

## LARVAS DO PEIXE-REI *ODONTESTHES ARGENTINENSIS* EXPOSTAS AO HERBICIDA ROUNDUP, APRESENTAM REDUÇÃO NA EXPRESSÃO DE GENES ASSOCIADOS AO CRESCIMENTO

JULIANA GABRIELA GERI MOREIRA<sup>1</sup>; MAIDANA DA SILVA IDIARTE<sup>1</sup>;  
VINICIUS FARIAS CAMPOS<sup>2</sup>; AMANDA WEEGE<sup>3</sup>; GILSON DE MENDONÇA<sup>4</sup>;  
RICARDO BERTEAUX ROBALDO<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – juliana.gerimoreira@gmail.com

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

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

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas – amandaweege@gmail.com

<sup>4</sup>Universidade Federal de Pelotas – gilsondemendonca@gmail.com

<sup>5</sup>Universidade Federal de Pelotas – ricardorobaldoufpel@gmail.com

### 1. INTRODUÇÃO

Herbicidas à base de glifosato são os agentes não seletivos mais utilizados no mundo, sendo o Brasil um dos países que mais utiliza este produto (BENBROOK, 2016). Em plantas, o glifosato (N-fosfometil glicina) suprime o crescimento vegetal ao atuar na via do Shikimato (HANEY et al., 2002). O seu intenso uso na agricultura por vezes gera contaminações ambientais, afetando espécies que não são o alvo de sua ação (GILL et al., 2018). Apesar de a meia vida do glifosato estar entre 7 a 14 dias (GIESY et al., 2000), no Rio Grande do Sul, esta molécula foi detectada em corpos hídricos de uma área de orizicultura mesmo após 90 da aplicação (MATTOS et al., 2002).

Conhecidos popularmente como “peixe-rei”, os atherinídeos do gênero *Odontesthes* têm ampla distribuição pela América do Sul, possuindo populações dulce-aquícolas, estuarinas e marinhas (PHONLOR & COUSIN, 1997). Segundo HUANTO (2017), as espécies *Odontesthes argentinensis* (Valenciennes, 1835) e *O. bonariensis* (Valenciennes, 1835) destacam-se pelo seu fácil manejo e importância para consumo humano. ZEBRAL et al., (2017) constataram alterações no diâmetro dos olhos e a distância entre os olhos de embriões de *O. humensis* expostos a 0,36 mg/L de glifosato. Além disso, SALBEGO et al., (2010) verificaram efeitos no eixo somatotrófico de peixes, pela exposição ao herbicida. Estes autores também detectaram alterações hematológicas e redução do glicogênio hepático.

O processo de crescimento, é regulado pelo eixo hipotálamo-hipófise, onde o hormônio do crescimento (GH) atua em diversas vias fisiológicas, estimulando a ingestão de alimentos, síntese proteica e lipólise. Nas células, o GH se liga aos seus receptores (GHR-I e GHR-II), desencadeando processos metabólicos para promover o crescimento (BALDISSEROTTO, 2009 p. 156; KAPIT, 2000, p. 118).

Sabe-se que o glifosato altera a expressão de genes em peixes. Segundo FARIA et al. (2021), a exposição ao herbicida alterou a expressão de genes envolvidos no sistema dopaminérgico em *Danio rerio*. Dentre outros efeitos nocivos,,) sabe-se que o glifosato reduz o crescimento de peixes SALBEGO et al. (2010). Porém, as vias fisiológicas para tal resposta ao herbicida não são totalmente compreendidas. Portanto, o objetivo deste trabalho foi verificar se a exposição ao glifosato afeta genes reguladores do crescimento. Para isso, utilizou-se a técnica de qPCR para avaliar a expressão do gene para hormônio do crescimento (*gh*) e receptores do hormônio do crescimento (*ghr1* e *ghr2*).

## 2. METODOLOGIA

Ovos do peixe-rei *Odontesthes argentinensis* foram coletados na zona de varrido da Praia do Cassino (32°11'16"S 52°8'32"W) (CEEA no. 23110.019099/2020-23), incubados no Laboratório de Fisiologia de Animais Aquáticos da UFPel e após a eclosão, aclimatados durante 5 dias. Cada unidade experimental consistiu em um aquário plástico (36L), com temperatura controlada (22°C), aeração constante, fotoperíodo 12:12h, salinidade 10ppm e pH 7,5. O experimento se deu em três tratamentos de exposição 0,36, 1,80 e 3,60mg/L de glifosato<sub>ea</sub> como Roundup Transorb® (RT) e o grupo controle sem adição do herbicida, sendo em triplicatas com 30 larvas por unidade experimental e tempo de exposição de 96h. Neste período, os animais foram alimentados *ad libitum* duas vezes ao dia com náuplios de *Artemia* sp. (4/mL) e ração comercial (NRD 2/3®-INVE Aquaculture). A cada 24h, amostras de água (200mL) foram coletadas para avaliação dos parâmetros de qualidade do meio experimental e dosagem de glifosato. O pH e compostos nitrogenados em forma de amônia, nitrito e nitrato foram avaliados diariamente utilizando kits colorimétricos (LabconTest®).

