

ANÁLISE DOS EFEITOS REPRODUTIVOS E EPIGENÉTICOS DO HERBICIDA ROUNDUP® NO PEIXE-ANUAL *Austrolebias charrua*: UNINDO GENÔMICA E BIOMONITORAMENTO

ANTÔNIO DUARTE PAGANO¹; TONY LEANDRO REZENDE DA SILVEIRA²;
MARIANA HÄRTER REMIÃO³; VINICIUS FARIAS CAMPOS⁴

¹Universidade Federal de Pelotas – antonioduartepagano@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – silveira.tlr@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – mariana.remiao@ufpel.edu.br

⁴Universidade Federal de Pelotas – fariascampos@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A poluição química é uma das principais causas da perda de biodiversidade e de serviços ecossistêmicos, afetando diretamente a saúde ambiental. Entre os países com maior biodiversidade do planeta, o Brasil destaca-se, mas enfrenta desafios crescentes relacionados ao uso extensivo de pesticidas, especialmente os herbicidas à base de glifosato (GBHs). O glifosato [(N-fosfonometil) glicina] é o pesticida mais amplamente utilizado no mundo, crucial para o controle de ervas daninhas na agricultura. Entre os GBHs, o Roundup Transorb® (RDT) destaca-se por sua eficácia biológica, devido à presença do surfactante polioxietileno amina (POEA), que aumenta a penetração nos tecidos vegetais (MESNAGE et al., 2019).

No entanto, apesar de o glifosato ter como alvo uma enzima específica das plantas, sua utilização contínua e intensiva em plantações de culturas geneticamente modificadas resistentes ao glifosato levanta preocupações quanto aos impactos na qualidade da água e nos ecossistemas. O Brasil, um dos maiores produtores agrícolas do mundo, consome quantidades massivas de GBHs, com 219 mil toneladas de glifosato vendidas em 2021 (IBAMA, 2023). O uso desenfreado de pesticidas, com 474 novos produtos aprovados em 2019 (DE ARAUJO et al., 2023), contribui para a contaminação de ambientes aquáticos e ameaça a biodiversidade, incluindo espécies de peixes nativos.

Os peixes anuais, como o *Austrolebias charrua*, são particularmente vulneráveis. Essas espécies possuem adaptações únicas de reprodução, como embriões tolerantes à seca e ciclos reprodutivos rápidos, mas dependem de ambientes temporários e estão expostas a altos níveis de contaminação em áreas agrícolas (VOLCAN; LANÉS, 2018). O *A. charrua* encontra-se criticamente ameaçado e habita regiões fortemente impactadas pelo uso de RDT, o que agrava sua vulnerabilidade.

Estudos indicam que o Roundup pode ser mais prejudicial aos peixes do que o glifosato puro, devido à presença do POEA. Esse herbicida causa estresse oxidativo, alterações comportamentais, genotoxicidade e danos reprodutivos em várias espécies de peixes. O impacto reprodutivo inclui a desregulação endócrina, diminuição da fertilidade e alterações histológicas nos tecidos gonadais, afetando diretamente a aptidão das espécies e contribuindo para a perda de biodiversidade (GROH et al., 2022).

Diante desses desafios, biomarcadores moleculares, como os microRNAs (miRNAs), emergem como ferramentas promissoras para a detecção precoce de danos ambientais. Os miRNAs são pequenas moléculas de RNA não codificantes que regulam a expressão gênica e têm sido usados como biomarcadores

epigenéticos na ecotoxicologia aquática (GEBERT; MACRAE, 2019). Sua capacidade de controlar processos celulares importantes torna-os essenciais para avaliar respostas ao estresse ambiental, imunidade e reprodução em peixes (RAZA et al., 2022).

Este estudo teve como objetivo investigar os efeitos da exposição aguda ao RDT em diferentes concentrações sobre os parâmetros reprodutivos do *A. charrua*, utilizando perfis globais de expressão de miRNAs e análises de interação molecular para identificar redes de genes-alvo afetadas.

2. METODOLOGIA

2.1. Coleta dos Animais e Exposição ao RDT

Peixes anuais *A. charrua* ($N = 78$, 30 machos e 48 fêmeas) foram coletados em áreas úmidas temporárias no distrito de Santa Isabel do Sul (Rio Grande, RS). Após a aclimação em laboratório, os animais expostos por 96 h ao herbicida RDT em concentrações de 0.065 mg. L^{-1} e 5 mg. L^{-1} , sendo que as concentrações utilizadas variam conforme o experimento em questão.

