

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E DO
DESENVOLVIMENTO**

LUCIANE NEZZI

**Toxicidade do herbicida Roundup WG sobre a morfofuncionalidade
das células germinativas e somáticas durante a espermatogênese de
*Danio rerio***

Tese de doutorado submetida ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento, da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial para a obtenção do Grau de doutora em Biologia Celular e do Desenvolvimento.

Orientadora: Prof^a Dr^a Evelise Maria Nazari

FLORIANÓPOLIS
2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da
UFSC.

Nezzi, Luciane
Toxicidade do herbicida Roundup WG sobre a
morfofuncionalidade das células germinativas e
somáticas durante a espermatogênese de Danio rerio
/ Luciane Nezzi ; orientadora, Evelise Maria
Nazari, 2019.
107 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de
Pós-Graduação em Biologia Celular e do
Desenvolvimento, Florianópolis, 2019.

Inclui referências.

1. Biologia Celular e do Desenvolvimento. 2.
Citotoxicidade. 3. Zebrafish. 4. Células de
Sertoli. 5. Roundup WG. I. Nazari, Evelise Maria .
II. Universidade Federal de Santa Catarina.
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do
Desenvolvimento. III. Título.

“Toxicidade do herbicida Roundup WG sobre a morfofuncionalidade das células germinativas e somáticas durante a espermatogênese de *Danio rerio*”

Por

Luciane Nezzi

Tese julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (006/2019/PPGBCD) do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento - UFSC.




Prof. Dr. Geison de Souza Izídio
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do
Desenvolvimento

Banca examinadora:



Dra. Evelise Maria Nazari (Universidade Federal de Santa Catarina)

Orientadora

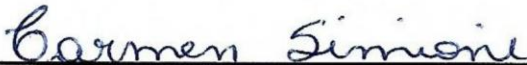


Prof. Dr. Geison de Souza Izídio
Coordenador do PPG em Biologia Celular
CCB/UFSC Portaria nº 1102/2017/GR

Dr. Carlos Eduardo da Rosa – participação por videoconferência
(Universidade Federal do Rio Grande)



Dr. Guilherme de Toledo e Silva (Universidade Federal de Santa Catarina)



Dra. Carmen Simioni (Universidade Federal de Santa Catarina)

Florianópolis, 10 de maio de 2019.

Dedico este trabalho, principalmente, a minha família, Jaci, Lourdes, Luciana, Jaciel, Luana e Lara, e a todos que me apoiaram, mesmo a distância e torceram imensamente pelo meu sucesso.

AGRADECIMENTOS

Em especial à minha orientadora Prof^a. Dr^a. Evelise Maria Nazari pela oportunidade de trabalharmos juntas em mais esta etapa de aprendizado, pela confiança, generosidade, amizade, presença constante e colaboração na realização deste trabalho e meu crescimento profissional.

À Prof^a. Dr^a. Yara Maria Rauh Müller, por ensinar ao grupo LRDA que ciência é feita com persistência e principalmente “brilho no olho”.

A Universidade Federal de Santa Catarina e ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento, por ter viabilizado a realização deste trabalho, e a todos os professores que de alguma forma contribuíram para minha formação profissional.

À agência de fomento CAPES, pela concessão de bolsa e apoio financeiro.

Aos membros da banca examinadora, agradeço a disponibilidade na avaliação deste trabalho.

A todos os colegas do Laboratório de Reprodução e Desenvolvimento Animal, em especial à “velha-guarda”, e aos novos colegas de bancada, pela amizade, pelas conversas científicas e divertidas, e pelos momentos de agradável convivência. Obrigada pela ajuda e compreensão nesta reta final.

À equipe dos laboratórios LAMEB e LCME, agradeço por todo o auxílio durante a realização das análises laboratoriais.

E por fim, agradeço em especial aos meus pais Jaci e Lourdes, a minha irmã Luciana, ao meu irmão Jaciel, minha cunhada Luana e a minha querida sobrinha Lara, que apesar da distância física sempre se fizeram presentes através do estímulo, carinho e apoio incondicional em todos os momentos.

A todos que de uma maneira ou de outra contribuíram para a realização deste trabalho.

Obrigada!

*Se as coisas são inatingíveis ... ora!
Não é motivo para não querê-las...
Que tristes os caminhos, se não fora
A presença distante das estrelas!
(Mário Quintana)*

RESUMO

Os ecossistemas aquáticos são importantes ambientes para manutenção de uma grande diversidade de espécies, e ao mesmo tempo um dos principais ambientes receptores de contaminantes provenientes de diferentes fontes. Dentre estes contaminantes, destacam-se os herbicidas a base de glifosato, como o Roundup, que são os mais utilizados mundialmente. Esse herbicida é solúvel em água, e após sua aplicação nas lavouras infiltra no solo, podendo chegar nos ecossistemas aquáticos e afetar organismos não-alvo, como os peixes. O objetivo deste estudo foi caracterizar a toxicidade do herbicida Roundup WG sobre a morfologia das células somáticas e germinativas, bem como sobre a qualidade espermática durante o processo de espermatogênese do peixe *Danio rerio*. Para tal, foi realizada inicialmente a determinação da concentração letal para 50% da população de ensaio (CL₅₀) e a curva de sobrevivência para auxiliar na definição das concentrações testadas, que foram estabelecidas a partir das normativas do CONAMA (0,065 mg/L, 0,65 mg/L e 6,5 mg/L), sendo realizados dois períodos de exposição, 7 e 15 dias. A morfologia das células somáticas e germinativas foi avaliada por microscopia de luz e eletrônica de transmissão, enquanto que a qualidade das células germinativas foi avaliada por citometria de fluxo e RT-qPCR. A CL₅₀ obtida foi de 42,61 mg/L, e a curva de sobrevivência mostrou que após 24 h houve mortalidade nas concentrações acima de 10 mg/L. As análises microscópicas demonstraram, após 15 dias, alterações na estrutura dos testículos, em particular na integridade dos prolongamentos citoplasmáticos das células de Sertoli, que delimitam os cistos germinativos e perda das pontes citoplasmáticas entre as células germinativas. Foram observadas ainda alterações nos compartimentos subcelulares das células de Sertoli e células germinativas, como perda da eletrondensidade do citoplasma, mitocôndrias dilatadas e perda de cristas mitocondriais. Além disso, nas células de Sertoli foi observado a presença de vesículas autofágicas com resíduos de membranas e acúmulo de partículas eletrodensas, acompanhada do aumento no nível de transcritos, após 7 dias de exposição, dos genes *atg5*, *atg16*, *map1-lc3II* e *lamp2*, envolvidos na formação da vesícula autofágica. Adicionalmente, foram observadas alterações na qualidade das células germinativas, verificada pelo aumento na produção de ERO após 7 dias e pela fragmentação do DNA em 7 e 15 dias de exposição. O nível de transcrito do gene *cyp17a1*, envolvido na regulação esteroidogênica, foi aumentado após 7 dias de exposição. Os resultados obtidos demonstram a toxicidade do Roundup WG e fornecem novos conhecimentos para melhor compreender as alterações na morfofuncionalidade das células somáticas e germinativas nos testículos de *D. rerio*.

Palavras-chave: reprodução, cistos germinativos, qualidade espermática, glifosato, peixe-zebra.

ABSTRACT

Aquatic ecosystems are important environments for the maintenance of a wide variety of species, and at the same time, one of the main environments receiving contaminants from different sources. Among these contaminants, glyphosate-based herbicides, such as Roundup, are the most widely used in the world. This herbicide is soluble in water, and after its application in crops, infiltrates the soil, reaches aquatic ecosystems and affects non-target organisms, such as fish. The aim of this study was to characterize the toxicity of the Roundup WG herbicide on somatic and germinative cell morphology, as well as sperm quality during the spermatogenesis process of the *Danio rerio* fish. For this purpose, the determination of the lethal concentration for 50% of the test population (LC₅₀) and the survival curve were performed to help in the definition of the concentrations tested, which were established according to CONAMA (0.065 mg/L, 0.65 mg/L and 6.5 mg/L), with two exposure periods, 7 and 15 days. The somatic and germ cell morphology was evaluated by light microscopy and transmission electron microscopy, while the germ cell quality was evaluated by flow cytometry and RT-qPCR. The LC₅₀ obtained was 42.61 mg/L, and the survival curve showed that after 24 h there was mortality at concentrations above 10 mg/L. Microscopic analyzes demonstrated after 15 days, changes in testis structure, particularly in the integrity of the cytoplasmic extensions of the Sertoli cells, which delimit the germinal cysts; loss of the cytoplasmic bridges between germ cells; as well as, the presence of atypical cells inside the lumen of seminiferous tubules. Changes were also observed in the subcellular compartments of Sertoli cells and germ cells, such as loss of cytoplasmic electron density, dilated mitochondria and loss of mitochondrial crests. In addition, in the Sertoli cells the presence of autophagic vesicles with membrane residues and accumulation of electrondense particles was observed, accompanied by an increase after 7 days of exposure, in the level of transcripts of the genes *atg5*, *atg16*, *map1-1c3II* and *lamp2*, involved in the formation of the autophagic vesicle. Besides that, changes in germ cell quality were observed, as evidenced by the increase in ROS production after 7 days and DNA fragmentation in 7 and 15 days of exposure. The transcript level of the *cyp17a1* gene, involved in steroidogenic regulation, was increased after 7 days of exposure. The results obtained demonstrate the toxicity of Roundup WG and provide new knowledge to better understand the changes in morphofunctionality of somatic and germinative cells in the testis of *D. rerio*.

Keywords: reproduction, germinative cysts, sperm quality, glyphosate, zebrafish.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Molécula do herbicida glifosato.	24
Figura 2: Organização do testículo de <i>Danio rerio</i>	30
Figura 3: Esquema representando o processo de espermatogênese de peixes.	33
Figura 4: Delineamento experimental demonstrando as características dos bioensaios e as técnicas utilizadas para investigar a toxicidade do herbicida Roundup WG em testículos de <i>Danio rerio</i>	37
Figura 5: Curva de sobrevivência para <i>Danio rerio</i> após exposição ao herbicida Roundup WG.	51
Figura 6: Concentração letal média (CL ₅₀) determinada para machos de <i>Danio rerio</i> após a exposição ao Roundup WG por 96 h.	52
Figura 7: Secções histológicas transversais de testículos de <i>Danio rerio</i> após 15 dias de exposição ao Roundup WG.	54
Figura 8: Eletromicrografias das células de Sertoli no testículo de <i>Danio rerio</i> exposto ao Roundup WG por 15 dias.	56
Figura 9: Eletromicrografias dos prolongamentos citoplasmáticos de células de Sertoli no testículo de <i>Danio rerio</i> exposto ao Roundup WG por 15 dias.	57
Figura 10: Frequência de vesículas nas células de Sertoli no testículo de <i>Danio rerio</i> exposto ao Roundup WG por 15 dias.	58
Figura 11: Eletromicrografias de espermatogônias no testículo de <i>Danio rerio</i> exposto ao Roundup WG por 15 dias.	59
Figura 12: Eletromicrografias de espermatócitos no testículo de <i>Danio rerio</i> exposto ao Roundup WG por 15 dias.	60
Figura 13: Eletromicrografias dos espermatozoides no lúmen do testículo de <i>Danio rerio</i> exposto ao Roundup WG por 15 dias.	61
Figura 14: Eletromicrografias de espermatozoides no testículo de <i>Danio rerio</i> exposto ao Roundup WG por 15 dias.	62
Figura 15: Análise por citometria de fluxo dos diferentes tipos de células germinativas de <i>Danio rerio</i> exposto ao Roundup por 7 e 15 dias.	65
Figura 16: Análise por citometria de fluxo das fases do ciclo celular de células germinativas de <i>Danio rerio</i> ao exposto ao Roundup por 7 e 15 dias.	66
Figura 17: Índice de fragmentação de DNA (IFD) das células germinativas de <i>Danio rerio</i> exposto ao Roundup WG por período de 7 e 15 dias.	67
Figura 18: Avaliação da funcionalidade mitocondrial das células germinativas de <i>Danio rerio</i> exposto ao Roundup WG pelo período de 7 e 15 dias.	68