Ao fim do ensaio, os animais foram individualmente eutanasiados com benzocaína (250ppm). Após, 5 larvas por unidade experimental foram armazenadas individualmente e outras 5 incluídas em pools (1 pool = 5 larvas), em microtubos Eppendorf RNAase free, e congeladas em nitrogênio líquido até o armazenamento em ultrafreezer, para posterior análise molecular que ocorreu através do método de RT qPCR. A análise estatística se deu por ANOVA de uma via seguida por teste post hoc de Tukey usando o software GraphPad Prism 8 (GraphPad software, EUA). Os resultados estão apresentados em médias ± erro padrão, sob nível de significância de 5%.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas primeiras 24h do experimento, 100% dos animais expostos à concentração de 3,6mg/L morreram, e entre os animais expostos à condição de 1,8mg/L, a taxa de mortalidade foi de 67% ao fim das 96h. Enquanto que nas larvas expostas a 0,36mg/L e grupo controle não houve nenhuma morte.

Pelas análises de qRT-PCR verificou-se diferenças significativas entre os grupos expostos e o controle em todos os genes avaliados (Figura 1). Para o *gh* mRNA, a expressão foi similar a dose-dependência, havendo uma diminuição nos níveis de expressão de acordo com o aumento da concentração do contaminante. Houve uma redução drástica na expressão de *gh* mRNA especialmente em 1,8mg/L.

A resposta gênica observada para os receptores de GH dos tipos I e II (*ghr1* e *ghr2*) foi a mesma, com redução da expressão nos dois grupos contaminados, que, porém, não diferiram entre si, mas foram significativamente diferentes comparados ao grupo controle, indicando efeito deletério do RT às larvas.

Salienta-se, que houve mortalidade de 100% dos indivíduos expostos à concentração de 3,6mg/L nas primeiras 24h de exposição, assim como 67% de mortalidade das larvas expostas à 1,8mg/L do herbicida. De acordo com VELASQUES et al. (2016), em sistemas hídricos no sul do Brasil já foram registradas concentrações de até 2,16mg/L de glifosato, locais onde os

*Odontesthes* (que são sensíveis a contaminantes) estão passíveis de exposição ao herbicida em ambientes naturais, o que torna estes resultados preocupantes, por estarem dentro de concentrações ambientalmente relevantes. O referido gênero de peixes possui função ecológica essencial na estrutura e função de ecossistemas, ciclagem de nutrientes atuando na composição e abundância de zooplânctons (DE SOUZA et al., 2017). Além disso, os peixe-rei possuem importância econômica e social, sendo muito apreciados na culinária, utilizados na aquicultura e pesca artesanal (DE SOUZA et al., 2017; DE SOUZA et al., 2021). Portanto, comprometer as populações de *Odontesthes* gera danos tanto socioeconômicos quanto ambientais.

Considerando que os mecanismos de toxicidade do glifosato ainda não são inteiramente compreendidos, a hipótese deste trabalho sugeriu que o herbicida afete genes do crescimento devido a alterações a nível gênico, o que foi corroborado, sendo um dos primeiros trabalhos neste sentido, até onde se sabe. De acordo com a Figura 1, é provável que o efeito nocivo do RT atue de forma mais intensa na expressão do *gh* considerando que nesta situação houve uma resposta similar a dose-dependência, diferente de seus receptores, onde a redução na expressão de mRNA foi observada apenas na concentração de 1,8mg/L. Sabe-se que agroquímicos organofosforados como o glifosato podem causar quebras na fita de DNA, afetando enzimas de reparo ou mesmo interagindo com a fita de DNA (GUILHERME et al., 2012). De acordo com NWANI et al. (2013), o glifosato eleva a produção de espécies reativas de oxigênio. Desta forma, alterações na expressão gênica podem ser explicadas pelos danos causados ao DNA ou em sua maquinaria de reparo devido ao estresse oxidativo, dado que o excesso de radicais livres é capaz de comprometer a função enzimática (SALBEGO et al., 2010).