2.2. Experimento Reprodutivo: Avaliações Histopatológicas, Taxa de Fertilização e Medição do Diâmetro dos Ovos

Após a aclimação, 54 peixes (18 machos e 36 fêmeas) foram expostos por 96 h ao herbicida RDT em concentrações de $0,065 \text{ mg. L}^{-1}$ e 5 mg. L^{-1} . Durante a exposição, os animais foram separados por uma divisória, permitindo a estimulação química sexual. Em seguida, os peixes permaneceram por mais 96 h em água limpa, onde puderam se reproduzir. Ao final dos 8 dias de experimentação (96 h de exposição ao RDT + 96 h em água limpa), foram realizadas análises de fertilidade, diâmetro dos ovos e coletas de ovários para análises histopatológicas.

2.3. Experimento Epigenômico: Sequenciamento de microRNAs Ovarianos e Análises de Bioinformática

Ao total, 24 animais (12 machos e 12 fêmeas) foram utilizados no experimento epigenômico. O delineamento deste consistiu em 96 horas de exposição ao RDT, sem 96 h em água limpa, para capturar os efeitos epigenéticos imediatos da exposição ao herbicida. O tecido ovariano foi coletado para extração de RNA total, seguido do sequenciamento de miRNAs. As análises de bioinformática envolveram a identificação e quantificação dos microRNAs expressos, com foco na expressão diferencial entre os grupos controle e expostos ao RDT. A seguir, foram realizadas análises para identificar genes alvo associado aos miRNAs diferencialmente expressos, visando explorar potenciais vias moleculares impactadas pela exposição tóxica.

2.4. Análises estatísticas

Os dados foram analisados usando ANOVA e testes de Tukey para comparações entre grupos, e análise bioinformática incluiu DESeq2 para expressão diferencial de miRNAs, com significância definida por $p < 0.05$ e $FDR < 0.05$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A exposição ao RDT causou alterações significativas na reprodução dos peixes anuais, evidenciadas pelo aumento do diâmetro dos oócitos e pela diminuição da fertilidade, indicando um efeito direto do pesticida sobre a capacidade reprodutiva da espécie *A. charrua*. Este achado sugere que a toxicidade do RDT pode comprometer a sobrevivência populacional, uma vez que a reprodução é um fator crítico para a manutenção das espécies, especialmente em peixes anuais, que têm ciclos de vida curtos e altamente dependentes de eventos reprodutivos bem-sucedidos.

Além disso, o estudo identificou 205 miRNAs ovarianos, dos quais 13 estavam diferencialmente expressos no grupo exposto ao RDT. Entre esses, 10 miRNAs foram downregulated (miR-499-5p, miR-375, miR-205-5p, miR-206-3p, miR-203a-3p, miR133b-3p, miR-203b-5p, miR-184, miR-133a-3p, e miR-2188-5p) e 3 foram upregulated (miR-10b-5p, miR-132-3p e miR-100-5p). A regulação diferencial desses miRNAs é crucial, pois eles desempenham papéis fundamentais em processos como desenvolvimento ovariano, diferenciação celular e resposta a estressores ambientais. A supressão de miRNAs envolvidos na regulação de processos celulares vitais pode comprometer a função ovariana, enquanto a superexpressão de outros pode estar relacionada a mecanismos compensatórios frente à exposição ao pesticida.

As vias moleculares afetadas incluem genes-alvo associados a biossíntese de hormônios esteroides (*sox*, *cyp19a1*, *cyp17a1*, *hsd17b12a*, *pgmrc1*), metabolismo de ácidos graxos (*pik3r3*, *pik3cb*, *g6pd*) e respostas ao estresse oxidativo e bioenergética (*gst*, *oxsr1a*, *pcxa*, *atp2a3*, *atp1a3a*, *atp1a2a*), sugerindo interferência na produção hormonal, metabolismo e função mitocondrial, o que pode levar a disfunção celular e redução da fertilidade.

