de peixes saudáveis e expostos ao ATR em cultivo celular.

Entre os genes imunológicos avaliados após a exposição a ATR, o TNF- α e a IL-1 β são fundamentais para o início da resposta inflamatória (17). A expressão do TNF- α encontrou-se reduzida tanto na exposição *in vivo* quanto *in vitro* e a IL-1 β apenas *in vivo*. A IL-1 β age por ligação ao receptor de interleucina 1 (IL1-R). Esta ligação causa uma série de reações

intracelulares, que envolvem várias moléculas sinalizadoras, dentre eles o receptor de interleucina 1 associado a quinase 4 (IRAK4) que possui um papel chave nas vias de sinalização em resposta a esta citocina (26). A expressão gênica do IRAK4 encontrou-se reduzida na exposição a ATR *in vitro*. A diminuição da expressão destes genes prejudica o processo inflamatório contra um agente agressor, deixando o organismo mais susceptível a infecções.

Diversas pesquisas já foram realizadas com a exposição de peixes a concentrações de ATR e posterior avaliação da expressão de genes imunológicos, porém os resultados não levam a uma conclusão unânime. Em carpas expostas a ATR por 40 dias, a expressão de IL-1 β e INF- γ variou conforme a concentração do herbicida e o órgão imune avaliado. No rim houve redução da expressão de IL-1 β e de seu receptor após exposição a ATR, enquanto no baço ocorreu um aumento da expressão gênica. (33), já a expressão do TNF- α estava aumentada em todas as concentrações de ATR e órgãos testados (38). Em embriões de *zebrafish* expostos a ATR por três dias não houve variação na expressão de TNF- α , INF- γ e um aumento na IL-1 β apenas no grupo exposto a 12,5 ug/L de ATR (25). Então, o efeito da ATR na expressão de genes imunes varia conforme o tempo de exposição, o órgão avaliado e a fase de crescimento do peixe.

Após a ativação do sistema imune, os mecanismos efetores para eliminação de microorganismos pelas células fagocíticas, envolvem principalmente a produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) (20). As células fagocíticas, principalmente neutrófilos, produzem a enzima mieloperoxidase, que está diretamente relacionada com mecanismos bactericidas dependentes de oxigênio (34). A exposição a ATR diminuiu a expressão gênica da mieloperoxidase tanto *in vitro* como *in vivo*, o que pode dificultar a destruição de patógenos pelas células fagocíticas. Existe uma carência de dados a respeito dos efeitos diretos da ATR sobre a enzima mieloperoxidase no contexto imunológico, enfatizando a importância dos resultados deste estudo.

A proteína Mx tem sua expressão regulada por interferons e atua como mediadora da imunidade inata, com amplo espectro de atividade antiviral, capaz de reconhecer e inibir vírus de replicação citoplasmática e celular (18). A exposição à ATR não alterou os níveis de mRNA do gene Mx. Não existem dados disponíveis sobre o efeito da ATR diretamente no gene Mx, porém, como já mencionado anteriormente, estudos demonstraram que a expressão do INF- γ não é afetada pela exposição ATR (25,33), o que justifica que a expressão do gene Mx também não altere após exposição à ATR.

Pelo nosso conhecimento, é a primeira vez que um estudo demonstra os efeitos da ATR *in vitro*, na expressão de genes do sistema imune em leucócitos mononucleares de peixes expostos em cultivo celular. Em outras espécies, a exposição de células imunológicas a diferentes concentrações de ATR, por diferentes períodos de tempo, demonstraram a redução da expressão gênica de várias moléculas fundamentais para a regulação da resposta imune (35,36), corroborando com os resultados encontrados neste estudo.

A redução da expressão destes genes fundamentais para regulação da resposta imunológica possivelmente levam ao efeito deletério previamente descrito no sistema imune inato, como a redução do índice fagocitário e da taxa de sobrevivência após o desafio com *Aeromonas hydrophila* em Jundiás expostos a ATR (14,37).

O mecanismo pelo qual a ATR reduz a expressão destes genes ainda não foi esclarecido, porém observa-se que os efeitos da ATR no sistema imune são semelhantes aos causados pelo aumento dos níveis de estrogênio. ATR é um disruptor endócrino, que causa aumento os níveis de estrogênio (28). O estrogênio tem efeitos imunossupressores, como redução da fagocitose, dos níveis plasmáticos de lisosima, da explosão respiratória e da contagem de leucócitos (29). Outro efeito notável do estrogênio no sistema imune é a modulação da secreção de citocinas, através da ligação à receptores específicos para o estrogênio presentes em várias células do sistema imune (30). Uma redução significativa na secreção de TNF- α e IL-1 β foi observada em peixes expostos a diferentes concentrações de estrogênio (31) e em células mononucleares de humanos expostas a estrogênio (32). Por conseguinte, a imunossupressão causada pela ATR pode ocorrer devido ao aumento dos níveis de estrogênio.

Aqui nós demonstramos que baixas concentrações de ATR na água causa redução na expressão de genes imunológicos, o que prejudica a resposta imune dos peixes. Estes resultados demonstram que a contaminação do ambiente aquático por herbicidas tem impactos diretos na saúde dos peixes, aumentando a susceptibilidade a infecções e consequentemente causando impactos negativos na piscicultura.

5. Agradecimentos

Este trabalho foi realizado com apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brasil, processo 476317/2012-6. Karina Schreiner Kirsten é estudante de mestrado com uma bolsa CAPES (01837123071). Lucas de Figueiredo Soveral é aluno de Iniciação Científica com bolsa FAPERGS (0413-2551/15-5).