Figura 19: Efeito da exposição ao Roundup sobre a formação de ERO nas células germinativas de <i>Danio rerio</i> exposto ao Roundup WG pelo período de 7 e 15 dias.	69
Figura 20: Níveis relativos de transcrito dos genes atg5, atg16, map1-LC3II e lamp2 nos testículo de <i>Danio rerio</i> analisados após 7 dias de exposição ao Roundup WG.....	71
Figura 21: Níveis relativos de transcrito dos genes star, cyp17a1, cyp11a1, sox9a, gsdf, ziw1 e ziw2 em testículo de <i>Danio rerio</i> analisados após 7 dias de exposição ao Roundup WG.....	73
Figura 22: Resumo gráfico dos efeitos da exposição de machos de <i>Danio rerio</i> ao Roundup WG.	86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Massa corporal/testículo e IGS de machos de <i>Danio rerio</i> após de exposição ao herbicida Roundup WG.	52
Tabela 2: Análise comparativa das alterações ultraestruturais observadas nos tipos celulares nos testículos de <i>Danio rerio</i> após exposição ao Roundup WG em diferentes concentrações.	63

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Alterações ultraestruturais a serem avaliadas nas células somáticas e germinativas nos testículos de <i>D. rerio</i>	42
Quadro 2: Características nucleares das células germinativas masculinas, utilizados para a quantificação por citometria de fluxo.....	43
Quadro 3: Descrição dos iniciadores utilizados no ensaio de RT-qPCR de testículo de <i>Danio rerio</i> após exposição ao herbicida Roundup WG.	48
Quadro 4: Classificação final da estabilidade dos genes de referência e elemento repetitivo para análises por RT-qPCR de testículo de <i>Danio rerio</i> exposto ao Roundup WG.....	70

LISTA DE ABREVIATURAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
<i>atg5</i>	do inglês <i>autophagy protein 5</i>
<i>atg16</i>	do inglês <i>autophagy-related protein 16-1</i>
CL ₅₀	Concentração letal média
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
<i>cyp11a1</i>	do inglês <i>citocromo P450 família 11 subfamília A membro 1</i>
<i>cyp17a1</i>	do inglês <i>citocromo P450 família 17 subfamília A membro 1</i>
DCFH-DA	2',7'-diacetado de dicloro-di-hidro-fluoresceína
EEC	Comunidade Econômica Europeia ou do inglês <i>European Economic Community</i>
<i>ef1a</i>	do inglês <i>eukaryotic translation elongation factor 1 alpha</i>
ERO	Espécies reativas de oxigênio
<i>gsdf</i>	do inglês <i>gonadal soma-derived fator</i>
IGS	Índice gonadossomático
JC-1	do inglês <i>5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolyl carbocyanine iodide</i>
LAMEB	Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia
<i>lamp-2</i>	do inglês <i>lysosome-associated membrane glycoprotein 2 precursor</i>
LCME	Laboratório Central de Microscopia Eletrônica
<i>map1-lc3II</i>	do inglês <i>microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3B</i>
OECD	Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico
PARA	Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos
RT-qPCR	Reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa em tempo real, do inglês <i>reverse transcriptase-quantitative real time polymerase chain reaction</i>
SCSA	do inglês <i>Sperm Chromatin Structure Assay</i>
<i>sox9a</i>	do inglês <i>SRY-related HMG-box gene 9</i>
<i>star</i>	do inglês <i>steroidogenic acute regulatory protein (StAR)</i>
USEPA	Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos ou do inglês <i>United States Environmental Protection Agency</i>

ziwi1
ziwi2

do inglês *piwi-like RNA-mediated gene silencing 1*
do inglês *piwi-like RNA-mediated gene silencing 2*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	21
1.1 O HERBICIDA GLIFOSATO E SEU POTENCIAL TOXICOLÓGICO	24
1.2 <i>Danio rerio</i> COMO MODELO EXPERIMENTAL EM ESTUDOS TOXICOLÓGICOS	28
1.2.1 Estrutura Testicular e Espermatogênese de <i>Danio rerio</i>	29
2 OBJETIVOS	35
2.1 GERAL	35
2.2 ESPECÍFICOS	35
3 MATERIAIS E MÉTODOS	37
3.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	37
3.2 OBTENÇÃO DOS ANIMAIS	38
3.3 HERBICIDA	38
3.4 DETERMINAÇÃO DA CL ₅₀ 96 h DO ROUNDUP WG	38
3.5 DETERMINAÇÃO DA TOXICIDADE DO ROUNDUP WG..	39
3.5.1 Exposição às concentrações do Roundup WG	39
3.5.2 Biometria corporal e determinação do índice gonadossomático (IGS).....	40
3.5.3 Análises morfológicas dos testículos	40
3.5.4 Análise ultraestrutural por microscopia eletrônica de transmissão	41
3.5.5 Análises por citometria de fluxo	42
3.5.5.1 Quantificação do número de células germinativas	42
3.5.5.2 Identificação das fases do ciclo celular.....	43
3.5.5.3 Índice de fragmentação de DNA	43
3.5.5.4 Análise do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$)	44
3.5.5.5 Quantificação de espécies reativas de oxigênio (ERO).....	44
3.5.6 Análise do perfil transcricional	45
3.5.6.1 Extração do RNA total.....	45
3.5.6.2 Síntese de cDNA	46
3.5.6.3 Análise da expressão gênica por RT-qPCR.....	46
3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	50
4 RESULTADOS.....	51
4.1 TOXICIDADE AGUDA DO ROUNDUP WG EM MACHOS de <i>D. rerio</i>	51
4.2 EFEITO DO ROUNDUP WG SOBRE A BIOMETRIA CORPORAL E O ÍNDICE GONADOSSOMÁTICO (IGS).....	52

4.3 EFEITO DA EXPOSIÇÃO POR 15 DIAS AO ROUNDUP WG SOBRE A MORFOLOGIA DOS TESTÍCULOS DE <i>D. rerio</i>	53
4.4 EFEITO DO HERBICIDA ROUNDUP WG SOBRE OS COMPARTIMENTOS DAS CÉLULAS SOMÁTICAS E GERMINATIVAS DO TESTÍCULO DE <i>D. rerio</i> APÓS A EXPOSIÇÃO POR 15 DIAS.....	55
4.5 EFEITO DA EXPOSIÇÃO POR 7 E 15 DIAS AO ROUNDUP WG SOBRE PARAMÊTROS DE QUALIDADE DA LINHAGEM DE CÉLULAS GERMINATIVAS NOS TESTÍCULOS DE <i>D. rerio</i>	64
4.5.1 Efeito do Roundup WG sobre o número de células germinativas.....	64
4.5.2 Efeito do Roundup WG sobre as fases do ciclo celular	66
4.5.3 Efeito do Roundup WG sobre a integridade de DNA genômico	67
4.5.4 Efeito do Roundup WG sobre a funcionalidade mitocondrial	67
4.5.5 Efeito do Roundup WG sobre a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO).....	68
4.6 EFEITO DA EXPOSIÇÃO AO ROUNDUP WG POR 7 DIAS SOBRE OS NÍVEIS DE TRANSCRITO DOS GENES ENVOLVIDOS COM PROCESSO DE AUTOFAGIA E ESTEREOIDOGENESE	70
4.6.1 Avaliação da estabilidade da expressão dos genes de referência no testículo de <i>D. rerio</i> ao Roundup WG por 7 dias...	70
4.6.2 Análise dos níveis de transcritos dos genes envolvidos no processo de autofagia nos testículos de <i>D. rerio</i> após exposição ao Roundup WG por 7 dias	71
4.6.3 Análise dos níveis de transcrito para as proteínas envolvidas no processo de manutenção da espermatogênese nos testículos de <i>D. rerio</i> após exposição ao Roundup WG por 7 dias.....	72
5 DISCUSSÃO	75
6 CONCLUSÕES	85
7. REFERÊNCIAS.....	87

1. INTRODUÇÃO

Os ecossistemas aquáticos são ambientes receptores de contaminantes, como compostos orgânicos, metais pesados e agrotóxicos. Tais contaminantes podem atingir os ecossistemas aquáticos por descargas diretas ou através das chuvas, lavagem do solo e infiltrações, gerando consequências em sua biodiversidade, a curto, médio e longo prazos (VAN DER OOST *et al.*, 2003; RELYEA, 2005).

Estudos têm demonstrado a necessidade de se focar a toxicidade das concentrações não letais dos contaminantes aquáticos, que por consequência, afetam os organismos presentes nesse ambiente, em vários níveis, desde o molecular até o sistêmico. Tais efeitos podem levar à redução da qualidade ambiental, influenciam na estrutura das comunidades e no funcionamento dos ecossistemas, reduzem a diversidade de espécies, modificam as cadeias alimentares, alteram os padrões de fluxo de energia e ciclagem de nutrientes, bem como alteram a estabilidade e a resiliência dos ecossistemas (PÉREZ *et al.*, 2011; MENSAH *et al.*, 2015; ACOSTA *et al.*, 2016; CASTRO *et al.*, 2018; SANTANA *et al.*, 2018).

Dentre os contaminantes, os agrotóxicos são conhecidos por seus efeitos adversos em diferentes organismos (DEEPANANDA *et al.*, 2011; GAUPP-BERGHAUSEN *et al.*, 2015; DEFARGE *et al.*, 2016; BARRETO *et al.*, 2018; SAALFELD *et al.*, 2018; MELO *et al.*, 2019). De acordo com a legislação brasileira para agrotóxicos, Lei nº 7.802 de 11/07/89, o Art.1, considera como substâncias agrotóxicas e afins, os produtos e os agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, pastagens, florestas (nativas ou implantadas), ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos, subdivididos de acordo com a espécie alvo que se pretende eliminar ou controlar (BRASIL, 1989). Atualmente em vigor a PL 6.299/2002, muda o nome dos agrotóxicos para “defensivos agrícolas” e “produtos fitossanitários”. Dentre os agrotóxicos que potencialmente contaminam os ambientes aquáticos, estão herbicidas, fungicidas e inseticidas, intensamente utilizados nas produções agrícolas (RASMUSSEN *et al.*, 2015).

A utilização de agrotóxicos na agricultura é necessária para beneficiar a produção de alimentos, diminuindo perdas e melhorando a qualidade dos alimentos, o que tem gerado o uso extensivo de herbicidas

em todo o mundo (MENSAH *et al.*, 2015). O Brasil no período de 1975 a 2009, esteve entre os seis maiores consumidores de agrotóxicos do mundo (REBELO *et al.*, 2010). Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), órgão federal responsável pela avaliação toxicológica para fins de registro de agrotóxicos e pela reavaliação de produtos já registrados, as vendas de agrotóxicos no Brasil aumentaram mais de 190% entre 2000 e 2010, sendo o Brasil um dos maiores consumidores de agrotóxicos do mundo (ANVISA, 2012; IBGE, 2012).

Dentre os agrotóxicos, os herbicidas são amplamente utilizados no território brasileiro, e dentre estes, os herbicidas a base de glifosato são os mais utilizados. Algumas das variações deste produto encontrados disponíveis ao consumo são: Roundup WG (720 g/Kg); Roundup Ultra (650 g/Kg); Roundup Transorb R (480 g/L); Roundup Original DI (370 g/L); Scout (720 g/Kg); Nortox (360 g/L), entre outras. Nos anos de 2009 a 2012, 62,4% dos herbicidas utilizados no Brasil foram a base de glifosato, chegando a 173.150,75 toneladas de ingrediente ativo glifosato em 2017, o que torna o país o 1º país no *ranking* mundial de consumo de glifosato (IBGE, 2015; ANVISA, 2019).

O glifosato foi um dos 14 ingredientes ativos de agrotóxicos colocados em reavaliação do potencial toxicológico pela ANVISA em 2009, devido principalmente à sua grande utilização e a ocorrência de casos de intoxicação humana. Em 2015, o glifosato foi indicado também para a reavaliação do seu potencial carcinogênico. Como resultado dessas reavaliações poderão ser revistos os limites aceitáveis de ingestão diária, os limites máximos aceitáveis para as classes de água e ainda o controle de limite máximo de impurezas presentes no produto. Cabe ressaltar, que as discussões de reavaliação do ingrediente ativo glifosato já resultaram na inclusão do monitoramento de seus resíduos em alimentos pelo Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA) da Anvisa a partir de 2017 (ANVISA, 2015; 2017).

