



Universidade Federal do Rio Grande
Instituto de Ciências Biológicas
Pós-graduação em Biologia de
Ambientes Aquáticos Continentais



**Efeitos da contaminação ambiental nas respostas
de *CYP1A* em duas espécies de peixes guarús**

Cíntia da Cruz Chivittz

Orientador: Juliano Zanette

Rio Grande
2014



Universidade Federal do Rio Grande
Instituto de Ciências Biológicas
Pós-graduação em Biologia de Ambientes
Aquáticos Continentais



Efeitos da contaminação ambiental nas respostas de *CYP1A* em duas espécies de peixes guarús

Aluna: Cíntia da Cruz Chivittz

Orientador: Juliano Zanette

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia de Ambientes Aquáticos Continentais como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biologia de Ambientes Aquáticos Continentais.

Rio Grande
2014

AGRADECIMENTOS

Primeiramente quero agradecer a minha família, em especial aos meus pais, pelo incentivo de sempre. Pai e mãe, obrigada por toda a educação que vocês me proporcionaram até hoje e por me ensinarem o verdadeiro valor das coisas. Gostaria de agradecer também a professora Ioni Colares, exemplo de profissional e de pessoa, que me ajudou muito na fase inicial do mestrado, obrigada pelas conversas e pelos conselhos. Ao meu orientador Juliano Zanette, por ter aceitado me orientar, mesmo sabendo que eu não tinha conhecimento algum sobre peixes e sobre biologia molecular. Obrigada pelos ensinamentos e pela confiança!

Aos colegas do PPG-BAC 2012, obrigada pela troca de conhecimento e pela companhia sempre agradável. As meninas do BAC, obrigada pelas conversas e por não me deixarem esmorecer nos momentos mais difíceis, vocês são demais! A minha turma da graduação, que mesmo com a distância está sempre presente de alguma forma, e que a cada encontro me faz ter orgulho de ter escolhido esta profissão. Aos técnicos Bernardo Vaz e Josencler Ferreira, sempre prestativos e dispostos a me ensinarem tudo sobre peixes, biotério e experimentos, muito obrigada. A querida Loraine Moraes, técnica do laboratório mais bonito e organizado da FURG, que com o seu bom humor contagiante fez os meus dias de laboratório muito mais agradáveis. Obrigada ao professor Cleber Palma Silva e ao técnico Leonardo Furlanetto por me ajudarem com as coletas e análise dos dados de água.

Aos meus “orientadores de laboratório” Mauricio e Cássia, que me ajudaram muito no começo do mestrado, sempre fazendo tudo parecer mais fácil. Ao Mauricio, que passou dias e dias me ensinando absolutamente tudo, muito obrigada por toda a paciência e pelo apoio, e por sempre me tranquilizar quando eu fazia alguma coisa errada. A minha amiga querida Debora, minha eterna dupla, que me acompanhou desde o vestibular até aqui, obrigada por tudo! Obrigada por me ajudar no laboratório, nas saídas de campo e por me dar aquela força sempre que eu precisava. Vamos formar sempre a melhor equipe (de duas) de pescadoras, de fotógrafas, seja lá o que vier pela frente.

Quero agradecer também ao Roger, o MALA mais legal que eu conheço. Obrigada pela ajuda nas saídas de campo, nas disseções, no trabalho braçal, no laboratório e também pelos sustos noturnos na fisiologia (vai ter volta! hahaha). Deixo um agradecimento também ao grupo de biomarcadores ambientais, que me proporcionou conhecer pessoas tão queridas como a Sabrina, a Vanessa, o Guilherme e o Félix. Aos meus companheiros de aventura, que literalmente enfiaram o pé na valeta comigo, além do Roger e da Debora; Mainara, Eduardo, Guilherme, Prof^o Flávio, Fernanda, Viviane, Bia e Félix, a ajuda de vocês foi fundamental e com

certeza vocês tornaram as saídas muito mais divertidas. As minhas amigas de fé e de sempre Karine, Keli, Bel, Manuh e Tchana, obrigada por todo o apoio e por fazerem da nossa amizade o meu porto seguro, amo vocês! Obrigada ao tio César, pelas dicas de pescador, por me indicar os melhores pontos de coleta e por se preocupar com as minhas pescarias, muitas vezes frustradas! A Manuh e a Bel, que além de amigas, também me acompanharam nos melhores dias de coleta, durante as férias e os finais de semana, realmente quem têm amigas tem tudo!

Ao meu namorado Leonardo, que esteve comigo desde o começo do mestrado, tornando os meus dias mais leves e os meus finais de semana mais completos. Obrigada por acreditar mais no meu potencial do que eu mesma, por viver repetindo que eu era capaz e que tudo iria acabar bem. Tudo é muito melhor e mais fácil do teu lado! Quero agradecer também a Michele Cristello, um exemplo de profissional, que me fez acreditar na conclusão deste mestrado e que foi fundamental para que eu concluísse essa etapa da melhor maneira possível, com toda minha admiração, muito obrigada!

“Agradecer é o reconhecimento do bem feito por alguém”, e por isso sou imensamente grata a todos que de alguma forma contribuíram com o mínimo que fosse para a conclusão desse mestrado. Sempre digo que minha turma da graduação, eterno ATBio 2011, foi a melhor parte da faculdade, agora também tenho a melhor parte do mestrado.

Muito obrigada!

RESUMO

A poluição dos ambientes aquáticos por contaminantes orgânicos e misturas complexas, como aquelas provenientes de efluentes domésticos e industriais, tem levado certas populações de peixes a apresentarem adaptações bioquímicas e moleculares. Dentre estas, estão o aumento nos níveis do citocromo P450 1A (*CYP1A*), e em algumas populações, a perda da sua capacidade de indução após exposição a contaminantes agonistas do receptor de hidrocarbonetos aromáticos (AHR). Tal impossibilidade de induzir *CYP1A* é denominada resposta refratária, e vem sendo estudada há décadas em certas populações de peixes nativos da América do Norte. O presente estudo avaliou as respostas transcricionais de *CYP1A* utilizando RT-qPCR em brânquia, fígado e gonopódio dos peixes guarús Sul-Americanos *Jenynsia multidentata* e *Phalloceros caudimaculatus* coletados no entorno do estuário da Lagoa dos Patos, RS, Brasil. Os níveis de *CYP1A* em *J. multidentata* e *P. caudimaculatus* de um local contaminado por efluentes domésticos e outro próximo ao polo petroquímico, respectivamente, foram mais altos do que em locais referência, distantes destas fontes de contaminação. Exemplares de *J. multidentata*, provenientes de quatro locais foram expostos a 1 µM de β-naftoflavona (BNF) durante 24 h; e obtiveram indução de *CYP1A* em todos os órgãos em relação aos controles, exceto no fígado de peixes de um local contaminado, o que indica a possível existência de resposta refratária de *CYP1A*. Os resultados sugerem que os mecanismos responsáveis pela adaptação de *J. multidentata* aos locais poluídos são de alguma forma semelhantes aos encontrados em peixes da América do Norte e, possivelmente, envolve a resposta refratária de *CYP1A* e polimorfismos do AHR. O presente estudo forneceu informações a respeito da adaptação envolvendo respostas refratárias de *CYP1A* em peixes de locais poluídos e dá suporte para a utilização dos níveis transcricionais de *CYP1A* em guarús Sul-Americanos como biomarcador para o monitoramento da contaminação ambiental.

Palavras-chave: América do Sul, *CYP1A*, peixes, poluição, resposta recalcitrante.

ABSTRACT

The water pollution caused by organic contaminants and complex mixtures, such as domestic and industrial sewage, caused some fish species to adapt at the biochemical and molecular level. This adaptation includes the increase in the level of cytochrome P450 1A (CYP1A) and an absence of induction by compounds that are agonists of the aryl hydrocarbon receptor (AHR). This impossibility to induce *CYP1A* is called refractory response of the *CYP1A*, and has been studied by decades in some native fish populations in North America. The present study evaluated the transcriptional responses of *CYP1A* using RT-qPCR in gills, liver and gonopodium of the South American guppies *Jenynsia multidentata* and *Phalloceros caudimaculatus* collected around the Patos Lagoon Estuary, RS, Brazil. The level of *CYP1A* in *J. multidentata* and *P. caudimaculatus* collected in a stream contaminated with domestic sewage discharges and from an area close to a petrochemical center, respectively, showed high levels of *CYP1A* expression when compared to reference locations distant from these sources of contamination. Copies of *J. multidentata*, from four sites were exposed to 1 μ M of β -naftoflavona (BNF) for 24 h; and obtained induction of *CYP1A* in all organs compared to controls, except for the liver of fish from one contaminated site, which indicates the possible existence of *CYP1A* refractory response. The results suggest that the mechanisms responsible for the adaptation of *J. multidentata* to live in polluted sites are somehow similar to those found in North American fish and possibly are also related to the *CYP1A* refractory response and AHR receptor polymorphisms. This study provided information about the adaptation involving refractory responses of *CYP1A* in fish from polluted environments and give support for the use of *CYP1A* transcriptional levels in South American guppies as biomarkers for the monitoring of environment contamination.

Key-words: South America, *CYP1A*, fish, pollution, recalcitrant response.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS DA INTRODUÇÃO GERAL	9
LISTA DE FIGURAS DO ARTIGO	9
LISTA DE TABELAS DO ARTIGO	10
1. INTRODUÇÃO GERAL	11
1.1. As águas continentais e a contaminação aquática	11
1.2. Os contaminantes orgânicos	12
1.3. A contaminação no estuário da Lagoa dos Patos e na cidade de Rio Grande	14
1.4. O monitoramento ambiental e os peixes guarús como biomonitores	15
1.5. Biomarcadores ambientais	20
1.6. O biomarcador citocromo P4501A (CYP1A)	21
1.7. Resposta refratária de <i>CYP1A</i> em peixes Cyprinodontiformes	23
2. OBJETIVOS	25
2.1. Objetivo geral	25
2.2. Objetivos específicos	25
3. REFERENCIAS	26
CAPÍTULO 1 (Artigo)	38
Abstract	43
1. Introduction	45
2. Material and methods	48
2.1. Collection locations	48
2.2. Evaluation of physico-chemical parameters of the water	49
2.3. Levels of <i>CYP1A</i> in <i>Jenynsia multidentata</i> and <i>Phalloceros caudimaculatus</i> collected around the Estuary of Patos Lagoon	50
2.4. Evaluation of the refractory response of <i>CYP1A</i> in <i>Jenynsia multidentata</i>	51
3. Results	52
3.1. Evaluation of physico-chemical parameters of the water	52
3.2. Levels of <i>CYP1A</i> in <i>Jenynsia multidentata</i> and <i>Phalloceros caudimaculatus</i> collected around the Estuary of Patos Lagoon	53
3.3. Evaluation of the refractory response of <i>CYP1A</i> in <i>Jenynsia multidentata</i>	54
4. Discussion	54
4.1. <i>CYP1A</i> expression in <i>Jenynsia multidentata</i> and <i>Phalloceros caudimaculatus</i> in relation to the collection sites	55
4.2. Evaluation of the refractory response of <i>CYP1A</i> in <i>Jenynsia multidentata</i>	60

5. Conclusions	63
Acknowledgements	63
References	65

LISTA DE FIGURAS DA INTRODUÇÃO GERAL

- Figura 1.** Imagem ilustrativa da fêmea (♀) e do macho (♂) de *Jenynsia multidentata* (Anablepidae). O círculo em vermelho no macho representa a nadadeira anal modificada em gonopódio (Vieira et al., 1998; Betito, 2006). 19
- Figura 2.** Imagem ilustrativa da fêmea (♀) e do macho (♂) de *Phalloceros caudimaculatus* (Poeciliidae). O círculo em vermelho no macho representa a nadadeira anal modificada em gonopódio (Kock et al., 2000). 19
- Figura 3.** Desenho esquemático da indução do gene *CYP1A* na presença de benzopireno, um hidrocarboneto policíclico aromático (HPA). 23

LISTA DE FIGURAS DO ARTIGO

- Figure 1.** Sampling sites of *Jenynsia multidentata* (S1, S2, S3 and S4) and *Phalloceros caudimaculatus* (S5, S6 and S7) in the city of Rio Grande, in the Estuary of Patos Lagoon, Brazil. The shaded area in the right panel corresponds to the urbanized region of the city.76
- Figure 2.** *CYP1A* transcript levels in gill, liver and gonopodium of *Jenynsia multidentata* sampled at four sites in the city of Rio Grande, in the Patos Lagoon Estuary, Brazil. Equal letters over the bars indicate significant similar groups, and numbers indicate fold induction compared with the Site 1 (S1), the less urbanized area. Significant differences were observed between groups using one-way ANOVA, followed by Tukey-HSD ($p < 0.05$)77
- Figure 3.** *CYP1A* transcript levels in gill, liver and gonopodium of *Phalloceros caudimaculatus* sampled at three locations in the city of Rio Grande, in the Patos Lagoon, Brazil Estuary. Same letters over the bars indicate similar means, and the numbers indicate fold induction compared with Site 5 (S5), the most distant from the

petrochemical complex. Significant differences were observed between groups using one-way ANOVA followed by Tukey's HSD test ($p < 0.05$).78

Figure 4. *CYP1A* transcriptional levels in gill, liver and gonopodium of *Jenynsia* after 24 h waterborne exposure to 1 μ M BNF (dark bars) and control (DMSO; gray bars). The *CYP1A* induction to BNF was evaluated in four different fish populations, sampled in four sites of the city of Rio Grande, in the Patos Lagoon Estuary, Brazil. Same letters over the bars indicate similar groups and the numbers represent fold induction of exposed groups compared to their respective controls (ANOVA, Tukey-HSD, $p < 0.05$).79

LISTA DE TABELAS DO ARTIGO

Table 1. Characteristics and location of the sampling sites of *Jenynsia multidentata* and *Phalloceros caudimaculatus* in the city of Rio Grande, in the Patos Lagoon Estuary, Brazil.....80

Table 2. Temperature, pH, salinity, dissolved oxygen, total phosphorus and total nitrogen in the four *Jenynsia multidentata* sampling sites. Values are the means and standard deviations of each parameter evaluated respectively. Different letters indicate significant difference between the locations determined by one-way ANOVA and Fischer LSD test ($p < 0.05$).80

Table 3. Characteristics and location of the sampling sites of *Jenynsia multidentata* and *Phalloceros caudimaculatus* in the city of Rio Grande, in the Patos Lagoon Estuary, Brazil.....81

Table 4. Forward (F) and reverse (R) primers to β -actin and *CYP1A* used in qPCR analysis for *Jenynsia multidentata* (Jm) and *Phalloceros caudimaculatus* (Pc).....81

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1. As águas continentais e a contaminação aquática

O conceito de águas continentais engloba em sua classificação uma variedade de ecossistemas. Entre eles incluem-se os corpos de água doce, salgada ou salobra, de origem natural ou artificial e com um regime de inundação temporário ou permanente (Maltchik et al., 2004). Essas áreas abrangem alguns dos ecossistemas mais produtivos do planeta, e são comumente encontradas em países da América do Sul (Rolon et al., 2004). O elevado grau de biodiversidade das águas continentais deve-se às interações com os ecossistemas adjacentes. As características físicas e químicas desses locais, juntamente com a heterogeneidade espacial formam um mosaico terra-água, com elevado grau de nutrientes, o que aumenta a sua produtividade e a sua biodiversidade (Ward et al., 1999; Rolon e Maltchik, 2006).

Nas últimas décadas, o processo de industrialização, sobretudo dos países em desenvolvimento, e o aumento da população mundial levaram ao incremento de compostos químicos nos corpos d'água (Hojat e Rahim, 2012). Em razão disso, as águas continentais são um dos ecossistemas mais afetados pela atividade antrópica, que é considerada a grande responsável pela redução da qualidade ambiental da água, e por alterações na saúde dos seres vivos que dependem direta ou indiretamente desse recurso (Cajaraville et al., 2000).

As águas continentais estão constantemente expostas a diversas fontes de contaminação, como substâncias tóxicas oriundas dos efluentes indústrias e domésticos, das atividades de drenagem agrícola e de derrames de contaminantes orgânicos, que incluem petróleo e gasolina (Besse et al., 2013). Na água, os contaminantes persistentes tem a propriedade de sofrer biomagnificação nos diferentes níveis tróficos da cadeia alimentar, podendo atingir diferentes sistemas além do seu local de descarga (Sarkar et al., 2006). Entre os principais contaminantes de origem antrópica estão os metais pesados, os poluentes orgânicos persistentes (POPs), os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) e uma infinidade de pesticidas (Ndiaye et al., 2012).

1.2. Os contaminantes orgânicos

Os contaminantes orgânicos compõem uma das principais classes de substâncias que afetam os ecossistemas aquáticos (Van Hamme et al., 2003). Substâncias dessa natureza incluem os óleos e as graxas, que podem ser de origem mineral, animal ou vegetal. Entre os contaminantes orgânicos mais comumente encontrados nas águas, destacam-se o petróleo e seus derivados, essencialmente pela alta demanda mundial e crescente produção (Fortuny et al., 2008). O petróleo é constituído por uma mistura de hidrocarbonetos aromáticos, compostos não hidrocarbonados e outras substâncias orgânicas. Em seu estado líquido apresenta-se como uma substância oleosa, inflamável e menos densa que a água (Triggia et al., 2001; Van Hamme et al., 2003).

Nas águas, a presença desse contaminante diminui a área de contato entre a água superficial e o ar atmosférico, o que impede a transferência do oxigênio presente na atmosfera para o ecossistema aquático (Bielecka et al., 2002). Em processos de decomposição, a presença de petróleo é responsável por reduzir o oxigênio dissolvido, o que conseqüentemente aumenta as taxas de demanda bioquímica de oxigênio (DBO) e demanda química de oxigênio (DBQ) (Vieira et al., 2007).

Essa redução na taxa de oxigênio dissolvido provoca alterações no ambiente aquático, o que prejudica as trocas gasosas dos animais e a ocorrência da fotossíntese (Piedade et al., 2000; Bielecka et al., 2002). Em ecossistemas de água doce, o impacto do petróleo e de seus derivados pode ser mais severo do que em águas marinhas, principalmente pela menor movimentação das águas continentais. Devido à complexidade desses sistemas, o óleo pode tanto ficar parado e permanecer no ambiente, como ser capturado por vegetais aquáticos e por aqueles presentes na margem, podendo interagir com outros organismos e com o sedimento (Woodhead et al., 1999).

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) estão entre os principais contaminantes orgânicos abordados em estudos ambientais. Os HPAs são compostos aromáticos, que incluem dois ou mais anéis benzênicos em sua estrutura, além de átomos de carbono e oxigênio (Netto et al., 2000). A origem dos HPAs provém da combustão incompleta da matéria orgânica, influenciada essencialmente pela temperatura e pela pressão (Siroka e Drastichova, 2004). A queima de florestas e de combustíveis fósseis aparecem como os principais responsáveis pela presença de HPAs no ambiente (Siroka e Drastichova, 2004). No entanto, os responsáveis pelo aumento nos índices de HPAs são provenientes de outras fontes, como atividades petroquímicas de refino e produção das

diferentes frações de petróleo, além de acidentes de derramamento, esgotos urbano e industrial e produção de energia elétrica (Yunker et al., 2002; Sisino et al., 2003).

Esses contaminantes podem provocar danos a nível genético na população humana, devido às suas propriedades mutagênicas e carcinogênicas (Netto et al., 2000). Em função da sua hidrofobicidade, os HPAs lançados no ecossistema aquático podem ser absorvidos pelos organismos ou interagir com as partículas em suspensão e com o sedimento. Isso se deve ao alto coeficiente de partição entre os solventes orgânicos e a água, que leva à sua acumulação nos sedimentos e nos solos (Holt, 2000).

O contato dos HPAs com as plantas aquáticas pode impedir a transpiração e reduzir a fotossíntese, pela sua presença nos poros dos estômatos, que restringe a entrada de CO₂. Como consequências desses efeitos, tem-se a redução no crescimento e diminuição da área foliar (Ekundayo et al., 2001; Maranhão et al., 2006). Em regiões temporariamente alagadas, a presença desse contaminante no solo pode causar a mortalidade das plantas aquáticas e interferir negativamente no ciclo de vida dos animais e no processo de rebrotamento das plantas (Lopes e Piedade, 2010).

