

O HERBICIDA ROUDUP® COMO POTENCIALIZADOR DA RESPOSTA DE ESTRESSE EM JUVENIS DE *Rhamdia quelen* (QUOY & GAIMARD, 1824)

YURI DORNELLES ZEBRAL¹; BRUNA DE CASTRO KNOPP²; BRUNA ZAFALON DA SILVA³; LUIZE REAL LANSINI⁴; RICARDO BERTEAUX ROBALDO⁵

¹ Universidade Federal de Pelotas – yurizebral@hotmail.com

² Universidade Federal de Pelotas – brunaknopp@hotmail.com

³ Universidade Federal de Pelotas – brunazs@gmail.com

⁴ Universidade Federal de Pelotas - lrl09@hotmail.com

⁵ Universidade Federal de Pelotas – ricardo_robaldoufpef.br

1. INTRODUÇÃO

A resposta fisiológica de estresse é regulada pelo eixo hipotálamo-hipófise-interrenais (HHI) e sua ativação culmina na liberação de glicocorticoides na corrente sanguínea. Este grupo de hormônios é responsável por modular ajustes metabólicos e iônicos necessários para se lidar com desafios ambientais, dessa forma, alterações no funcionamento deste eixo podem diminuir o *fitness* das espécies (CERICATO et al., 2008). O perfil leucocitário e a razão ente neutrófilos:linfócitos (N:L) são alterados em resposta à liberação de glicocorticoides, portanto, podem ser utilizados como marcadores de estresse confiáveis. Aumentos na razão N:L estão correlacionados à elevações nas concentrações plasmáticas de corticosteroides (DAVIS et al. 2008).

No Rio Grande do Sul, as práticas de monoculturas, como o arroz, promovem a descaracterização e degradação do ambiente aquático. Parte desses impactos está relacionada com a utilização de agrotóxicos que podem poluir corpos d'água adjacentes às plantações. Dentre estes compostos, o herbicida Roundup® (RD) é um dos mais populares (SALBEGO et al., 2010). Este composto possui ação não seletiva e contém glifosato (N-fosfometil glicina) como seu princípio ativo (JIRAUNGKOORSKUL et al., 2002).

A ação do glifosato sobre a fisiologia de vertebrados está relacionada à desregulação das vias de esteroidogênese. Este composto inibe a transcrição da proteína de esteroidogênese rápida (proteína stAR), responsável pelo transporte de moléculas de colesterol de fora para dentro da membrana mitocondrial. Dessa forma, a produção de hormônios esteróides é diminuída (WALSH et al., 2000). Sendo assim, o glifosato pode alterar diversos processos fisiológicos que são modulados por tais hormônios, como a resposta fisiológica de estresse (SOSO et al., 2007; CERICATO et al., 2008). Além de alterações nas vias esteroidogênicas, o RD pode causar também aumento no estresse oxidativo pela ação de diversos surfactantes presentes em sua formulação. Estes compostos inibem a ação de enzimas antioxidantes, dessa forma, potencializam danos causados por espécies reativas de oxigênio em estruturas celulares e diversos tecidos (GLUSCZAK et al., 2007). O processo de estresse oxidativo também vem sendo relacionado com a ativação do eixo HHI por diversos trabalhos (DORVAL et al., 2003; MILLER et al., 2007).

O jundiá *Rhamdia quelen* (QUOY & GAIMARD 1824) é uma espécie nativa do RS e possui grande relevância para a aquicultura no estado. Esta espécie representa também um importante modelo para estudos toxicológicos (SOSO et al., 2007) e sobre estresse (CERICATO et al., 2008).

Dentro do contexto apresentado, tivemos por objetivo testar o sinergismo entre exposição aguda ao RD em baixa concentração e a resposta fisiológica de estresse, utilizando juvenis de *R. quelen* como modelo experimental.

2. METODOLOGIA

Animais experimentais

Foram utilizados 24 juvenis de *R. quelen* ($1,40 \pm 0,46$ g; $5,76 \pm 0,68$ cm), todos com a mesma idade e criados sob mesmas condições. Os animais foram obtidos junto ao Laboratório de Piscicultura da Barragem do Chasqueiro e os experimentos realizados no Laboratório de Fisiologia Aplicada a Aquicultura, na UFPel. Os alevinos não foram alimentados durante o experimento.