6. Referências Bibliográficas

1. Mokarizadeh A, Faryabi MR, Rezvanfar MA, Abdollahi M. A comprehensive review of pesticides and the immune dysregulation: mechanisms, evidence and consequences. *Toxicol Mech Methods*. 2015;6516(July):1–21.
2. Brender JD, Weyer PJ. *Agricultural Compounds in Water and Birth Defects*. 2016;144–52.
3. Graymore M, Stagnitti F, Allinson G. Impacts of atrazine in aquatic ecosystems. *Environ Int*. 2001;26(7-8):483–95.
4. Dores, Eliana Freire G aspar de C, Maria D-L-F. Contaminação do ambiente aquático por pesticidas. Estudo de caso: águas usadas para consumo humano em primavera do leste - Mato Grosso - Análise preliminar. 2001;24(1):27–36.
5. Cabrera L, Pinho F, Gilberto E. Estimativa de risco de contaminação das águas por pesticidas na região sul do estado do RS. *Quim Nov*. 2008;31(8):1982–6.
6. Vonberg D, Vanderborght J, Cremer N, Pütz T, Herbst M, Vereecken H. 20 years of long-term atrazine monitoring in a shallow aquifer in western Germany. *Water Res*. 2014;50.
7. Zhao. Sub-acute exposure to the herbicide atrazine suppresses cell immune functions in adolescent mice. *Biosci Trends*. 2013;7(4):193–201.
8. Pathak RK, Dikshit AK. Atrazine and Human Health. *Int J Ecosyst*. 2011;1(1):14–23.
9. Montanha FP, Nagashima JC, Kirnew MD, Astrauskas JP, Pimpão CT. Características fisiológicas e reprodutivas do *Rhamdia Quelen*. *Rev científica eletrônica Med Veterinária*. 2011;(17):8
10. Cericato L, Neto JGM, Kreutz LC, Quevedo RM, da Rosa JGS, Koakoski G, 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 C Toxicol Pharmacol*. 2009 Apr;149(3):363–7.
11. Ferreira D, Motta a. CD, Kreutz LC, Toni C, Loro VL, Barcellos LJG. Assessment of oxidative stress in *Rhamdia quelen* exposed to agrichemicals. *Chemosphere*. 2010 May;79(9):914–21.
12. Chen D, Zhang Z, Yao H, Liang Y, Xing H, Xu S. Effects of atrazine and chlorpyrifos on oxidative stress-induced autophagy in the immune organs of common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Fish Shellfish Immunol*. 2015;44(1):12–20.
13. Mela M, Guiloski IC, Doria HB, Randi M a F, de Oliveira Ribeiro C a, Pereira L, et al. Effects of the herbicide atrazine in neotropical catfish (*Rhamdia quelen*). *Ecotoxicol Environ Saf*. 2013 Jul;93:13–21.
14. Kreutz LC, Gil Barcellos LJ, Marteninghe A, Davi dos Santos E, Zanatta R. Exposure to sublethal concentration of glyphosate or atrazine-based herbicides alters the phagocytic function and increases the susceptibility of silver catfish fingerlings (*Rhamdia quelen*) to *Aeromonas hydrophila* challenge. *Fish Shellfish Immunol*. 2010 Oct;29(4):694–7.
15. Kreutz LC, Pavan TR, Alves a. G, Correia a. G, Barriquel B, dos Santos ED, et al. Increased immunoglobulin production in silver catfish (*Rhamdia quelen*) exposed to agrichemicals. *Brazilian J Med Biol Res*. 2014;47(6):499–504.
16. Shachar I, Karin N. The dual roles of inflammatory cytokines and chemokines in the regulation of autoimmune diseases and their clinical implications. *J Leukoc Biol*. 2012;93(January):51–61.
17. Dinarello C a. Historical Review of Cytokines. *Eur J Immunol*. 2007;37(Suppl 1):S34–45.
18. Haller O, Kochs G. Human MxA Protein: An Interferon-Induced Dynamin-Like

- GTPase with Broad Antiviral Activity. *J Interf Cytokine Res* . 2010;31(1):79–87.
19. Underhill DM, Goodridge HS. Information processing during phagocytosis. *Nat Rev Immunol*. 2012;12(7):492–502.
 20. Yeh HY, Klesius PH. Changes of serum myeloperoxidase and nitric oxide in the early stage of *Edwardsiella ictaluri* infection in channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque). *J Fish Dis*. 2013;36(4):441–6.
 21. Bols NC, Brubacher JL, Ganassin RC, Lee LEJ. Ecotoxicology and innate immunity in fish. *Dev Comp Immunol*. 2001;25(8-9):853–73.
 22. Rao X, Huang X, Zhou Z, Lin X. An improvement of the $2^{-(\Delta\Delta CT)}$ method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis. *Biostat Bioinforma Biomath*. 2013;3(3):71–85
 23. Kreutz LC, Anziliero D, Martins D, Lorenson M, Marteninghe A. Acute toxicity test of agricultural pesticides on silver catfish (*Rhamdia quelen*) fingerlings. *Ciência Rural*. 2008;38:1050–5.
 24. Baldisserotto B, Martos-Sitcha JA, Menezes CC, Toni C, Prati RL, Garcia LDO, et al. The effects of ammonia and water hardness on the hormonal, osmoregulatory and metabolic responses of the freshwater silver catfish *Rhamdia quelen*. *Aquat Toxicol*. 2014;152:341–52.
 25. Jin Y, Chen R, Liu W, Fu Z. Effect of endocrine disrupting chemicals on the transcription of genes related to the innate immune system in the early developmental stage of zebrafish (*Danio rerio*). *Fish Shellfish Immunol*. 2010;28(5-6):854–61.
 26. Koziczak-Holbro M, Littlewood-Evans A, Pöllinger B, Kovarik J, Dawson J, Zenke G, et al. The critical role of kinase activity of interleukin-1 receptor-associated kinase 4 in animal models of joint inflammation. *Arthritis Rheum*. 2009;60(6):1661–71.
 27. Díaz-Resendiz KJG, Toledo-Ibarra GA, Giron-Perez MI. Modulation of immune response by organophosphorus pesticides: Fishes as a potential model in immunotoxicology. *J Immunol Res*. 2015;(1-10)
 28. Hayes TB. There Is No Denying This: Defusing the Confusion about Atrazine. *Bioscience*. 2004;54(12):1138.
 29. Casanova-Nakayama A, Wenger M, Burki R, Eppler E, Krasnov A, Segner H. Endocrine disrupting compounds: Can they target the immune system of fish? *Mar Pollut Bull*. 2011;63(5-12):412–6.
 30. Kramer PR, Kramer SF, Guan G. 17- β -estradiol regulates cytokine release through modulation of CD16 expression in monocytes and monocyte-derived macrophages. *Arthritis Rheum*. 2004;50(6):1967–75.
 31. Seemann F, Knigge T, Rocher B, Minier C, Monsinjon T. 17 β -Estradiol induces changes in cytokine levels in head kidney and blood of juvenile sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L., 1758). *Mar Environ Res*. 2013;87-88:44–51.
 32. Rogers a, Eastell R. The effect of 17beta-estradiol on production of cytokines in cultures of peripheral blood. *Bone*. 2001;29(1):30–4.
 33. Wang X, Xing H, Li X, Xu S, Wang X. Effects of atrazine and chlorpyrifos on the mRNA levels of IL-1 and IFN- γ 2b in immune organs of common carp. *Fish Shellfish Immunol*. 2011; 31(1):126–33.
 34. Klebanoff SJ. Myeloperoxidase: friend and foe. *J Leukoc Biol*. 2005;
 35. Devos S, De Bosscher K, Staels B, Bauer E, Roels F, Vanden Berghe W, et al. Inhibition of cytokine production by the herbicide atrazine: Search for nuclear receptor targets. *Biochem Pharmacol*. 2003;65(2):303–8.
 36. Hooghe RJ, Devos S, Hooghe-Peters EL. Effects of selected herbicides on cytokine production in vitro. *Life Sci*. 2000;66(26):2519–25.
 37. Kreutz LC, Gil Barcellos LJ, de Faria Valle S, de Oliveira Silva T, Anziliero D, Davi