Já a interação com os sedimentos pode aumentar ou diminuir o poder tóxico do contaminante, que depende de atuação de processos químicos, físicos e biológicos (Abessa, 2006). O grau de sensibilidade dos animais expostos à HPAs depende da concentração e do tempo de exposição ao contaminante. Em modelos experimentais, os HPAs são facilmente absorvidos pelos pulmões, intestinos, glândulas mamárias, tecidos adiposo e mucoso dos animais (Modica et al., 1983). Os HPAs em geral, possuem um período de meia vida curto. Os presentes no ar, por exemplo, possuem meia vida estimada em dias, que pode variar conforme a sua associação com o material particulado presente no ar. Dessa forma, não há relação entre o nível trófico ocupado pelos organismos e a sua sensibilidade aos HPAs, visto que esses contaminantes não sofrem processos de biomagnificação ou bioacumulação (Billet et al., 2008).

No ambiente, esses compostos são geralmente classificados como fontes não pontuais de contaminação. Isso se deve a sua associação com outras substâncias, que formam uma mistura complexa de contaminantes de origens distintas (Mantis et al., 2005). Em áreas menores, como corpos de água continentais, a elevada quantidade de HPAs presente tanto nos organismos, quanto nos sedimentos pode facilitar a investigação da sua fonte de emissão (Mantis et al., 2005).

1.3. A contaminação no estuário da Lagoa dos Patos e na cidade de Rio Grande

A Lagoa dos Patos é considerada a maior lagoa do Brasil, e recebe a maior parte do sistema de drenagem do estado do Rio Grande do Sul, constituindo um dos maiores ecossistemas aquáticos costeiros do mundo, com uma bacia de drenagem de 201.626 km² (Luz et al., 2010). A Lagoa dos Patos é na verdade uma laguna, por apresentar ligação direta com o Oceano Atlântico através da Barra de Rio Grande. A área ao sul da lagoa dos Patos constitui uma região estuarina, por apresentar características de um corpo de água costeiro, fechado, e com livre ligação com o mar (Castelo e Möller, 1978; Ferreira e D’Incao, 2008).

A porção estuarina abrange uma área de 900 km², e o uso de suas águas é destinado a diversas atividades, como irrigação, navegação comercial e turística, e principalmente pesca, uma vez que a economia das cidades estuarinas é dependente dessa atividade (Luz et al., 2010). Dessa forma, o estuário da Lagoa dos Patos é exposto a significativos efeitos antropogênicos, oriundos de atividades industriais e da ocupação urbana, provenientes principalmente da descarga de efluentes não tratados das cidades de Rio Grande, Pelotas e São José do Norte (Niencheski et al., 1988; Vilas Boas, 1990; Luz et al., 2010).

Além disso, a região estuarina da Lagoa dos Patos abriga um dos maiores complexos portuários do país, localizado na cidade de Rio Grande, o qual apresenta importância regional dentro do MERCOSUL, sendo o principal responsável pela movimentação de cargas no estado do Rio Grande do Sul. Por essa razão, diversas indústrias se estabeleceram na região, entre elas, indústrias de fertilizantes, uma refinaria de petróleo e a partir de 2006, as indústrias vinculadas ao polo naval (Garcia et al., 2010). Devido a essa concentração de indústrias, diversos estudos são realizados a fim de evidenciar a poluição em Rio Grande, especialmente nas áreas ao entorno dos polos industrial e portuário (Mirlean et al., 2002; Garcia et al., 2010).

O estudo de Mirlean et al. (2002) indicou a presença de substâncias oriundas das indústrias de fertilizante da cidade, como o Flúor, em solo e água da chuva. Nessa mesma área, constatou-se a presença de O₃ e de elevado acúmulo de PTS (partículas totais em suspensão) que foram responsáveis pela origem de problemas respiratórios na população, especialmente em bairros próximos ao polo industrial (Nóbrega e Krusche, 2010).

Igualmente, os contaminantes orgânicos são resultado da ação antrópica e conduzem estudos de monitoramento ambiental na região. Em Rio Grande, a contaminação orgânica é proveniente da combustão de combustíveis fósseis, de produtos petroquímicos lançados nos corpos d'água e do descarte de lixo doméstico e industrial (Santos et al., 2008; Medeiros et al., 2005). Estudos pioneiros de Kartin (1980) e Almeida et al. (1993) encontraram elevados índices de HPAs nas águas da área portuária referente ao Porto Novo, onde há liberação de efluentes da refinaria de petróleo.

Baisch et al. (2000) encontrou altas concentrações de óleo e graxa na Lagoa dos Patos, em uma área da cidade conhecida como o Superporto. Segundo Garcia et al. (2010) a cidade de Rio Grande registra elevados índices de HPAs quando comparada a outras cidades gaúchas, principalmente próximo à postos de combustíveis, à refinaria e à área portuária. Além disso, o tratamento do esgoto na cidade é considerado precário, bem como na maioria das cidades da América Latina, que tem grande parte do esgoto depositado em rios, estuários e oceanos (Medeiros et al., 2005). Assim, a descarga de esgoto e de resíduos industriais, somados a atividade de navegação são apontados como os principais responsáveis pela emissão de HPAs na cidade (Garcia et al., 2010).

1.4. O monitoramento ambiental e os peixes guarús como biomonitores

No Brasil, o monitoramento ambiental das águas teve início com estudos que utilizavam o diagnóstico dos parâmetros físico-químicos da água. As características físico-químicas da água podem auxiliar em programas de monitoramento ambiental, pois atuam como indicadores de contaminação aquática (White e Rasmussen, 1998). No entanto, estudos baseados unicamente na utilização destes parâmetros não são capazes de determinar as reais problemáticas do ecossistema, especialmente se a avaliação for distante da fonte de emissão (Pratt et al., 1976).

Atualmente, estudos que combinam diferentes metodologias tendem a fornecer respostas mais sensíveis a respeito das perturbações ambientais. A análise em conjunto da água, do sedimento e de organismos vivos, por exemplo, são potenciais indicadores de qualidade ambiental das águas continentais (Chiba et al., 2011). A análise de sedimento, por exemplo, fornece características importantes a respeito do grau de contaminação do ecossistema aquático, pois permite detectar contaminantes que não

permanecem solúveis, e que não seriam detectados apenas pela análise da água (Cotta et al., 2006).

Aliado a isso, o uso de organismos vivos tornou-se uma ferramenta importante em programas de monitoramento ambiental (Ladson et al., 1999). O biomonitoramento ou monitoramento biológico consiste no uso de respostas biológicas a fim de avaliar as mudanças ambientais e utilizar esse conhecimento em programas de melhoria da qualidade ambiental (Suyama et al., 2002; Guimarães et al., 2004). Segundo Buss et al. (2003) o mecanismo natural de bioacumulação dos organismos vivos fornece informações de compostos tóxicos acumulados, que por vezes não são detectados somente com o estudos de parâmetros físico-químicos da água. Em vista disso, o monitoramento biológico permite a detecção temporal de contaminantes, enquanto a avaliação físico-química da água fornece apenas dados atuais de contaminação (Rinaldi, 2007).

Atualmente, o estudo de monitoramento biológico pode ser classificado como ativo ou passivo (Besse et al., 2013). O biomonitoramento passivo utiliza organismos nativos do local de estudo, enquanto o ativo permite a utilização de organismos transplantados de locais de referência para o local de interesse (Sudaryanto et al., 2002; Andral et al., 2004; Benedicto et al., 2011). O monitoramento passivo é tradicionalmente o mais empregado em estudos ambientais e é útil na determinação de contaminantes orgânicos e metais. No entanto, o monitoramento ativo aparece como uma alternativa para contornar eventuais limitações, como a efetiva presença de um organismo no local de estudo (Besse et al., 2012). Apesar disso, estudos utilizando o biomonitoramento ativo são menos comuns em águas continentais quando comparados ao ambiente marinho (Andral et al., 2004; Benedicto et al., 2011).

Em relação aos ecossistemas aquáticos, diversos organismos como macrófitas, macroinvertebrados bentônicos, moluscos, crustáceos, mamíferos, aves e peixes podem ser utilizados como biomonitores (Beeby, 2001; Hering, 2004). Entre esses organismos destacam-se os peixes, pois tem grande distribuição geográfica, são capazes de metabolizar contaminantes presentes na água e podem ocupar o topo da cadeia alimentar, inferindo efeitos crônicos e acumulativos ao longo da cadeia trófica (Goksoyr et al., 1991; Araújo et al., 2003).

A região neotropical apresenta o maior número de espécies de peixes, entre eles, aproximadamente 8.000 correspondem a peixes de água doce (Schaefer, 1998). A maior parte dessa diversidade é composta por peixes de pequeno porte, presentes

principalmente em riachos, onde correspondem a 50% da assembleia do ecossistema (Castro, 1999). Entre as diversas ordens de peixes, destacam-se os peixes da ordem Cyprinodontiformes, considerados biomonitores potenciais (Clark e Di Giulio, 2012). Essa é uma das ordens com maior diversidade de famílias, com cerca de 400 espécies descritas, incluindo as espécies de guarús (*guppies*) que são cosmopolitas nos ambientes aquáticos (Lévêque et al., 2008).

Muitas espécies de Cyprinodontiformes são abundantes e tradicionalmente de tamanho pequeno, com a capacidade de tolerar altos níveis de toxicidade ambiental (Burnett et al., 2007; Bosker et al., 2010; Clark e Di Giulio, 2012). Algumas espécies são utilizadas em estudos ecotoxicológicos como os guarús *Jenynsia multidentata*, *Phalloceros caudimaculatus*, *Poecilia vivipara*, *Poecilia latipinna*, e o killifish *Fundulus heteroclistus* (Clark e Di Giulio, 2012; Dorrington et al., 2012; Ferreira et al., 2012; Shiogiri et al., 2010).

No Brasil, alguns Cyprinodontiformes são facilmente encontrados e apresentam elevado potencial para novos estudos em ecotoxicologia (Betito, 2006; Mai et al., 2007; Zanette, 2013). Na região Sul do Rio Grande do Sul, há registro de algumas espécies, entre elas, *Jenynsia multidentata* e *Phalloceros caudimaculatus*, que ocorrem em todas as épocas do ano (Betito, 2006; Bastos, et al., 2013). Essas espécies possuem características importantes que os fazem bons modelos de estudo, como a representatividade de um diverso grupo biológico, a fácil captura e o ciclo reprodutivo curto, além de serem cosmopolitas e nativas da América do Sul (Wolff et al., 2007). Além disso, possuem tamanho pequeno e apresentam certa tolerância a oscilações de salinidade e temperatura, que os tornam modelos promissores para estudos em campo e em laboratório (Mai et al., 2005; Betito, 2006).

Em comum essas duas espécies apresentam algumas particularidades fisiológicas e morfológicas, uma das mais características é a presença de viviparidade, a qual inspirou o nome comum de espécies dessa ordem, chamadas no Brasil de barrigudinhos ou guarús (Vieira et al., 1998). Outra característica importante e pouco comum entre os peixes é a modificação da nadadeira anal dos machos em um sistema gonopodial para transferência do esperma no sistema urogenital feminino (Sabino e Castro, 1990; Betito, 2006). O gonopódio possui estrutura rígida e capacidade de regeneração, sua forma é fina e alongada, e pode chegar a até 10 mm de comprimento (Betito, 2006; Rahayu et al., 2013).

O peixe *J. multidentata* é a espécie mais comum da família Anablepidae, e ocorre do Rio Negro, na Argentina até o estado do Rio de Janeiro, no Brasil (Ghedotti e Weitzman, 1998). São indivíduos de fácil identificação, possuem corpo alongado, ventre arredondado e manchas escuras curtas e estreitas ao longo das laterais do corpo (Garcia et al., 2004). Machos e fêmeas apresentam dimorfismo sexual externo, além disso, os machos são tradicionalmente menores que as fêmeas, atingindo no máximo 6 cm, já as fêmeas podem atingir até o dobro do comprimento dos machos (Garcia et al., 2004). As fêmeas possuem o ventre aumentado em função das gestações, que duram 25 dias, cada fêmea pode ter até 4 gestações, gerando em média de 40 a 50 embriões (Vieira et al., 1998; Betito, 2006).

O período reprodutivo ocorre duas vezes a cada ano, um principal no fim da primavera e durante o verão, e outro de menor duração e intensidade, no final do inverno e no início da primavera. *J. multidentata* é uma espécie eurihalina, e pode ocorrer tanto em corpos d'água doce, quanto em estuários, com capacidade de viver em águas contaminadas (Vieira et al., 1998; Hued e Bistoni, 2005). O hábito alimentar é omnívoro, com dieta baseada na ingestão de diatomáceas epífitas, restos de material vegetal em decomposição, além de poliquetos e anfípodes (Betito, 2006; Mai et al., 2007). Exemplares desta espécie são capturados em maior número no Sul do Brasil no período do verão (Garcia et al., 2004).

P. caudimaculatus pertence à família Poeciliidae e é uma das vinte e uma espécies identificadas até o momento para o gênero Phalloceros (Sabino e Castro, 1990; Lucinda, 2008). Ocorre no sudeste e no sul do Brasil, incluindo Laguna dos Patos, baixo Rio Uruguai, Bacias dos Rios Tramandaí e Mampituba, além de drenagens costeiras do Uruguai e da Argentina (Bisazza, 1993; Lucinda, 2008). Fêmeas e machos possuem dimorfismo externo, como a presença de gonopódio e diferenças significativas de tamanho. Os machos possuem em média 1,9 a 2,1 cm, já as fêmeas são tradicionalmente maiores que os machos, com média entre 2,3 cm, podendo atingir o triplo do tamanho dos machos na fase juvenil (Wolff et al., 2007). Da mesma forma que *J. multidentata*, a fêmea, apresenta o abdômen aumentado devido as gestações (4 de até 25 dias cada uma), gerando em média 40 a 50 embriões (Kock et al., 2000).

O hábito alimentar do *P. caudimaculatus* é omnívoro, com tendência à herbivoria, alimentam-se também de larvas aquáticas de moscas e mosquitos, auxiliando assim, no controle biológico (Sabino e Castro, 1990; Kock et al., 2000). Habitam corpos de água doce e salobra, com preferência pela zona próxima à superfície, onde o teor de

oxigênio é maior, o que lhes permitem ocupar ambientes pouco oxigenados. O período de maior captura dessa espécie no sul do Brasil apresenta certa variação (Kock et al., 2000; Wolff et al., 2000). No Paraná, animais jovens tiveram seus picos de ocorrência nos meses de novembro e março, já as fêmeas grávidas foram encontradas em maior número nos bimestres de março-abril e julho-agosto, e no mês de janeiro (Wolff et al., 2000).

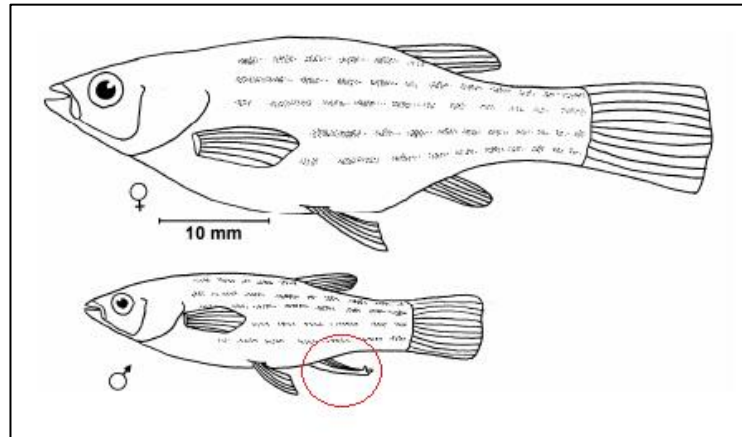


Figura 1. Imagem ilustrativa da fêmea (♀) e do macho (♂) de *Jenynsia multidentata* (Anablepidae). O círculo em vermelho no macho representa a nadadeira anal modificada em gonopódio (Vieira et al., 1998; Betito, 2006).

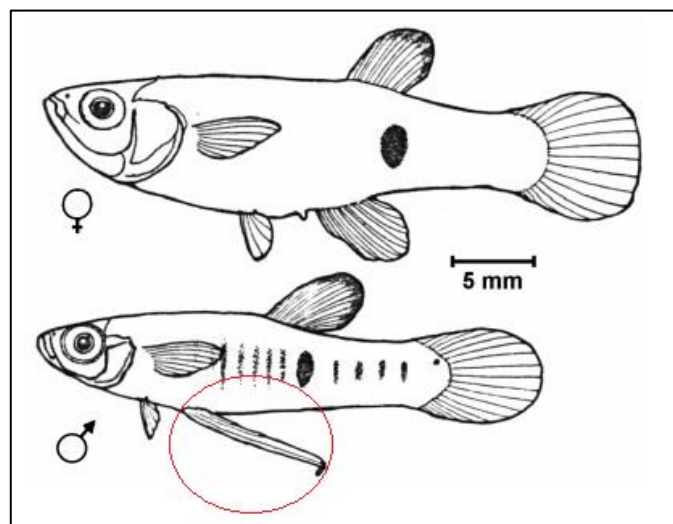


Figura 2. Imagem ilustrativa da fêmea (♀) e do macho (♂) de *Phalloceros caudimaculatus* (Poeciliidae). O círculo em vermelho no macho representa a nadadeira anal modificada em gonopódio (Kock et al., 2000).

1.5. Biomarcadores ambientais

Para avaliar o impacto da contaminação ambiental deve-se conhecer o efeito que os contaminantes causam nos organismos vivos do ecossistema (Wells et al., 2001). Para isso, os estudos de biomonitoramento empregam biomarcadores ambientais, definidos como alterações bioquímicas, celulares, moleculares ou fisiológicas nas células, fluídos corpóreos, tecidos ou órgãos de um organismo que expressam os efeitos tóxicos causados por contaminantes (Lam e Gray, 2003).

De acordo com o tipo de estudo a ser realizado, o emprego de biomarcadores deve atender a alguns pressupostos como: especificidade do biomarcador com o contaminante e com o efeito produzido no tecido alvo; apresentar resultados claros, que possibilite distinguir os efeitos do contaminante das alterações normais ocorrentes nos organismos e ainda apresentar uma viável reprodutibilidade metodológica (Stegeman et al., 1992; Cajaraville et al., 2000). Segundo Stegeman et al. (1992) a utilização de biomarcadores em estudos ecotoxicológicos apresenta vantagens, pois possibilita: (1) avaliar precocemente a ocorrência de contaminação nos sistemas biológicos, (2) avaliar o grau de contaminação, (3) avaliar a severidade dos efeitos causados pelos contaminantes, (4) avaliar as espécies ou populações que estão sujeitas a contaminação.

Os biomarcadores podem ser classificados de acordo com o tipo de alteração que são capazes de detectar nos organismos. Um biomarcador de efeito é classificado como um parâmetro biológico, que é medido no organismo e que reflete na interação da substância química com os receptores biológicos. Na maioria das vezes, as alterações bioquímicas são consideradas como uma fonte potencial de indicadores biológicos de efeito (Amorim, 2003). Um biomarcador de exposição pode ser usado para confirmar e avaliar a exposição do organismo a uma substância em particular, estabelecendo uma ligação entre a exposição externa e a quantificação da exposição interna (Amorim, 2003). Um biomarcador de exposição bastante conhecido é o Citocromo P450 (ou CYP) e a sua elevada atividade pode indicar a exposição dos organismos frente a compostos indutores e consequentemente avaliar o grau e o possível risco de contaminação ambiental (Stegeman e Hahn, 1994). Já os biomarcadores inespecíficos são capazes de detectar vários tipos de contaminantes e são geralmente utilizados como indicadores gerais de exposição em ambientes aquáticos (Van der Oost et al., 2003).

Atualmente há uma série de biomarcadores utilizados em ecotoxicologia. Os biomarcadores moleculares e celulares fornecem respostas referentes aos primeiros sinais

de perturbação ambiental, podendo ser utilizados como indicativo de futuros riscos aos ecossistemas (Cajaraville et al., 2000). Esses marcadores são muito úteis em estudos envolvendo a exposição a diversos contaminantes, como metais, contaminantes de origem orgânica e compostos organometálicos (Ross et al., 2002). Além disso, são capazes de detectar àqueles rapidamente metabolizados, como os HPAs e os organofosforados (Sarkar et al., 2006). Dessa forma, o uso desses biomarcadores é útil em estudos de campo, pois permite avaliar diversos contaminantes, que geralmente encontram-se em misturas complexas no ambiente (Monserrat et al., 2007).