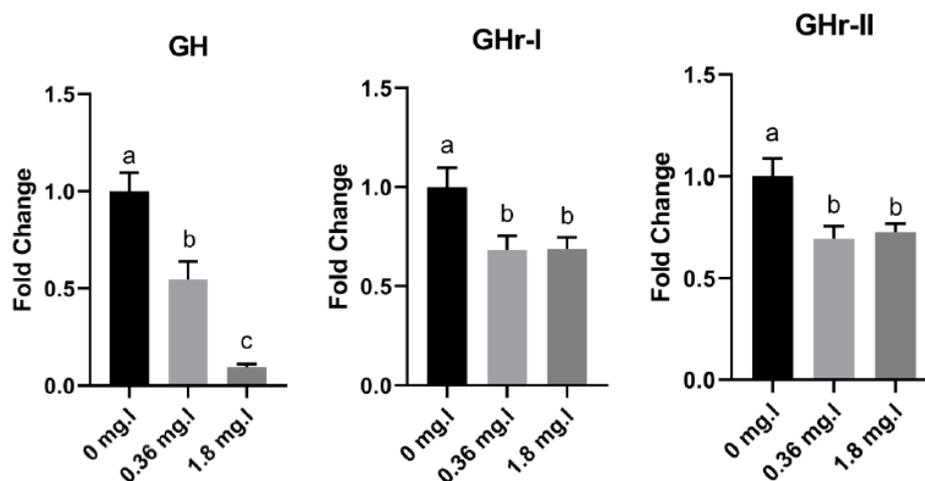


Figura 1 - Expressão dos genes associados ao eixo do crescimento de larvas do peixe-rei *Odontesthes argentinensis* com 5 dias após a eclosão, após exposição ao herbicida a base de glifosato Roundup Transorb® em concentrações de 0; 0,36 e 1,8mg/L<sub>ea</sub>, pelo período de 96h. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos (n=5; ANOVA; Tukey; p<0,05)

#### 4. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados, conclui-se que Roundup Transorb em concentrações ambientalmente relevantes de até 1,8mg/L de glifosato diminui o

crescimento de *Odontesthes argentinensis* por redução na expressão dos genes do eixo somatotrófico, o que reitera a espécie como bioindicadora em pesquisas toxicológicas. O estudo evidencia a expressão dos genes *gh*, *ghr1* e *ghr2* como eficiente biomarcador da toxicidade de herbicidas à base de glifosato. Ainda, os efeitos subletais observados revelam um possível impacto negativo na biologia do peixe-rei e consequentemente em seu papel ecológico e econômico.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BALDISSEROTTO, B. **Fisiologia de peixes aplicada à aquicultura**. 2. ed. Santa Maria: UFSM, 2009.
- BENBROOK, C. M. Trends in glyphosate herbicide use in the United States and globally. **Environmental Sciences Europe**, v. 28, n. 1, p. 1-15, 2016.
- DE SOUZA, J. R. G. et al. Seasonality effects over the ecological aquaculture of the native zooplanktivorous fish from South America *Odontesthes bonariensis*. **Aquaculture**, v. 471, p. 19-27, 2017.
- DE SOUZA, J. R. G. et al. The performance of ecological cage aquaculture of pejerrey *Odontesthes bonariensis* in Pampean lakes under two different hydrological scenarios. **Aquaculture Research**, v. 52, n. 10, p. 4829-4840, 2021.
- FARIA, M. et al. Glyphosate targets fish monoaminergic systems leading to oxidative stress and anxiety. **Environment International**, v. 146, 2021.
- GIESY, J. P.; DOBSON, S.; SOLOMON, K. R. Ecotoxicological risk assessment for Roundup® herbicide. **Reviews of environmental contamination and toxicology**. 2000.
- GILL, J. P. K. et al. Glyphosate toxicity for animals. **Environmental Chemistry Letters**, v. 16, n. 2, p. 401-426, 2018.
- GUILHERME, S., I.; GAIVÃO, M. A.; SANTOS; PACHECO, M. DNA damage in fish (*Anguilla anguilla*) exposed to a glyphosate-based herbicide—elucidation of organ-specificity and the role of oxidative stress. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**. 2012.
- HANEY, R. L.; SENSEMAN, S. A.; HONS, F. M. Effect of Roundup Ultra on microbial activity and biomass from selected soils. **Journal of environmental quality**, v. 31, p. 730-735. 2002.
- HUANTO, R. B. **Dissertação de Mestrado**. Assembleia de metazoários parasitos e histopatologias associadas às brânquias de *Odontesthes* (Atherinopsidae) em habitat aquáticos do extremo sul do Brasil. 2017.
- KAPIT, W.; MACEY, R. I.; MEISAMI, E. **The physiology coloring book**. 2.Ed. 2000.
- MATTOS, M. L. T. et al. Monitoramento ambiental do glifosato e do seu metabólito (ácido aminometilfosfônico) na água de lavoura de arroz irrigado. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 12, 2002.
- NWANI, C. D. et al. DNA damage and oxidative stress modulatory effects of glyphosate-based herbicide in freshwater fish, *Channa punctatus*. **Environmental toxicology and pharmacology**, v. 36, n. 2, p. 539-547, 2013.
- SALBEGO, Joseânia, et al. Herbicide Formulation with Glyphosate Affects Growth, Acetylcholinesterase Activity, and Metabolic and Hematological Parameters in Piava (*Leporinus obtusidens*). **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**. 2010.
- PHONLOR, G.; J. C. B. COUSIN. Early life history of silverside fishes. In: **Subtropical convergence environments: the coast and sea in Southwestern Atlantic**. p.136–141. 1997
- VELASQUES, R. R. et al. Roundup® in zebrafish: effects on oxidative status and gene expression. **Zebrafish**. p. 432-441. 2016.
- ZEBRAL, Y. D. et al. Effects of a glyphosate-based herbicide in pejerrey *Odontesthes humensis* embryonic development. **Chemosphere**. p. 860-867. 2017.