

## ALTERÇÕES NO DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO DE *Odonthestes humensis* APÓS EXPOSIÇÃO AO HERBICIDA ROUNDUP®

BRUNA DE CASTRO KNOPP<sup>1</sup>; BRUNA ZAFALON DA SILVA<sup>2</sup>; LUIZE REAL LANSINI<sup>3</sup>; YURI DORNELLES ZEBRAL<sup>4</sup>; RICARDO BERTEAUX ROBALDO<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal de Pelotas – brunaknopp@hotmail.com

<sup>2</sup> Universidade Federal de Pelotas – brunazs@gmail.com

<sup>3</sup> Universidade Federal de Pelotas - lr109@hotmail.com

<sup>4</sup> Universidade Federal de Pelotas – yurizebral@hotmail.com

<sup>5</sup> Universidade Federal de Pelotas – ricardo\_robaldo@ufpel.tche.br

### 1. INTRODUÇÃO

O *Odonthestes humensis* (BUEN, 1953) é um peixe Sul Americano de água doce pertencente à ordem Atheriniformes, família Atherinopsidae, popularmente conhecido como Peixe-rei. Este peixe-rei tem sido apontado como promissor candidato à aquicultura continental, da mesma forma que outras espécies do gênero introduzidas na piscicultura em países da América Latina (Bolívia e Chile) e Ásia (TSUZUKI et al., 2000). No Japão a espécie congênera *O. bonariensis* possui grande importância comercial devido ao apreço de sua carne na culinária local. *Odonthestes humensis* distribui-se naturalmente no Estado do Rio Grande do Sul, desde o norte, na Lagoa Itapeva, até a região das grandes lagoas na Fronteira Sul, onde existem reservas de água doce, composta pela Lagoa dos Patos, Mirim e Mangueira (GROSMAN, 2002).

A prática de monoculturas como o arroz, a aveia e a soja, é muito importante na economia do Rio Grande do Sul, porém a utilização de agrotóxicos nessas plantações pode poluir as reservas de água doce do estado (SALBEGO, 2010). A produção de peixes no Sul do Brasil é abastecida a partir destas reservas, portanto, os contaminantes provenientes destas plantações podem acabar por interferir na vida destes animais, seja nos cultivos ou mesmo no ambiente.

O Roundup® é um dos agrotóxicos mais utilizados no mundo (SALBEGO, 2010), possui ação não seletiva e atua no controle de plantas daninhas indesejadas nas plantações (WILLIAMS et al., 2000). Este herbicida é composto pelo princípio ativo glifosato e por adjuvantes que o auxiliam a penetrar no tecido vegetal (JIRAUNGKOORSKUL et al., 2002). Estudos mostram que esses componentes possuem ações deletérias sobre a fisiologia de vertebrados. A ação dos adjuvantes está relacionada ao aumento do processo de estresse oxidativo (CAVALCANTE et al., 2008), já o glifosato possui duas ações deletérias comprovadas: como desregulador endócrino devido a inibição da transcrição de proteínas essenciais a esteroidogênese e também aumentando a atividade do ácido retinóico durante o desenvolvimento embrionário e levando a alterações crânio-faciais (PAGANELLI ET al., 2010).

Levando-se em consideração a importância econômica dos estoques pesqueiros de *O. humensis* e seu potencial na aquicultura, bem como a grande quantidade de Roundup® que é lixiviada para os mananciais de água doce do estado, o objetivo do trabalho foi estudar a ação deste herbicida sobre o desenvolvimento embrionário desta espécie a partir da avaliação da morfologia crânio-facial e da pigmentação dos embriões.

## 2. METODOLOGIA

### *Animais experimentais*

Para a realização dos experimentos, foi utilizado um total de 4158 embriões recém fertilizados de *O. humensis* provenientes de reprodutores capturados por pescadores da Lagoa Mangueira.

### *Desenho experimental*

No experimento foram utilizadas 4 tratamentos (1, 5, 10 e 15mg/L Roundup Transorb R<sup>®</sup>) feitos em triplicata e um grupo controle com quatro repetições. Os experimentos foram feitos em recipientes com volume de 4L, aeração constante, temperatura ambiente e fotoperíodo natural. Cada repetição possuía 2g de ovos (aproximadamente 250 embriões). O experimento teve duração de 96h e foram observados 10 embriões de cada repetição (esteriomicroscópio) em três períodos distintos: 48h, 72h e 96h de exposição, sendo observada a fase do desenvolvimento, a taxa de embriões pigmentados ( $n^{\circ}$  de embriões pigmentados/  $n^{\circ}$  de embriões não pigmentados) e medidos o diâmetro do olho (DO) e espaço entre os olhos (EO), respectivamente. Embriões mortos foram retirados diariamente das repetições e ao final do experimento foi calculada a taxa total de mortalidade.

As diluições foram feitas com água de torneira decolorada e sua temperatura ( $22,8 \pm 0,12^{\circ}\text{C}$ ) e pH ( $6,4 \pm 0,17$ ) foram verificados diariamente.

Os experimentos foram realizados na Estação de Piscicultura da Barragem do Chasqueiro (UFPel), durante o mês de setembro de 2013.

### *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. Os dados que não possuíam distribuição normal foram analisados a partir do teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste *Post-hoc* de Dunn. As análises foram feitas com uso dos softwares Statistica 7 e SigmaPlot 11.0, sob o nível de significância de 95% ( $\alpha = 0,05$ ).