1.6. O biomarcador citocromo P4501A (CYP1A)

O citocromo P450 faz parte do sistema monooxigenase de função mista (MFO), e atua no metabolismo oxidativo e na detoxificação de inúmeras substâncias de origem natural e xenobiótica (Bonacci et al., 2007). O processo de metabolização de xenobióticos como HPAs ou outros contaminantes, consiste basicamente na transformação de moléculas lipofílicas em compostos mais polares, a fim de serem eliminados pela célula com maior facilidade (Busby et al., 1999). O sistema enzimático citocromo P450 ou CYP é constituído por uma superfamília de hemoproteínas presente desde bactérias até mamíferos (Craft et al., 2003; Dong et al., 2004).

CYP possui diferentes isoformas, das quais algumas são utilizadas como biomarcadores, estas isoformas estão presentes principalmente no fígado, embora ocorram em menor concentração em tecidos extra-hepáticos (Nakajima e Aoyama, 2000). Em relação à nomenclatura, o prefixo CYP indica o sistema enzimático citocromo P450, que é classificado dentro de famílias e subfamílias. O número após o prefixo CYP indica a família (ex.: CYP1, CYP2, CYP3), enquanto a letra depois do número indica a subfamília (ex.: CYP1A, CYP3A). O último número da nomenclatura especifica a isoenzima dentro de uma determinada subfamília (ex.: CYP1A4, CYP2C9, CYP3A4) (Audi e Pussi, 2000; Nelson, 2011; Koenig et al., 2012).

Nos peixes, são conhecidas quatro subfamílias de CYP1: CYP1A, CYP1B, CYP1C e CYP1D que são reguladas de forma distinta ao nível transcricional (Jönsson et al., 2007; Zanette et al., 2009). Entre essas subfamílias, CYP1A é amplamente utilizada como biomarcador hepático em peixes tanto em águas continentais quanto marinhas (Parente et al., 2004; Kirby et al., 2007). Além disso, a subfamília CYP1A é uma das

mais estudadas no monitoramento da poluição em ambientes aquáticos, pois é capaz de biotransformar HPAs, bifenilos policlorados (PCBs), dioxinas (TCDDs) e alguns pesticidas (Machala et al., 1997).

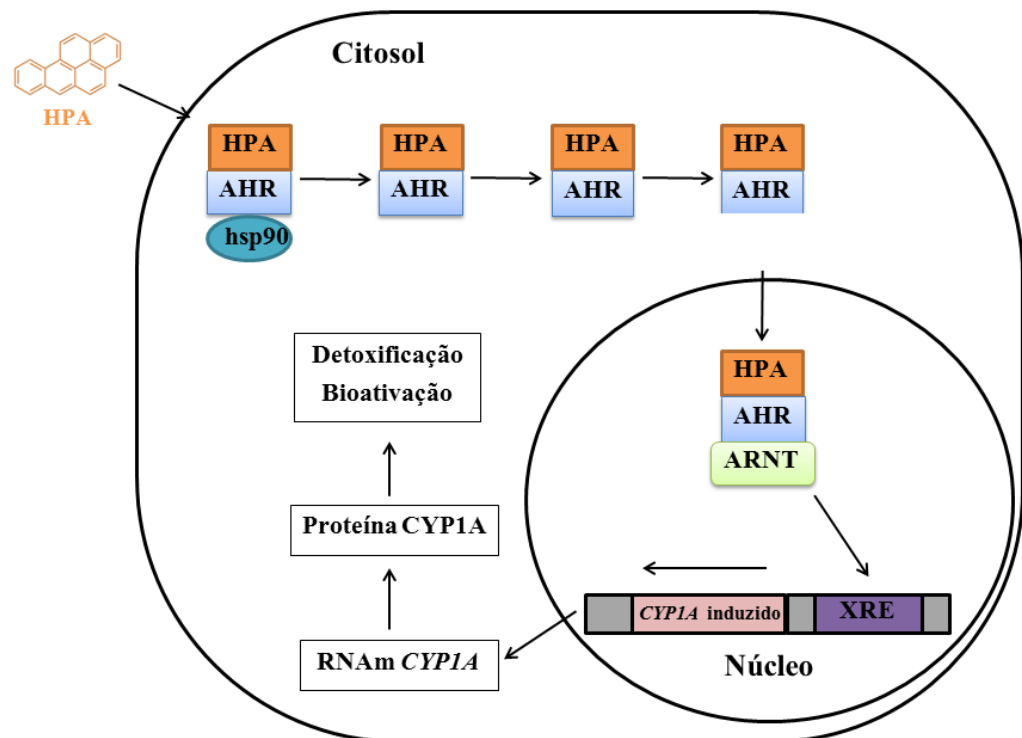
Em Cyprinodontiformes, como *Fundulus heteroclitus*, *Poecilia vivipara*, *Jenynsia multidentata* e *Phalloceros caudimaculatus*, vários estudos demonstram a indução de *CYP1A* frente à exposição a certos contaminantes orgânicos (Zanette et al., 2009; Dorrington et al., 2012; Ferreira et al., 2012). Sobretudo, os níveis de transcrição gênica de *CYP1A* variam de acordo com o órgão analisado e com o tempo de exposição ao contaminante (Kim et al., 2008). Segundo Dorrington et al (2012) os níveis de expressão relativa para cada gene variam de acordo com o órgão, sendo *CYP1A* mais expresso no fígado, *CYP1B1* nas brânquias e *CYP1C1* no intestino de *P. vivipara*.

A propriedade de *CYP1A* como um biomarcador de exposição deve-se ao efeito produzido no receptor de hidrocarboneto aromático (AHR) presente nas células (Honkakoski e Negishi, 2000). Em estudos que visam à exposição de modelos biológicos a contaminantes usam-se geralmente substâncias sintéticas, que provocam as mesmas respostas do contaminante de interesse. Entre essas substâncias, destaca-se a beta-naftoflavona (BNF-5,6 benzoflavona) que é um composto sintético, derivado de um composto natural de flavonóides, e tem a aptidão de induzir aumentos significativos nos níveis de *CYP1A*, causando efeitos distintos em outros membros do sistema MFO (Di Giovanni, 1990; Navas e Segner, 2001).

O BNF tem a propriedade de ser um forte indutor de CYP1, e não se apresenta como um composto genotóxico, o que torna seu uso recomendável quando comparado a outras substâncias sintéticas como o benzo[a]pireno e PCB126, que produzem o mesmo efeito sobre o receptor AHR e *CYP1A*, porém são altamente tóxicos (Ferreira et al., 2012). Outra característica positiva do BNF é a não indução de outras famílias de CYP, o que facilita os estudos cujo alvo seja apenas a sufamília CYP1A (Ito et al., 1996).

O mecanismo de indução da enzima *CYP1A* depende basicamente do receptor AHR, que está envolvido na regulação da expressão do gene *CYP1A*. A indução inicia-se pela ligação do xenobiótico específico ao complexo proteico que compreende o AHR e a proteína de choque térmico 90 (hsp 90), que depois é dissociada do complexo receptor-indutor. Após a liberação da hsp 90, o complexo receptor-indutor liga-se a outra proteína, o translocador de receptor de hidrocarbonetos aromáticos (ARNT), que localiza-se no núcleo da célula (Stegeman e Hahn, 1994). No núcleo, o complexo ARNT-AHR liga-se a uma região específica do DNA, o elemento de resposta à

xenobiótico (XRE). Fatores transcripcionais são usados para acessar a região promotora do gene *CYP1A*, e o RNA mensageiro é então sintetizado. Essa ativação gênica provoca um aumento na expressão e na atividade da enzima *CYP1A*, levando então a biotransformação, que resulta na detoxificação/bioativação dos contaminantes orgânicos (Safe e Krishnan, 1995) (Figura 3).



HPA: hidrocarboneto policíclico aromático; hsp 90: proteína de choque térmico; AHR: receptor de hidrocarboneto aromático; XRE: elemento de resposta a xenobiótico; ARNT: translocador de receptor de hidrocarbonetos aromáticos; RNAm: ácido ribonucléico mensageiro.

Figura 3. Desenho esquemático da indução do gene *CYP1A* na presença de benzo-a-pireno, um hidrocarboneto policíclico aromático (HPA).

1.7. Resposta refratária de *CYP1A* em peixes Cyprinodontiformes

Atualmente estudos de biomonitoramento envolvendo diferentes populações de uma mesma espécie de peixe são realizados com o objetivo de avaliar uma gama maior de áreas expostas à contaminação e, assim, estabelecer parâmetros comparativos entre estas populações (Timme-Laragy et al., 2005; Wills et al., 2010). Para isso, uma das espécies mais utilizadas é *F. heteroclitus*, em função da sua tradicional aplicação na

ecotoxicologia (Wills et al., 2010). Essa espécie é amplamente distribuída na América do Norte, e ocupa ambientes estuarianos livres de contaminação, bem como ambientes fortemente impactados por compostos químicos (Wirgin e Waldman, 2004).

Estudos comparativos permitem verificar semelhanças e diferenças de adaptação a diversos contaminantes e a capacidade de resistência e tolerância ao estresse entre as populações (Williams e Oleksiak, 2008). Oleksiak (2008) realizou um estudo com diferentes populações de *F. heteroclitus* pertencentes a locais referência (limpos) e contaminados, e mostrou que os peixes de locais contaminados apresentaram índices menores de indução para os genes ligados a síntese de ácidos graxos, que converte o excesso de energia em gordura. A não indução desses genes sugere que os peixes de populações contaminadas possuem um estoque limitado de energia armazenada, em relação a peixes de populações de locais referência.

Outro estudo semelhante apontou que a adaptação de *F. heteroclitus* aos locais poluídos deve-se a supressão da expressão do gene *CYP1*, devido a uma provável alteração na sinalização ou controle do AHR, responsável pela ativação de enzimas metabólicas das fases I e II da biotransformação de xenobióticos (Wills et al., 2010). Essa supressão na indução de genes, incluindo o gene *CYP1A*, é chamada de resposta refratária ou recalcitrante, e é comum em populações de *F. heteroclitus* adaptadas a contaminação crônica (Timme-Laragy et al., 2005).

Várias hipóteses tentam explicar a não indução de *CYP1A*, como desacetilação de histonas por interferência de fatores endógenos (Matzke e Birchler, 2005), degradação de RNA (Bevilacqua et al., 2003), metilação do nucleotídeo CpG na região promotora do gene *CYP1A* e modificações pós-traducionais envolvidas com o receptor AHR (Timme-Laragy et al., 2005). Atualmente, uma das hipóteses mais aceitas, é de que a resistência adquirida dessas populações à contaminação esteja no polimorfismo do AHR, e que essa adaptação seja comum para diferentes espécies de peixes (Aluru et al., 2011; Wirgin et al., 2011).

No presente estudo, foram verificadas as variações na transcrição e indução de *CYP1A* em locais possivelmente contaminados, utilizando diferentes populações de *J. multidentata* e *P. caudimaculatus*. Avaliou-se também a possível ocorrência da resposta refratária de *CYP1A* em *J. multidentata*, a fim de melhor compreender possíveis mecanismos de adaptação e resistência dessas populações na região, e dar suporte ao uso de guarús Cyprinodontiformes para estudos em ecotoxicologia.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Verificar as respostas transcricionais de *CYP1A* em diferentes populações de *Jenynsia multidentata* e *Phalloceros caudimaculatus* para contaminantes agonistas do receptor AHR.

2.2. Objetivos específicos

- Caracterizar, a nível hidroquímico, os locais de coleta de *J. multidentata* e *P. caudimaculatus*.
- Avaliar os níveis de expressão de *CYP1A* em peixes *J. multidentata* e *P. caudimaculatus* coletados em locais contaminados e locais distantes de possíveis fontes de contaminação.
- Avaliar a ocorrência de resposta refratária de *CYP1A* no Cyprinodontiformes Sul-Americano *J. multidentata*.

3. REFERENCIAS

- Abessa, D.M.S., Sousa, E.C.P.M., Tommasi, L.R., 2006. Utilização de testes de toxicidade na avaliação da qualidade de sedimentos marinhos. *Rev. Geol.* 19, 253-261.
- Almeida, M.T.A., Baumgarten, M.G.Z., Rodrigues, R.M.S., 1993. Identificação das possíveis fontes de contaminação das águas que margeiam a cidade do Rio Grande (RS). Série Documentos Técnicos - Oceanografia. Editora da FURG n.6, 34 p.
- Aluro, N., Karchner, S.I., Hahn, M.E., 2011. Role of DNA methylation of AHR1 and AHR2 promoters in differential sensitivity to PCBs in Atlantic Killifish, *Fundulus heteroclitus*. *Aquat. Toxicol.* 101, 288-294.
- Amorim, L.C.A. 2003. Os biomarcadores e sua aplicação na avaliação da exposição aos agentes químicos ambientais. *Rev. Bras. Epidemiol.* 6, 158-170.
- Andral, B., Stanisiere, J.Y., Sauzade, D., Damier, E., Thebault, H., Galgani, F., Boissery, P., 2004. Monitoring chemical contamination levels in the Mediterranean based on the use of mussel caging. *Mar. Pollut. Bull.* 49, 704-712.
- Araújo, F.G., Fichberg, I., Pinto, B.C.T., Peixoto, M.G., 2003. A preliminary index of biotic integrity for monitoring the condition of the Rio Paraíba do Sul, Southeast Brazil. *Environ. Manage.* 32, 516-526.
- Audi, E., Pussi, F., 2000. Isoenzimas do CYP450 e biotransformação de drogas. *Acta Scientiarum.* 22, 599-604.
- Baisch, P., Zamboni, A., Cordeiro, L.H., Rocha, A.C., 2000. Avaliação preliminar dos níveis de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos nos sedimentos do estuário da Lagoa dos Patos, Rio Grande, RS, in: XIII Semana Nacional de Oceanografia, Itajaí. Resumos Expandidos, pp. 302-304.
- Bastos, R.F., Condini, M.V., Garcia, A.M., 2013. Fish species list of coastal streams in southern Brazil, with notes on austral distribution limits of marine and freshwater endangered species. *Panamjas* 8, 347-351.
- Benedicto, J., Andral, B., Martínez-Gómez, C., Guitart, C., Deudero, S., Cento, A., Scarpato, A., Caixach, J., Benbrahim, S., Chouba, L., Boulahdid, M., Galgani, F., 2011. A large scale survey of trace metal levels in coastal waters of the Western

- Mediterranean basin using caged mussels (*Mytilus galloprovincialis*). J. Environ. Monitor. 13, 1495-1505.
- Beeby, A., 2001. What do sentinels stand for? Environ. Pollut. 112, 285-298.
- Bevilacqua, A., Ceriani, M.C., Capaccioli, S., Nicolin, A., 2003. Posttranscriptional regulation of gene expression by degradation of messenger RNAs. J. Cell. Physiol. 195, 356-372.
- Besse, J.P., Geffard, O., Coquery, M., 2012. Relevance and applicability of active biomonitoring in continental waters under the Water Framework Directive. Trends Anal. Chem. 6, 113-127.
- Besse, J.P., Coquery, M., Lopes, C., Chaumot, A., Budzinski, H., Labadie, P., Geffard, O., 2013. Caged *Gammarus fossarum* (Crustacea) as a robust tool for the characterization of bioavailable contamination levels in continental waters: Towards the determination of threshold values. Water Res. 47, 650-660.
- Betito, R. 2006. Comparação da complexidade das adaptações bioecológicas de dois peixes (*Jenynsia multidentata* e *Poecilia vivipara*) Cyprinodontiformes no estuário da Lagoa dos Patos (RS - Brasil). Rev. Did. Sist. 3, 71-100.
- Bielecka, K., Kaczorek, E., Olszanowski, A., Voelkel, A., 2002. Examination of biodegradation of hydrocarbons in emulsified systems. Polish J. Environ. Stud. 11, 11-16.
- Bisazza, A., 1993. Male competition, female mate choice and sexual size dimorphism in Poeciliidae fishes. Mar. Behav. Physiol. 23, 257-286.
- Billet, S., Abbas, I., Legoff, J., Verdin, A., Andre, V., Lafargue, P.E., Hachimi, A., Cazier, F., Sichel, F., Shirali, P., Garcon, G., 2008. Genotoxic potential of polycyclic aromatic hydrocarbons-coated onto airborne particulate matter (PM (2.5)) in human lung epithelial A549 cells. Cancer Lett. 270, 144-55.
- Bonacci, S., Iacocca, A., Fossi, S., Lancini, L., Caruso, T., Corsi, I., Focardi, S., 2007. Biomonitoring aquatic environmental quality in a marine protected area: a biomarker approach. Ambio 36, 308-315.
- Bosker, T., Hewitt, L.M., Munkittrick, K.R., Maclatchy, D.L., 2010. Validation of a refined short-term adult fish reproductive test with improved power for mummichog (*Fundulus heteroclitus*) to test complex effluents. Ecotox. Environ. Safe. 73, 1596-1601.
- Burnett, K.G., Bain, L.J., Baldwin, W.S., Callard, G.V., Cohen, S., Di Giulio, R.T., Evans, D.H., Gomez-Chiarri, M., Hahn, M.E., Hoover, C.A., Karchner, S.I.,

- Katoh, F., Maclatchy, D.L., Marshall, W.S., Meyer, J.N., Nacci, D.E., Oleksiak, M.F., Rees, B.B., Singer, T.D., Stegeman, J.J., Towle, D.W., Van Veld, P.A., Vogelbein, W.K., Whitehead, A., Winn, R.N., Crawford, D.L., 2007. *Fundulus* as the premier teleost model in environmental biology: opportunities for new insights using genomics. *Comp. Biochem. Phys. D* 2, 257-286.
- Buss, D.F., Baptista, D.F., Nessimian, J.L., 2003. Bases conceituais para a aplicação de biomonitoramento em programas de avaliação da qualidade da água de rios. *Caderno de Saúde Pública*, Rio de Janeiro, pp. 465-473.
- Busby, W.F., Ackermann, J.M., Crespi, C.L., 1999. Effect of methanol, ethanol, dimethyl sulfoxide, and acetonitrile on in vitro activities of cDNA-expressed human cytochromes P-450. *Drug Metab. Dispos.* 27, 246-249.
- Cajaraville, M.P., Bebianno, J.M., Blasco, J., Porte, C., Sarasquete, C., Viarengo, A., 2000. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. *Sci. Total Environ.* 247, 295-311.
- Castro, R.M.C., 1999. Evolução da ictiofauna de riachos sul-americanos: Padrões gerais e possíveis processos causais, in: Caramaschi, E.P. R., Mazzoni, C.R.S.F., Bizerril, P.R., Peres-Neto (Eds.), *Ecologia de Peixes de Riachos: Estado Atual e Perspectivas*. Oecologia Brasiliensis Inc., Rio de Janeiro, pp. 139-155.
- Castelo, J.P., Möller, O.O., 1978. On the relationship between rainfall and shrimp production in the estuary of the Patos Lagoon (Rio Grande do Sul, Brasil). *Atlântica* 3, 67-74.
- Chiba, W.A.C., Passerini, M.D., Tundisi, J.G., 2011. Metal contamination in benthic macroinvertebrates in a sub-basin in the southeast of Brazil. *Braz. J. Biol.* 71, 391-399.
- Clark, B.W., Di Giulio, R.T., 2012. *Fundulus heteroclitus* adapted to PAHs are cross-resistant to multiple insecticides. *Ecotoxicology* 21, 465-474.
- Craft, D.L., Madduri, K.M., Eshoo, M., Wilson, R., 2003. Identification and characterization of the CYP52 family of *Candida tropicalis* ATCC 20336, important for the conversion of fatty acids and alkanes to α, ω -dicarboxylic acids. *Appl. Environ. Microb.* 69, 5983-5991.
- Cotta, J.A.O., Rezende, M.O.O., Piovani, M.R., 2006. Evaluation of metal content in sediments of the Betari River in the Parque Estadual Turístico do Alto Ribeira-Petar-, São Paulo, Brazil. *Quim. Nova* 29, 40-45.