- dos Santos E, et al. Altered hematological and immunological parameters in silver catfish (*Rhamdia quelen*) following short term exposure to sublethal concentration of glyphosate. *Fish Shellfish Immuno*. 2011 ;30(1):51–7.
38. Pathak RK, Dikshit AK. Atrazine and Human Health. *Int J Ecosyst*. 2011;1(1):14–23.

Tabela 1: *Primers* degenerados para realização de PCR convencional, bem como suas respectivas temperaturas de anelamento, tamanhos dos fragmentos obtidos e a homologia da sequência de cada fragmento com o a região respectiva do gene do *I. punctatus*.

Gene alvo	<i>Primers</i>	Sequência (5'-3')	Temperatura de anelamento	Tamanho do Fragmento (pb)	Homologia <i>I. punctatus</i>
β-Actina	β -Act-F β -Act-R	ACCACAGCCGAGAGAAAT TCCTGTCTGCAATGCCAGGGT	56°C	336	96%
RNA18s	RNA18s-F RNA18s-R	TCGAAATGTCTGCCCTATCAAC CCACAAAATAGAAACCGGAGTCC	54°C	550	98%
IL-1β	IL-1 β -F IL-1 β -R	TGATGARMITGGACTG CCCARRCAYACAGGCTG	47°C	456	82%
TNF-α	TNF- α F TNF- α -R	GTCCTKCTSGCYGTGGC CCTGRCTGTAGACGAAAGTA	53°C	283	79%
iNOS	iNOS-F iNOS-R	CTGATGGCCARCATGATTTCCG CCAATCTCCAGCAACATGTTGGACAC	60°C	330	88%
Mielo	Mielo-F Mielo-R	CTGTRAGAGCYGCAGA TGTTCTCRTCMACACG	48°C	948	79%
IRAK4	Irak4-F Irak4-R	TATGCTTACATGTCHAAATGGTTC CATCYTTCATCTCYATCAG	48°C	425	88%
Mx	Mx-F Mx-R	GCACAGCACCTGTATC GAGCTGAAGATGAAGAGG	50°C	1081	89%

Tabela 2: *Primers* para qPCR e suas respectivas temperaturas de anelamento

Gene alvo	Primers	Sequência (5'-3')	Temperatura de anelamento	Eficiência
β-Actina	q β -Act-F q β -Act-R	ATTGGCAATGAGAGGTTTCAGG CGGATATCGACGTCACACTTC	55°C	97.1%
IL-1β	qIL-1 β -F qIL-1 β -R	GTTCACTGACCAGGAGCTTT GCATGCTGTAAGTGTGGATTC	60°C	97.8%
TNF-α	qTNF- α -F qTNF- α -R	TTCCGAGACGGCGAAAG TCCTGAAGAGAAGGACTGGT	60°C	96.4%
Mielo	qMielo-F qMielo-R	TGATTGTGCGTCTGACTGG GCTGTGCGGTATCTGTTCA	60°C	98.6%
IRAK-4	qiRAK-4-F qiRAK-4-R	GTACCCACAATCCTCTCTGTAATC TGGACGAATCCTTCATTGCTAA	60°C	99.4%
Mx	qMx-F qMx-R	GGATAAAGGCACGGAGGATAC CTGTCCTCTACACCTGACAATC	60°C	97.9%

Figura 1: Eletroforese em gel de agarose demonstrando os fragmentos dos genes amplificados por PCR. 1: Marcador 100pb (LUDWIG), 2: β -actina, 3: RNA18S, 4: Mieloperoxidase, 5: TNF- α ; 6: Mx, 7: iNOS, 8: IRAK4, 9: IL-1 β .

Figura 2: Alinhamento das sequências gênicas obtidas para o Jundiá com as sequências do *I. punctatus*. Os primers de qPCR estão sublinhados e acompanhados de uma seta com a direção do primer: \blacktriangleright (primer forward), \blacktriangleleft (primer reverse)

Figura 3: Níveis de mRNA dos genes imunológicos após exposição de Jundiás a ATR (n=6). Os valores estão representados por média \pm EPM ($2^{-\Delta\Delta ct}$). * Diferença significativa ($p < 0.05$) entre o grupo controle e grupo exposto a ATR.

Figura 4: Níveis de mRNA dos genes imunológicos após exposição de leucócitos mononucleares de Jundiás a ATR *in vitro* (n=3). Os valores estão representados por média \pm EPM ($2^{-\Delta\Delta ct}$). * Diferença significativa ($p < 0.05$) entre o grupo controle e grupo exposto a ATR.