No início do ano de 2019, a ANVISA (26/02/2019) aprovou a abertura de consulta pública com base nos resultados apresentados na Nota Técnica nº 23/2018 (publicada em 22/02/2019), que traz propostas de mudanças para os herbicidas a base de glifosato. Este relatório técnico é resultado da avaliação feita por técnicos da ANVISA, com base nas evidências científicas mais atuais sobre o glifosato, contanto com 16 pareceres da própria Agência e outros três pareceres externos, com análises de dados nacionais sobre agrotóxicos que incluíram: monitoramento de resíduos de agrotóxicos em alimentos, monitoramento de água para consumo humano (coletados entre 2014 e 2016) e dados do perfil de intoxicações humanas por glifosato no Brasil. A Nota Técnica nº

23/2018 conclui que o glifosato não apresenta características mutagênicas, teratogênicas e carcinogênicas, não é desregulador endócrino e não é tóxico para a reprodução, contudo, após avaliações e relatórios de agências reguladoras internacionais, a ANVISA sugere alterações em alguns parâmetros de referência para avaliação de risco do glifosato, como: Ingestão Diária Aceitável (IDA) = 0,5 mg/Kg pc/dia; Dose de Referência Aguda (DRfA) = 0,5 mg/Kg pc/dia; Nível Aceitável de Exposição Ocupacional (AOEL) = 0,1 mg/Kg pc/dia; proibição de produtos com concentração de Polioxietilenoamina (POEA) acima de 20% para garantir exposição dietética segura; proibida a comercialização de produtos para jardinagem amadora em concentrações superior a 1%, entre outras (ANVISA, 2019).

Para subsidiar as reavaliações do potencial toxicológico e carcinogênico do herbicida glifosato são necessários estudos voltados para o reconhecimento do mecanismo de ação dos herbicidas a base de glifosato e seus adjuvantes, da molécula de glifosato e de seus produtos de degradação, para a caracterização de seus efeitos. Assim, é importante a utilização de diversos modelos animais, diferentes formulações do herbicida, de diferentes metodologias de investigação molecular, celular, tecidual e sistêmico, a fim de reconhecer a gama de resposta biológicas frente à exposição a esses compostos, como em poliqueta (TAROUÇO *et al.*, 2017), molusco (MOHAMED, 2011), peixe (MODESTO E MARTINEZ, 2010; VELASQUES *et al.*, 2016), anfíbio (LAJMANOVICH *et al.*, 2011), réptil (BURELLA *et al.*, 2017), aves (OLIVEIRA *et al.*, 2007) e mamífero (ROMANO *et al.*, 2012; CONRAD *et al.*, 2017; CONNOLLY *et al.*, 2019).

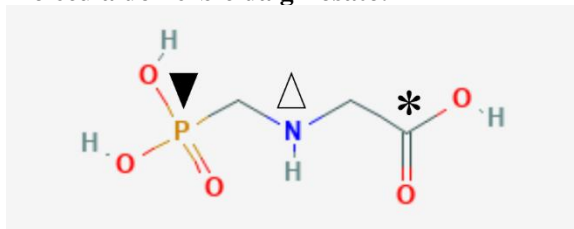
Neste sentido, o Laboratório de Reprodução e Desenvolvimento Animal (LRDA) do Centro de Ciências Biológicas (CCB) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) vem desenvolvendo trabalhos com a utilização do peixe-zebra *Danio rerio* expostos à herbicidas a base de glifosato, buscando caracterizar os seus efeitos nas células e tecidos dos órgãos dos sistemas reprodutor, nervoso e respiratório (ARMILIATO *et al.*, 2014; NEZZI, 2015; DAVICO, 2017; JARAMILLO *et al.*, 2018; PEREIRA *et al.*, 2018). Com relação ao sistema reprodutor, foram investigados os efeitos de herbicida a base de glifosato nos testículos de *D. rerio*, sendo reconhecida redução no número de espermatozoides e alterações na morfologia das células de Sertoli a partir de análises morfológicas. Esses resultados foram o passo inicial para as investigações realizadas nesta tese de doutorado, que ampliou o uso de ferramentas metodológicas a fim de melhor caracterizar a toxicidade do glifosato nas células germinativas e somáticas nos testículos de *D. rerio*.

1.1 O HERBICIDA GLIFOSATO E SEU POTENCIAL TOXICOLÓGICO

A molécula de glifosato foi sintetizada pela primeira vez em 1950, por Henri Martin, químico suíço de uma pequena empresa farmacêutica, sem aplicação farmacêutica reconhecida na época, a molécula foi vendida para outras empresas (DUKE E POWLES, 2008). Em 1970, as propriedades herbicidas da molécula de glifosato foram descobertas por cientistas da Monsanto Company nos Estados Unidos, sendo este composto introduzido como componente de herbicidas no mercado americano em 1974, na formulação comercial Roundup, e no mercado brasileiro em 1975 (WILLIAMS *et al.*, 2000; VEREECKEN, 2005). Apesar de estar no mercado desde os anos de 1970, foi somente depois de 1996 com os organismos geneticamente modificados (OMGs) tolerantes ao glifosato, que foram registrados os maiores volumes de comercialização do herbicida denominado “*Roundup Ready*” (BENBROOK, 2016).

O glifosato é um organofosforado pertencente ao grupo químico das glicinas substituídas, cuja formulação comercial recebe o nome químico de [N-(fosfonometil) glicina], sendo a fórmula molecular $C_3H_8NO_5P$ (Figura 1). Devido a ligação estável entre carbono e fosfato, a molécula apresenta boa estabilidade enzimática e térmica, solubilidade em água de 12 g/L a 25°C, boa estabilidade na presença da luz, além da capacidade anfótera, atuando como ácido fraco e base fraca ao mesmo tempo (AMARANTE JUNIOR *et al.*, 2002). O glifosato é um herbicida de amplo espectro e pós-emergente, cujos organismos alvos são plantas daninhas terrestres e aquáticas (DUKE E POWLES, 2008; ANNETT *et al.*, 2014; BENBROOK, 2016). Esse herbicida tem sido empregado na agricultura, nas culturas de milho, soja, café, cana-de-açúcar, arroz, maçã, citros, entre outras (REBELO *et al.*, 2010), além de uso em gramados, vias públicas e jardins (HANKE *et al.*, 2010).

Figura 1: Molécula do herbicida glifosato.



▼ grupo fosfato, Δ grupo amina, * grupo carboxila. Fonte: adaptado de www.pubchem.ncbi.nlm.nih.gov.

O glifosato é um herbicida sistêmico, pois após absorvido principalmente pela superfície das folhas e secundariamente pelas raízes, é transportado para todas as partes da planta, através do floema (DUKE E POWLES, 2008). Nas plantas, o glifosato interfere nas vias de produção de aminoácidos aromáticos, inibindo a enzima 5-enolpiruvil-shikimato-3-fosfato sintase (EPSPs), responsável pela biossíntese de corismato, um intermediário na síntese dos aminoácidos fenilalanina, tirosina e triptofano. Estas vias são as responsáveis pela defesa das plantas contra organismos patogênicos (DE MARÍA *et al.*, 2006; KOMIVES E SCHRÖDER, 2016). Assim quando esses efeitos ocorrem no meristema, devido ao modo de ação lento do glifosato o crescimento das plantas é inibido e as demais partes da planta começam a secar (DUKE E POWLES, 2008). Para aumentar a eficácia da penetração do glifosato nas plantas, ele é formulado com outros compostos chamados “ingredientes inertes”, o mais conhecido é o surfactante Polioxietilenamida (POEA) (ANNETT *et al.*, 2014).

De modo geral, a aplicação de herbicida a base de glifosato se dá por pulverização, sendo que grande parte do herbicida pulverizado chega ao solo, onde apresenta rápida e alta taxa de adsorção pelos sedimentos e partículas. Dependendo do tipo de solo, o glifosato pode apresentar tempo de meia vida de 45-60 dias, podendo chegar até 141-197 dias (GIESY *et al.*, 2000; PRATA *et al.*, 2005; TONI *et al.*, 2006). A rápida adsorção do glifosato ao solo se dá devido a sua característica anfótera e à capacidade de formar complexos com íons metálicos de maneira semelhante à solução aquosa, enquanto que o seu tempo de permanência se dá em função da composição do solo (AMARANTE JUNIOR *et al.*, 2002).

O glifosato adsorvido aos sedimentos do solo pode ser transportado para ambientes aquáticos, através de lixiviação e erosão, onde permanece adsorvido ao sedimento ou em suspensão aderido a partículas orgânicas, passando a apresentar meia-vida de 7 a 21 dias (TONI *et al.*, 2006; PERUZZO *et al.*, 2008; MENSAH *et al.*, 2015). Nos ambientes aquáticos, o glifosato pode induzir efeitos adversos em diferentes organismos, passando estes a serem denominados organismos não-alvo do glifosato, uma vez que os organismos alvo são as plantas daninhas. Dentre os organismos não-alvo, se destacam os peixes e muitas espécies de invertebrados (JIRAUNGKOORSKUL *et al.*, 2003; BENAMÚ *et al.*, 2010; DEEPANANDA *et al.*, 2011; GAUPP-BERGHAUSEN *et al.*, 2015; MOTTIER *et al.*, 2015; RENO *et al.*, 2018).

Assim considerando a não-seletividade do glifosato, o seu uso traz potenciais riscos à qualidade do solo e das águas superficiais e subterrâneas, o que demanda o estabelecimento de critérios que definam

a sua concentração máxima para as diferentes classes de águas. Cada país tem sua própria regulamentação para os limites máximos permitidos de glifosato na água. No Brasil, é responsabilidade do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), vinculado ao Ministério do Meio Ambiente, estabelecer normas, critérios e padrões relativos ao controle e à manutenção da qualidade do meio ambiente. A Resolução nº 357/CONAMA/2005, dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais, classifica os corpos d'água e regulamenta que para as classes 1 e 2 (água doce), destinadas entre outros, proteção das comunidades aquáticas, abastecimento para o consumo humano e animal, bem como para atividades recreativas. Para essas classes de águas, a concentração máxima permitida de glifosato é de 65 µg/L (BRASIL, 2005). Esta resolução passou por diversas alterações, contudo as concentrações máximas de glifosato para as classes de água doce 1-2 e 3 destinadas à diretrizes ambientais não foram alteradas (65 µg/L, 65 µg/L e 280 µg/L, respectivamente).

A resolução nº 396/CONAMA/2008 e a Portaria nº 2914/Ministério da Saúde/2011, que dispõem sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, estabeleceram um novo limite máximo de glifosato e do seu metabólito, o ácido aminometilfosfônico (AMPA) para água para consumo humano, o qual passou a ser de 500 µg/L (BRASIL, 2008; 2011).

Como dito anteriormente, cada país tem seus limites máximos de glifosato permitidos, sendo os valores bastante discrepantes. Além do Brasil, a Comunidade Econômica Europeia (EEC) estabelece a concentração de 0,1 µg/L (de qualquer agrotóxico) em águas destinadas ao consumo humano e a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA) estabelece o nível máximo de 700 µg/L para água potável (MALLAT E BARCELÓ, 1998; USEPA, 2016).

Diante da discrepância entre as concentrações máximas permitidas em cada país, a toxicidade do glifosato ainda é uma questão bastante controversa na literatura. Não se reconhece consenso em relação à gravidade da toxicidade desse herbicida nos organismos não-alvo, embora haja muitos estudos realizados em campo ou em laboratório, que descrevem seu impacto em animais e na saúde humana (BENAMÚ *et al.*, 2010; MYERS *et al.*, 2016).

Dentre os organismos não-alvo estudados, os peixes têm sido utilizados em trabalhos que investigam os efeitos histopatológicos, fisiológicos, bioquímicos e comportamentais, demonstrando que exposições subletais a herbicidas a base de glifosato induzem (i)

alterações nas brânquias, no fígado e rins da tilápia-do-nylo *Oreochromis niloticus* (JIRAUNGKOORSKUL *et al.*, 2003); (ii) interferência nas defesas antioxidantes e peroxidação lipídica no curimatá *Prochilodus lineatus* (MODESTO E MARTINEZ, 2010); (iii) neurotoxicidade na carpa *Cyprinus carpio* (CATTANEO *et al.*, 2011); (iv) danos no DNA no cará *P. lineatus* (MORENO *et al.*, 2014); (v) alterações nas células das brânquias e na expressão de proteínas do fígado no barrigudinho *Poecilia reticulatae* (ROCHA *et al.*, 2015); (vi) mudanças do metabolismo no jundiá *Rhamdia quelen*, na piava *Leporinus obtusidens*, e peixe-rei *Odontesthes bonariensis* (GLUSCZAK *et al.*, 2007; SALBEGO *et al.*, 2010; MENÉNDEZ-HELMAN *et al.*, 2015), e (vii) alterações na cadeia respiratória mitocondrial e no comportamento de peixe-zebra *D. rerio* (PEREIRA *et al.*, 2018).