- Di Giovanni, J., 1990. Inhibition of chemical carcinogenesis, in: Copper, C.S., Grover, P.L. (Eds.), *Chemical Carcinogenesis and Mutagenesis*. Springer Verlag, Berlin, pp. 159-253.
- Dong, W., Teraoka, H., Tsujimoto, Y., Stegeman, J.J., Hiraga, T., 2004. Role of aryl hydrocarbon receptor in mesencephalic circulation failure and apoptosis in zebrafish embryos exposed to 2,3,5,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. *Toxicol. Sci.* 77, 231-240.
- Dorrington, T., Zanette, J., Zacchi, F.L., Stegeman, J., Bainy, A.C.D., 2012. Basal and 3-methylcholanthrene-induced expression of cytochrome P450 1A, 1B and 1C genes in the Brazilian guppy, *Poecilia vivipara*. *Aquat. Toxicol.* 124-125, 106-113.
- Ekundayo, E.O., Emede, T.O., Osayande, D.I., 2001. Effects of crude oil spillage on growth and yield of maize (*Zea mays* L.) in soils of midwestern Nigeria. *Plant Foods Hum. Nutr.* 53, 313-324.
- Ferreira, L.S., D'Incao, F., 2008. Crescimento de *Callinectes sapidus* (Crustacea, Decapoda, Portunidae) no estuário da laguna dos Patos, RS, Brasil. *Iheringia* 98, 70-77.
- Ferreira, R.S., Monserrat, J.M., Ferreira, J.L.R., Kalb, A.C., Stegeman, J., Bainy, A.C.D., Zanette, J., 2012. Biomarkers of organic contamination in the South American fish *Poecilia vivipara* and *Jenynsia multidentata*. *J. Toxicol. Env. Heal. A* 75, 1023-1034.
- Fortuny, M., Ramos, A.L.D., Dariva, C., Egues, S.M.S., Santos, A.F., Nele, M., Coutinho, R.C.C., 2008. Principais aplicações das micro-ondas na produção e refino de petróleo. *Quim. Nova* 31, 1553-1561.
- Garcia, A.M., Vieira, J.P., Winemiller, K.O., Raseira, M.B., 2004. Reproductive cycle and spatiotemporal variation in abundance of the one-sided livebearer *Jenynsia multidentata*, in Patos Lagoon, Brazil. *Hydrobiologia* 515, 39-48.
- Garcia, M.R., Mirlean, N., Baisch, P.R., Caramão, E.B., 2010. Assessment of polycyclic aromatic hydrocarbon influx and sediment contamination in an urbanized estuary. *Environ. Monit. Assess.* 168, 269-276.
- Ghedotti, M.J., Weitzman, S.H., 1998. A new species of *Jenynsia* (Cyprinodontiformes: Anablepidae) from Brazil with comments on the composition and taxonomy of the genus. *Nat. Hist. Museum Dep. Syst. Ecol.* 179, 1-25.

- Guimarães, E.T., Macchione, M., Lobo, D.J.A., Domingos, M., Saldiva, P.H.N., 2004. Evaluation of mutagenic potencia of urban air pollution in São Paulo, Southeastaern Brazil, using the *Tradescantia* stamen-hair essay. *Environ. Toxicol.* 19, 578-584.
- Goksoyr, A., Andersson, T., Buhler, D.R., Stegeman, J.J., Williams, D., Forlin, L., 1991. Immunochemical Cross-Reactivity of Beta-naphthoflavone inducible cytochrome P450 (P450ia) in liver- microsomes from different fish species and rat. *Fish Physiol. Biochem.* 9, 1-13.
- Hering, D., Verdonshot, P.F.M., Moog, O., Sandin, L., 2004. Overview and application of the AQEM assessment system: integrated assessment of running waters in Europe. *Hydrobiologia* 516, 1-20.
- Hojat, A.H.M., Rahim, K.A., 2012. Effluent charge reform for controlling water pollution in the Malaysian crude palm oil industry. *Environ. Dev. Econ.* 17, 781-794.
- Honkakoski, P., Negishi, M., 2000. Regulation of cytochrome P450 (CYP) genes by nuclear receptors. *Bioch. J.* 347, 321-337.
- Holt, M. S., 2000. Sources of chemical contaminants and routes into the freshwater environment. *Food Chem. Toxicol.* 38, 21-27.
- Hued, A.C., Bistoni, M.A., 2005. Development and validation of a biotic index for evaluation of environmental quality in the central region of Argentina. *Hydrobiologia* 543, 279-298.
- Ito, N., Hasegawa, R., Imaida, K., Hirose, M., Shirai, T., 1996. Mediumterm liver and multi-organ carcinogenesis bioassays for carcinogens and chemopreventive agents. *Exp. Toxicol. Pathol.* 48, 113-119.
- Jönsson, M.E., Orrego, R., Woodin, B.R., Goldstone, J.V., Stegeman, J.J., 2007. Basal and 3,3'',4,4'',5-pentachlorobiphenyl-induced expression of cytochrome P450 1A, 1B and 1C genes in zebrafish. *Toxicol. Appl. Pharm.* 221, 29-41.
- Kantin, E., Costa, N. R., Baptista, J. R., Philomena, A.L., Giesta, S. M., Niencheski, L. F., 1980. Contaminação das águas ao redor da cidade do Rio Grande: óleos e graxas. *Ciência e Cultura* 33, 236-239.
- Kim, J.H., Raisuddin, S., Ki, J.S., Lee, J.S., Han, K.N., 2008. Molecular cloning and β -naphthofavone-induced expression of a cytochrome P450 1A (*CYP1A*) gene from

- an anadromous river pufferfish, *Takifugu obscurus*. Mar. Pollut. Bull. 57, 433-440.
- Kirby, M.F., Smith, A.J., Rooke, J., Neall, P., Scott, A.P., Katsiadaki, I., 2007. Ethoxyresorufin-*O*-deethylase (EROD) and villogenin (VGT) in flounder (*Platichthys flesus*): System interaction, crosstalk and implications for monitoring. Aquat. Toxicol. 81, 233-244.
- Kock, W.R., Milani, P.C., Grosser, K.M., 2000. Guia Ilustrado; Peixes Parque Delta do Jacuí. Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- Koenig, S., Fernández, P., Solé, M., 2012. Differences in cytochrome P450 enzyme activities between fish and crustacea: Relationship with the bioaccumulation patterns of polychlorobiphenyls (PCBs). Aquat. Toxicol. 108, 11-17.
- Lam, P.K.S., Gray, J.S., 2003. The use of biomarkers in environmental monitoring programmes. Mar. Pollut. Bull. 46, 182-186.
- Ladson, A.R., White, L.J., Doolan, J.A., Tilleard, J.L. 1999. Development and testing of an Index of Stream Condition for waterway management in Australia. Freshwater Biol. 41, 453-468.
- Lévêque, C., Oberdorff, T., Paugy, D., Stiassny, M.L.J., Tedescop, A., 2008. Global diversity of fish (Pisces) in freshwater. Hydrobiologia 595, 545-567.
- Lopes, A., Piedade, M.T.F., 2010. O período da contaminação com petróleo influencia a rebrota de *Echinochloa polystachya* (H.B.K.) Hitchcock em solo de várzea da Amazônia Central? Biota Neotrop. 10, 143-148.
- Lucinda, P.H.F., 2008. Systematics and biogeography of the genus *Phalloceros* Eigenmann, 1907 (Cyprinodontiformes: Poeciliidae: Poeciliinae), with the description of twenty-one new species. Neotrop. Ichthyol. 6, 113-158.
- Luz, L.P., Filho, P.J.S., Sousa, E.E.H., Kerstner, T., Caramão, E.B., 2010. Evaluation of surface sediment contamination by polycyclic aromatic hydrocarbons in colony Z3 - (Patos Lagoon, Brazil). Microchem. J. 96, 161-166.
- Machala, M., Nezveda, K., Petrivalský, M., Jarosová, A., Piaňacka, V., Svobodová, Z., 1997. Monooxygenase activities in carp as biochemical markers of pollution by polycyclic and polyhalogenated aromatic hydrocarbons: choice of substrates and effects of temperature, gender and capture stress. Aquat. Toxicol. 37, 113-123.
- Mai, A.C.G., Garcia, A.M., Vieira, J.P., 2005. Influência da salinidade no crescimento de juvenis do barrigudinho *Jenynsia multidentata* Jenyns, 1842. Rev. Bras. de Zool. 22, 780-783.

- Mai, A.C.G., Garcia, A.M., Vieira, J.P., Mai, M.G., 2007. Reproductive aspects of the one-sided livebearer *Jenynsia multidentata* (Jenys, 1842) (Cyprinodontiformes) in the Patos Lagoon estuary, Brazil. *Panmjas*. 2, 40-46.
- Maltchik, L., Rolon, A.S., Guadagnin, D.L., Stenert, C., 2004. Wetlands of Rio Grande do Sul, Brazil: a classification with emphasis on plant communities. *Acta Limnol. Bras.* 16, 197-151.
- Mantis, J., Chaloulakou, A., Samara, C., 2005. PM10-bound polycyclic hydrocarbons (PAHs) in the greater area of Athens, Greece. *Chemosphere* 59, 593-604.
- Maranho, L.T.; Galvão, F.; Preusslen, K.H., 2006. Efeitos da poluição por petróleo na estrutura da folha de *Podocarpus lambertii* Klotzsch ex Endl., Podocarpaceae. *Acta Bot. Bras.* 20, 615-624.
- Matzke, M.A., Birchler, J.A., 2005. RNAi-mediated pathways in the nucleus. *Nat. Rev., Genet.* 6, 24-35.
- Medeiros, P.M., Bicego, M.C., Castelão, R.M., Rosso, C.D., Fillmann, G., Zamboni, A.J., 2005. Natural and anthropogenic hydrocarbon inputs to sediments of Patos Lagoon Estuary, Brazil. *Environ. Int.* 31, 77-87.
- Mirlean, N., Casartelli, M.R., Garcia, M.R.D., 2002. Propagação da poluição atmosférica por flúor nas águas subterrâneas e solos de regiões próximas às indústrias de fertilizantes (Rio Grande, RS). *Quim. Nova* 25, 191-195.
- Modica, R., Fiume, M., Guaitani, A., Bartosek, I., 1983. Comparative kinetics of benz(a)anthracene, chrysene and triphenyle in rats after oral administration. I. Study with single compounds. *Toxicol. Lett.* 18, 103-109.
- Monserrat, J.M., Martínez, P.E., Geracitano, L.A, Amado, L.L., Martins, C.M., Pinho, G.L., Chaves, I.S., Ferreira-Cravo, M., Ventura-Lima, J., Bianchini, A., 2007. Pollution biomarkers in estuarine animals: critical review and News perspectives. *Comp. Biochem. Phys. C* 146, 221-234.
- Nakajima, T., Aoyama, T., 2000. Polymorphism of drug-metabolizing enzymes in relation to individual susceptibility to industrial chemicals. *Ind. Health* 38, 143-152.
- Navas, J.M., Segner, H., 2001. Estrogen-mediated suppression of cytochrome P4501A (CYP1A) expression in rainbow trout hepatocytes: role of estrogen receptor. *Chem-Biol. Interact.* 138, 285-298.
- Ndiaye, A., Sanchez, W., Durand, J.D., Budzinski, H., Palluel, O., Diouf, K., Ndiaye, P., Panfili, J., 2012. Multiparametric approach for assessing environmental quality

- variations in West African aquatic ecosystems using the black-chinned tilapia (*Sarotherodon melanotheron*) as a sentinel species. Environ. Sci. Pollut. R. 19, 4133-4147.
- Niencheski, L.F.H., Moller, Jr., Odebrecht, C., Fillmann, G., 1988. Distribuição espacial de alguns parâmetros físico-químicos na Lagoa dos Patos Porto Alegre a Rio Grande, RS (verão/86). Acta Limnol. Brasil. 2, 79-97.
- Netto, A.D.P., Moreira, J.C., Dias, A.E.X.O., Arbilla, G., Ferreira, L.F.V., Oliveira, A.S., Barek, J., 2000. Avaliação da contaminação humana por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) e seus derivados nitrados (NHPAs): uma revisão metodológica. Quim. Nova 23, 765-773.
- Nelson, D.R., 2011. Progress in tracing the evolutionary paths of cytochrome P450. Biochim. Biophys. Acta 1814, 12-18.
- Nóbrega, MR. e Krusch, N., 2010. Diagnóstico qualitativo da poluição atmosférica em Rio Grande, 2000-2002. Geosul 25, 129-150.
- Oleksiak, M.F., 2008. Changes in gene expression due to chronic exposure to environmental pollutants. Aquat. Toxicol. 90, 161-171.
- Parente, T.E., Oliveira, A.C., Silva, I.B., Araujo, F.G., Paumgarten, F.J., 2004. Induced alkoxyresorufin-*O*-dealkylases in tilapias (*Oreochromis niloticus*) from Gandu River, Rio de Janeiro, Brazil. Chemosphere 54, 1613-1618.
- Piedade Díaz, M., Grigson, S.J.W., Peppiatt, C.J., Burgess, J.G., 2000. Isolation and characterization of novel hydrocarbon-degrading euryhaline consortia from crude oil and mangrove sediments mar. Biotechnol. 2, 522-532.
- Pratt, J. M., Coler, R. A., 1976. A procedure for the routine biological evaluation of urban runoff in small rivers. Water Res. 10, 1019-1025.
- Rahayu, D.A., Listyorini, D., Ibrohim., 2013. Morphological study to improve identification toward Poeciliidae family based on gonopodium structures and morphometric analysis. JTLS. 3, 91-95.
- Rinaldi, S. A., 2007. Uso de macroinvertebrados bentônicos na avaliação do impacto antropogênico às margens do Parque Estadual do Jaraguá, São Paulo-SP. Dissertação de Mestrado, Departamento de ecologia da USP, São Paulo.
- Rolon, A. N., Maltchik, L., Irgang, B.E., 2004. Levantamento de Macrófitas aquáticas em áreas úmidas do Rio Grande do Sul. Acta Biol. Leopold. 26, 17-35.
- Rolon, A. N., Maltchik, L., 2006. Áreas palustres: classificar para proteger. Ciência Hoje 38, 66-70.

- Ross, K., Cooper, N., Bidwell, J.R., Elder, J., 2002. Genetic diversity and metal tolerance of two marine species: a comparison between populations from contaminated and reference sites. *Mar. Pollut. Bull.* 44, 671-679.
- Sabino, J., Castro, R.M.C., 1990. Alimentação, período de atividade e distribuição espacial dos peixes de um riacho da floresta Atlântica (Sudeste do Brasil). *Rev. Brasil. Biol.* 50, 23-36.
- Safe, S., Krishnan, V. 1995. Cellular and molecular biology of aryl hydrocarbon (AHR) receptor-mediated gene expression. *Arch. Toxicol.* 17, 99-115.
- Santos, I. R., Costa, R. C., Freitas, U., Fillmann, G., 2008. Influence of effluents from a wastewater treatment plant on nutrient distribution in a Coastal Creek from southern Brazil. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 51, 153-162.
- Sarkar, A., Ray, D., Shrivastava, N.A., Sarker, S., 2006. Molecular Biomarkers: their significance and application in marine pollution monitoring. *Ecotoxicology* 15, 333-340.
- Schaefer, S.A. 1998. Conflict and resolution: impact of new taxa on Phylogenetic studies of the Neotropical cascudinhos (Siluroidei: Loricariidae). In: Malabarba, L.R., Reis, R.E., Vari, R.P., Lucena, Z.M.S., Lucena, C.A.S. (Eds.), *Phylogeny and classification of Neotropical fishes*. Porto Alegre, pp. 375-400.
- Shiogiri, N.S., Carraschi, S.P., Cubo, P., Schiavetti, B.L., Cruz, C., Pitelli, A.R., 2010. Ecotoxicity of glyphosate and aterbane® br surfactant on guaru (*Phalloceros caudimaculatus*). *Acta Sci. Biol. Sci.* 32, 285-289.
- Sisino, C.L.S., Netto, A.D.P., Rego, E.C.P., Lima, G.S., 2003. Hidrocarbonetos policíclicos Aromáticos em resíduos sólidos industriais: uma avaliação preliminar do risco potencial de contaminação ambiental e humana em áreas de deposição de resíduos. *Cad. Saúde Públ.* 19, 671-676.
- Sudaryanto, A., Takahashi, S., Monirith, I., Ismail, A., Muchtar, M., Zheng, J., Richardson, B.J., Subramanian, A., Prudente, M., Hue, N.D., Tanabe, S., 2002. Asia-Pacific mussel watch: monitoring of butyltin contamination in coastal waters of Asian developing countries. *Environ. Toxicol. Chem.* 21, 2119-2130.
- Siroka, Z., Drastichova, J., 2004. Biochemical markers of aquatic environment contamination - cytochrome P450 in fish. *Acta Vet. Czech.* 73, 123-132.
- Stegeman, J. J., Brouwer, M., Di Giulio, R.T., Förlin, L., Fowler, B.A., Sanders, B.M., Van Veld, P.A., 1992. Molecular responses to enzyme and protein systems as indicators of chemical exposure and effect, in: Hugget, R.J., Kimerle, R.A.,

- Mehrle, J.R., Bergman, H.L. (Eds.), Biomarkers: Biochemical, Physiological and Histological Markers of Anthropogenic Stress. SETAC/Lewis Publishers, Inc., Chelsea, pp. 235-335.
- Stegeman, J.J., Hahn, M.E., 1994. Biochemistry and Molecular Biology of Monooxygenases: Current perspectives on forms, functions and regulation of cytochrome P450 in aquatic species, in: Malins, D.C., Ostrander, G.K. (Eds.), Aquatic Toxicology: Molecular, Biochemical and Cellular Perspectives. Lewis Publishers, Boca Raton, pp. 87-206.
- Suyama, F., Guimarães, E.T., Lobo, D.J.A., Rodrigues, G.S., Domingos, M., Alves, E.S., Carvalho, H.A., Saldiva, P.H.N., 2002. Pollen mother cells of *Tradescantia* clone 4430 and *Tradescantia pallida* var. *purpurea* are equally sensitive to the clastogenic effects of X-rays. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 35, 27-129.
- Timme-Laragy, A.R., Meyer, J.N., Waterland, R.A., Di Giulio, R.T., 2005. Analysis of CpG methylation in the killifish CYP1A promoter. *Comp. Biochem. Phys. C* 141, 406-411.
- Triggia, A.A., Correia, C.A., Filho, C.V., 2001. Processamento Primário de Fluidos, in: Thomas, J.E., Barros, V., Santos, C.L., Fernandes, E. (Eds.), Fundamentos de Engenharia de Petróleo. Interciência, Rio de Janeiro, pp. 219-301.
- Van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N.P.E., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ. Toxicol. Pharm.* 13, 57-149.
- Van Hamme, J.D., Singh, A., Ward, O.P., 2003. Recent advances in petroleum microbiology. *Microbiol. Mol. Biol. R.* 67, 503-549.
- Vieira, J.P., Castello, J.P., Pereira, L.E.D., 1998. A Ictiofauna, in: Seeliger, U., Odebrecht, C., Castello, J.P. (Eds.), Os ecossistemas costeiro e marinho do extremo sul do Brasil. Ecoscientia Inc. Rio Grande, pp. 60-68.
- Vieira, P.A., Vieira, R.B., França, F.P., Cardoso, V.L., 2007. Biodegradation of effluent contaminated with diesel fuel and gasoline. *Journ. Hazard. Mat.* 140, 52-59.
- Vilas Boas, D.F., 1990. Distribuição e comportamento dos sais nutrientes, elementos maiores e metais pesados na Lagoa dos Patos-RS. Tese de Mestrado. FURG. 120 p.
- Ward, J.V., Tockener, K., Schiemer, F., 1999. Biodiversity of floodplain river ecosystems: ecotones and connectivity. *Regul. Rivers: Res. Manage.* 15, 125-139.