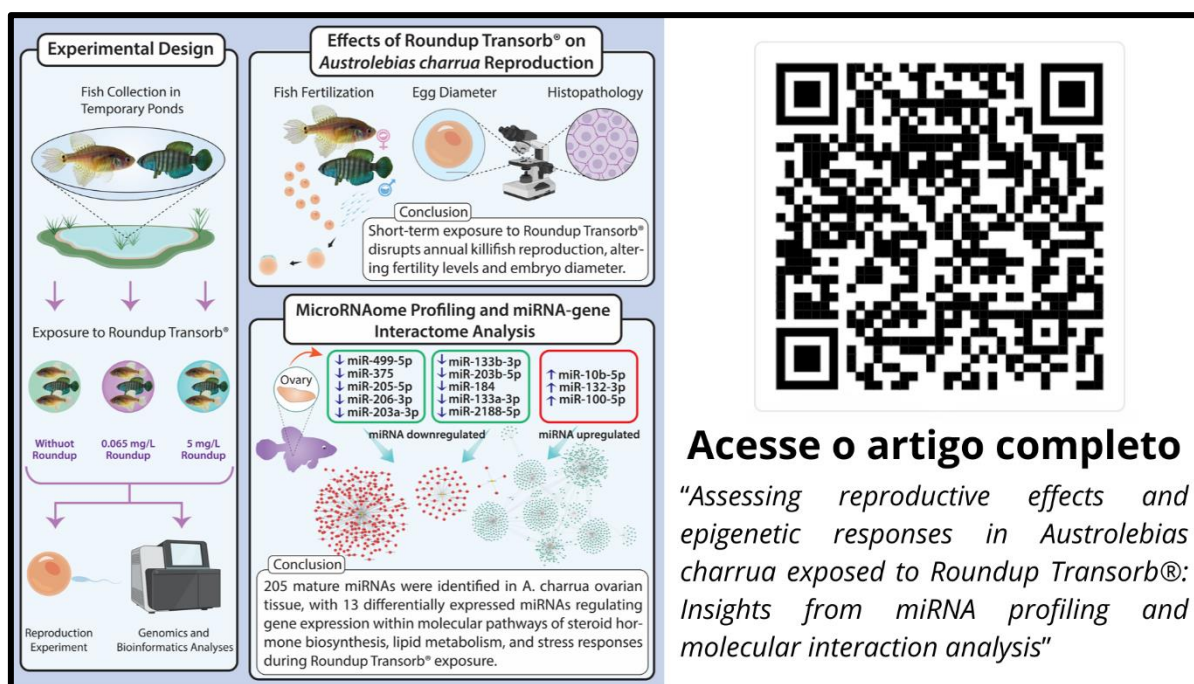


Figura 1. Representação esquemática deste estudo e QR-Code para acessar o artigo publicado na revista *Environmental Toxicology and Pharmacology*

4. CONCLUSÕES

Este estudo traz novas e relevantes descobertas sobre os efeitos da exposição aguda ao RDT no peixe anual *Austrolebias charrua*. A concentração mais alta testada (5 mg. L⁻¹) causou alterações significativas nos parâmetros reprodutivos, incluindo fertilidade, tamanho dos embriões e expressão de miRNAs ovarianos. O estudo avança no entendimento de como os miRNAs regulam a reprodução e a resposta ao estresse químico, fornecendo uma base teórica para o desenvolvimento de novos biomarcadores e melhorias nas estratégias de avaliação da saúde ambiental. Pesquisas futuras devem focar na expressão de miRNAs testiculares em *A. charrua* para expandir o escopo deste trabalho. Como esses peixes dependem de um ciclo de vida curto e de uma reprodução eficaz para garantir sua sobrevivência, qualquer interferência na fertilidade ou no desenvolvimento ovariano pode resultar em consequências catastróficas para suas populações. Dado que a poluição química contribui para a perda de biodiversidade, integrar tecnologias baseadas em miRNAs na ecotoxicologia pode melhorar o monitoramento de respostas ao estresse e mitigar os efeitos da poluição em espécies ameaçadas.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

DE ARAUJO, L.G., ZORDAN, D.F., CELZARD, A., FIERRO, V.M. Glyphosate uses, adverse effects and alternatives: focus on the current scenario in Brazil. **Environ. Geochem. Health.** 45(12), 9559-9582, 2023.

GEBERT, L.F.R., MACRAE, I.J. Regulation of microRNA function in animals. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.** 20(1), 21-37, 2019.

GROH, K., VOM BERG, C., SCHIRMER, K., TILILI, A. Anthropogenic Chemicals As Underestimated Drivers of Biodiversity Loss: Scientific and Societal Implications. **Environ. Sci. Technol.** 56(2), 707-710, 2022.

IBAMA. **Relatórios de Comercialização de Agrotóxicos.** Boletim 2021. Os 10 IAs mais vendidos 2021. Disponível em: <<https://www.gov.br/ibama/pt-br/assuntos/quimicos-e-biologicos/agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos#sobreosrelatorios>>, 2023. Acesso em 23/09/2024

MESNAGE, R., BENBROOK, C., ANTONIOU, M.N. Insight into the confusion over surfactant co-formulants in glyphosate-based herbicides. **Food Chem. Toxicol.** 128, 137-145, 2019.

RAZA, S.H.A., ABDELNOUR, S., ALOTAIBI, M., *et al.* MicroRNAs mediated environmental stress responses and toxicity signs in teleost fish species. **Aquaculture.** 546, 737310, 2022.

VOLCAN, M.V., LANÉS, L.E.K. Brazilian killifishes risk extinction. **Science.** 361(6400), 340–341, 2018.