Figura 1

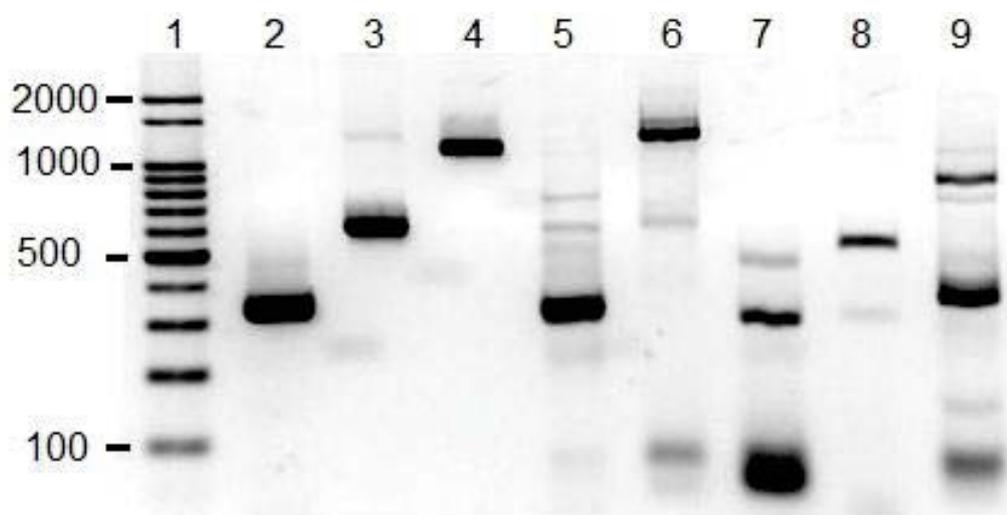


Figura 2

Gene RNA 18S *Rhamdia quelen* x *Ictalurus punctatus*

R. quelen	CTACCATGGTGACCACGGGTAACGGGGAATCAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAG	77
I. punctat	CTACCATGGTGACCACGGGTAACGGGGAATCAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGGG	412
	➔	
R. quelen	AMMCGKYTACCACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCATTC CCG GACACGGG	137
I. punctat	AAACGGCTACCACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCATTC CCG GACACGGG	472
R. quelen	GAGGTAGTGACGAAAAATAACGATACAGGTCTCTTTTCGAGGCCCTGTAATCGGAATGAGC	197
I. punctat	GAGGTAGTGACGAAAAATAACGATACAGGTCTCTTTTCGAGGCCCTGTAATCGGAATGAGC	532
	←	
R. quelen	<u>GTATCCT</u> AMMCCCATGGGTGAGGACCCATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGG	257
I. punctat	GTATCCTAAACCCATGGGTGAGGACCCATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGG	592
R. quelen	TAATTCAGCTCCAATAGCGTATATTTAAAGTTGCTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGAT	317
I. punctat	TAATTCAGCTCCAATAGCGTATATTTAAAGTTGCTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGAT	652
R. quelen	CTCGGGAGTGGGCTGGCGGTCCGCCGCGAGGCGAGCCACCGCTGTCCCAGACCCTGCCT	377
I. punctat	CTCGGGAGTGGGCTGGCGGTCCGCCGCGAGGCGAGCCACCGCTGTCCCAGACCCTGCCT	712
R. quelen	CCCCGGTGCCCCCGGATGCCCTTGGCTGGGTGTCCGGTCCCTTTTCAGGGGTCCGGAGCG	437
I. punctat	CCCCGGCGCCCCCGGATGCCCTTGGCTGGGTGTCCGGTCCCTTTCAGGGGCCCCGGAGCG	772
R. quelen	TTTACTTTGAAAAAATTAGAGTGTTCAAAGCGGGCCGCCAAACTCGCCTGAATACCTGAG	497
I. punctat	TTTACTTTGAAAAAATTAGAGTGTTCAAAGCGGGCCGCCAAACTCGCCTGAATACCTGAG	832
R. quelen	CTAGGAATAATGGAATAGGACTCCGGTCTATTTTGTGGGT	538
I. punctat	CTAGGAATAATGGAATAGGACTCCGGTCTATTTTGTGGGT	873

Gene iNOS: *Rhamdia quelen* x *Ictalurus punctatus*

R. quelen	AGATACGCTGGCTATCATATGGACGACGGACAAATTATCGGAGACCCTGCTAACGTTGAC	62
I. punctatus	AGATACGCTGGCTATCAAACGGAGGATGGCCGAATTATAGGAGACCCTGCTAATGTGGAA	669
	➔	
R. quelen	TTCACTGAGATTTGTGTCCAACCTTGGATGGACACCAAAGTACGGCTCCTTTGATGTTTTG	122
I. punctat	TTCACTGAGATTTGTGTCCAACCTTGGATGGACACCAAAGTACGGGTCTTTGATGTGCTG	729
	←	
R. quelen	<u>CCTCTGATCCTGC</u> AGGCCAGTGGAGAAGATCCTGAGCTGTATGAAATTCCTCCAGAGTTA	182
I. punctat	CCACTGATCTTGCAGGCCAATGGGGAAGATCCTGAACTATTTGAAATTTCCAGGAGTTG	789
R. quelen	ATACTTGAGGTTGAAATAGAACACCCGAATCATGACTGGTTCAAAGATCTGAACCTTAGA	242
I. punctat	GTACTGGAGGTTGAAATAGAGCACCCACATATGAGTGGTTCAAAGATCTGAACCTTAGA	849
R. quelen	TGGTATGCGCTACCTGCTGTGTCCAACATGTTGCTGGAGATTGG	286
I. punctat	TGGTATGCAGTACCTGCAGTGTCCAACATGTTGCTGGAGATTGG	893

Gene Mieloperoxidase: *Rhamdia quelen* X *Ictalurus punctatus*

R. quelen	CACGCACACAWGAGATCCATAAACGCCACAGCACTGCTAACCCATGAAKAACTCSARATG	92
I punctatus	CACGCCACAAGAGATCCATCAACGCTACAGAAGTATTCTCCTAATGAGCTTCGCATG	499
R. quelen	ATTGTGCGTCTGACTGGMTGTGCTGCTCAAACCTTGCCACCTCCCTGCATAAC-ATTGCC	151
I punctatus	ATCGAGCGTCTGACTGGCTGTGCTGCTCAAGTCCAGCCCCCTTCTGCAGGACCACTCCC	559
R. quelen	AGATCTGAACAGATACCGCACAGCCACCAGCGTCTGCAACAACCATGTAAATCCATTTCA	211
I punctatus	A-ACGTTAACAAGTACCGCACCGCAACAGCGTCTGCAACAACCGGAAGAACCCGCTTCT	618
R. quelen	AGGARCTCAAACACAGCCTTCAMCCGCTGGCTGCCTCCARCTTATGAAGATAACATCTC	271
I punctatus	CGGTGCAGCGAACACGCCCTTAGCTAGCTGGCTTCTACTATTTATGAAGACGGGATCTC	678
R. quelen	CCAGCCTCAAGGATGGAACCCakaaaraCTCTACAATGGAGTTTTGCTGCCACTGGTGAG	331
I punctatus	GCAGCTGTAGGATGGAACCCAGGCAGACTCCACAACGGGGTCTCCCTCCCTCTGGTGAG	738
R. quelen	GCTGGTGTCAAATCCCATTTTCAGCA	357
I punctatus	GCTGGTGTGCAACCAGATTTTGAGCA	