- Wells, P.G., Depledge, M.H., Butler, J.N., Manock, J.J., Knap, A.H., 2001. Rapid toxicity assessment and biomonitoring of marine contaminants – exploiting the potencial of rapid biomarker assays and microscale toxicity tests. *Mar. Pollut. Bull.* 42, 799-804.
- White, P.A., Rasmussen, J.B., 1998. The genotoxic hazards of domestic wastes in surface waters. *Mutat. Res.* 410, 223-36.
- Williams, L.M., Oleksiak, M.F., 2008. Signatures of selection in natural populations adapted to chronic pollution. *BMC Evol. Biol.* 8, 1-12.
- Wills, L.P., Matson, C.W., Landon, C.D., Di Giulio, R.T., 2010. Characterization of the recalcitrant CYP1 phenotype found in Atlantic killifish (*Fundulus heteroclitus*) inhabiting a Superfund site on the Elizabeth River, VA. *Aquat. Toxicol.* 99, 33-41.
- Wirgin, I., Waldman, J.R., 2004. Resistance to contaminants in North American fish populations. *Mutat. Res.* 552, 73-100.
- Wirgin, I., Roy, N.K., Loftus, M., Chambers, R.C., Franks, D.G., Hahn, M.E., 2011. Mechanistic basis of resistance to PCBs in Atlantic tomcod from the Hudson River. *Science.* 331, 1322-1324.
- Woodhead, R.J., Law, R.J., Matthiessen, P., 1999. Polycyclic aromatic hydrocarbons in surface sediments around England and Wales, and their possible biological significance. *Mar. Pollut. Bull.* 38, 773-790.
- Wolff, L.L., Ericsson, R.H., Viana, D., Zaleski, T., Donatti, L., 2007. Population structure of *Phalloceros caudimaculatus* (Hensel, 1868) (Cyprinodontiformes, Poeciliidae) collected in a brook in Guarapuava, PR. *Braz. Arch. Biol. Techn.* 50, 417-423.
- Yunker, M.B., Macdonald, R.W., Vingarzan, R., Mitchell, H., Goyette, D., Sylvestre, S., 2002. PAHs in the Fraser river basin: a critical appraisal of PAH ratios as indicators of PAH source and composition. *Org. Geochem.* 33, 489-515.
- Zanette, J., Jenny, M.J., Goldstone, J.V., Woodin, B.R., Watka, L., Bainy, A.C.D., Stegeman, J.J., 2009. New cytochrome P450 1B1, 1C2 and 1D1 genes in the killifish *Fundulus heteroclitus*: basal expression and response of five killifish CYP1s to the AHR agonist PCB126. *Aquat. Toxicol.* 93, 234-243.
- Zanette, J., 2013. Genes and proteins related with biotransformation in tropical fishes. Perspectives in aquatic toxicology, in Almeida, E. A. and Ribeiro, A. O. (Eds.),

Pollution and fish health in tropical ecosystems. E- Publishing Inc., Boca Raton,
pp. 16-34.

CAPÍTULO 1

Effects of Environmental Contamination on the *CYP1A* Response in Two Species of South American Guppies.

(Manuscrito a ser submetido para a revista *Ecotoxicology and Environmental
Safety*).



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

Rio Grande, November 04, 2014.

From: Juliano Zanette, PhD
Instituto de Ciências Biológicas, ICB
Universidade Federal do Rio Grande
Av. Itália Km 8, Rio Grande, RS
Brazil, 96203-900

To:
Dr. Kurunthachalam Kannan (Editor-in-Chief – Ecotoxicology and Environmental Safety)
State University of New York (SUNY) at Albany, Albany, New York, USA

Dear Editor,

Enclosed you can find the manuscript entitled “Effects of Environmental Contamination on the *CYP1A* Response in Two Species of South American Guppies.” from, Cíntia C. Chivittz, Debora P. Pinto, Roger S. Ferreira and Juliano Zanette to be submitted for publication as regular research article in *Ecotoxicology and Environmental Safety*. Studies evaluating the adaptation of fish to survive in highly impacted environments are common in North America and involves responses at the molecular level. This adjustment includes increasing the P450 1A (*CYP1A*) level and lack of induction by compounds that are agonists of the aromatic hydrocarbon receptor (AHR), called the refractory response. In this study we evaluated the hydrochemical characteristics of the sampling sites and the level of expression of *CYP1A* in South American guppies, *Jenynsia multidentata* and *Phalloceros caudimaculatus*. In addition, we also recorded the existence of refractory response in populations of *J. multidentata* exposed for 24h to beta-naphthoflavone (BNF; 1µM), an agonist of AHR. This is possibly the first study that shows the occurrence of refractory response in South American fish. The results of biomonitoring field also indicate that fish exposed to a point source of PAH contamination showed high *CYP1A* levels in different organs evaluated. These results suggest the use of guppys *P. caudimaculatus* and *J. multidentata* as model organisms for studies of population biomonitoring in South America. The manuscript was edited for proper English language, grammar, punctuation, spelling, and overall style by one or more of the highly qualified native English speaking editors at American Journal Experts (AJE certificate for this manuscript is under, in the last page of this cover letter). We hope you can find the manuscript adequate to be submitted and published in *Ecotoxicology and Environmental Safety*.

Sincerely,

Juliano Zanette, PhD
Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande
juliano.zanette@pq.cnpq.br or biozanette@hotmail.com

Highlights

- Higher *CYP1A* levels were observed in organs of fish from contaminated sites
- *CYP1A* refractory response was recorded in guppy from a polluted site
- Effects of pollution in South American fish from the Patos Lagoon Estuary were evaluated
- *CYP1A* responses were evaluated in biopsied fin from guppies
- South American guppies were used to study adaptation to pollution

Suggested reviewers:

Maria E. Jönsson

Dept. of Environmental Toxicology, Evolutionary Biology, Centre, Uppsala University, Norbyvägen 18A, 752 36 Uppsala, Sweden

maria.jonsson@ebc.uu.se

María Valeria Amé

Universidad Nacional de Córdoba, Facultad de Ciencias Químicas, Haya de la Torre esq. Medina Allende, CP 5000, Córdoba, Argentina

vame@fcq.unc.edu.ar or valeriaame@gmail.com

John J. Stegeman

Biology Department, Redfield 3-42 MS#32, Woods Hole Oceanographic Institution, Woods Hole, MA, 02543, USA

jstegeman@whoi.edu

Afonso Celso Dias Bainy

Departamento de Bioquímica, CCB, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC 88040-900, Brazil.

bainy@mbox1.ufsc.br

Tarquin Dorrington

Biochemistry Department, Universidade Federal de Santa Catarina, SC, 88034-257, Brazil

tarquindorrington@gmail.com.

**Effects of Environmental Contamination on the *CYP1A* Response in
Two Species of South American Guppies.**

Cíntia C. Chivittz¹, Debora P. Pinto¹, Roger S. Ferreira¹, Mauricio da S. Sopezki¹,
Juliano Zanette^{1*}

¹ Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande (FURG), Rio Grande, RS, Brazil 96208-060.

* Corresponding author:

Juliano Zanette, Instituto de Ciências Biológicas, ICB, Universidade Federal do Rio Grande, Av. Itália Km 8, Rio Grande, RS, 96208-060, Brazil

Tel: +55-53-32975196 Fax.: +55-53-32336633

E-mail: julianozanette@furg.br; biozanette@hotmail.com

1 **Abstract**

2 The aquatic contamination with organic compounds (e.g. PAHs and PCBs)
3 and complex mixtures (e.g. industrial and domestic sewage discharges) lead fishes to
4 respond with the induction of the biomarker cytochrome P450 1A (CYP1A).
5 Alternatively, the resistance acquired in some fish populations to live in heavily
6 polluted sites (e.g. *Fundulus heteroclitus* from New Bedford Harbor, MA, USA) is
7 correlated to the suppression of *CYP1A* induction; the so-called *CYP1A* refractory
8 phenotype. The present study, evaluated for the first time the *CYP1A* transcriptional
9 level in the South American Cyprinodontiformes guppies *Jenynsia multidentata* and
10 *Phalloceros caudimaculatus* collected in sites with distinct level and types of
11 contamination and investigated the presence of the *CYP1A* refractory phenotype in
12 those fish populations. High *CYP1A* level was observed in *J. multidentata* from an
13 urban area, where high nutrient concentration and low level of dissolved oxygen was
14 also recorded and eliciting contamination with domestic sewage discharges. *P.*
15 *caudimaculatus* from a site located in a petrochemical pole showed high levels of
16 *CYP1A* expression in gill, liver and gonopodium, comparing to other sites.
17 Laboratory exposure of *J. multidentata* from four sites, to 1µM β-naphthoflavone for
18 24 h, caused the *CYP1A* induction in all organs analyzed (gill, liver and
19 gonopodium), relative to controls, with the exception of the liver of fish from one of
20 the sites, suggesting a weak liver-specific *CYP1A* refractory response in that fish
21 population. The *CYP1A* induction to BNF in gonopodium of guppies was similar to
22 gill and liver, which indicates the use of this biopsied organ for non-lethal biomarker
23 analysis. The results suggest that the mechanisms responsible for the adaptation of *J.*
24 *multidentata* are somehow similar to those found in fish from North America and
25 possibly are also related to polymorphism in the AHR receptor. This study provided

26 the first information about the adaptation in polluted sites involving the *CYP1A*
27 refractory responses in South American guppies. Additional studies are needed to
28 understand the basic mechanisms involved in this adaptation.

29

30 **Keywords:** South America, contamination, *CYP1A*, fish, recalcitrant response.

31

32

33

34

35

36

37

38

39

40

41

42

43

44

45

46

47

48

49

50

51

52

53

54

55

56

57

58 **1. Introduction**

59 South America continental waters exhibit a high biodiversity and comprise
60 some of the most productive ecosystems on the planet (Ward et al., 1999; Lévêque,
61 2005). The chaotic human occupation in these environments is one of the main
62 causes of reduction in the environmental water quality, which results in changes on
63 the health of living beings that depend directly or indirectly on this resource
64 (Cajaraville et al., 2000).

65 The polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are one of the main classes of
66 contaminants that affect aquatic ecosystems (Netto et al., 2000; Van Hamme et al.,
67 2003). The estuarine region of Patos Lagoon, where this study was conducted,
68 comprises the city of Rio Grande and the second largest Brazilian port complex, as
69 well as fertilizer industries and an oil refinery (Medeiros et al., 2005; Amado et al.,
70 2006; Garcia et al., 2010). Furthermore, sewage treatment is considered precarious,
71 as well as in most cities of Latin America where sewage is deposited in rivers,
72 estuaries and oceans (Niencheski and Windom, 1994; Medeiros et al., 2005). Thus,
73 the discharge of sewage and industrial waste, together with the navigation activity,
74 are mainly responsible for PAHs emissions in the region (Medeiros et al., 2005;
75 Garcia et al., 2010).

76 The environmental monitoring programs aim to provide answers concerning
77 the environmental disturbances and use this information as a source of remediation
78 and management (Ladson et al., 1999). The joint analysis of water, sediment and
79 living organisms, for example, is a potential indicator of environmental quality of
80 continental waters (Chiba et al., 2011). Among the organisms used in biomonitoring,
81 fish possess wide geographic distribution and can metabolise the contaminants

82 present in the water, inferring chronic and cumulative effects along the trophic chain
83 (Goksoyr et al., 1991; Araújo et al., 2003).

84 In Brazil, some species of Cyprinodontiformes are abundant and have high
85 potential to be used in ecotoxicology studies (Ferreira et al., 2012, Zanette, 2013).
86 *Jenynsia multidentata* and *Phalloceros caudimaculatus* have small size and certain
87 tolerance to salinity and temperature fluctuations, which makes them promising
88 models for field and laboratory studies (Mai et al., 2005; Wolff et al., 2007, Ferreira
89 et al., 2012). In addition, they possess the ability to live in contaminated and
90 deteriorated environments with low oxygen availability (Hued Bistoni, 2005; Araújo
91 et al., 2009). These species share external sexual dimorphism, characterized by an
92 anal fin modified into a copulating organ (gonopodium) and significant differences
93 in size, with females traditionally larger than males (Wolff et al., 2007; Rahayu et al.,
94 2013).

95 Currently there are a great number of biomarkers used in ecotoxicological
96 studies. Among these, molecular and cellular biomarkers provide answers on the first
97 signs of environmental disturbance (Cajaraville et al., 2000). Their use permits to
98 plan remediation measures before higher levels of biological organization, such as
99 population, community and ecosystem, are affected (Monserrat et al., 2003). The
100 cytochrome P450 enzyme system or CYP is associated with the mixed-function
101 monooxygenase (MFO) system and acts on the oxidative metabolism and
102 detoxification of numerous substances of natural or xenobiotic origin (Bonacci et al.,
103 2007). CYP is composed of a superfamily of hemoproteins, present from bacteria to
104 mammals, used for the detection of toxic contaminants in aquatic systems,
105 particularly in fish (Arinc et al., 2000; Craft et al., 2003; Dong et al., 2004). This
106 system metabolizes polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and other

107 contaminants, converting lipophilic into hydrophilic compounds that can be easily
108 excreted (Busby et al., 1999).

109 Four subfamilies of CYP1 are known in fishes: CYP1A, CYP1B, CYP1C and
110 CYP1D, which are separately regulated biomarkers at the transcriptional level
111 (Jönsson, et al., 2007; Zanette et al., 2009). Among these subfamilies, CYP1A is
112 widely used as a biomarker for contamination in fish liver, both in continental and
113 marine waters (Parente et al., 2004; Kirby et al., 2007). The CYP1A property of
114 acting as a biomarker of exposure is due to the effect produced on the aromatic
115 hydrocarbon receptor (AHR) present in the cells, starting the process of induction
116 that leads to the activation of *CYP1A* at the transcriptional level (Honkakoski and
117 Negishi, 2000).

118 The biomonitoring with different populations aims to evaluate a wider range
119 of areas exposed to contamination and thus establish comparative parameters
120 between these populations (Timme-Laragy et al., 2005; Oleksiak 2008). The
121 Cyprinodontiform fish *Fundulus heteroclitus* is widely used in this type of
122 monitoring, on the basis of their traditional use in Ecotoxicology (Burnett et al.,
123 2007). Studies in North America indicate that one of *F. heteroclitus* adaptations to
124 contaminated sites involves suppression in the induction of genes, such as *CYP1A*
125 (Oleksiak 2008; Wills et al., 2010).

126 Various hypotheses suggest this suppression of *CYP1A* with deacetylation of
127 histones by interference of endogenous factors (Matzke and Birchler, 2005),
128 degradation of RNA (Bevilacqua et al., 2003), nucleotide CpG methylation in the
129 promoter region of the gene *CYP1A* and posttranslational modifications involved
130 with the receptor AHR (Timme-Laragy et al., 2005). Currently, one of the most
131 accepted hypotheses is that the acquired resistance to contamination by these

132 populations relies on the polymorphism of AHR, and that this adaptation is shared by
133 different species of fish (Aluru et al., 2011; Wirgin et al., 2011). This suppression of
134 *CYP1A* gene induction is called refractory or recalcitrant response, characterized as
135 the absence of *CYP1A* induction in organisms exposed to organic contaminants that
136 are AHR agonists, which is common in populations of *F. heteroclitus* adapted to
137 chronic contamination (Meyer et al., 2003; Timme-Laragy et al., 2005; Aluro et al.,
138 2011). However, there are no reports of this gene suppression occurring in native fish
139 species from South America.

140 This study evaluated expression and induction variations of *CYP1A* by PAHs,
141 including field and laboratory analyses in different populations of *J. multidentata* and
142 *P. caudimaculatus*. The possible occurrence of refractory response in *J. multidentata*
143 was also evaluated to investigate the mechanisms of adaptation and resistance of
144 these populations in the region, providing a basic knowledge for future studies.

145

146 **2. Material and methods**

147

148 2.1. Collection locations

149 Adult male specimens of *J. multidentata* and *P. caudimaculatus* (2.24 ± 0.25 and
150 1.78 ± 0.22 cm, respectively) were collected near the Patos Lagoon Estuary, where
151 the city of Rio Grande - RS is located, between February 2013 and May 2014. *J.*
152 *multidentata* was collected in the sites 1, 2, 3 and 4 (S1, S2, S3 and S4, respectively;
153 Figure 1 and Table 1). S1, S2 and S3 are three washouts located in Cassino beach, a
154 seaside resort with approximately 20,000 inhabitants. S1 was considered a reference

155 location, because it is a deserted area located approximately 22 km to the south of the
156 nearest urbanized area. S2 is located around 1 km to the north of the residential area
157 of Cassino beach and it was considered little impacted. S3 is located in the residential
158 area of the beach, which is irrigated with domestic sewage and has been used in
159 studies with guppies in the region (Ferreira et al., 2012; Machado et al., 2013). S4 is
160 an artificial channel that runs through the city and is known to be contaminated by
161 domestic sewage and organic contaminants (Niencheski and Baumgarten, 2010). The
162 sampling point S4 corresponds to the northern location that flows into the estuary of
163 Patos Lagoon.

164 *P. caudimaculatus* was collected at the sites 5, 6 and 7 (S5, S6 and S7,
165 respectively) in different regions of the city of Rio Grande (Figure 1 and Table 1).
166 The choice of these sites was based on the type of contamination present in each
167 location; S6 was located outside of an oil refinery, close to PAHs emission; the other
168 two sites were located far from this source of contamination. S5 is located at the
169 Vieira stream, near ERS-734, between two neighborhoods of the city and
170 approximately 15km distant from S6, with high amounts of domestic sewage (Santos
171 et al., 2008). S7 is a canal located in the industrial complex, distant around 11 km
172 from S6.

173

174 2.2. Evaluation of physico-chemical parameters of the water

175 Water samples were collected from April 2013 to May 2014 where *J.*
176 *multidentata* and *P. caudimaculatus* were also collected, respectively. Total nitrogen
177 and phosphorus levels were evaluated through 0.5 L water samples, collected at
178 approximately 30 cm from the surface. The samples were stored in glass containers
179 and analyzed in a period of less than 24 h after collection to obtain results as close to

180 the actual levels as possible. Total nitrogen was evaluated according to the Kjeldahl
181 method (Mackereth and Talling, 1978) and the concentration of total phosphorus was
182 determined according to Valderrama (1981). Three replicas were made for these two
183 parameters. The value of each parameter was the average of the results obtained.
184 Measurements of temperature, pH, salinity and dissolved oxygen were carried out
185 with a multiparameter water quality checker Horiba U-50 at the moment of the
186 collection. The value of each parameter measured by the checker was obtained
187 through the average of three measurements.

188

189 2.3. Levels of *CYP1A* in *Jenysia multidentata* and *Phalloceros caudimaculatus*
190 collected around the Estuary of Patos Lagoon

191 Fish were collected (n = 10 per site) with a fish dip net and anesthetized in
192 tricaine solution (Sigma, St Louis, MO, USA) at a concentration of approximately
193 150 mg/L for 2.5 min, and later euthanized with cervical transection. These
194 procedures were approved by the Ethics Committee and Animal Use (CEUA) at
195 FURG. Previous experiments have been conducted in order to use this method of
196 anesthesia, which confirmed that the expression and induction capacity of *CYP1A* are
197 not altered by this procedure (submitted manuscript).

198 Liver, gill and anal fin (gonopodium) were dissected and stored immediately
199 in RNAlater (Ambion, Austin, TX, USA) for further assessment of *CYP1A* levels.
200 Total RNA was isolated with Trizol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and its
201 transcript was converted to cDNA with the High-Capacity cDNA Reverse
202 Transcription kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). *CYP1A* and β -actin
203 specific primers were used for the analysis through real-time PCR according to
204 Ferreira et al. (2012) (Table 4). The real-time PCR analyses were performed with

205 GoTaq qPCR Master Mix kit (Promega, Madison, WI, USA) and real-time PCR
206 System 7300 (Applied Biosystems), using the following program: 50° C for 2 min,
207 95° C for 2 min and 40 cycles of 95° C for 15 seconds and 60° C for 30 sec. The
208 samples were analyzed in duplicate and the method $E^{-\Delta ct}$ was employed to calculate
209 the relative level of transcription of the experimental groups according to Livak and
210 Schmittgen (2008), using β -actin as a housekeeping gene. Data were logarithmically
211 transformed to fit ANOVA assumptions of normality and homoscedasticity. The
212 difference among the groups was determined via one-way ANOVA followed by
213 Tukey's HSD test ($p < 0.05$).