Tratamentos

Foram utilizados dois tratamentos, um controle (n=12) com juvenis que não passaram por exposição e um segundo tratamento (n=12) no qual os animais foram expostos durante 96h à concentração nominal de 10% da LC50_{96h} de Roundup Transorb R® (0,73 mg/l) descrito para *R. quelen* adulto (CERICATO et al., 2008). Ambos os tratamentos foram divididos em repetições que continham 3 juvenis. Ambos os tratamentos possuíam 4 repetições.

Design experimental

Após o período de exposição ao RD, os animais foram expostos ao ar por 5 minutos com o intuito de provocar uma resposta de estresse. Após a exposição ao ar, os animais foram postos novamente em seus respectivos tratamentos. Tendo-se passado uma hora, os animais foram crio-anestesiados e sacrificados para a coleta de sangue, feita através de secção do pedúnculo caudal. Após a coleta de sangue, os juvenis foram necropsiados para obtenção do fígado, o qual foi pesado. As lâminas de extensão sanguínea foram fixadas com metanol e coradas com giemsa 5%. Por fim, foram quantificados 100 leucócitos por peixe para realização dos perfis leucocitários e razão N:L. As células observadas foram: linfócitos, neutrófilos, célula granulocítica especial, eosinófilos, monócitos e basófilos (DAVIS et al. 2008).

Análise estatística

Os dados que respeitavam as pressuposições da análise de variância (distribuição normal e homogeneidade da variância) foram comparados a partir do teste de ANOVA seguido do teste *Post-hoc* de Tukey e de testes t. Os dados que não possuíam distribuição normal foram analisados a partir do teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste *Post-hoc* de Dunn. Regressões também foram feitas para se obter os índices de correlação de Person. As análises foram processadas com uso dos softwares Statistica 7 e SigmaPlot 11.0 sob o nível de significância de 95% ($p = < 0,05$).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados do perfil leucocitário são apresentados na tabela 1. Encontramos diferenças estatísticas apenas nas seguintes medições: número de linfócitos, o qual apresentou correlação negativa com as concentrações ($r = - 0,60$; $p = < 0,001$); número de neutrófilos, o qual apresentou correlação positiva com os tratamentos (0,63; $p = < 0,001$) e razão N:L, que apresentou correlação positiva com as concentrações ($r = 0,60$; $p = < 0,001$).

Tabela 1 – Perfil leucocitário de juvenis de *Ramdia quelen* expostos por 96h à Roundup® (0,73 mg/l) e grupo controle. Médias em negrito denotam diferença estatística entre os tratamentos (teste t).

Tipos celulares	Controle (Media±DP)	Exposição (Media±DP)
Neutrófilos	24,00±9,91	39,91±10,31
Linfócitos	71,25±10,79	56,08±10,43
Célula granulocítica especial	0,25±0,45	0,41±0,90
Eosinófilos	0,00±0,00	0,16±0,38
Monócitos	4,41±2,81	3,33±2,53
Basófilos	0,08±0,28	0,08±0,28
Razão N:L	0,36±0,20	0,76±0,33

As respostas observadas no perfil de leucócitos são moduladas pela liberação de glicocorticóides, estes hormônios alteram as proporções entre leucócitos por ações sobre a distribuição destas células entre a corrente sanguínea e demais tecidos. Em resposta ao estresse, os linfócitos se ligam às células endoteliais e passam para tecidos como o baço, a pele e nódulos linfáticos. Dessa forma, a quantidade de linfócitos na corrente sanguínea diminui. No caso dos neutrófilos, a ação dos glicocorticóides é contrária, já que estas células migram dos tecidos mencionados para a corrente sanguínea, aumentando a quantidade de neutrófilos circulantes (DAVIS et al. 2008).

As diferenças observadas demonstram que a exposição ao RD induziu à respostas de estresse mais acentuadas. No caso da razão N:L, os animais da exposição exibiram uma resposta duas vezes maior do que a apresentada no controle. De fato, diversos trabalhos demonstram que exposições à baixas concentrações de RD (menores do que 50% da LC50_{96h}) geram respostas de estresse fisiológico (SOSO et al., 2007). Em oposição a isso, exposições mais altas podem inibir a resposta de estresse (CERICATO et al., 2008).

A explicação para o efeito antagônico e dose-dependente do RD sobre a resposta de estresse fisiológico pode ser elucidada pelas ações dos diferentes compostos que constituem este herbicida. O aumento de estresse oxidativo, gerado por seus adjuvantes, pode ser responsável por uma maior ativação do eixo HHL, visto que ambos os processos parecem correlacionar-se (DORVAL et al., 2003; MILLER et al., 2007). Todavia, os efeitos inibitórios do RD sobre a resposta fisiológica de estresse podem ser explicados pelas ações do glifosato como supressor da esteroidogênese (WALSH et al., 2000).