Gene IL-1 β *Rhamdia quelen* x *Ictalurus punctatus*

R. quelen	AWGTGAMCTGCACAA-GGACTCCGTATTGAAGTTACCAGGGAGCCTCATAGCATGCGCCG	75
I. puntat	ATGTGACCTGCACAAAGGACTCCGCATCGAGGTACCAAGGAGCCTCTTAGTATGCGCCA	256
R. quelen	CAYYGCTACAGTTTTAATAGCTGTGCAGAGATTAAGCACATTC AACATGCTCAATCCAC	135
I. puntat	TGTTGCTAATGTTGTAATCGCTTTGCGAGGCTGAAACTCACTCAAAATATTCAGTCCAC	316
R. quelen	AGAGTTCACTGACCAGGAGCTTTTAAATATCTTTATTGAAAATGTGATTGAAGATAATAT	195
I. puntat	GGAGTTCACCGACCAGGAGCTTTTCAATGTCTTCATTGATAATGTGATTGAAGAGAGCAT	376
R. quelen	GGAGATCAATTTGACGTGCAGTGAATCCAACAGTTACAGCATGCAGGACAAGGTTGTGCA	255
I. puntat	GGTGATCAATTTGAAGTGCAGTGAATCCAAGGTTACAGCTGCAAGACAAGGTTGTGCG	436
R. quelen	GTGCACTATATGTGACAAGTCTAAAAGGGCCCTGGTGAARAARGAAAATCTTCTGWTCT	315
I. puntat	GTGCACTATATGTGACAAGTCTAAAAGGGCTTTGGTGCAGAAGGAAAAGCTTCTCTTCT	496
R. quelen	TCTGG	320
I. puntat	GCTGG	501

Gene Mx *Rhamdia quelen x ictalurus punctatus*

R. quelen	GAAAGATCAAGTACAAGAARGATCATGACCAGGAATATGAGGAAGAGATTRAAGATCCAG	83
I. punctatus	GAAAGATCAAGTACAAGAAAGATCACGATGAGGATTATGAAGAAGAGATCCAAAATCCAG	443
R. quelen	CARACGTGGAGAAAAAGATTAGAGAAGCTCAAGACCATATGGCTGGAGTTGGTGTGCGCA	143
I. punctatus	CAGACGTGGAGAAAAAGATTAGAGAAGCTCAGGACCATATGGCTGGGGTTCGGCGTGGGCA	503
R. quelen	TCAGCGAYGAGCTCATCAGCCTGGAAGTGACATCAGCTGATGTTCCCGACCTCACACTTA	203
I. punctatus	TCAGCGACGAGCTCATCAGCCTGGAAGTAACGTGAGCTGATGTTCCAGACCTCACGCTCA	563
R. quelen	TTGATCTGCCTGGTATTGCCCGTGTGGCAGTTAAAGGCCAACAGAGAATATTGGTGAAC	263
I. punctatus	TTGATCTGCCTGGTATTGCCCGTGTGGCAGTCAAAGGCCAACCGGAGAACATCGGAGAAC	623
R. quelen	AGATAAAAAGGCTAATCAGAAAGTTCATCACAAAGCAAGAAACCATCAATCTGGTGGTGG	323
I. punctatus	AGATTAAGAGGCTGATCAAAAAGTTCATCACAAAGCAAGAAACCATCAACTGGTGGTGG	683
R. quelen	TGCCATGTAACGTGGACATAGCCACTACYGAAGCATTAAAGATGGCTCAGGAGTTGATC	383
I. punctatus	TGCCGAGTAACGTGGACATCGCCACTACTGAAGCGTTGAAGATGGCTCAGGAAGTTGATC	743
R. quelen	CAAATGGCGAGAGAACCCTTGGCATTCTAACAAAGCCCGACCTGGTGGATAAAAGGCACGG	443
I. punctatus	CAAATGGCGAGAGAACCCTCGGCATCCTAACGAAGCCTGACCTGGTGGATAAAAGGCACGG	803
R. quelen	<u>AGGATACGGTGGTGTCTCYGTCATCCATAACGAGGTCATCTMCCTYACTAAAGGCTACATGA</u>	503
I. punctatus	AGGAGACGGTGGTGTCCATCATAACGAGATCATTACCTCACCAAAGGCTACATGA	863
R. quelen	<u>TTGTCAGGTGTAGAGGACAGAAGGAGATCATGGACCGTGTCTCTCTACGCGAAKCCACTG</u>	563
I. punctatus	TCGTCAGGTGCAGAGGGCAGAAGGAGATCATGGACCGTGTCTCTCTGCAGGAAGCCACCG	923
R. quelen	AGAAGGAGAAGGACTTCTTCAAAAATCACCCACATTTTCAGTACACTGTATGAWGAASACA	623
I. punctatus	AGAAGGAGAAGGACTTCTTTAAAGACCACCCACATTTTCAGCACACTGTATGAGGAAGGCA	983
R. quelen	TGGCCACCATTCCAAACCTG	643
I. punctatus	TGGCCACCATTCCAAACCTG	

Gene TNF- α : *Rhamdia quelen x ictalurus punctatus*

R. quelen	AACCAGATGA-ACASAAGAAATCAAACACACGCTGAGGCAGATTTCCGAGACGGCGAAAG	95
I. punctat	AACCAGACGAGACCCAAGAAATCAAGCACTCTCTCAGGCAGATTTCCAGACTGCGAAGG	332
R. quelen	CRGCGATCCATCTCKCAGGTAACGGGTACA-----CTGG----GAAC---TCGCTTCACT	143
I. punctat	CTGCGATCCATCTCTCAGGTCAC---TACAACCCGCGAGGTTTCGAGCGTATCTATGCAGT	389
R. quelen	GGTTCACCAACGCAGACCAGTCTTCTCTTCAGGATTAATAACTGGAGAAAAACAAGATCA	203
I. punctat	GGTTCGACAACGCAGACCAGTCTTCTCTTCAGGCTTGAAACTGGAGGACAACGAGATCA	449
R. quelen	AGATTATGCGTACCGGTTTGTACTTCRTMTACAGCCAGG	242
I. punctat	AGATTCTCCGCGACGGCCTCTACTTCGTCTACAGCCAGG	488