Dentre os sistemas orgânicos que podem apresentar algum tipo de alteração, estudos demonstram a potencialidade de herbicidas a base de glifosato como disruptor endócrino, principalmente nas funções de hormônio esteroide-dependente, por exemplo, diminuição da atividade da aromatase (uma enzima chave no equilíbrio dos hormônios sexuais) em linhagens de células humanas (GASNIER *et al.*, 2009; DEFARGE *et al.*, 2016), podem ser responsáveis por alterações relacionadas ao sistema reprodutivo, como relatado em fêmeas de jundiá *R. quelen* altera os níveis de 17 β -estradiol e redução da fertilidade (SOSO *et al.*, 2007); em fêmeas de peixe-zebra *D. rerio* aumento no diâmetro de ovócitos e maior expressão de fator esteroidogênico-1 (ARMILIATO *et al.*, 2014); em machos tais alterações podem comprometer também a qualidade espermática, como observado no guará *Poecilia vivípara* (HARAYASHIKI *et al.*, 2013); no peixe-rei *Odontesthes humensis* (SILVEIRA *et al.*, 2019).

Estudos realizados demonstram ainda que herbicidas a base de glifosato induzem a ocorrência de estresse oxidativo como resposta bioquímica a este composto, no peixe curimatá *Prochilodus lineatus* (LANGIANO E MARTINEZ, 2008; MODESTO E MARTINEZ, 2010); na enguia europeia *Angilla angilla* (GUILHERME *et al.*, 2012; MARQUES *et al.*, 2014); nos peixes amazônicos *Colossoma macropomun* e *Pseudoplatystoma* sp (SINHORIN *et al.*, 2014; BRAZ-MOTA *et al.*, 2015); no peixe-zebra *D. rerio* (VELASQUES *et al.*, 2016), no peixe jundiá *Leiarius marmoratus* (MOURA *et al.*, 2017), no peixe barrigudinho *Jenunisia multidentada* (SÁNCHEZ *et al.*, 2017).

Tanto em ambientes naturais, como em condições controladas de laboratório, tem-se proposto a utilização de peixes como bioindicadores de contaminação aquática, pois estes apresentam respostas biológicas geradas em um ecossistema sujeito a contaminantes. Essas respostas são

medidas através de alterações biológicas nos fluidos corporais, células ou tecidos, pois estes animais apresentam mecanismos acentuados de bioconcentração e bioacumulação, estão presentes em praticamente todos os corpos d'água com grande variedade de nichos ecológicos entre as espécies. Além disso, os organismos bioindicadores fornecem respostas quanto a exposição a concentrações subletais de substâncias tóxicas, que desencadeiam distúrbios morfológicos e fisiológicos (VAN DER OOST *et al.*, 2003; FERNANDES *et al.*, 2007; WEISBROD *et al.*, 2007).

1.2 *Danio rerio* COMO MODELO EXPERIMENTAL EM ESTUDOS TOXICOLÓGICOS

D. rerio é uma espécie de peixe teleósteo de água doce pertencente à família Cyprinidae. O gênero *Danio* apresenta um padrão de coloração com listras horizontais claras e escuras alternadas, sua distribuição natural é sul da Ásia, principalmente Índia, Bangladesh e Nepal, seu habitat natural são pequenos corpos d'água com temperatura entre 24 a 38 °C, (SPENCE *et al.*, 2006; ENGESZER *et al.*, 2007; SPENCE *et al.*, 2008). Conhecido popularmente no mundo como peixe-zebra, no Brasil também como paulistinha (GRUNWALD E EISEN, 2002).

A espécie *D. rerio* foi descrita pelo médico escocês Francis Hamilton (Hamilton, 1822) e vem sendo usada em biotério desde os anos de 1950. Na década de 1980, o grupo liderado pelo Dr. George Streisinger da Universidade do Oregon, introduziu o uso de *D. rerio* em experimentos laboratoriais contribuindo para que este animal se tornasse um organismo modelo vertebrado. Os adultos apresentam comprimento total entre 3 a 4 cm, possuindo vida média em torno de três anos, atingindo a maturidade sexual com 3 meses de idade e se reproduzindo em temperatura média de 26-28 °C (STREISINGER *et al.*, 1981; DAMMSKI *et al.*, 2011).

Desde então, uma grande variedade de ferramentas e informações estão disponíveis para os estudos toxicológicos utilizando este peixe, incluindo a disponibilidade da sequência de seu genoma (SEGNER, 2009). Diante dessas características descritas a espécie *D. rerio* vem sendo utilizada para investigar fármacos e também poluentes ambientais, pois possui grande sensibilidade quando exposto a produtos químicos por ser capaz de absorver de forma rápida os compostos que são diretamente adicionados na água (PARNG *et al.*, 2002; CLAIR *et al.*, 2012; WEBSTER *et al.*, 2014; ROY *et al.*, 2016; BRIDI *et al.*, 2017; LOPES *et al.*, 2018; PEREIRA *et al.*, 2018).

A espécie *D. rerio* é considerada um organismo modelo de vertebrado amplamente utilizado em ciências biológicas, em diferentes

áreas de pesquisa como genética, biologia do desenvolvimento, toxicologia. Diversas são as características que tornaram *D. rerio* um excelente modelo de estudo em toxicologia e reprodução, como: (i) as condições simples de manuseio, devido a seu porte pequeno, (ii) a forma cíclica de reprodução, ajustada aos fatores ambientais, (iii) as gônadas apresentam uma série de modificações morfológicas e fisiológicas, (iv) a capacidade de se reproduzir a cada 1-4 semanas, neste período a fêmea pode desovar cerca de 200-300 ovos, (v) sua fertilização é externa, (vi) desenvolvimento embrionário rápido e externo e (vii) as larvas e os indivíduos adultos podem ser mantidos a uma densidade elevada em aquários de laboratório (GRUNWALD E EISEN, 2002; AKINGBEMI *et al.*, 2004; SEGNER, 2009; DAMMSKI *et al.*, 2011; HUSZNO E KLAG, 2012; HE *et al.*, 2014).

1.2.1 Estrutura Testicular e Espermatogênese de *Danio rerio*

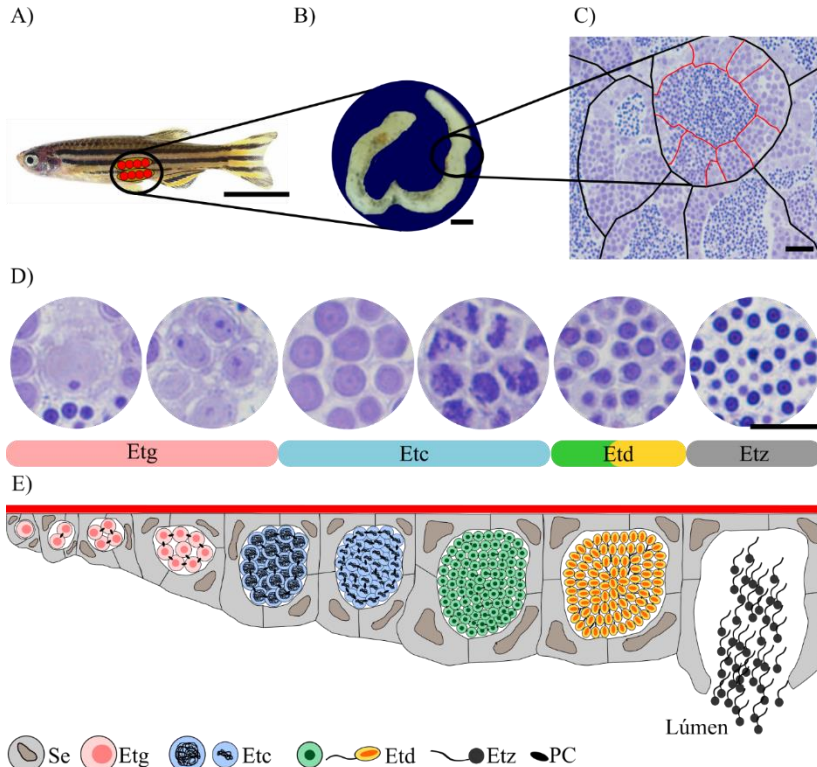
D. rerio é uma espécie dioica, os testículos são órgãos pares e alongados, de cor cinza claro, individualizados em toda sua extensão, localizados em ambos os lados da bexiga natatória, unindo-se apenas na extremidade caudal, para formar o ducto espermático que se abre na papila urogenital (VAN DER VEN E WESTER, 2003; RUPIK *et al.*, 2011).

O testículo de *D. rerio* é composto por túbulos seminíferos organizados em cistos germinativos, próximos a parede do túbulo. Esses cistos contêm as células germinativas em diferentes fases da espermatogênese (espermatogônia indiferenciada → espermatogônia diferenciada (tipo A) → espermatogônia do tipo B, 9 gerações em peixe-zebra (LEAL *et al.*, 2009a) → espermatócito primário → espermatócito secundário → espermátides → espermatozoides) e são delimitados pelas células somáticas de Sertoli. Os cistos germinativos delimitam o lúmen do túbulo seminífero, onde estão os espermatozoides (LEAL *et al.*, 2009a; NÓBREGA *et al.*, 2009; SCHULZ *et al.*, 2010). Na região intersticial, entre os túbulos seminíferos, estão as células esteroidogênicas de Leydig, células do tecido conjuntivo e vasos sanguíneos (NÓBREGA *et al.*, 2009; SCHULZ *et al.*, 2010; RUPIK *et al.*, 2011; HUSZNO E KLAG, 2012) (Figura 2).

A formação do cisto germinativo é iniciada quando as extensões citoplasmáticas de uma ou duas células de Sertoli envolvem uma única espermatogônia, que inicia o processo de proliferação. Devido a citocinese incompleta, as células resultantes das divisões mitóticas das espermatogônias, e posteriores divisões meióticas dos espermatócitos, permanecem interconectadas por pontes citoplasmáticas, que mantem as

células germinativas num mesmo estágio dentro de um mesmo cisto. Essas características permitem a classificação da espermatogênese de *D. rerio* em cística e sincrônica (PUDNEY, 1995; SCHULZ E MIURA, 2002; SCHULZ *et al.*, 2005; URIBE *et al.*, 2015; YOSHIDA, 2016).

Figura 2: Organização do testículo de *Danio rerio*.



Exemplar de macho com representação da localização dos testículos (A). Testículo dissecado (B). Seção transversal de testículo corado com azul de toluidina, evidenciando os túbulos seminíferos (delimitados em preto), compostos por cistos germinativos em diferentes fases da espermatogênese (delimitados em vermelho) (C). Seções semifinas de células germinativas coradas com azul de toluidina: espermatogônias (Etg), espermatócitos (Etc), espermátides (Etd) e espermatozoides (Etz) (D). Desenho esquemático da espermatogênese cística, onde células de Sertoli (Se) envolvem as células germinativas, formando os cistos germinativos (E – modificado de Yoshida (2016)). Ponte citoplasmática (PC). Barras de escala em A= 1cm, em B=1mm, em C= 20 µm, em D=10 µm.

No processo de espermatogênese as células germinativas dependem da interação contínua com as células de Sertoli (SCHULZ *et al.*, 2005; SCHULZ *et al.*, 2010). Essa interação é responsável pela regulação fisiológica e repasse hormonal, oriundos das células de Leydig, para o crescimento e diferenciação das células germinativas. Além do controle hormonal, por exemplo, a espermatogênese é regulada também pelo produto dos genes que codificam fatores de crescimento, como o fator derivado gonadal (*gonadal soma-derived fator – gsdf*), responsável pela regulação da proliferação de espermatogônias, e *sox9a* (*SRY-related HMG-box gene 9*), ambos encontrados em células de Sertoli, a regulação desses genes muda ao longo das diferentes fases da espermatogênese (RODRÍGUEZ-MARÍ *et al.*, 2005; ALMEIDA *et al.*, 2008; HOFMANN, 2008; RAGHUVÉER E SENTHILKUMARAN, 2010; SCHULZ *et al.*, 2010; GAUTIER *et al.*, 2011; ADOLFI *et al.*, 2015).