214

215 2.4. Evaluation of the refractory response of *CYP1A* in *Jenynsia multidentata*

216 *J. multidentata* adult males were collected ($n = 80$; 20 per site) at S1, S2, S3
217 and S4. The animals were taken to the aquatic vivarium and acclimatized for two
218 weeks in dechlorinated water with salinity 5 and temperature of 24° C, constant
219 aeration and photoperiod of 12 h light/12 h dark. They were fed twice a day with the
220 commercial ration *Alcon BASIC MEP 200 Complex* (Alcon, Camboriú, SC, Brasil).
221 For the exposure experiment, fish from each site were separated into two 6 L
222 aquariums ($n = 10$ each) for the control and exposed groups, totaling 8 aquariums for
223 fish from the 4 sites. The animals were kept in the same conditions of
224 acclimatization, but without feeding for 24 h prior to the beginning of the
225 experiment. Beta-naphthoflavone (BNF) (Sigma, St Louis, MO, USA) dissolved in
226 dimethyl sulfoxide (DMSO) (Sigma, St Louis, MO, USA) was added into the water
227 of the exposure groups to obtain a final concentration of 1 μ M of BNF. DMSO was
228 added to the control groups to obtain an equivalent DMSO concentration of 0.002%
229 that was used in the BNF exposed group (Jönsson et al., 2007; Kim et al., 2008).

230 After 24 h of exposure, fish were anesthetized and euthanized, as described in
231 the item 2.3. Liver, gill and gonopodium were dissected to extract RNA, synthesize
232 cDNA and assess the quantitative expression of *CYP1A* and β -actin through real-time
233 PCR (item 2.3). Data were logarithmically transformed to fit ANOVA assumptions
234 of normality and homoscedasticity and the difference among the groups was
235 determined via one-way ANOVA followed by Tukey's HSD test ($p < 0.05$).

236

237 **3. Results**

238

239 3.1. Evaluation of physico-chemical parameters of the water

240 The physical and chemical parameters of the water are described in Tables 2
241 and 3 for the collection sites of *J. multidentata* and *P. caudimaculatus*, respectively.
242 Among the sampling points of *J. multidentata*, the temperature did not oscillate too
243 much between sites, being slightly lower in S1 ($16.41 \pm 0.61^\circ \text{C}$), higher in S4 (19.75
244 $\pm 0.04^\circ \text{C}$) and similar in S2 and S3 (17.44 ± 0.35 ; 17.65 ± 0.12 , respectively). The
245 levels of pH stayed around 7 and did not show significant differences among S1, S2,
246 S3 and S4 (6.49 ± 1.09 ; 6.86 ± 0.70 ; 6.77 ± 0.21 ; 7.18 ± 0.05 , respectively). Salinity
247 also did not show great variations, being slightly higher in S2 (1.29 ± 0.56) than in
248 S1, S3 and S4 (0.01 ± 0.01 ; 0.10 ± 0.03 and 0.12 ; ± 0.02 , respectively). Dissolved
249 oxygen levels were lower in S3 and S4 (5.06 ± 3.39 and 2.65 ± 1.10 mg/L,
250 respectively) than in S1 and S2 (11.84 ± 2.39 and 9.23 ± 1.03 mg/L, respectively).
251 Total phosphorus levels were higher in S4 (0.65 ± 0.01 mg/L), and gradually
252 decreases in S3, S1 and S2 (0.27 ± 0.02 mg/L, 0.15 ± 0.01 and 0.09 ± 0.01 mg/L,

253 respectively). Total nitrogen was higher in S4 (7.41 ± 0.57) than in S1, S2 and S3
254 (0.26 ± 0.09 mg/L, 1.09 ± 0.02 and 1.19 ± 1.11 mg/L, respectively).

255 The temperature of the water from *P. caudimaculatus* collection sites did not
256 oscillate too much, being slightly higher in S5 (14.20 ± 2.30 °c) than S7 ($11.70 \pm$
257 0.60 ° C) and equal to both locations in S6 (13.20 ± 0.30). The levels of pH did not
258 show significant differences among the sites, being around 6 (5.70 ± 0.20 , $6.60 \pm$
259 0.10 , 6.30 ± 1.50 to S5, S6 and S7, respectively). Salinity also did not vary
260 drastically, being slightly lower at S7 and S5 (0.008 ± 0.010 and 0.010 ± 0.010 and,
261 respectively) than in S6 (0.030 ± 0.010). As for dissolved oxygen levels, S6 showed
262 the lowest level (2.90 ± 3.30 mg/L) when compared to S7 and S5 (6.90 ± 2.20 and
263 7.50 ± 2.80 mg/L, respectively).

264

265 3.2. Levels of *CYP1A* in *Jenynsia multidentata* and *Phalloceros caudimaculatus*
266 collected around the Estuary of Patos Lagoon

267 Transcriptional levels of *CYP1A* in *J. multidentata* and *P. caudimaculatus*
268 from different collection sites are shown in Figures 2 and 3, respectively. In the gills
269 of *J. multidentata*, the highest transcriptional level of *CYP1A* was recorded in the fish
270 from the contaminated location S4, being 3 times higher compared to fish from the
271 reference site S1. In the liver, *CYP1A* expression in fish from the impacted sites S3
272 and S4 was near twice that of fish from S1. A transcriptional level of *CYP1A* in the
273 gonopodium of fish from S2 was 17 times greater than in the fish from the reference
274 site S1.

275 Specimens of *P. caudimaculatus* from the site S6, located near the
276 petrochemical center, showed higher levels of *CYP1A* in gills, liver and gonopodia
277 than those from the reference site S5 (around 5, 6 and 4 times, respectively; $p <$

278 0.05). Gills and livers of fish from S7, located in the industrial complex, also showed
279 levels of *CYP1A* twice higher than those from the reference site S5 ($p < 0.05$).

280 3.3. Evaluation of the refractory response of *CYP1A* in *Jenynsia multidentata*

281 The exposure of *J. multidentata* from the four sites to 1 μM of BNF for 24
282 hours in laboratory, caused induction of *CYP1A* in all organs of the exposed groups
283 compared to their respective controls, except for the liver of fish from site S4 (Figure
284 4). Despite the lack of induction in the liver, fish from this location presented
285 significant induction of *CYP1A* by BNF in gills and gonopodium. The *CYP1A*
286 induction to BNF in relation to their respective controls, were around 59-111 fold in
287 gills, 30-59 fold in livers and 28-74 fold in gonopodium, except for liver of fish from
288 site S4, where no *CYP1A* induction was observed.

289

290 **4. Discussion**

291 The two species of Cyprinodontiformes analyzed in this study, *J.*
292 *multidentata* and *P. caudimaculatus*, are still little explored in environmental
293 toxicology studies, although they present favorable characteristics to field and
294 laboratory studies, such as tolerance to salinity and temperature oscillations and
295 ability to live in impacted environments with low oxygen availability (Hued and
296 Bistoni, 2005; Mai et al., 2005; Wolff et al., 2007; Araújo et al., 2009). These species
297 are representative in South American countries; *J. multidentata* occurs from Rio
298 Negro, Argentina, to Rio de Janeiro State, Brazil (Ghedotti and Weitzman, 1998,
299 1998); *P. caudimaculatus* were registered in South and Southeast regions of Brazil
300 and in coastal drainages of Uruguay and Argentina (Bisazza, 1993; Lucinda, 2008).
301 In this study, important informations were found regarding the use of these species in

302 ecotoxicological studies, in addition to explore adaptation developed by South
303 American Cyprinodontiformes exposed to organic contamination.

304

305 4.1. *CYP1A* expression in *Jenynsia multidentata* and *Phalloceros caudimaculatus* in
306 relation to the collection sites

307 Studies with water monitoring programs demonstrated that water pollution is
308 harmful not only to the water intended for human consumption, but it also interferes
309 on the health of living organisms in aquatic ecosystems (Contardo-Jara et al., 2009;
310 Rola et al., 2012). As in most water bodies of Latin America, the Patos Lagoon
311 Estuary receives pollutants with complex composition from different sources of
312 contamination such as organic substances, discharges of poorly treated sewage and
313 industrial waste (Medeiros et al., 2005; Luz et al., 2010).

314 In our study, the physical and chemical parameters of the water such as pH,
315 salinity and temperature, indicate that the two species live in similar abiotic
316 conditions and that the variations found in the responses of *CYP1A* were probably
317 caused by the presence of contaminants of human origin and not by the variation of
318 those parameters. Among the collection sites of *J. multidentata*, S3 and S4 were the
319 most impacted with the highest levels of *CYP1A* transcription when compared with
320 the less impacted sites S1 and S2. A study with *J. multidentata* in Córdoba,
321 Argentina, showed that the sites contaminated by industrial and/or domestic effluents
322 with dissolved oxygen levels between 5.1 and 7.1 mg/L influence on *cyp19a1b* gene
323 expression in the brain of fish (Guyón et al., 2012). Although this study uses another
324 gene, it is likely that the environmental characteristics of the sampling sites also
325 influence the expression of *CYP1A* in wild *J. multidentata*.

326 Most water quality indexes, such as the Canadian Council of Ministers of the
327 Environment Water Quality Index (CCME WQI), the Oregon Water Quality Index
328 (OWQI) and the NSF Water Quality Index (NSF IQA) are calculated with a
329 combination of some physical and chemical parameters (Akkoyunlu and Akiner,
330 2012). As the present study evaluated the raw value data of each parameter, it was
331 not possible to establish a comparison between our results and those international
332 standards. The National Environment Council, responsible for the classification of
333 Brazilian waters (CONAMA 357/2005), establishes that the levels of dissolved
334 oxygen should not be lower than 5 mg/L in shallow freshwater bodies and
335 recommends total phosphorus levels of up to 0.030 mg/L and total nitrogen of up to
336 3.7 mg/L for waters with pH below 7.5. The levels found in S3 show that the
337 environmental conditions in this site are near those required by Brazilian law.
338 However, S4 presented lower levels of dissolved oxygen and total phosphorus and
339 nitrogen levels higher than those recommended.

340 The levels of dissolved oxygen in S3 and S4 were also below those
341 recommended by the water quality Index adopted in China (EQSSW), which
342 establishes levels between 7.5 and 6 mg/L as vital for the maintenance of aquatic life
343 in waters where spawning and growth of animals occur (Ban et al., 2014). The Patos
344 Lagoon Estuary is considered a nursery for several coastal species that begin their
345 life cycle in the estuarine region and then migrate to the Atlantic Ocean (Tagliari et
346 al., 2003). The results obtained for the dissolved oxygen in S3 and S4 are indicative
347 of contamination by domestic sewage and organic source contaminants, since
348 eutrophic or highly polluted waters consume a great amount of oxygen due to the
349 decomposition of organic matter (Ban et al., 2014). Thus, low levels of dissolved
350 oxygen may harm aquatic organisms that are not adapted to live under these

351 conditions and that rely exclusively on these regions for spawning and growth
352 (Affonso et al., 2011).

353 In addition to dissolved oxygen, total phosphorus and total nitrogen levels
354 were above those recommended by the Chinese index, which range from 0.01 to
355 0.025 mg/L and from 0.2 to 0.5 mg/L, respectively (Ban et al., 2014). Phosphorus
356 and nitrogen in natural water bodies are good indicators of water pollution because
357 they show the occurrence of anthropogenic sources of contamination, mainly caused
358 by discharge of sewage and to a lesser extent by effluents from chemical industries
359 and agricultural drainage activities (Guo and Li, 2003; Ban et al., 2014; Li et al.,
360 2014). In this way, the high expression of *CYP1A* registered in the livers of fish from
361 S3 is probably due to the presence of xenobiotics from domestic effluents, since it is
362 located far from the city's industrial complex but inserted in the residential area of
363 Cassino beach, where sewage treatment is considered precarious and incipient
364 (Calliari et al., 2010).

365 The S4 site is situated in the center of Rio Grande city and connected directly
366 to the estuary of the Patos Lagoon (Santos et al., 2008). The contamination in this
367 region has already been documented in studies of water analysis, which showed high
368 levels of nutrients such as phosphorus, nitrate and nitrite in function of the
369 accumulation of chemicals from fertilizer factories present in this region, in addition
370 to high concentration of *Escherichia coli*, indicating domestic sources of
371 contamination (Mirlean et al., 2002; Santos et al., 2008; Niencheski e Baumgarten,
372 2010). Sediment analyses also revealed a high concentration of arsenic in sediments
373 of the estuary of Patos Lagoon, probably due to the fertilizer industries (Mirlean et
374 al., 2003). In this way, the high *CYP1A* expression in gills and livers of fish from this

375 population is probably caused by the contamination of water with a complex mixture
376 of contaminants.

377 Fish from the location S2 showed high levels of *CYP1A* expression in
378 gonopodia when compared to fish from other locations. This result was not expected,
379 since S2 is located in an area that is far from human activities that could potentially
380 pollute Cassino beach and there was no evidence of contamination based on the
381 water parameters evaluated. Probably, the greatest expression of *CYP1A* in S2
382 occurred due to the difference in the age of the fishes collected, since younger
383 animals have an immature or maturing gonopodium, which could cause different
384 patterns of expression in the gonopodia of fish from that site (Ogino et al., 2004;
385 Rahayu et al., 2013).

386 High *CYP1A* expression levels were registered in all organs of *P.*
387 *caudimaculatus* from S6. Fish from S7 also presented higher *CYP1A* expression in
388 liver and gill than fish from S5. S7 is located in the industrial complex of the city of
389 Rio Grande, which is an area of intense vehicular traffic near fertilizer industries.
390 The contamination of the water from S7 was not confirmed by the low level of
391 dissolved oxygen, but the increased expression in fish organs from this site are
392 probably due to the contamination by PAHs. PAHs can also be produced in the
393 atmosphere as by-products of incomplete combustion of fossil fuels, or by pyrolysis
394 of organic material from fertilizer industries, which happens close to S7 (Mirlean,
395 2002; Macdonald et al., 2005).

396 The site S6, located outside of an oil refinery, presented the lowest levels of
397 dissolved oxygen, significantly lower than all sites evaluated, including the locations
398 where *J. multidentata* was collected. The low dissolved oxygen levels indicate that
399 this site is subjected to contamination (Ban et al., 2014), and that it is probably the

400 most impacted among all sites evaluated. According to Ban et al. (2004) water from
401 industrial regions have dissolved oxygen levels of at least 3 mg/L, which is above the
402 level found at S6. High levels of *CYP1A* in liver of fish exposed to punctual
403 contaminations from an oil refinery were also registered in a population of *F.*
404 *heteroclitus* adapted to conditions similar to those of the population from S6
405 (Loughery et al., 2014). The contamination of waters surrounding oil refineries has
406 been previously demonstrated through the presence of high concentration of grease
407 and oil in this region (Niencheski e Baumgarten, 2010). In addition, sediment
408 samples from that location indicate the oil refinery as one main responsible for the
409 presence of anthropogenic PAHs in the city of Rio Grande (Medeiros et al., 2005).
410 This high concentration of PAHs in the region is the possible cause of the high level
411 of *CYP1A* expressed in all organs of the fish population, which were probably
412 subjected to a chronic contamination by PAHs.

413 The ability of *CYP1A* expression in fish gonopodium of *J. multidentata* and
414 *P. caudimaculatus* from all collection sites suggests that this organ can be used in
415 biomonitoring studies. In *P. caudimaculatus*, the gonopodium collected did not
416 present sampling problems as recorded in specimens of *J. multidentata* from S2,
417 showing a similar expression pattern to classic organs like gills and liver in all sites
418 evaluated. According to Aranha and Caramaschi (1999), male juveniles of *P.*
419 *caudimaculatus* have total length of up to 2 cm and a developing gonopodium.
420 Although the size of the animals collected was less than 2 cm (1.78 cm), it is
421 assumed that the juveniles of this species are also capable of expressing the *CYP1A*
422 gene. The *CYP1A* expression in this organ is probably due to their epithelial
423 constitution and external location, which contributes to the interaction of the
424 contaminant with the tissue (Rahayu et al., 2013). The analysis of gonopodium

425 biomarkers, as well as other fins, can serve as a non-lethal alternative to the use of
426 these fish as biomonitors, since this organ has an efficient capacity of regeneration
427 (Salomao and Sawaya, 1988; Rahayu et al, 2013). Subsequent studies are necessary
428 to standardize the biopsy procedures in order to promote tissue regeneration and not
429 compromise animal health and welfare.

430 The results of the *CYP1A* expression in *J. multidentata* and *P.*
431 *caudimaculatus*, combined with the evaluation of physico-chemical parameters of
432 the water, show that the most contaminated sites were S4 and S6. The causes of this
433 pollution confirm the main environmental problems registered in the surroundings of
434 Patos Lagoon Estuary, including contamination by domestic sewage, registered in
435 S4, and contamination by PAHs, as described for S6. This contamination is the result
436 of various anthropogenic factors, such as the disposal of industrial and domestic
437 effluents, inappropriate waste disposal and activities of refining and distribution of
438 petroleum (Marlean et al., 2003; Medeiros et al., 2005, Niencheski et al., 2006;
439 Spengler et al., 2007; Niencheski et al., 2010).

440

441 4.2. Evaluation of the refractory response of *CYP1A* in *Jenynsia multidentata*

442 The resistance to pollution, observed in some fish populations that inhabit
443 highly impacted sites, is being studied in order to understand basic mechanisms in
444 toxicology (Bello et al., 2001; Wirgin and Waldman, 2004). These mechanisms are
445 not yet completely understood, though it is known that certain populations of fish
446 have developed a pattern of hereditary resistance and that the suppression of genes
447 can occur in *CYP1A* and in other genes that are under the control of the AHRs (Nacci
448 et al., 2010; Whitehead et al., 2010). Most studies investigating the refractory
449 response of *CYP1A* focus on the Cyprinodontiform species *Fundulus heteroclitus*

450 (Wills et al., 2009; Williams e Oleksiak, 2011), but studies with other species of fish,
451 including species of commercial value, are also being recently conducted (Wirgin et
452 al., 2011; Oziolor et al., 2014; Doering et al., 2014).

453 In this study with *J. multidentata*, the absence of *CYP1A* induction was found
454 at the site of collection with the highest percentage of contamination registered, as
455 described in other species of fish adapted to living in highly impacted sites
456 (Oleksiak, 2008; Wills et al., 2009). Refractory *CYP1A* responses were organ-
457 specific, being observed only in the liver of the S4 fish population and not in gill and
458 gonopodium. Bello et al. (2001) demonstrated, through *CYP1A* protein levels and
459 EROD activity, that the occurrence of refractory response in *F. heteroclitus* also
460 occurred in extrahepatic tissues. However, studies involving the organ-specific
461 comparison regarding the suppression of genes are not common and studies with
462 South American Cyprinodontiformes are nonexistent.

463 Another study suggested that the recalcitrant response in *F. heteroclitus* could
464 be caused by DNA methylation in the promoter region of *AHR* gene. However,
465 significant differences were not recorded between susceptible populations and those
466 adapted to contamination (Timme-Laragy et al., 2005). Aluro et al. (2011) did not
467 register population differences as for methylation, but suggested that this may be
468 related with the tissue and with the isoform of *AHR*. According to this study, the
469 transcriptional level of *AHR1* receptor was higher in the brain than in the liver of two
470 populations evaluated (sensitive and adapted to contamination). However, the
471 receptor *AHR2* presented a higher expression pattern than *AHR1* in both organs,
472 which was 22 times greater in the liver. This suggests that the recalcitrant response
473 found only in the liver of *J. multidentata* can be related to the *AHR2* isoform and,

474 similarly to what occurs in *F. heteroclitus*, this isoform of AHR is more expressed in
475 the liver than in other organs.

476 In addition, Wirgin et al. (2011) evaluated *Microgadus tomcod* populations
477 and pointed out that the resistance of this species for contamination by PCBs and
478 TCDDs is based on the deletion of six nucleotides of AHR2 (nucleotides 1314 to
479 1319 in exon 10; TTCCTC), which suggests that this receptor is responsible for
480 acquired resistance to contamination in this species. Another study with *F.*
481 *heteroclitus* demonstrated that AHR2 was the primary mediator in BNF, BKF and
482 PCB-126-induced cardiac teratogenesis, which demonstrates that the adaptive
483 mechanism developed by *F. heteroclitus* is probably in the AHR2 isoform and not
484 AHR1 (Clark et al., 2010). These studies reinforce our hypothesis that the
485 contamination resistance mechanisms developed by the population from S4 are
486 dependent on AHR2, since this is the isoform responsible for numerous processes
487 involving the adaptation to contaminants in different species of fish.