Figura 3:

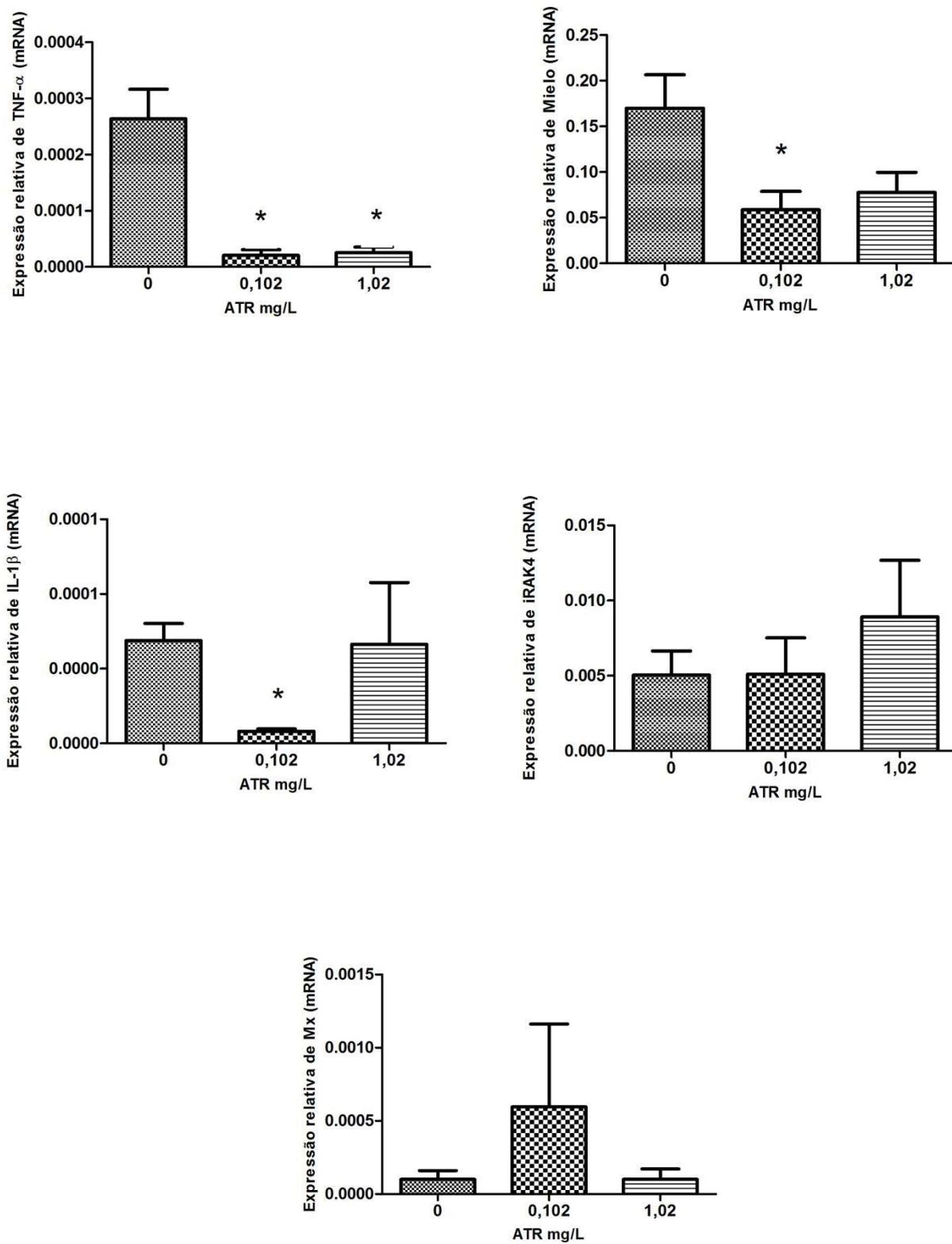
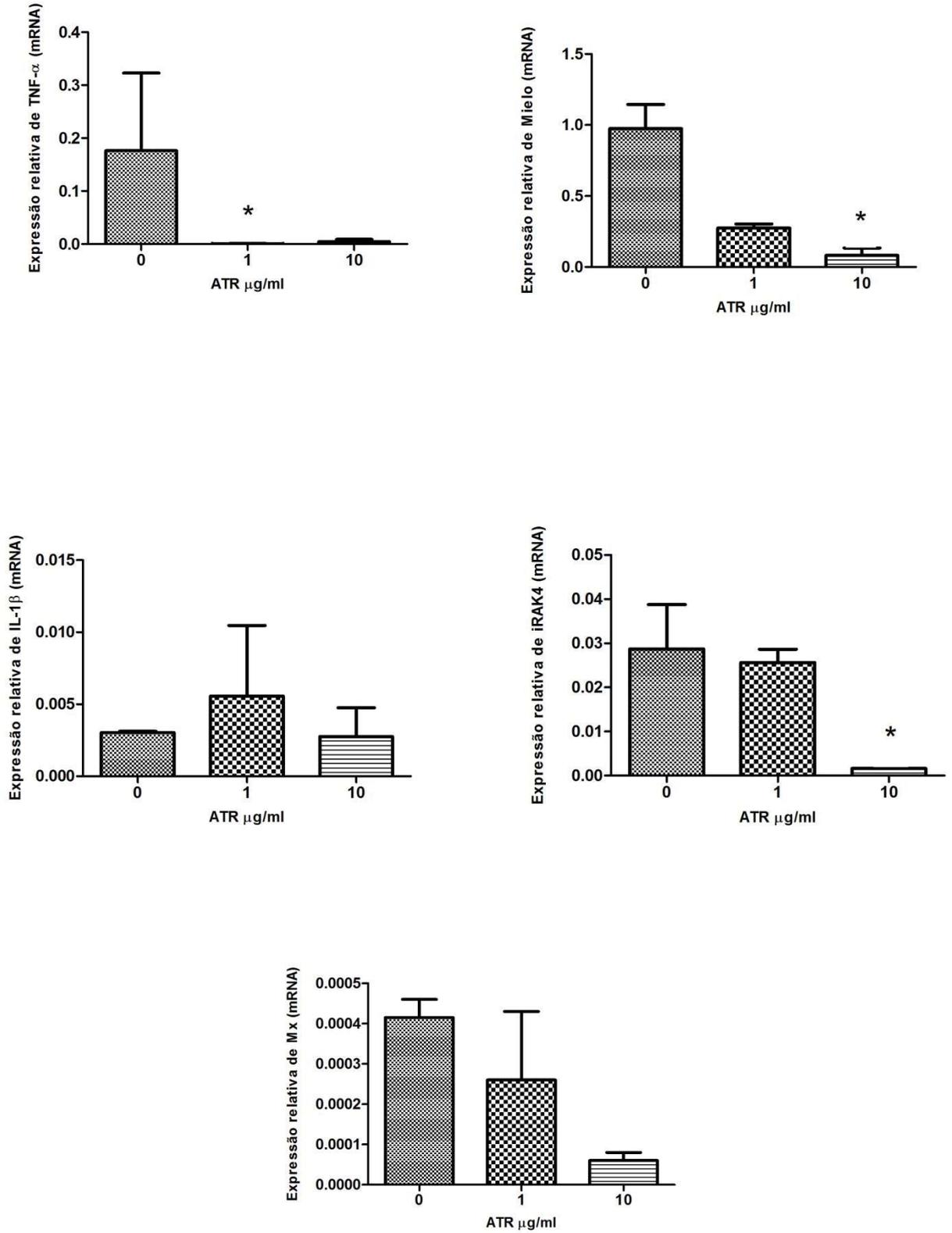