Para manter essa estrutura cística, as células de Sertoli proliferam principalmente durante a fase mitótica das espermatogônias, aumentando em até 9 vezes seu número (LEAL *et al.*, 2009a). Concomitante com a proliferação ocorre a formação de junções íntimas entre as células de Sertoli vizinhas, proporcionando um aumento neste ambiente específico para a diferenciação de células germinativas (SCHULZ *et al.*, 2005). Outra característica importante dessa célula, está relacionado com a capacidade de manter cerca de 100 espermátides por célula de Sertoli (MATTA *et al.*, 2002; SCHULZ *et al.*, 2005; ALMEIDA *et al.*, 2008; FRANÇA *et al.*, 2016).

Entre as funções fisiológicas da célula de Sertoli, está a secreção de fluídos para o lúmen e a fagocitose. O processo de fagocitose é muito importante para a remoção de corpos residuais das espermátides durante a espermiogênese, de modo que tais resíduos celulares raramente aparecem no interior dos cistos germinativos e/ou no lúmen (ALMEIDA *et al.*, 2008; SCHULZ *et al.*, 2010). Juntamente com a fagocitose o processo de autofagia é requerido no metabolismo das células de Sertoli (HORIBE *et al.*, 2019). O processo de autofagia é caracterizado pela formação e expansão de membranas duplas para organização do autofagossoma. Esse processo é regulado por proteínas da família das ATG, associadas as proteínas de cadeia leve 3 da proteína 1 associada a microtúbulos (MAP1-LC3II). O autofagossoma se funde com os lisossomos, através da proteína de membrana 2 associada ao lisossomo (LAMP-2), de modo que o conteúdo desta vesícula seja digerido pelas enzimas lisossômicas (NAKATOGAWA *et al.*, 2009; YANG E KLIONSKY, 2010; MA *et al.*, 2015; DUAN *et al.*, 2016; LIU *et al.*, 2016a; LIU *et al.*, 2016b; OROZCO-GARCÍA E GALLEGU-GÓMEZ, 2016; HORIBE *et al.*, 2017; KOTIL *et al.*, 2017; MATHAI *et al.*, 2017).

As células de Leydig são encontradas juntamente com o tecido conjuntivo frouxo de preenchimento, no espaço entre os túbulos seminíferos, com função na biossíntese de hormônios esteroides, como o 11-cetotestosterona (11-KT) (SCHULZ *et al.*, 2010). Nessa biossíntese, a proteína esteroidogênica reguladora aguda (*steroidogenic acute regulatory - star*), que medeia a transferência de colesterol da membrana mitocondrial externa para a interna, onde as proteínas da família da enzima P450sc (*cholesterol side-chain cleavage enzyme, mitochondrial*), como por exemplo as *cyp11a1* (*cytochrome P450 family 11 subfamily A member 1*) e *cyp17a1* (*cytochrome P450 family 17 subfamily A member 1*), iniciam a síntese de hormônios esteroides (WALSH *et al.*, 2000; NÓBREGA *et al.*, 2009; SCHULZ *et al.*, 2010).

O processo de espermatogênese propriamente dito, é conservado entre as diferentes espécies de peixe, sobretudo nos aspectos estruturais e funcionais deste processo biológico, os quais se assemelham a outros vertebrados (SCHULZ E MIURA, 2002; WEISBROD *et al.*, 2007; SCHULZ *et al.*, 2010). O processo de espermatogênese pode ser dividida em três etapas principais: (i) etapa de proliferação das espermatogônias, caracterizada por rápidas e sucessivas divisões mitóticas; (ii) etapa de divisões meióticas onde o material genético é duplicado, recombinado e segregado, formando os espermatócitos, e espermátides; e (iii) etapa de diferenciação onde as espermátides passam por mudanças morfofuncionais, como a condensação nuclear e a formação do flagelo, dando origem aos espermatozoides (SCHULZ E MIURA, 2002; LEAL *et al.*, 2009a; NÓBREGA *et al.*, 2009; RUPIK *et al.*, 2011) (Figura 3).

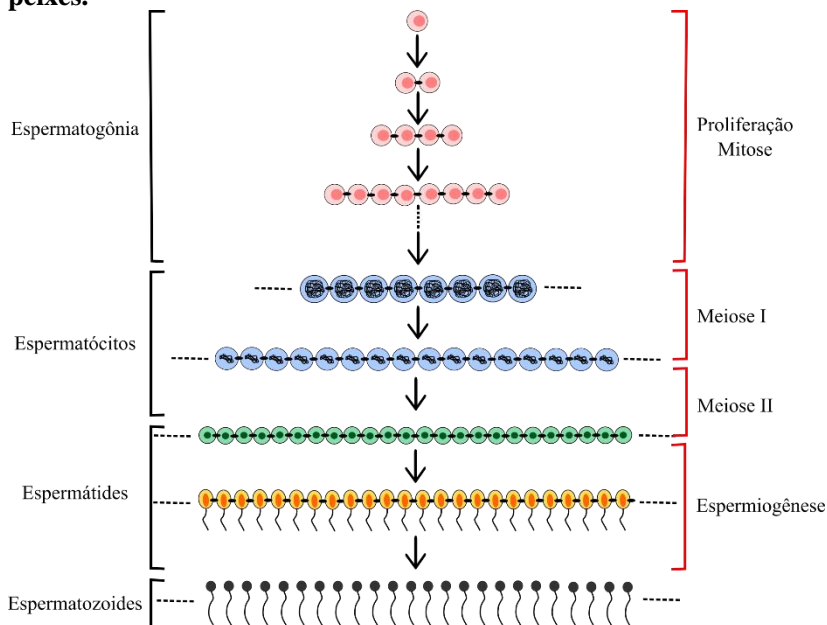
No início da espermatogênese, na etapa de proliferação, as espermatogônias diploides são classificadas como do tipo A e do tipo B, num processo regulado pelo gene *ziwi1* (*piwi-like RNA-mediated gene silencing 1*). As espermatogônias do tipo A, apresentam núcleo central e citoplasma volumoso, passam por constantes divisões mitóticas dentro do cisto, mantendo a ligação entre as mesmas através das pontes citoplasmáticas, sendo consideradas células fonte germinativas. As espermatogônias do tipo B, são menores e depois de um número espécie-específico de divisões mitóticas, crescem e passam a espermatócitos primários, iniciando a fase meiótica (SCHULZ E MIURA, 2002; LEAL *et al.*, 2009a; LEAL *et al.*, 2009b; NÓBREGA *et al.*, 2009; RUPIK *et al.*, 2011).

Na etapa de meiose, regulada pelo gene *ziwi2* (*piwi-like RNA-mediated gene silencing 1*), os espermatócitos podem ser identificados por características nucleares, como tamanho e condensação cromossômica. Os espermatócitos primários iniciam dois ciclos celulares, a meiose I e II, na meiose I (reducional), os cromossomos homólogos são

separados nos espermatócitos secundários, na meiose II (equacional), as cromátides irmãs são separadas, resultando em quatro espermátides haploides conectadas por pontes citoplasmáticas (LEAL *et al.*, 2009a; SCHULZ *et al.*, 2010; LIM *et al.*, 2013).

Na última etapa, de diferenciação, ocorre a espermiogênese, onde as espermátides passam por uma série de transformações morfológicas, que incluem condensação nuclear, eliminação de organelas e redução do citoplasma, formação do flagelo, rearranjo das organelas celulares no citoplasma do futuro espermatozoide. Ao final desta etapa, as pontes citoplasmáticas intracelulares são rompidas, o complexo juncional entre as células de Sertoli passa por um remodelamento para abertura do cisto germinativo e os espermatozoides são liberados para o lúmen. Os espermatozoides têm um núcleo esférico com cromatina altamente condensada e homogênea (SCHULZ *et al.*, 2010; RUPIK *et al.*, 2011).

Figura 3: Esquema representando o processo de espermatogênese de peixes.



O processo de espermatogênese é dividido em três etapas: proliferação e mitose das espermatogônias, etapa de divisões meióticas e etapa de espermiogênese (diferenciação das espermátides – espermatozoides). A citocinese incompleta deixa as células germinativas interconectadas através das pontes citoplasmáticas (PC -). Modificado de Yoshida (2016).

O número de células germinativas por cisto germinativo aumenta expressivamente, de 1 ± 1360 células de espermatogônias do tipo A até as espermátides. A duração da espermatogênese é de aproximadamente 6 dias, um dos períodos mais curtos entre os peixes teleósteos (LEAL *et al.*, 2009a).

Por fim, a partir do panorama apresentado nesta introdução e considerando (i) a estrutura celular do testículo, composta por células das linhagens somáticas e germinativas, (ii) a estreita interação entre as células de Sertoli e as células germinativas, (iii) o efeito do glifosato em organismos não-alvos, onde certamente os peixes estão incluídos, definimos algumas questões que este estudo se propõe a responder:

A exposição ao Roundup WG altera o processo de espermatogênese no testículo de *D. rerio*, especificamente:

1. Como as células de Sertoli, responsáveis pela manutenção e aporte das células germinativas, respondem à exposição ao herbicida Roundup WG?

2. O herbicida Roundup WG é capaz de provocar toxicidade reprodutiva inibindo a produção de espermatozoides ou alterando sua morfologia?

Considerando o crescente aumento no uso de herbicidas a base de glifosato em todo território brasileiro, a facilidade com que este chega aos corpos de água, atingindo organismos não alvo, a controvérsia em relação aos seu limite máximo seguro ao meio ambiente, estabelecemos como hipóteses científicas desta tese: (i) a exposição ao herbicida a base de glifosato promove a perda da interação entre as células somáticas e germinativas, com isso, diminuindo ou inibindo o processo de espermatogênese em peixes expostos. (ii) a exposição ao herbicida a base de glifosato provoca toxicidade reprodutiva induzindo alterações morfológicas e ultraestruturais no testículo de *D. rerio*.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Caracterizar a toxicidade do herbicida Roundup WG sobre a morfologia testicular, considerando as células somáticas e germinativas, bem como sobre a qualidade espermática durante o processo de espermatogênese de *D. rerio*.

2.2 ESPECÍFICOS

Determinar a biometria e morfologia dos testículos de *D. rerio* após a exposição a diferentes concentrações do herbicida Roundup WG por 7 e 15 dias;

Investigar o efeito do herbicida Roundup WG, sobre a integridade ultraestrutural de células germinativas e somáticas de testículo de *D. rerio* expostos a diferentes concentrações por 15 dias;

Quantificar o número de células germinativas nos testículos de *D. rerio* expostos ao herbicida Roundup WG por 7 e 15 dias;

Avaliar a integridade das mitocôndrias e do DNA genômico das células germinativas em machos de *D. rerio* expostos ao herbicida Roundup WG por 7 e 15 dias;

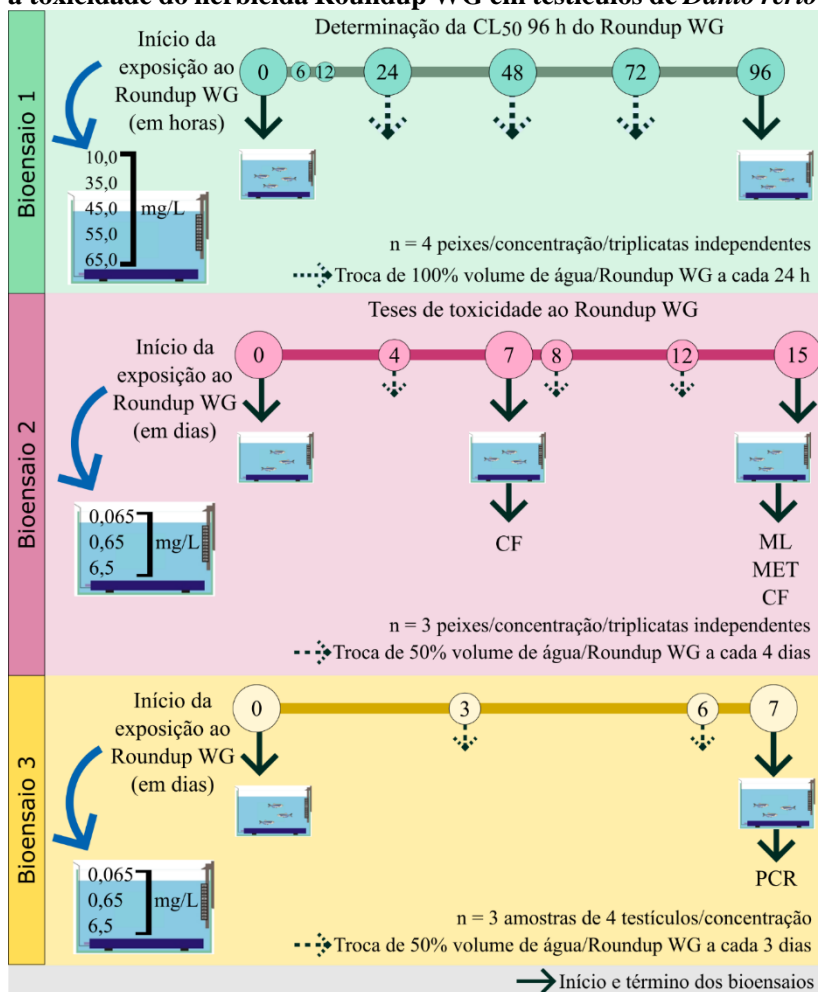
Avaliar o perfil transcricional dos genes envolvidos na formação de vesículas autofágicas, relacionado a integridade de células germinativas e somáticas de machos de *D. rerio* expostos ao herbicida Roundup WG por 7 dias;

Avaliar o perfil transcricional de genes envolvidos no processo de manutenção da espermatogênese (*cyp11a1*, *cyp17a1*, *star*, *sox9a*, *gsdf*, *ziwi1* e *ziwi 2*) de *D. rerio* expostos ao herbicida Roundup WG por 7 dias.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Figura 4: Delineamento experimental demonstrando as características dos bioensaios e as técnicas utilizadas para investigar a toxicidade do herbicida Roundup WG em testículos de *Danio rerio*.