488 Thus, it is suggested that the occurrence of refractory response in *J.*
489 *multidentata* involves adaptation mechanisms partly similar to those seen in *F.*
490 *heteroclitus* and other fish species in North America (Aluro et al., 2011; Wirgin et
491 al., 2011). Furthermore, it is likely that the recalcitrant phenotype of *CYP1A*
492 developed by *F. heteroclitus* adapted to contamination is similar for all species of
493 fish that live in contaminated environments, and not a specific phenotype of each
494 population exposed to a certain class of contaminant.

495 It should be pointed out that the water pollution in S4 is characterized by a
496 complex mixture of contaminants, particularly by domestic sewage, and not point
497 sources of contamination, which may have hindered the occurrence of refractory
498 response in other organs. In addition, other mechanisms that are independent of the

499 AHR receptor may be involved in *J. multidentata* resistance to contamination. This
500 was the first study to investigate the occurrence of refractory response in South
501 American Cyprinodontiformes, though subsequent studies are needed to understand
502 the mechanisms involved in this response.

503

504 **5. Conclusions**

505 In this study, the effects of environmental contamination on *CYP1A*
506 biomarker levels in different populations of *J. multidentata* and *P. caudimaculatus*
507 suggest the use of these two species as model organisms for the study of molecular
508 mechanisms involved in the adaptation of certain populations to environmental
509 contamination. In addition, we registered the occurrence of refractory response in *J.*
510 *multidentata* livers, but not in other organs, suggesting that adaptive mechanisms in
511 the South American Cyprinodontiformes are partly similar to those observed in fish
512 species from North America. Subsequent studies should be performed with other
513 populations and species of fish native to South America to understand basic
514 toxicologic mechanisms. This study provides important data about the adaptation
515 developed by fish in Southern Brazil, and also suggests the application of *CYP1A*
516 biomarker in South American guppies for monitoring studies of environmental
517 contamination.

518

519 **Acknowledgements**

520 The authors are grateful to CNPq for supporting the projects 482768/2010-0,
521 480708/2013-4 and 573949/2008-5; to FAPERGS 12/1328-5; IFS A/5350-1 and to
522 the CAPES REUNI program. We also thank the partnership with the Laboratory of

523 Limnology of FURG, especially the professor Cleber Palma Silva and technician
524 Leonardo Furlanetto, who analysed water samples, and the technicians Bernardo
525 Vaz, Loraine Moraes and Josencler Ferreira for the assistance with the experiment
526 and laboratory analyses.

527

528

529

530

531

532

533

534

535

536

537

538

539

540

541

542

543

544

545

546

547

548 **References**

549

550 Affonso, A.G., Barbosa, C., Novo, E.M.L.M., 2011. Water quality changes in
551 floodplain lakes due to the Amazon River flood pulse: Lago Grande de
552 Curuaí (Pará). *Braz. J. Biol.* 71, 601-610.

553 Akkoyunlu, A., Akiner, M.E., 2012. Pollution evaluation in streams using water
554 quality indices: A case study from Turkey's Sapanca Lake Basin. *Ecol. Indc.*
555 18, 501-511.

556 Aluro, N., Karchner, S.I., Hahn, M.E., 2011. Role of DNA methylation of AHR1 and
557 AHR2 promoters in differential sensitivity to PCBs in Atlantic Killifish,
558 *Fundulus heteroclitus*. *Aquat. Toxicol.* 101, 288-294.

559 Amado, L.L., Robaldo, R.B., Geracitano L., Monserrat, J.M., Bianchini, A. 2006.
560 Biomarkers of exposure and effect in the Brazilian flounder *Paralichthys*
561 *orbignyanus* (Teleostei: Paralichthyidae) from Patos Lagoon estuary
562 (Southern Brazil). *Mar. Pollut. Bull.* 52, 207-213.

563 Aranha, J.M.R., Caramaschi, E.P., 1999. Estrutura populacional, aspectos da
564 reprodução e alimentação dos Cyprinodontiformes (Osteichthyes) de um
565 riacho do sudeste do Brasil. *Rev. Bras. Zool.* 16, 637-651.

566 Araújo, F.G., Fichberg, I., Pinto, B.C.T., Peixoto, M.G., 2003. A preliminary index
567 of biotic integrity for monitoring the condition of the Rio Paraíba do Sul,
568 Southeast Brazil. *Environ. Manag.* 32, 516-526.

569 Araújo, F.G., Peixoto, M.G., Pinto, B.C.T., Teixeira, T.P., 2009. Distribution of
570 guppies *Poecilia reticulata* (Peters, 1860) and *Phalloceros caudimaculatus*
571 (Hensel, 1868) along a polluted stretch of the Paraíba do Sul River, Brazil.
572 *Braz. J. Biol.* 69, 41-48.

573 Arinc, E., Sen, A., Bozcaarmutlu, A., 2000. Cytochrome P4501A and associated
574 mixed-function oxidase induction in fish as a biomarker for toxic
575 carcinogenic pollutants in the aquatic environment. P.AC. 72, 985-994.

576 Ban, X., Wu, Q., Pan, B., Du, Y., Feng, Q., 2014. Application of Composite Water
577 Quality Identification Index on the water quality evaluation in spatial and
578 temporal variations: a case study in Honghu Lake, China. Environ. Monit.
579 Assess. 184, 4237-4277.

580 Bello, S.M., Franks, D.G., Stegeman, J.J., Hahn, M.E., 2001. Acquired resistance to
581 aryl hydrocarbon receptor agonists in a population of *Fundulus heteroclitus*
582 from a marine superfund site: in vivo and in vitro studies on the induction of
583 xenobiotic metabolizing enzymes. Toxicol. Sci. 60, 77-91.

584 Bevilacqua, A., Ceriani, M.C., Capaccioli, S., Nicolin, A., 2003. Post transcriptional
585 regulation of gene expression by degradation of messenger RNAs. J. Cell.
586 Physiol. 195, 356-372.

587 Bisazza, A., 1993. Male competition, female mate choice and sexual size
588 dimorphism in Poeciliidae fishes. Mar. Behav. Physiol. 23, 257-286.

589 Bonacci, S., Iacocca, A., Fossi, S., Lancini, L., Caruso, T., Corsi, I., Focardi, S.,
590 2007. Biomonitoring aquatic environmental quality in a marine protected
591 area: a biomarker approach. Ambio. 36, 308-315.

592 Brasil. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução n° 357 23 de Janeiro 2005.
593 Disponível em: <www.mma.gov.br/port/conama>. Acesso em: 8 out. 2014.

594 Burnett, K.G., Bain, L.J., Baldwin, W.S., Callard, G.V., Cohen, S., Di Giulio, R.T.,
595 Evans, D.H., Gomez-Chiarri, M., Hahn, M.E., Hoover, C.A., Karchner, S.I.,
596 Katoh, F., Maclatchy, D.L., Marshall, W.S., Meyer, J.N., Nacci, D.E.,
597 Oleksiak, M.F., Rees, B.B., Singer, T.D., Stegeman, J.J., Towle, D.W., Van

598 Veld, P.A., Vogelbein, W.K., Whitehead, A., Winn, R.N., Crawford, D.L.,
599 2007. *Fundulus* as the premier teleost model in environmental biology:
600 opportunities for new insights using genomics. *Comp. Biochem. Phys. D.* 2,
601 257-286.

602 Busby, W.F., Ackermann, J.M., Crespi, C.L., 1999. Effect of methanol, ethanol,
603 dimethyl sulfoxide, and acetonitrile on in vitro activities of cDNA-expressed
604 human cytochromes P-450. *D. M. D.* 27, 246-249.

605 Cajaraville, M.P., Bebianno, J.M., Blasco, J., Porte, C., Sarasquete, C., Viarengo, A.,
606 2000. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal
607 environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. *Sci. Total.*
608 *Environ.* 247, 295-311.

609 Calliari, L.J., Guedes, R.M.C., Pereira, P.S., Lélis, R.F. Antiquiera, J.A., Figueiredo,
610 S.A., 2010. Perigos e riscos associados a processos costeiros no litoral sul do
611 Brasil (RS): uma síntese. *Braz. J. Aquat. Sci. Technol.* 2010, 14, 51-63.

612 Chiba, W.A.C., Passerini, M.D., Tundisi, J.G., 2011. Metal contamination in benthic
613 macroinvertebrates in a sub-basin in the southeast of Brazil. *Braz. J. Biol.* 71,
614 391-399.

615 Clark, B.W., Matson, C.W., Jung, D., Di Giulio, R.T., 2010. AHR2 mediates cardiac
616 teratogenesis of polycyclic aromatic hydrocarbons and PCB-126 in Atlantic
617 killifish (*Fundulus heteroclitus*). *Aquat. Toxicol.* 99, 232-240.

618 Contardo-Jara, V., Galanti, L.N., Amé, M.V., Monferrán, M.V., Wunderlin, D.A.,
619 Wiegand, C., 2009, Biotransformation and antioxidant enzymes of
620 *Limnoperna fortunei* detect site impact in watercourses of Córdoba,
621 Argentina. *Ecotox. Environ. Safe.* 72, 1871-1880.

622 Craft, D.L., Madduri, K.M., Eshoo, M., Wilson, R., 2003. Identification and
623 characterization of the CYP52 family of *Candida tropicalis* ATCC 20336,
624 important for the conversion of fatty acids and alkanes to α, ω -dicarboxylic
625 acids. *Appl. Environ. Micro.* 69, 5983-5991.

626 Dong, W., Teraoka, H., Tsujimoto, Y., Stegeman, J.J., Hiraga, T., 2004. Role of aryl
627 hydrocarbon receptor in mesencephalic circulation failure and apoptosis in
628 zebrafish embryos exposed to 2,3,5,8-tetrachlorodibenzo-*p*dioxin. *J. Toxicol.*
629 *Sci.* 77, 231-240.

630 Doering, J.A., Farmahin, R., Wilseman, S., Kennedy, S.W., Giesy, J.P., Hecker, M.,
631 2014. Functionality of Aryl Hydrocarbon Receptors (AhR1 and AhR2) of
632 White Sturgeon (*Acipenser transmontanus*) and Implications for the Risk
633 Assessment of Dioxin-like Compounds. *Environ. Sci. Technol.* 48, 8219-
634 8226.

635 Ferreira, R.S., Monserrat, J.M., Ferreira, J.L.R., Kalb, A.C., Stegeman, J., Bainy,
636 A.C.D., Zanette, J., 2012. Biomarkers of Organic Contamination in the South
637 American Fish *Poecilia vivipara* and *Jenynsia multidentata*. *J. Toxicol. Env.*
638 *Heal. A.* 75, 1023-1034.

639 Garcia, M.R., Mirlean, N., Baisch, P.R., Caramão, E.B., 2010. Assessment of
640 polycyclic aromatic hydrocarbon influx and sediment contamination in an
641 urbanized estuary. *Environ. Monit. Assess.* 168, 269-276.

642 Ghedotti, M.J., Weitzman, S.H., 1998. A new species of *Jenynsia*
643 (Cyprinodontiformes: Anablepidae) from Brazil with comments on the
644 composition and taxonomy of the genus. *Nat. Hist. Museum Dep. Syst. Ecol.*
645 179, 1-25.

646 Goksoyr, A., Andersson, T., Buhler, D.R., Stegeman, J.J., Williams, D., Forlin, L.,
647 1991. Immunochemical Cross-Reactivity of Beta-Naphthoflavone-Inducible
648 Cytochrome P450 (P450ia) in Liver-Microsomes from Different Fish Species
649 and Rat. *Fish Physiol. Biochem.* 9, 1-13.

650 Guo, L., Li, Z., 2003. Effects of nitrogen and phosphorus from fish cage-culture on
651 the communities of a shallow lake in middle Yangtze River basin of China.
652 *Aquaculture.* 226, 201-212.

653 Guyón, N.F, Bistoni, M.A., Wunderlin, D.A., Amé, M.V., 2012. Inhibition of the
654 brain cytochrome P450 aromatase isoform expression in *Jenynsia*
655 *multidentata* reflects changes in water quality. *J. Braz. Soc. Ecotoxicol.* 7, 97-
656 104.

657 Honkakoski, P., Negishi, M., 2000, Regulation of cytochrome P450 (CYP) genes by
658 nuclear receptors. *Biochem. J.* 347, 321-337.

659 Hued, A.C., Bistoni, M.A., 2005. Development and validation of a biotic index for
660 evaluation of environmental quality in the central region of Argentina.
661 *Hydrobiologia* 543, 279-298.

662 Jönsson, M.E., Orrego, R., Woodin, B.R., Goldstone, J.V., Stegeman, J.J., 2007.
663 Basal and 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl-induced expression of cytochrome
664 P450 1A, 1B and 1C genes in zebrafish. *Toxicol. Appl. Pharm.* 221, 29-41.

665 Kim, J.H., Raisuddin, S., Ki, J.S., Lee, J.S., Han., K.N., 2008. Molecular cloning and
666 β -naphthoflavone-induced expression of a cytochrome P450 1A (*CYP1A*)
667 gene from an anadromous river pufferfish, *Takifugu obscurus*. *Mar. Pollut.*
668 *Bull.* 57, 433-440.

669 Kirby, M.F., Smith, A.J., Rooke, J., Neall, P., Scott, A.P., Katsiadaki, I., 2007.
670 Ethoxyresorufin-*O*-deethylase (EROD) and villogenin (VGT) in flounder

671 (*Platichthys flesus*): System interaction, crosstalk and implications for
672 monitoring. *Aquat. Toxicol.* 81, 233-244.

673 Ladson, A.R., White, L.J., Doolan, J.A.; Tilleard, J.L., 1999. Development and
674 testing of an Index of Stream Condition for waterway management in
675 Australia. *Freshwater Biol.* 41, 453-468.

676 Lévêque, C., Balian, E.V., Martens, K., 2005. An assessment of animal species
677 diversity in continental waters. *Hydrobiologia* 542, 39-67.

678 Li, X., Li, P., Wang, D., Wang, Y., 2014. Assessment of temporal and spatial
679 variations in water quality using multivariate statistical methods: a case study
680 of the Xin'anjiang River, China. *Front. Environ. Sci.* 8, 1-10.

681 Loughery, J.R., Arciszewski, T.J., Kidd, K.A., Mercer, A., Hewitt, L.M., MacLatchy,
682 D.L., Munkittrick, K.R., 2014. Understanding the Chronic Impacts of Oil
683 Refinery Wastewater Requires Consideration of Sediment Contributions to
684 Toxicity. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 66, 19-31.

685 Lucinda, P.H.F., 2008. Systematics and biogeography of the genus *Phalloceros*
686 Eigenmann, 1907 (Cyprinodontiformes: Poeciliidae: Poeciliinae), with the
687 description of twenty-one new species. *Neotrop. Ichthyol.* 6, 113-158.

688 Luz, L.P., Filho, P.J.S., Sousa, E.E.H., Kerstner, T., Caramão, E.B., 2010. Evaluation
689 of surface sediment contamination by polycyclic aromatic hydrocarbons in
690 colony Z3 - (Patos Lagoon, Brazil). *Microchem. J.* 96, 161-166.

691 Macdonald, R.W., Harner, T.T, Fyfe, J., 2005. Recent climate change in the Arctic
692 and its impact on contaminant pathways and interpretation of temporal trend
693 data. *Sci. Total. Environ.* 34, 5-86.

694 Machado, A.A.S., Hoff, M.L.M., Klein, R.D., Cardozo, J.G., Giacomini, M.M.,
695 Pinho, G.L.L., Bianchini, A., 2013. Biomarkers of waterborne copper

696 exposure in the guppy *Poecilia vivipara* acclimated to salt water. *Aquat.*
697 *Toxicol.* 138-139, 60-69.

698 Mackereth, F. J., Talling, J. F., 1978. *Water Analysis: Some Revised Methods for*
699 *Limnologist.* Freshwater Biological Association, Cumbria. 120p.

700 Mai, A.C.G., Garcia, A.M., Vieira, J.P., 2005. Influência da salinidade no
701 crescimento de juvenis do barrigudinho *Jenynsia multidentata* Jenyns, 1842.
702 *Rev. Bras. Zool.* 22, 780-783.

703 Matzke, M.A., Birchler, J.A., 2005. RNAi-mediated pathways in the nucleus. *Nat.*
704 *Rev. Genet.* 6, 24-35.

705 Medeiros, P.M., Bicego, M.C., Castelão, R.M., Rosso, C.D., Fillmann, G., Zamboni,
706 A.J., 2005. Natural and anthropogenic hydrocarbon inputs to sediments of
707 Patos Lagoon Estuary, Brazil. *Environ. Int.* 31, 77-87.

708 Meyer, J.N., Wassenberg, D.M., Karchner, S.I., Hahn, M.E., Di Giulio, R.T., 2003.
709 Expression and inducibility of aryl hydrocarbon receptor pathway genes in
710 wild-caught killifish (*Fundulus heteroclitus*) with different contaminant-
711 exposure histories. *Environ. Toxicol. Chem.* 22, 2337-2343.

712 Mirlean, N., Casartelli, M.R., Garcia, M.R.D., 2002. Propagação da poluição
713 atmosférica por flúor nas águas subterrâneas e solos de regiões próximas às
714 indústrias de fertilizantes (Rio Grande, RS). *Quim. Nova* 25, 191-195.

715 Mirlean, N., Andrus, V. E., Baish, P., Griep, G., Casartelli, M.R., 2003. Arsenic
716 pollution in Patos Lagoon estuarine sediments, Brazil. *Mar. Pollut. Bull.* 46,
717 1480-1484.

718 Monserrat, J.M., Geracitano, L.A., Bianchini, A., 2003. Current and future
719 perspectives using biomarkers to assess pollution in aquatic ecosystems.
720 *Comments Toxicol.* 9, 255-269.

- 721 Nacci, D.E., Champlin, D., Jayaraman, S., 2010. Adaptation of the estuarine fish
722 *Fundulus heteroclitus* (Atlantic killifish) to polychlorinated biphenyls
723 (PCBs). *Estuar. Coast.* 33, 853-864.
- 724 Netto, A.D.P., Moreira, J.C., Dias, A.E.X.O., Arbilla, G., Ferreira, L.F.V., Oliveira,
725 A.S.,Barek, J., 2000. Avaliação da contaminação humana por hidrocarbonetos
726 policíclicos aromáticos (HPAs) e seus derivados nitrados (NHPAs): uma
727 revisão metodológica. *Quim. Nova* 23, 765-773.
- 728 Niencheski, L.F.H, Windom H.L., 1994. Nutrient flux and budget in Patos Lagoon
729 estuary. *Sci. Total. Environ.* 149, 53-60.
- 730 Niencheski, L.F.H, Baumgarten, M.G.Z., Cabrera, L., Juliano, S. K., 2006. Patos
731 Lagoon: Indicators of Organic Pollution. *J. Coastal. Res. Special Issue* 39,
732 1356-1359.
- 733 Niencheski, L.F.H, Baumgarten, M.G. Z., 2010. Water Quality in Mangueira Bay:
734 Anthropic and Natural Contamination. *J. Coastal. Res.*, 10047, p. 56-62.
- 735 Ogino, Y., Katoh, H., Yamada, G., 2004. Androgen dependent development of a
736 modified anal fin, gonopodium, as a model to understand the mechanism of
737 secondary sexual character expression in vertebrates. *FEBS Letters.* 575, 119-
738 126.
- 739 Oleksiak, M.F., 2008. Changes in gene expression due to chronic exposure to
740 environmental pollutants. *Aquat. Toxicol.* 90, 161-171.
- 741 Oziolor, E.M., Bigorgne, E., Aguilar, L., Usenko, S., Matson, C.W., 2014. Evolved
742 resistance to PCB- and PAH-induced cardiac teratogenesis, and reduced
743 CYP1A activity in Gulf killifish (*Fundulus grandis*) populations from the
744 Houston Ship Channel, Texas. *Aquat. Toxicol.* 150, 210-219.

745 Parente, T.E., Oliveira, A.C., Silva, I.B., Araujo, F.G., Paumgarten, F.J., 2004.
746 Induced alkoxyresorufin-*O*-dealkylases in tilapias (*Oreochromis niloticus*)
747 from Gandu River, Rio de Janeiro, Brazil. *Chemosphere*. 54, 1613-1618.

748 Rahayu, D.A., Listyorini, D., Ibrohim., 2013. Morphological Study to Improve
749 Identification Toward Poeciliidae Family Based on Gonopodium Structures
750 and Morphometric Analysis. *J. Tropical Life Sci.* 3, 91-95.