Figura 4:



4. CONCLUSÕES

Com a realização deste estudo, nós concluímos que a exposição ao herbicida atrazina causa redução da expressão de genes fundamentais para a resposta imunológica. Os resultados foram semelhantes em peixes expostos a concentrações de atrazina na água (*in vivo*), e em leucócitos mononucleares de peixes expostos a atrazina em cultivo celular (*in vitro*).

Foi previamente demonstrado que a exposição a atrazina causa um efeito deletério no sistema imune inato, com redução do índice fagocitário e da taxa de sobrevivência após o desafio com *Aeromonas hydrophila*. Neste estudo nós evidenciamos que o provável mecanismo pelo qual ocorre a imunossupressão é por uma diminuição na expressão de genes imunes, como o TNF- α , IL-1 β , IRAK4, fundamentais para o início do processo inflamatório, e como a mieloperoxidase, enzima envolvida na destruição de patógenos após a fagocitose.

O sistema imune de peixes é um indicador sensível da presença de poluentes ambientais, e alterações no sistema imune causadas por produtos químicos reduzem a capacidade de proteção contra infecções. Os peixes são considerados organismos em situação de alto risco para a modulação da resposta imunológica por produtos químicos no ambiente aquático, pois eles estão direta e constantemente expostos a estes produtos. Aqui nós demonstramos que baixas concentrações de atrazina na água prejudicam o sistema imune de peixes, aumentando a susceptibilidade a infecções.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A utilização de produtos químicos na agricultura vem aumentando gradativamente e a consequência disso é o acúmulo destes produtos e de seus resíduos no meio ambiente. Dentre os defensivos agrícolas, os herbicidas são amplamente utilizados, sendo importante identificar qual o impacto destes produtos em espécies aquáticas. Estudos anteriores demonstraram que a presença de herbicidas na água causa alterações no sistema imune dos peixes, porém o mecanismo pelo qual estas alterações ocorrem ainda não foi esclarecido. Neste estudo, avaliamos a expressão de genes imunológicos específicos em jundiás expostos ao herbicida atrazina para estabelecer quais as vias moleculares envolvidas nas alterações observadas no sistema imune.

O primeiro desafio para a realização desta pesquisa foi a seleção de *primers* que amplificassem sequências gênicas específicas de Jundiás, uma vez que dos genes avaliados, apenas a sequência da β - actina estava disponível no *Genbank*. A metodologia para seleção de *primers* de baseou em comparações de sequências gênicas em espécies de peixes com proximidade filogenética com o Jundiá. Obtivemos sucesso na seleção de *primers* para PCR convencional e a partir do sequenciamento dos fragmentos amplificados, selecionamos os primers para qPCR, permitindo assim a avaliação da expressão gênica em Jundiás.

Na avaliação da expressão gênica observamos que houve uma redução na expressão de genes imunológicos na avaliação *in vivo* e *in vitro*. Reforçando a hipótese de que os efeitos deletérios previamente observados no sistema imune ocorrem devido a uma redução na expressão de genes fundamentais para a resposta imune.

Este é o primeiro estudo que avalia expressão de genes imunológicos do *Rhamdia quelen*, bem como realiza cultivo celular desta espécie. A partir da metodologia de seleção de *primers*, verificamos que é possível avaliar a expressão gênica de uma espécie mesmo sem ter disponível a sequência do gene.