Organograma das atividades experimentais realizadas e técnicas utilizadas para investigar a toxicidade do herbicida Roundup WG. Citometria de Fluxo

(CF), microscopia eletrônica de transmissão (MET), microscopia de luz (ML), RT-qPCR (PCR).

3.2 OBTENÇÃO DOS ANIMAIS

Machos adultos (em idade reprodutiva) da espécie *D. rerio* foram obtidos em distribuidores especializados na comercialização de animais aquáticos e transportados para o Laboratório de Reprodução e Desenvolvimento Animal (LRDA), Centro de Ciências Biológicas (CCB), Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) em condições apropriadas de oxigenação e ao abrigo da luz, para minimizar o estresse fisiológico. Durante o período de 7 dias de aclimatação, os peixes em uma proporção de 2 g/L, foram mantidos em aquários com água corrente de clorada pH 7,0 ($\pm 0,5$), com aeração contínua, temperatura (28 ± 2 °C), em condição de 12 h claro: 12 h escuro, sendo utilizada a lâmpada Philips TLT 40 W para o período claro. Os parâmetros de qualidade da água dos aquários, como temperatura e pH foram monitorados diariamente e semanalmente, respectivamente. Os peixes foram alimentados duas vezes ao dia com ração comercial para peixe (Alcon Base).

Todos os procedimentos adotados na tese foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFSC), projeto número 5466040416/2016. Os bioensaios e as análises foram realizadas no LRDA, utilizando também os equipamentos do Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) e do Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia (LAMEB).

3.3 HERBICIDA

O herbicida utilizado foi a formulação comercial Roundup WG (Monsanto do Brasil Ltda), registrada no Ministério Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) sob nº 002094. A formulação contém 720,0 g/kg de equivalente de ácido de N-(fosfometil)glicina (glifosato). Todas as concentrações utilizadas no trabalho foram calculadas a partir da quantidade de glifosato contida na formulação do Roundup WG.

3.4 DETERMINAÇÃO DA CL₅₀ 96 h DO ROUNDUP WG

O teste de toxicidade aguda por 96 h foi realizado de acordo com o protocolo definido pela Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD), Teste N°203 (OECD, 1992), adaptado para as diferentes concentrações utilizadas nesta tese, através do

cálculo da CL_{50} , definida como a concentração de um composto químico que causa mortalidade de 50% dos organismos expostos, dentro de um determinado tempo. Seguindo o protocolo, os peixes foram expostos ao Roundup WG, por um período de 96 h, com renovação de 100% das concentrações testadas a cada 24 h. Os peixes ($n = 2$ peixes/L, total de 4 peixes em cada concentração testadas/triplicatas independentes) com aeração constante, temperatura de $28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, em condição de 12 h claro: 12 h escuro. A alimentação foi suspensa 24 h antes e durante o período de exposição ao herbicida. As concentrações utilizadas para avaliar a toxicidade aguda foram 10,0 mg/L, 35,0 mg/L, 45 mg/L, 55 mg/L e 65 mg/L de glifosato contido no Roundup WG. Os peixes do grupo controle não foram expostos ao Roundup WG (0,00 mg/L) e foram mantidos nas mesmas condições dos grupos expostos, sendo a água dechlorada renovada a cada 24 h. A mortalidade foi registrada em seis intervalos de tempo (6, 12, 24, 48, 72 e 96 h) após o início do teste. O valor de CL_{50} 96 h e os seus correspondentes limites de confiança de 95% foram calculados usando o programa PriProbit versão 1.63 (SAKUMA, 1998).

3.5 DETERMINAÇÃO DA TOXICIDADE DO ROUNDUP WG

3.5.1 Exposição às concentrações do Roundup WG

Os peixes (machos e fêmeas) foram expostos a três concentrações do herbicida Roundup WG, a saber: 0,065 mg/L; 0,65 mg/L e 6,5 mg/L de glifosato contido no herbicida. Os peixes do grupo controle não foram expostos ao Roundup WG (0,00 mg/L). Durante a exposição, os peixes foram mantidos nas mesmas condições de aeração, temperatura e fotoperíodo da aclimatação.

A definição das concentrações de Roundup WG foi baseada inicialmente na concentração máxima permitida pelo CONAMA (Resolução n. 357/2005, que dispõe sobre os limites máximos de glifosato e classifica os corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento), de 65 $\mu\text{g/L}$ (0,065 mg/L). As duas outras concentrações foram determinadas por fator de 10, a partir da concentração máxima permitida pelo CONAMA.

Os peixes (machos e fêmeas) foram expostos durante 7 e 15 dias, na densidade de 2 peixes/L em aquários de 10 L. Os experimentos foram realizados em triplicatas e em condição semi-estática, sendo que 50% da água dos aquários foi trocada a cada 4 dias para manter a qualidade da água e renovar as concentrações de glifosato (GHOLAMI-SEYEDKOLAEI *et*

al., 2013). Os períodos de 7 e 15 dias de exposição foram definidos com base nos valores estimados de meia-vida do glifosato em água (GIESY *et al.*, 2000), e considerando o protocolo da Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos da América (USEPA, do inglês *United States Environmental Protection Agency*) para testes de toxicidade de substâncias com potencial de desregular o sistema endócrino (ANKLEY *et al.*, 1998).

Após os períodos de exposição, os peixes foram submetidos à eutanásia por decapitação, de acordo com as normativas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA, 2013). Em seguida, os peixes foram pesados e dissecados para obtenção dos testículos, os quais foram destinados para as diferentes técnicas e análises propostas no desenho experimental.

Após cada experimento, a água dos aquários contendo herbicida Roundup WG foi descartada junto ao Sistema de Gestão de Resíduos Líquidos da UFSC.

3.5.2 Biometria corporal e determinação do índice gonadossomático (IGS)

Para obtenção dos dados biométricos, foram obtidas as medidas de massa corporal (mg) e dos testículos (mg) de machos de *D. rerio*. Essas medidas foram utilizadas para o cálculo do Índice gonadossomático (IGS), através da fórmula: (massa do testículo/massa do macho) x 100 (LEAL *et al.*, 2009a).

3.5.3 Análises morfológicas dos testículos

Os testículos (n = 3 pares de testículo/concentração/triplicatas independentes) foram fixados na solução de glutaraldeído a 0,5% + paraformaldeído a 2% diluídos em tampão cacodilato de sódio a 0,05 M (pH 7,2), durante 24 h a 4°C. A desidratação foi realizada em série crescente de etanol (50%, 70%, 90% e 100%) por 30 min cada. A infiltração foi feita em série crescente de resina LR White (Sigma-Aldrich) diluída em etanol PA (1:2, 1:1, 2:1, resina pura) por 12 h cada. Após polimerização da resina em capsula fechada em estufa 60°C por 24 h, os blocos confeccionados foram seccionados em ultramicrótomo (LCME), para a obtenção de secções semifinas (700 nm). As secções foram montadas seriadamente em lâminas histológicas previamente tratadas com polilissina. Cada lâmina continha secções dos quatro grupos experimentais, proporcionando as mesmas condições durante a realização

da técnica. As lâminas foram coradas com azul de toluidina a 1% + 1% de borato de sódio (pH 4,5) por 45 seg a 60°C, em seguida lavadas em água destilada, deixadas secar a temperatura ambiente e montadas com Entellan® (Merck), após, foram analisadas sob microscópio de luz (400 e 1000X). A aquisição das fotos foi realizada no microscópio de luz invertida Olympus IX83, com sistema de captura Olympus DP73 (17 mpixel) e o programa CellSens Dimension 1.12 (LAMEB). A análise da estrutura dos testículos foi realizada com base nas descrições de Schulz *et al.* (2010).

3.5.4 Análise ultraestrutural por microscopia eletrônica de transmissão

Os testículos (n = 2 pares de testículo/concentração/triplicatas independentes) foram fixados em solução de glutaraldeído a 2,5% + paraformaldeído a 4% diluídos em tampão cacodilato de sódio a 0,1 M (pH 7,2), durante 24 h a 4°C. A pós-fixação foi realizada em solução de tetróxido de ósmio a 1% diluído em tampão cacodilato de sódio a 0,1 M por 2 h a temperatura ambiente. Na sequência a desidratação foi realizada em série crescente de acetona (30%, 50%, 70%, 90% e 100%) 30 min cada e a infiltração foi feita em série crescente de resina Spurr em acetona PA (1:3, 1:2, 1:1, 2:1; 3:1; resina pura) por 24 h cada. Após polimerização da resina em estufa 70°C por 24 h, os blocos confeccionados foram seccionados em ultramicrotomo para a obtenção de secções semifinas (700 nm) e ultrafinas (70 nm) (LCME). As secções semifinas foram coradas com azul de toluidina a 1% + 1% de borato de sódio (pH 4,5) e observadas ao microscópio de luz para controle da orientação e observação da qualidade do material para posterior realização das secções ultrafinas. As secções ultrafinas foram coletadas em grades de 300 *mesh*, contrastadas com acetato de uranila a 5% por 20 min e citrato de chumbo a 1% por 5 min e observadas ao microscópio eletrônico de transmissão Jeol JEM 1011 (LCME).

Para a análise ultraestrutural das células somáticas e germinativas foi adotada a atribuição de escores para a quantificação das frequências de alterações celulares (Quadro 1), sendo (-) ausência (0%); (+) baixa frequência (25%); (++) média frequência (50%); (+++) moderada frequência (75%); (++++) alta frequência (100%). Nessa etapa foram analisadas 45 células de Sertoli por grupo.

Quadro 1: Alterações ultraestruturais a serem avaliadas nas células somáticas e germinativas nos testículos de *D. rerio*

Tipo Celular	Alterações celulares
Células de Sertoli	Citoplasma menos eletrodense; Presença de vesículas; Mitocôndrias dilatadas e perda de cristas mitocondriais; Ruptura de membrana plasmática nos prolongamentos celulares.
Espermatócitos	Mitocôndrias dilatadas e perda de cristas mitocondriais; Ruptura de membrana plasmática.
Espermatozoides	Material genético não-condensado e excesso de citoplasma; Ruptura de membrana plasmática; Presença no lúmen de espermatogônias e espermatócitos, juntamente com os espermatozoides.