Frente a isso, Cericato e colaboradores injetaram ACTH exógeno em indivíduos de *E. quelen* que haviam passado por exposições ao RD e em animais que não haviam passado por exposição. Ambos os grupos apresentaram respostas semelhantes de esteroidogênese. Dessa forma, é possível que a ação do glifosato não seja apenas sistêmica sobre a produção de hormônios esteroides, mas também a nível central, sobre a relação entre a interpretação de estímulos estressantes e feedbacks entre o hipotálamo e a hipófise (CERICATO et al. 2009).

4. CONCLUSÕES

Independentemente dos mecanismos de ação, nós observamos um aumento na resposta de estresse montada por peixes que haviam passado por exposição ao RD. Dessa forma, concluímos que este herbicida possui capacidade de potencializar os efeitos fisiológicos causados por agentes estressores a juvenis de *R. quelen*, mesmo sobre curtos períodos de exposição e sob baixas concentrações, tidas como ecologicamente relevantes.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- DAVIS, A. K.; MANEY, D. L.; MAERZ, J. C. The use of leukocyte profiles to measure stress in vertebrates: a review for ecologists. **Functional Ecology**, v. 22, p. 760–772, 2008.
- DORVAL, J.; LEBLOND, V.S.; HONTELA, A. Oxidative stress and loss of cortisol secretion in adrenocortical cells of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed in vitro to endosulfan, an organochlorine pesticide. **Aquatic Toxicology** v.63, p.229–241, 2003.
- MILLER, L.L.; WANG, F.; PALACE, V.P.; HONTELA, A. Effects of acute and subchronic exposures to waterborne selenite on the physiological stress response and oxidative stress indicators in juvenile rainbow trout. **Aquatic Toxicology** v. 83, p. 263–271, 2007.
- CERICATO, L.; NETO, J. G.; FAGUNDES, M.; KREUTZ, L. C.; QUEVEDO, R. M.; FINCO, J.; DA ROSA, J. G.; KOAKOSKI, G.; CENTENARO, L.; POTTKER, E.; ANZILIERO, D.; BARCELLOS, L. J. Cortisol response to acute stress in jundia *Rhamdia quelen* acutely exposed to sub-lethal concentrations of agrichemicals. **Comparative Biochemistry and Physiology. Part C**, v. 148, n. 3, p. 281–286, 2008.
- SALBEGO, J., PRETTO, A., GIODA, C. R., DE MENEZES, C. C., LAZZARI, R., RADÜNZ NETO, J., BALDISSEROTTO, B. Herbicide formulation with glyphosate affects growth, acetylcholinesterase activity, and metabolic and hematological parameters in piava (*Leporinus obtusidens*). **Archives of environmental contamination and toxicology**, v. 58, n. 3, 740–745, 2010.
- JIRAUNGKOORSKUL, W.; UPATHAM, E. S.; KRUAETRACHUE, M.; SAHAPHONG, S.; VICHASRI-GRAMS, S.; POKETHITIYOOK P. Histopathological effects of Roundup, a glyphosate herbicide, on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Science Asia**, v. 28, p. 121–127, 2002.
- WALSH, L. P.; MCCORMICK, C.; MARTIN C.; STOCCO D. M. Roundup inhibits steroidogenesis by disrupting steroidogenic acute regulatory (StAR) protein expression. **Environmental health perspectives**, v. 108, n. 8, p. 769–776, 2000.
- SOSO, A. B.; BARCELLOS, L. J. G.; RANZANI-PAIVA, M. J.; KREUTZ L. C.; QUEVEDO R. M.; ANZILIERO, D.; LIMA, M.; SILVA, L. B.; RITTER, F.; BEDIN, A. C.; FINCO, J. A. Chronic exposure to sub-lethal concentration of a glyphosate-based herbicide alters hormone profiles and affects reproduction of female jundia (*Rhamdia quelen*). **Environment Toxicology and Pharmacology**. v. 23, n. 3, p. 308–313, 2007.
- GLUSCZAK, L.; MIRON, D. S.; CRESTANI, M.; FONSECA, M. B.; PEDRON, F. A.; DUARTE, D. F.; VIEIRA, V. L. P. Effect of glyphosate herbicide on acetylcholinesterase activity and metabolic and hematological parameters in piava (*Leporinus obtusidens*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 65, p. 237–241, 2006.