Por fim, nossa perspectiva é sequenciar os genes avaliados neste estudo através de kits de PCR 3' e 5' RACE e depositar as sequências no *Genbank*.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Carvalho L De, Jaqueline G, Golombieski I, Regina A, Gomes C, Baldisserotto B, et al. *BIOLOGIA DO JUNDIÁ Rhamdia quelen (TELEOSTEI, PIMELODIDAE)*. 2000;179–85.
2. Montanha FP, Nagashima JC, Kirnew MD, Astrauskas JP, Pimpão CT. Características fisiológicas e reprodutivas do Rhamdia Quelen. *Rev científica eletrônica Med Veterinária*. 2011;(17):8.
3. Kreutz LC, Gil Barcellos LJ, Marteninghe A, Davi dos Santos E, Zanatta R. Exposure to sublethal concentration of glyphosate or atrazine-based herbicides alters the phagocytic function and increases the susceptibility of silver catfish fingerlings (*Rhamdia quelen*) to *Aeromonas hydrophila* challenge. *Fish Shellfish Immunol*. 2010 Oct;29(4):694–7.
4. Oost D, Beyer J, Vermeulen NPE. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment : a review. *Environmental Toxicol Pharmacol*. 2003;13(2):57–149.
5. Cericato L, Neto JGM, Kreutz LC, Quevedo RM, da Rosa JGS, Koakoski G, 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 C Toxicol Pharmacol*. 2009 Apr;149(3):363–7. 6. Mokarizadeh A, Faryabi MR, Rezvanfar MA, Abdollahi M. A comprehensive review of pesticides and the immune dysregulation: mechanisms, evidence and consequences. *Toxicol Mech Methods*. 2015;6516(July):1–21.
7. Graymore M, Stagnitti F, Allinson G. Impacts of atrazine in aquatic ecosystems. *Environ Int*. 2001;26(7-8):483–95.
8. Ferreira D, Motta a. CD, Kreutz LC, Toni C, Loro VL, Barcellos LJG. Assessment of oxidative stress in *Rhamdia quelen* exposed to agrichemicals. *Chemosphere*. 2010 May;79(9):914–21.
9. Mela M, Guiloski IC, Doria HB, Randi M a F, de Oliveira Ribeiro C a, Pereira L, et al. Effects of the herbicide atrazine in neotropical catfish (*Rhamdia quelen*). *Ecotoxicol Environ Saf*. 2013 Jul;93:13–21.
10. Kreutz LC, Gil Barcellos LJ, de Faria Valle S, de Oliveira Silva T, Anziliero D, Davi dos Santos E, et al. Altered hematological and immunological parameters in silver catfish (*Rhamdia quelen*) following short term exposure to sublethal concentration of glyphosate. *Fish Shellfish Immunol*. 2011 Jan;30(1):51–7.
11. Kreutz LC, José L, Barcellos G, Davi E, Pivato M, Zanatta R. Fish & Shellfish Immunology Innate immune response of silver catfish (*Rhamdia quelen*) exposed to atrazine. *Fish Shellfish Immunol*. 2012;
12. Kreutz LC, Pavan TR, Alves a. G, Correia a. G, Barriquel B, dos Santos ED, et al. Increased immunoglobulin production in silver catfish (*Rhamdia quelen*) exposed to agrichemicals. *Brazilian J Med Biol Res*. 2014;47(6):499–504.
13. Dinarello C a. Historical Review of Cytokines. *Eur J Immunol*. 2007;37(Suppl 1):S34–45.
14. Tellez-Bañuelos MC, Santerre A, Casas-Solis J, Zaitseva G. Endosulfan increases seric interleukin-2 like (IL-2L) factor and immunoglobulin M (IgM) of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) challenged with *Aeromona hydrophila*. *Fish Shellfish Immunol*. 2010 Mar;28(2):401–5.
15. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Celular and molecular immunology*. 2015. 547 p.
16. Underhill DM, Goodridge HS. Information processing during phagocytosis. *Nat Rev*

- Immunol. 2012;12(7):492–502.
17. Yeh HY, Klesius PH. Changes of serum myeloperoxidase and nitric oxide in the early stage of *Edwardsiella ictaluri* infection in channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque). *J Fish Dis*. 2013;36(4):441–6.
 18. Ministério da Pesca e Aquicultura. 2015. p. <http://www.mpa.gov.br/>.
 19. Borges AM. Aquicultura Desenvolvimento Sustentável Cenário Brasileiro. Ministério da pesca e aquicultura. 2014;
 20. Van Wijngaarden RPA, Brock TCM, Van Den Brink PJ. Threshold levels for effects of insecticides in freshwater ecosystems: A review. *Ecotoxicology*. 2005;14(3):355–80.
 21. Cabrera L, Pinho F, Gilberto E. Estimativa de risco de contaminação das águas por pesticidas na região sul do estado do RS. *Quim Nov*. 2008;31(8):1982–6.
 22. Dores, Eliana Freire G aspar de C, Maria D-L-F. Contaminação do ambiente aquático por pesticidas. Estudo de caso: águas usadas para consumo humano em primavera do leste - Mato Grosso - Análise preliminar. 2001;24(1):27–36.
 23. Vonberg D, Vanderborght J, Cremer N, Pütz T, Herbst M, Vereecken H. 20 years of long-term atrazine monitoring in a shallow aquifer in western Germany. *Water Res*. 2014;50.
 24. Wang T, Secombes CJ. The cytokine networks of adaptive immunity in fish. *Fish Shellfish Immunol*. 2013;35(6):1703–18.
 25. Zhu L yun, Nie L, Zhu G, Xiang L xing, Shao J zhong. Advances in research of fish immune-relevant genes: A comparative overview of innate and adaptive immunity in teleosts. *Dev Comp Immunol*. 2012;39(1-2):39–62.
 26. Zou J, Secombes CJ, Long S, Miller N, Clem LW, Chinchar VG. Molecular identification and expression analysis of tumor necrosis factor in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Dev Comp Immunol*. 2003;27(10):845–58.
 27. Shachar I, Karin N. The dual roles of inflammatory cytokines and chemokines in the regulation of autoimmune diseases and their clinical implications. *J Leukoc Biol*. 2012;93(January):51–61.
 28. Haller O, Kochs G. Human MxA Protein: An Interferon-Induced Dynamin-Like GTPase with Broad Antiviral Activity. *J Interf Cytokine Res*. 2010;31(1):79–87.
 29. Klebanoff SJ. Myeloperoxidase: friend and foe. *J Leukoc Biol*. 2005;
 30. Jung JY, Madan-Lala R, Georgieva M, Rengarajan J, Sohaskey CD, Bange FC, et al. The intracellular environment of human macrophages that produce nitric oxide promotes growth of mycobacteria. *Infect Immun*. 2013;81(9):3198–209.
 31. Wang X, Xing H, Li X, Xu S, Wang X. Effects of atrazine and chlorpyrifos on the mRNA levels of IL-1 and IFN- γ 2b in immune organs of common carp. *Fish Shellfish Immunol*. Elsevier Ltd; 2011;31(1):126–33.
 32. Richard S, Prévot-D'Alvise N, Bunet R, Simide R, Couvray S, Coupé S, et al. Effect of a glyphosate-based herbicide on gene expressions of the cytokines interleukin-1 β and interleukin-10 and of heme oxygenase-1 in European sea bass, *Dicentrarchus labrax* L. *Bull Environ Contam Toxicol*. 2014;92(3):294–9.