3.5.5 Análises por citometria de fluxo

A quantificação do número de células germinativas e as análises das fases do ciclo celular e de integridade destas células foram realizadas por meio de citometria de fluxo, utilizado o Citômetro de Fluxo BD FACSCanto™ II (BD Biosciences) (LAMEB). Em todas as análises foi adotado o mesmo parâmetro de leitura celular, 20.000 eventos por amostra, sendo as especificidades de cada análise descritas abaixo:

3.5.5.1 Quantificação do número de células germinativas

Os testículos (n = 3 pares de testículos/concentração/triplicatas independentes) foram fragmentados manualmente com pistilo em tampão fosfato salino a 0,01 M (PBS, do inglês *Phosphate Buffered Saline*, Na₂HPO₄ a 0,01 M + KH₂PO₄ a 0,0015 M + KCl a 0,0027 M + NaCl a 0,137 M) pH 7,8 a 4°C. Após, as células foram dissociadas com tampão tripsina (1 mg/mL) por 30 min em banho-maria a 37°C. Posteriormente, foi adicionado soro fetal bovino a 10%, permanecendo as amostras em agitação por 15 min a 4°C. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 640 x g por 5 min a 4°C. Ao sobrenadante foi adicionado Triton-X100 a 0,1% e corante Hoechst-33258 a 1 mM (*Bisbenzimidazole H 33258 Fluorochrome, Trihydrochloride* – Calbiochem, corante fluorescente de

DNA), sendo as amostras mantidas em agitação por 15 min a 4°C, ao abrigo da luz. A identificação dos diferentes tipos de células germinativas foi realizada de acordo com os parâmetros definidos por Lima *et al.* (2016) (Quadro 2):

Quadro 2: Características nucleares das células germinativas masculinas, utilizados para a quantificação por citometria de fluxo

Células germinativas		Número de cópias de DNA
Espermatogônias	Diploide - 2n	2C
Espermatócitos I	Diploide - 2n	4C
Espermatócitos II	Haploide - n	2C
Espermátides	Haploide - n	1C
Espermatozoides	Haploide - n	1C

3.5.5.2 Identificação das fases do ciclo celular

O processamento inicial dos testículos ($n = 3$ pares de testículo/concentração/triplicatas independentes) até a centrifugação das amostras foi realizado de acordo com o item 3.5.5.1 desta metodologia. Em seguida, foi adicionado etanol gelado a 70% ao sobrenadante das amostras, sendo mantidas por 30 min a -4°C. Posteriormente, as amostras foram novamente centrifugadas a 640 x g por 5 min a 4°C, sendo que o precipitado foi ressuspensão em tampão PBS pH 7,8 contendo Triton-X100 a 0,1% e RNase (100 µg/mL), sendo as amostras marcadas com iodeto de propídeo (marcador nuclear fluorescente) e mantidas em agitação por 10 min a 4°C, ao abrigo da luz.

3.5.5.3 Índice de fragmentação de DNA

Os testículos ($n = 3$ pares de testículo/concentração/triplicatas independentes) foram fragmentados manualmente com pistilo em tampão PBS a 1M pH 7,8 a 4°C e centrifugados a 640 x g por 5 min a 4°C. O sobrenadante foi dividido em alíquotas de 140 µL, as quais foram adicionados 70 µL de tampão TNE (Tris-HCl a 0,01 M + NaCl a 0,15 M + EDTA a 1 mM) pH 7,2 e incubadas por 30 seg. Após, foi acrescentado às amostras Triton X-100 a 0,1% (concentração final), que foram incubadas por 30 seg, e adicionado 5 µL de Laranja de Acridina mantidas ao abrigo da luz por 5 min.

Os parâmetros para a determinação do índice de fragmentação do DNA foram definidos por Everson *et al.* (1994; 2016) no ensaio de estrutura da cromatina espermática (SCSA, do inglês *Sperm Chromatin Structure Assay*), onde a fluorescência verde indica o DNA íntegro e a fluorescência vermelha indica DNA fragmentado. O índice de fragmentação do DNA foi definido por:

$$\% \text{ IFD} = \frac{\text{número de eventos (fluorescência vermelha)}}{\text{número de eventos total (fluorescência vermelha+verde)}} \times 100$$

3.5.5.4 Análise do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$)

Os testículos (n = 3 pares de testículo/concentração/triplicatas independentes) foram fragmentados manualmente com pistilo em tampão PBS a 1M pH 7,8 a 4°C e centrifugados a 640 x g por 5 min a 4°C. O sobrenadante foi dividido em alíquotas de 200 µL e adicionado a sonda JC-1 (5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolyl carbocyanine iodide - ThermoFisher Scientific) a 2 µM (concentração final). As amostras foram incubadas por 15 min a 10°C, ao abrigo da luz (modificado de Figueroa *et al.* (2015)). O controle da reação foi realizado usando o disruptor do potencial de membrana mitocondrial CCCP 50 µM (cianeto carbonil mclorofenil-hidrazona, concentração final), adicionado antes do tratamento com JC-1, por 5 min a 10°C, ao abrigo da luz.

A taxa de funcionalidade das mitocôndrias foi calculada pela equação descrita por Silveira *et al.* (2019), onde a fluorescência verde indica mitocôndrias não funcionais (baixo $\Delta\psi_m$) e a fluorescência vermelha indica mitocôndrias funcionais (alto $\Delta\psi_m$), como segue:

$$\% \Delta\psi_m = \frac{\text{número de eventos (fluorescência vermelha)}}{\text{número de eventos total (fluorescência vermelha+verde)}} \times 100$$

3.5.5.5 Quantificação de espécies reativas de oxigênio (ERO)

Os testículos (n = 3 pares de testículo/concentração/triplicatas independentes) foram fragmentados manualmente com pistilo em tampão PBS a 1M pH 7,8 a 4°C e centrifugados a 640 x g por 5 min a 4°C. O sobrenadante foi dividido em alíquotas de 200 µL e adicionado H₂DCFH-DA (2',7'-diacetado de dicloro-di-hidro-fluoresceína, Sigma-Aldrich) a 10 µM (concentração final), incubadas por 30 min a 37°C. A produção de ERO foi quantificada pelo número de eventos com intensidade de fluorescência verde emitida.

3.5.6 Análise do perfil transcricional

Para avaliar os níveis de transcritos dos genes *atg5*, *atg6*, *maplc3II* e *lamp2*, que codificam proteínas envolvidas na formação de vesículas autofágicas, assim como dos *star*, *cyp11a1* e *cy17a1*, que codificam proteínas esteroidogênicas, genes *sox9a*, *gsdf* presentes em células de Sertoli, *ziwi1* e *ziwi2* que codificam proteínas de células germinativas, foi realizada a RT-qPCR em amostras testículos de *D. rerio* expostos por 7 dias ao herbicida Roundup WG nas concentrações de 0,065 mg/L; 0,65 mg/L e 6,5 mg/L, e um grupo controle. Os iniciadores específicos para esses genes foram desenhados utilizando o programa Primer3Plus (Bioinformatics), e a análise de formação de dímeros foi realizada com o programa OligoAnalyser 3.1 (Quadro 3).

A estabilidade da expressão de 6 genes de referência (*β -act*, *gapdh*, *ef1a*, *b2m*, *rpl8*, *hprt1*) e 1 elemento repetitivo (*hatn10*), foi avaliada em testículos de *D. rerio* nas mesmas condições experimentais acima citadas (JARAMILLO *et al.*, 2018).

3.5.6.1 Extração do RNA total

O RNA total foi extraído dos testículos de *D. rerio* expostos por 7 dias ao herbicida Roundup WG nas concentrações de 0,065 mg/L; 0,65 mg/L e 6,5 mg/L, e um grupo controle (n = 3 amostras contendo pool de 2 pares de testículo /concentração/triplicatas independentes) utilizando o reagente Trizol (*Thermo Fisher Scientific*), de acordo com as instruções do fabricante. As amostras foram homogeneizadas em Trizol e centrifugadas (12.000 x g por 10 min a 4 °C). Ao sobrenadante foram adicionados 200 μ L de clorofórmio gelado (5:1 Trizol/Clorofórmio) e as amostras foram centrifugadas novamente (12.000 x g por 15 min a 4 °C). A fase aquosa foi coletada e adicionada 500 μ L de isopropanol e novamente centrifugado (12.000 x g por 15 min a 4 °C). Depois de eliminar o sobrenadante, o sedimento foi lavado com etanol 75%, centrifugado (12.000 x g por 10 min a 4 °C) e diluído em água tratada com dietilpirocarbonato (DEPC). As amostras foram tratadas com DNase I (1 U/mL, *Thermo Scientific*®) durante 30 min a 37 °C e 10 min a 65 °C. Em seguida, as amostras (100 μ L) foram precipitadas utilizando 10 μ L acetato de sódio (3 M, pH 5,2) e 110 μ L de isopropanol. Depois da centrifugação (12.000 x g por 10 min a 4 °C), os sedimentos das amostras foram lavados com etanol 75%, secados, e solubilizados em água tratada com DEPC. A integridade de RNA foi verificada por eletroforese em géis de agarose a 1,5% corado com GelRed (1:500, Biotium). As eletroforeses

foram realizadas em tampão TAE 0,5 X de corrida (Tris-hidroximetilaminometano, ácido acético glacial, ácido etilenodiaminotetracético) a 100 V durante 30 min. Os géis foram fotodocumentados em ChemDoc MP (Bio-Rad). A quantificação do RNA total foi realizada através do Nano espectrofotômetro BIO-5000-BI (KASUAKI), e as amostras com valores de 260/280 > 1,8 foram selecionadas para a síntese de cDNA.

3.5.6.2 Síntese de cDNA

A partir das amostras de RNA total, a síntese de DNA complementar (cDNA) foi realizada usando o Kit de Transcriptase Reversa GoScript™ (Promega), de acordo com as instruções do fabricante. A reação de síntese consistiu em 1 µg do RNA total, 0,25 µg do primer oligo(dT)₁₅ e 0,25 µg *random* iniciadores, 4 µL de GoScript 5X Reaction Buffer, 2,5 mM de MgCl₂, 1 µL de mix de nucleotídeos (10 mM), inibidor de ribonuclease (20 unidades) e 1 µL da enzima GoScript Reverse Transcriptase. Amostras de RNA total foram primeiramente misturadas com oligo (dT)₁₅ e *random* iniciadores seguido de incubação a 70 °C por 5 min, e imediatamente colocadas em gelo por 5min. As reações de cDNA foram mantidas a 25 °C por 5 min, a 42 °C por 50 min e 70 °C por 15 min. As amostras de cDNA foram diluídas em água deionizada (1:10) e armazenadas em -20 °C.

3.5.6.3 Análise da expressão gênica por RT-qPCR

Para cada gene, reações de qPCR foram realizadas em duplicata com 1 µL de cDNA diluído (1/10) de cada uma das amostras. A reação de qPCR foi realizada utilizando o GoTaq® qPCR Master Mix (Promega) através do equipamento 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Cada reação de qPCR consistiu de 5 µL de GoTaq® Master Mix 2X, 0,5 µM de cada iniciador, 0,1 µL *CXR Reference Dye*, 2 µL de cDNA diluído (1/10) e água livre de nuclease em volume total de 10 µL. Para todas as amostras de cDNA foram realizadas reações em duplicata para cada gene. As condições de qPCR foram as seguintes: desnaturação a 95 °C durante 10 min, seguido de 40 ciclos de desnaturação a 95 °C durante 15 seg, anelamento e extensão a 62 °C durante 1 min. A eficiência de amplificação para cada gene foi calculada a partir de uma série de diluição (1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64) de *pools* de cDNA de todas as amostras usando a equação $E = 10^{-1/\text{slope}}$ (PFAFFL, 2001; 2004). Eficiências de amplificação, na faixa de 1,9 - 2,1 e coeficiente de correlação (R²) da curva padrão superior a 0,99, foram utilizadas nas

análises de RT-qPCR. A especificidade dos iniciadores foi avaliada por análises da curva de *Melting* e pela amplificação dos produtos de qPCR avaliados por eletroforese em gel de agarose 1,5% com GelRed (1:500, Biotium). Os níveis dos transcritos dos genes foram normalizados com o gene *eflα* e a expressão gênica relativa foi calculada pelo método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (LIVAK E SCHMITTGEN, 2001).

Quadro 3: Descrição dos iniciadores utilizados no ensaio de RT-qPCR de testículo de *Danio rerio* após exposição ao herbicida Roundup WG.