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O primeiro caractere que foi observado foi o estágio do desenvolvimento no qual os animais se encontravam depois de 48h de exposição. Os embriões de ambos os tratamentos se encontravam na mesma fase (nêurula). A taxa de embriões pigmentados mostrou correlação negativa em relação às concentrações (correlação de Pearson:  $r = -0,53$ ;  $p = < 0,05$ ) e diferenças estatísticas foram encontradas entre os tratamentos. O único teste *Post-hoc* que poderia ser utilizado para análise pareada dos tratamentos ( $n$  desigual) foi o de Dunn, mas devido a sua robustez não foi possível identificar diferença entre os tratamentos. Tendo-se completado 96h de exposição, foram medidos o DO e o EO. As medidas do DO demonstraram correlação negativa em relação aos tratamentos (correlação de Pearson:  $r = -0,74$ ;  $p = < 0,001$ ) e a resposta as concentrações utilizadas foram todas diferentes a do grupo controle. Diferenças

também foram encontradas entre os tratamentos (1ppm  $\neq$  10ppm; 1ppm  $\neq$  15ppm; 5ppm  $\neq$  15ppm). Da mesma forma, as medidas do EO também demonstraram correlação negativa em relação aos tratamentos (correlação de Pearson:  $r = -0,63$ ;  $p < 0,001$ ) e o efeito das concentrações utilizadas foram diferentes do grupo controle. Diferenças também foram encontradas entre os tratamentos, visto que o tratamento 1ppm diferiu de todas as outras exposições. Por fim, a mortalidade final demonstrou correlação positiva com os tratamentos (correlação de Pearson:  $r = 0,81$ ;  $p < 0,001$ ), mas não foram observadas diferenças entre os grupos controle e exposição.

Os resultados obtidos no trabalho proporcionaram a construção de duas hipóteses possíveis sobre a ação do Roundup<sup>®</sup> na embriogênese, sendo elas: 1) A exposição ao Roundup<sup>®</sup> atrasa o desenvolvimento embrionário; 2) A exposição ao Roundup<sup>®</sup> provoca alterações morfológicas durante a formação do embrião.

A primeira hipótese é sustentada pela interpretação de que as diferenças encontradas nas taxas de pigmentação demonstram atraso no desenvolvimento embrionário. Dessa forma, os embriões expostos apresentaram-se pigmentados mais tardiamente. Seguindo a mesma lógica, as diferenças encontradas nas medidas do DO e no EO, feitas após 96h do início do experimento, demonstram que os embriões expostos ao Roundup<sup>®</sup> possuíam tecidos menos desenvolvidos, evidenciando atraso na organogênese.

A segunda hipótese é sustentada pelas ações já conhecidas do Roundup<sup>®</sup> gerando alterações morfológicas em embriões. Dentro desta hipótese, as diferenças observadas nas taxas de pigmentação podem ser explicadas por danos gerados pelo estresse oxidativo. Este processo pode resultar na morte dos melanócitos ou na destruição do pigmento melanina (KUMAR, et al. 2012) causando pigmentação menos intensa nos embriões. Da mesma forma, as alterações encontradas nas medidas do DO e no EO podem se relacionar com os efeitos do glifosato sobre a produção do ácido retinóico (aumento na produção), o qual atua como importante sinalizador celular para o desenvolvimento embrionário. De fato, a super produção de ácido retinóico já foi relacionada com a diminuição no tamanho do olho e alterações crânio-faciais em vertebrados (PAGANELLI et al. 2010). Portanto, a segunda hipótese baseia-se na interpretação das diferenças observadas no DO e EO como alterações morfológicas do desenvolvimento embrionário e não como resultados de atraso no desenvolvimento, ideia sustentada pela primeira hipótese.

#### 4. CONCLUSÕES

Independentemente das hipóteses construídas para a explicação dos mecanismos de ação do Roundup<sup>®</sup>, conclui-se que este herbicida gera alterações embrionárias de forma concentração-dependente, mesmo em exposições agudas. Porém, é necessário testar as hipóteses levantadas assim como as possíveis implicações que essas alterações podem ter sobre a sobrevivência desses animais.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CAVALCANTE, D. G. S. M.; MARTINEZ, C. B. R.; SOFIA, S. H. Genotoxic effects of Roundup on the fish *Prochilodus lineatus*. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 655, n. 1-2, p. 41-46, 2008.

GROSMAN, F.G. 2002. Fundamentos Biologicos, Economicos y Sociales para una Correcta Gestion del Recurso Pejerrey. Ed. Astyanax, Prov. Bs. As., Argentina. 246p.

JIRAUNGKOORSKUL, W.; UPATHAM, E. S.; KRUATRACHUE, 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.

KUMAR, R.; PARSAD, D. Melanocytorrhagy and apoptosis in vitiligo: Connecting jigsaw pieces. **Indian J Dermatol Venereol Leprol**. V. 78, p.19-23, 2012.

PAGANELLI, A.; GNAZZO, V.; ACOSTA, H.; LÓPEZ, S. L.; CARRASCO, A. E. Glyphosate-Based Herbicides Produce Teratogenic Effects on Vertebrates by Impairing Retinoic Acid Signaling. **Chemical research in toxicology**, v. 23, n. 10, p. 1586–1595, 2010.

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.

TUSUZUKI, M. Y.; AIKAWAI, H.; STRUSSMAN, C. A.; TAKASHIMAO, F. Comparative survival and growth of embryos\ larvae\ and juveniles of pejerrey *Odontesthes bonariensis* and *O. hatcheri* at different salinities. **Journal Applied Ichthyology**, n. 16, p. 126-130, 2000.

WILLIAMS, G. M.; KROES, R.; MUNRO, I. C. Safety evaluation and risk assessment of the herbicide Roundup and its active ingredient, glyphosate, for humans. **Regulatory Toxicology Pharmacology**, v. 31, p. 117–165, 2000.