751 Rola, R.C., Monteiro, M.C., Reis, S.R.S., Sandrini, J.Z., 2012. Molecular and
752 biochemical biomarkers responses in the mussel *Mytilus edulis* collected
753 from Southern Brazil coast. *Mar. Pollut. Bull.* 64, 766-771.

754 Salomão, M.G., Sawaya, P., 1988. Morphology and regeneration of the gonopodium
755 in poecilid fish. *Zool. Anz.* 220, 135-143.

756 Santos, I. R., Costa, R. C., Freitas, U., Fillmann, G., 2008. Influence of Effluents
757 from a Wastewater Treatment Plant on Nutrient Distribution in a Coastal
758 Creek from Southern Brazil. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 51, 153-162.

759 Schmittgen, T.D., Livak, KJ., 2008. Analyzing real-time PCR data by the
760 comparative C-T method. *Nat. Protoc.* 3, 1101-1108.

761 Spengler, A., Wallner-Kersanach, M., Baumgarten, M.G.Z., 2007. Rio Grande
762 municipal dump site impact in estuary of the Patos Lagoon (RS, Brazil). *Acta.*
763 *Limnol. Bras.*, vol.19, p. 197–210.

764 Tagliari, P.R.A., Landazuri H., Reis, E.G., Tagliari, C.R., Asmus, M.L., Sanches-
765 Arcilla, A., 2003. Integrated coastal zone management in the Patos Lagoon
766 estuary: perspectives in context of developing country, *Ocean Coast. Manage.*
767 46, 807–822.

768 Timme-Laragy, A.R., Meyer, J.N., Waterland, R.A., Di Giulio, R.T., 2005. Analysis
769 of CpG methylation in the killifish *CYP1A* promoter. *Comp. Biochem. Phys.*
770 *C.* 141, 406-411.

771 Valderrama, J. C., 1981. The simultaneous analysis of total nitrogen and phosphorus
772 in natural waters. *Mar. Chem.* 10, 109-122.

773 Van Hamme, J.D., Singh, A., Ward, O.P., 2003. Recent advances in petroleum
774 microbiology. *Microbiol. Mol. Biol. R.* 67, 503-549.

775 Ward, J.V., Tockener, K., Schiemer, F., 1999. Biodiversity of foodplain river
776 ecosystems: ecotones and connectivity. *Regul. River.*15, 125-139.

777 Whitehead, A., Triant, D.A., Champlin, D., Nacci, D., 2010. Comparative
778 transcriptomics implicates mechanisms of evolved pollution tolerance in a
779 killifish population. *Mol. Ecol.* 23, 5186-203.

780 Wills, L.P., Zhu, S., Willett, K.L., Di Giulio, R.T., 2009. Effect of *CYP1A* inhibition
781 on the biotransformation of benzo[a]pyrene in two populations of *Fundulus*
782 *heteroclitus* with different exposure histories. *Aquat. Toxicol.* 92, 195-201.

783 Wills, L.P., Matson, C.W., Landon, C.D., Di Giulio, R.T., 2010. Characterization of
784 the recalcitrant CYP1 phenotype found in Atlantic killifish (*Fundulus*
785 *heteroclitus*) inhabiting a Superfund site on the Elizabeth River, VA. *Aquat.*
786 *Toxicol.* 99, 33-41.

787 Williams, L.M., Oleksiak, M.F., 2011. Ecologically and Evolutionarily Important
788 SNPs Identified in Natural Populations. *Mol. Biol. Evol.* 28, 1817-1826.

789 Wirgin, I., Waldman, J.R., 2004. Resistance to contaminants in North American fish
790 populations. *Mutat. Res.* 552, 73-100.

791 Wirgin, I., Roy, N.K., Loftus, M., Chambers, R.C., Franks, D.G., Hahn, M.E., 2011.
792 Mechanistic basis of resistance to PCBs in Atlantic tomcod from the Hudson
793 River. *Science*. 331, 1322-1324.

794 Wolff, L.L., Ericsson, R. H., Viana D., Zaleski, T., Donatti, L., 2007. Population
795 Structure of *Phalloceros caudimaculatus* (Hensel, 1868)
796 (Cyprinodontiformes, Poeciliidae) Collected in a Brook in Guarapuava, PR.
797 *Braz. Arch. Biol. and Techn.* 50, 417-423.

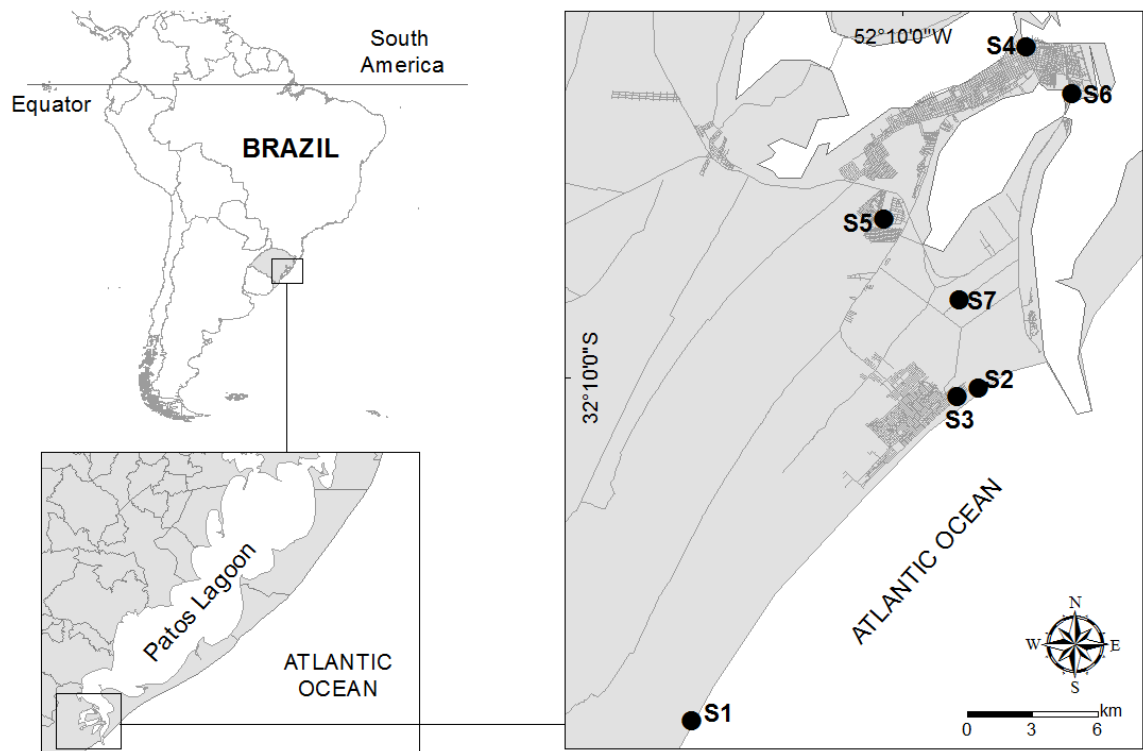
798 Zanette, J., Jenny, M.J., Goldstone, J.V., Woodin, B.R., Watka, L., Bainy, A.C.D.,
799 Stegeman, J.J., 2009. New cytochrome P450 1B1, 1C2 and 1D1 genes in the
800 killifish *Fundulus heteroclitus*: basal expression and response of five killifish
801 CYP1s to the AHR agonist PCB126. *Aquat.Toxicol.* 93, 234-243.

802 Zanette, J., 2013. Genes and proteins related with biotransformation in tropical
803 fishes. *Perspectives in aquatic toxicology*, in Almeida, E. A. and Ribeiro, A.
804 O. (Eds.), *Pollution and fish health in tropical ecosystems*. E- Publishing Inc.,
805 Boca Raton, pp. 16-34.

806
807
808
809
810
811
812
813
814
815
816

817 **Figures article**

818

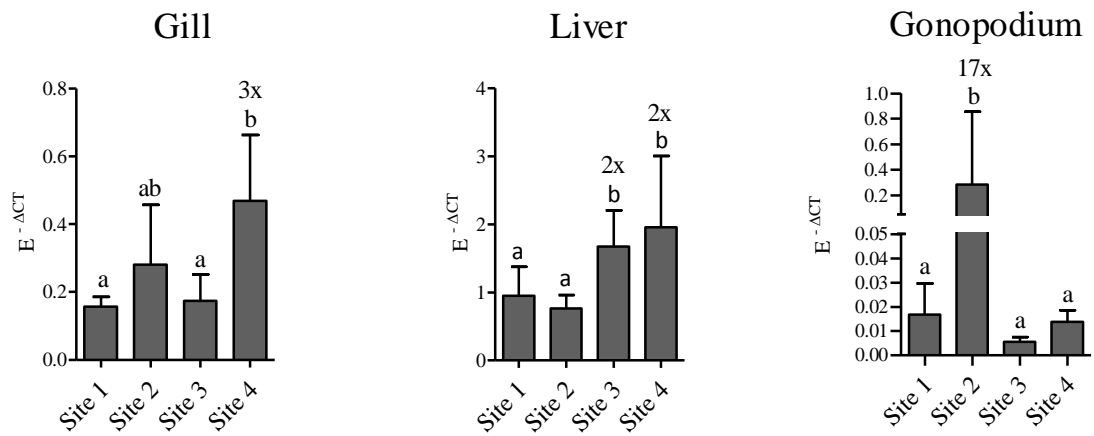


819

820

821 **Fig. 1.** Sampling sites of *Jenynsia multidentata* (S1, S2, S3 and S4) and *Phalloceros*
822 *caudimaculatus* (S5, S6 and S7) in the city of Rio Grande, in the Estuary of Patos
823 Lagoon, RS, Brazil. The shaded area in the right panel corresponds to the urbanized
824 region of the city.

825



826

827

828 **Fig.2.** *CYP1A* transcript levels in gill, liver and gonopodium of *Jenynsia*
 829 *multidentata* sampled at four sites in the city of Rio Grande, in the Estuary of Patos
 830 Lagoon, RS, Brazil. Equal letters over the bars indicate significant similar groups,
 831 and numbers indicate fold induction compared with the Site 1 (S1), the less
 832 urbanized area. Significant differences were observed between groups using one-way
 833 ANOVA, followed by Tukey-HSD ($p < 0.05$).

834

835

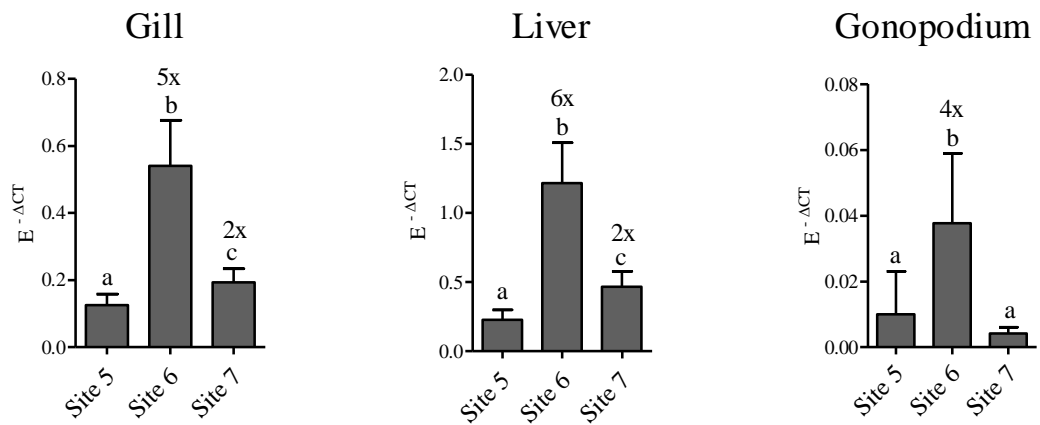
836

837

838

839

840



841

842

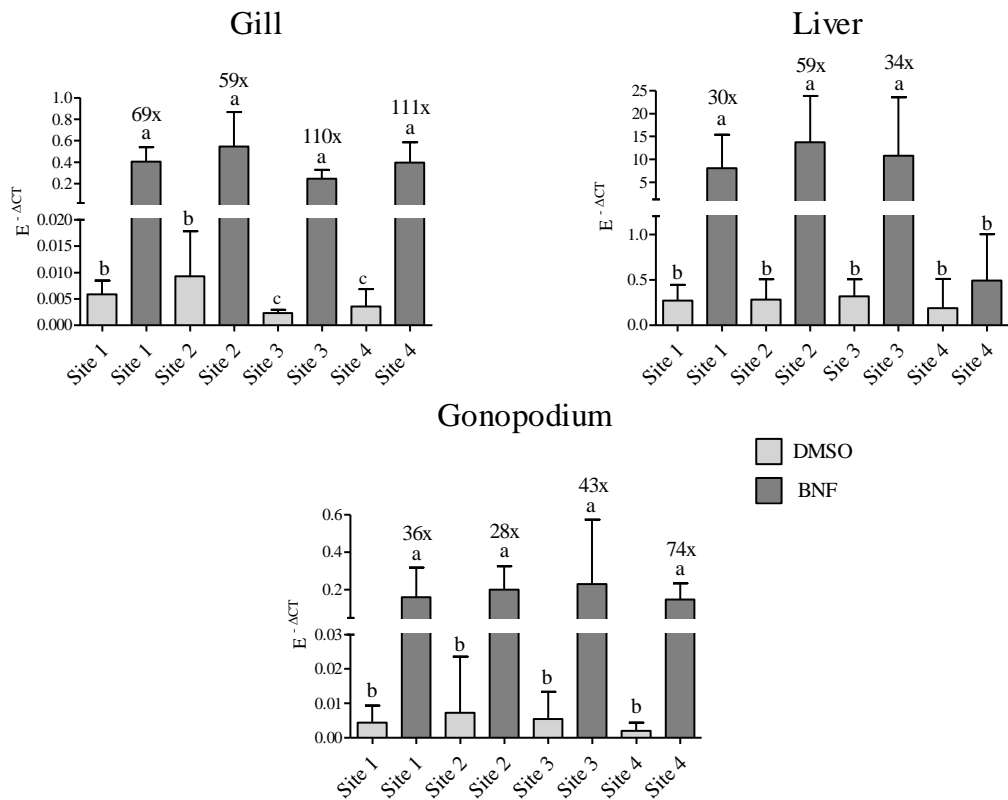
843 **Fig.3.** *CYP1A* transcript levels in gill, liver and gonopodium of *Phalloceros*
 844 *caudimaculatus* sampled at three locations in the city of Rio Grande, in the Estuary
 845 of Patos Lagoon, RS, Brazil. Same letters over the bars indicate similar means, and
 846 the numbers indicate fold induction compared with Site 5 (S5), the most distant from
 847 the petrochemical complex. Significant differences were observed between groups
 848 using one-way ANOVA followed by Tukey's HSD test ($p < 0.05$).

849

850

851

852



853

854

855 **Fig. 4.** *CYP1A* transcriptional levels in gill, liver and gonopodium of *Jenynsia* after
 856 24 h waterborne exposure to 1 μ M BNF (dark bars) and control (DMSO; gray bars).
 857 The *CYP1A* induction to BNF was evaluated in four different fish populations,
 858 sampled in four sites of the city of Rio Grande, in the Estuary of Patos Lagoon, RS,
 859 Brazil. Same letters over the bars indicate similar groups and the numbers represent
 860 fold induction of exposed groups compared to their respective controls (ANOVA,
 861 Tukey-HSD, $p < 0.05$).

862

863

864

865

866

867

868

869 **Tables article**

870

871 **Table 1.** Characteristics and location of the sampling sites of *Jenynsia multidentata*
872 and *Phalloceros caudimaculatus* in the city of Rio Grande, in the Estuary of Patos
873 Lagoon, RS, Brazil.

Collection site	Characteristics	Geographic coordinates
Site 1 (S1)	Washout ~ 22 km away from the urban area of Cassino Beach.	32°33'32.48"S, 52°23'54.59"W
Site 2 (S2)	Washout ~ 1 km away from the urban area of Cassino Beach.	32°10'30.81"S, 52°08'22.77"W
Site 3 (S3)	Washout located in the urban area of Cassino Beach.	32°10'47.91"S, 52°08'52.00"W
Site 4 (S4)	Artificial channel located in the Rio Grande downtown.	32°01'49.35"S, 52°06'31.15"W
Site 5 (S5)	Arroyo distant ~ 15 km from the petrochemical pole.	32°06'17.50"S, 52°10'52.60"W
Site 6 (S6)	Channel located in the petrochemical pole.	32°02'56.48"S, 52°05'06.98"W
Site 7 (S7)	Channel ~ 11 km away from the petrochemical pole.	32°08'03.56"S, 52°08'12.62"W

874

875

876 **Table 2.** Temperature, pH, salinity, dissolved oxygen, total phosphorus and total
877 nitrogen in the four *Jenynsia multidentata* sampling sites. Values are the means and
878 standard deviations of each parameter evaluated respectively. Different letters
879 indicate significant difference between the locations determined by one-way
880 ANOVA and Fischer LSD test ($p < 0.05$).

881

Parameter	Site 1	Site 2	Site 3	Site 4
Temperature (°C)	16.41 ± 0.61 ^a	17.44 ± 0.35 ^b	17.65 ± 0.12 ^b	19.75 ± 0.04 ^c
pH	6.49 ± 1.09 ^a	6.86 ± 0.70 ^a	6.77 ± 0.21 ^a	7.18 ± 0.05 ^a
Salinity	0.010 ± 0.010 ^a	1.290 ± 0.560 ^b	0.100 ± 0.030 ^a	0.120 ± 0.020 ^a
Dissolved Oxygen (mg/L)	11.84 ± 2.39 ^a	9.23 ± 1.03 ^a	5.06 ± 3.39 ^b	2.65 ± 1.10 ^b
Total Phosphorus (mg/L)	0.15 ± 0.01 ^a	0.09 ± 0.01 ^b	0.27 ± 0.02 ^c	0.65 ± 0.01 ^d
Total Nitrogen (mg/L)	0.26 ± 0.09 ^a	1.09 ± 0.02 ^a	1.19 ± 1.11 ^a	7.41 ± 0.57 ^b

882

883

884

885

886 **Table 3.** Results obtained for temperature, pH, salinity and dissolved oxygen, three
 887 *Phalloceros caudimaculatus* sampling sites. The values correspond to averages and
 888 standard deviations of each parameter evaluated, different letters indicate significant
 889 differences between sites, determined by one-way ANOVA test and Fischer-LSD (p
 890 < 0.05).

Parameter	Site 5	Site 6	Site 7
Temperature (°C)	14.20 ± 2.30 ^a	13.20 ± 0.30 ^{ab}	11.70 ± 0.60 ^b
pH	5.70 ± 0.20 ^a	6.60 ± 0.10 ^a	6.30 ± 1.50 ^a
Salinity	0.010 ± 0.010 ^a	0.030 ± 0.010 ^b	0.008 ± 0.010 ^a
Dissolved Oxygen (mg/L)	7.50 ± 2.80 ^a	2.90 ± 3.30 ^b	6.90 ± 2.20 ^a

891
892

893 **Table 4.** Forward (F) and reverse (R) primers to *β-actin* and *CYP1A* used in qPCR
 894 analysis for *Jenynsia multidentata* (Jm) and *Phalloceros caudimaculatus* (Pc).

Primer name	Sequence (5'-3')	Comment
Jm_CYP1A_qPCR_F	CATGGGCAGTGATGTACCTTGTGG	<i>CYP1A</i>
Jm_CYP1A_qPCR_R	GGAGTTCGATCCAGACCAATTTGC	<i>CYP1A</i>
Jm_β-Actin_qPCR_F	AAAGCCAACAGGGAGAAGATGAC	<i>β-Actin</i>
Jm_β-Actin_qPCR_R	GCCTGGATGGCAACGTACA	<i>β-Actin</i>
Pc_CYP1A_qPCR_F	GAGGACCGGAAGCTGGATGAGAA	<i>CYP1A</i>
Pc_CYP1A_qPCR_R	GCCCATGACAAACCAGTAGAGATGG	<i>CYP1A</i>
Pc_β-Actin_qPCR_R	ATGTACGTTGCCATCCAGGCCGT	<i>β-Actin</i>
Pc_β-Actin_qPCR_F	ACCATCACCGGAGTCCATGACGA	<i>β-Actin</i>

895