Gene		Sequência de iniciadores (5' e 3')	Produto amplificado (pb)
Símbolo	Nome		
<i>atg5</i> (NM_001009914)	<i>autophagy protein 5</i>	F: AGGCAGAGGATGTGGAGG R: GCAGAGCGGAGTTTGAAG	108
<i>atg16</i> NM_001017854	<i>autophagy-related protein 16-1</i>	F: CAATGCTGAGAACGAGAAGG R: TTACTGGGTGTGCGACTG	183
<i>map1-1c3II</i> NM_199604	<i>microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3B</i>	F: CGAGAGATACAAGGGAGAGAAG R: AAATGGCAGTGGACACAGA	182
<i>lamp2</i> NM_001013533	<i>lysosome-associated membrane glycoprotein 2 precursor</i>	F: TCTGTGGGAGGCTTCTGT R: GGGATTAAGAGGCTGGTG	177
<i>star</i> AF220435	<i>steroidogenic acute regulatory protein (StAR)</i>	F: CCCCAATGTCAAGCAAGTC R: CATCCCAGCCAGAAAACAG	163
<i>cyp11a1</i> NM_152953	<i>citocromo P450 família 11 subfamília A membro 1</i>	F: AGCAATACTGTCCCTCTCG R: CCTCAATCTGCTTCTGCTTC	174
<i>cyp17a1</i> NM_152953	<i>citocromo P450 família 17 subfamília A membro 1</i>	F: CGACAGTAAGATTGGGAAAGAAAG R: GATGAGGAGCGGAGAAACAG	118
<i>sox9a</i> BC093134	<i>SRY-related HMG-box gene 9</i>	F: CCGAGCCATTACAACGAG R: GGTGATGGAGGGAAATGAAG	105
<i>gsdf</i> NM_001114668	<i>gonadal somatic cell derived factor</i>	F: TTTGTGCTCCATCCGTC R: AGTTTCCAGAGTCCTCCG	196

<i>ziwi1</i> NM_183338	<i>piwi-like RNA-mediated gene silencing 1</i>	F: TGTGCAGTGAGACCAGAA R: GTGGGATGTTGAATGGGTC	186
<i>ziwi2</i> NM_001365624	<i>piwi-like RNA-mediated gene silencing 2</i>	F: ACCCATCCGTGTAGAGTT R: AGATGGTCCGAACGTTGAT	200
<i>βact</i> (LANG <i>et al.</i> , 2016)	<i>actin, beta 1</i>	F: CGAGCTGTCTTCCCATCCA R: TCACCAACGTAGCTGTCTTTCTG	86
<i>Cat</i> (WEBSTER <i>et al.</i> , 2014)	<i>catalase</i>	F: AGTTCCTCTGATTCCTGTG R: ATGGCGATGTGTGTCTGG	173
<i>ef1α</i> (LANG <i>et al.</i> , 2016)	<i>eukaryotic translation elongation factor 1 alpha</i>	F: TACAAATGCGGTGGAATCGAC R: GTCAGCCTGAGAAGTACCAGT	246
<i>gapdh</i> (LANG <i>et al.</i> , 2016)	<i>glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>	F: CGCTGGCATCTCCCTCAA R: TCAGCAACACGATGGCTGTAG	84
<i>b2m</i> (VANHAUWAERT <i>et al.</i> , 2014)	<i>beta-2-microglobulin</i>	F: TCTCCATTGAACTGCTGAAG R: ACGCTGCAGGTATATTCATC	142
<i>rpl8</i> (WEBSTER <i>et al.</i> , 2014)	<i>ribosomal protein L8</i>	F: CCGAGACCAAGAAATCCAGAG R: CCAGCAACAACACCAACAAC	91
<i>hpri1</i> (VANHAUWAERT <i>et al.</i> , 2014)	<i>hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1</i>	F: GAGGAGCGTTGGATACAGA R: CTCGTTGTAGTCAAGTGCAT	85
<i>hatn10</i> (VANHAUWAERT <i>et al.</i> , 2014)	<i>expressed repetitive elements, reference target</i>	F: TGAAGACAGCAGAAGTCAATG R: CAGTAAACATGTCAGGCTAAATAA	56

F = sequência *forward*

R = sequência *reverse*

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos a partir das análises realizadas foram apresentados em média e erro padrão. Foram realizadas análise de variância ANOVA de uma via para verificar o efeito das concentrações do Roundup WG (0,065; 0,65 e 6,5 mg/L) e do grupo controle, seguido de um teste post hoc de Tukey com grau de significância de 5%. Os resultados foram obtidos a partir de três experimentos independentes.

4 RESULTADOS

4.1 TOXICIDADE AGUDA DO ROUNDUP WG EM MACHOS de *D. rerio*

Após 24 h de exposição ao Roundup WG às concentrações de 35 mg/L, 45 mg/L, 55 mg/L e 65 mg/L foi observada mortalidade de 7,14%; 21,43%; 6,67% e 25%, respectivamente. Após 48 h, houve aumento da mortalidade nessas mesmas concentrações, passando a 14,28% de mortalidade na concentração de 35 mg/L; 42,86% para 45 mg/L; 46,67% para 55 mg/L e na concentração de 65 mg/L foi registrada a mortalidade de 100% dos peixes. Em 72 horas de exposição não foi mais observada mortalidade na concentração de 35 mg/L, o que se manteve até o final das 96 h de exposição. Já para as demais concentrações em 72 h foi observada uma taxa de mortalidade crescente, atingindo 57,14% para 45 mg/L e 80% para 55 mg/L. Após 96 h, nas concentrações de 45 mg/L e 55 mg/L foi registrada mortalidade de 64,29% e 93,33%, respectivamente (Figura 5). O teste Log-rank revelou que, de um modo geral, as curvas de sobrevivência foram dependentes ($\chi^2 = 79,23$; $df = 5$; $p < 0,0001$) das concentrações testadas e dos tempos avaliados. Ao final das 96 h de exposição, a concentração letal média (CL₅₀) determinada foi de 42,61 mg/L, com um intervalo de confiança 95% = [39; 46 mg/L] (Figura 6).

Figura 5: Curva de sobrevivência para *Danio rerio* após exposição ao herbicida Roundup WG. Os pontos na curva indicam a porcentagem média de sobrevivência nos intervalos de tempo de 24 h, 48 h, 72 h e 96 h para cada concentração testada (n = 4 peixes/concentração/triplicatas independentes).

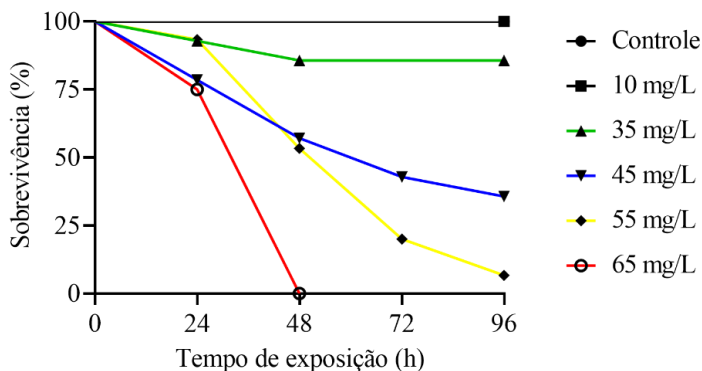
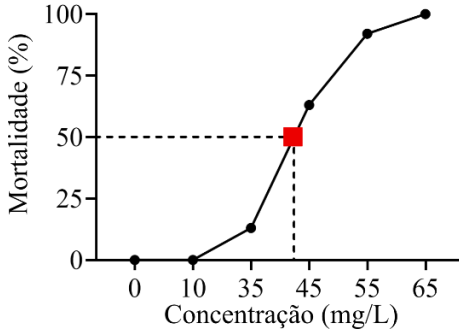


Figura 6: Concentração letal média (CL₅₀) determinada para machos de *Danio rerio* após a exposição ao Roundup WG por 96 h. O ponto vermelho indica a CL₅₀ 42,61 mg/L. (n = 4 peixes/concentração/triplicatas independentes).



4.2 EFEITO DO ROUNDUP WG SOBRE A BIOMETRIA CORPORAL E O ÍNDICE GONADOSSOMÁTICO (IGS)

A análise da biometria corporal e do IGS dos machos não demonstrou diferenças entre as concentrações testadas nos tempos de exposição de 7 e 15 dias (Tabela 1) indicando que todos os machos utilizados para os ensaios se encontravam em condições semelhantes, principalmente relacionadas à maturação dos testículos.

Tabela 1: Massa corporal/testículo e IGS de machos de *Danio rerio* após de exposição ao herbicida Roundup WG.

	Biometrias (mg)	Concentração Roundup WG (mg/L)			
		Controle	0,065	0,65	6,5
7 dias	Massa corporal	227,1 (± 96,9)	225,5 (± 89,3)	241,5 (± 78,9)	229,6 (± 81,9)
	Massa testículo	5,4 (± 1,9)	6,0 (± 1,8)	5,7 (± 2,0)	5,3 (± 1,3)
	IGS	2,504 (± 1,16)	2,379 (± 1,13)	2,334 (± 1,10)	2,326 (± 1,12)
15 dias	Massa corporal	303,6 (± 84,8)	284,5 (± 67,1)	283,5 (± 86,0)	288,2 (± 67,6)
	Massa testículo	6,2 (± 2,0)	6,0 (± 1,9)	6,3 (± 2,0)	6,4 (± 2,0)
	IGS	1,879 (± 0,87)	1,871 (± 0,81)	1,840 (± 1,10)	1,61 (± 0,77)

(n = 33 peixes/concentração). Dados apresentados em valores de média ± desvio padrão.

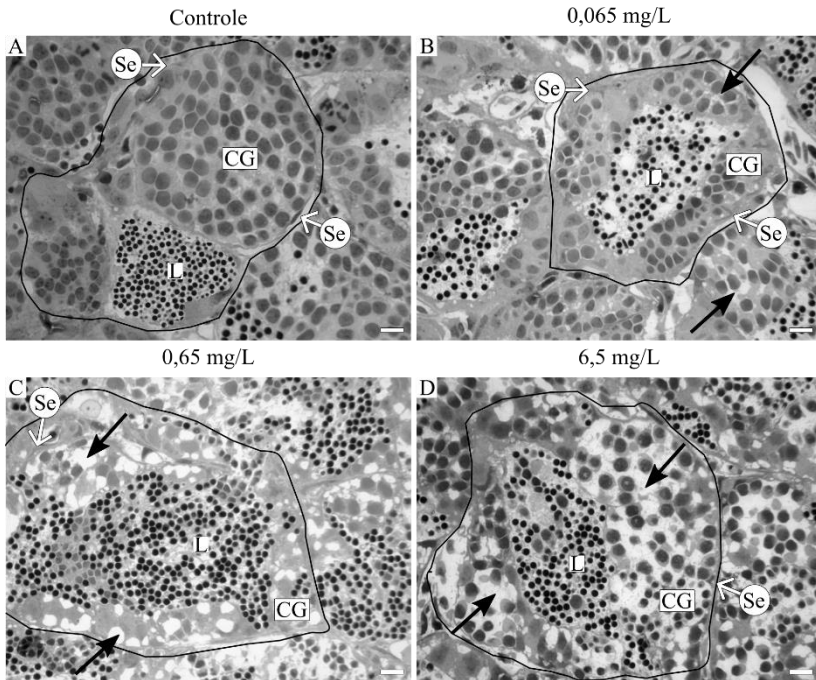
4.3 EFEITO DA EXPOSIÇÃO POR 15 DIAS AO ROUNDUP WG SOBRE A MORFOLOGIA DOS TESTÍCULOS DE *D. rerio*

A organização dos túbulos seminíferos nos testículos de *D. rerio*, organizados em cistos foi reconhecida nos machos expostos a todas as concentrações testadas. Além disso, foi possível identificar em microscopia de luz, os cistos formados por espermatogônias e espermatócitos, bem como os espermatozoides no lúmen do túbulo seminífero. As células de Sertoli foram identificadas por seu núcleo triangular ou pavimentoso e pelos prolongamentos citoplasmáticos, delimitando os cistos germinativos (Figura 7).

Nos machos expostos à concentração de 0,065 mg/L verificou-se a presença de pequenos espaços entre os espermatócitos nos cistos germinativos, apresentando uma frequência média (50%) de cistos com alteração. Ainda no lúmen, observou-se a presença atípica de células com características de espermatócitos, junto com os espermatozoides. Essas características são distintas dos animais controles, pois os espermatócitos encontravam-se justapostos, ocupando todo o cisto germinativo, e no lúmen havia a presença apenas de espermatozoides.

Nos cistos germinativos dos machos expostos às concentrações de 0,65 mg/L e 6,5 mg/L, a presença de espaços entre os espermatócitos nos cistos germinativos foi mais acentuada, com uma frequência moderada de cistos alterados (75%). No lúmen dos túbulos seminíferos verificou-se também a presença atípica de células com características de espermatócitos.

Figura 7: Secções histológicas transversais de testículos de *Danio rerio* após 15 dias de exposição ao Roundup WG.



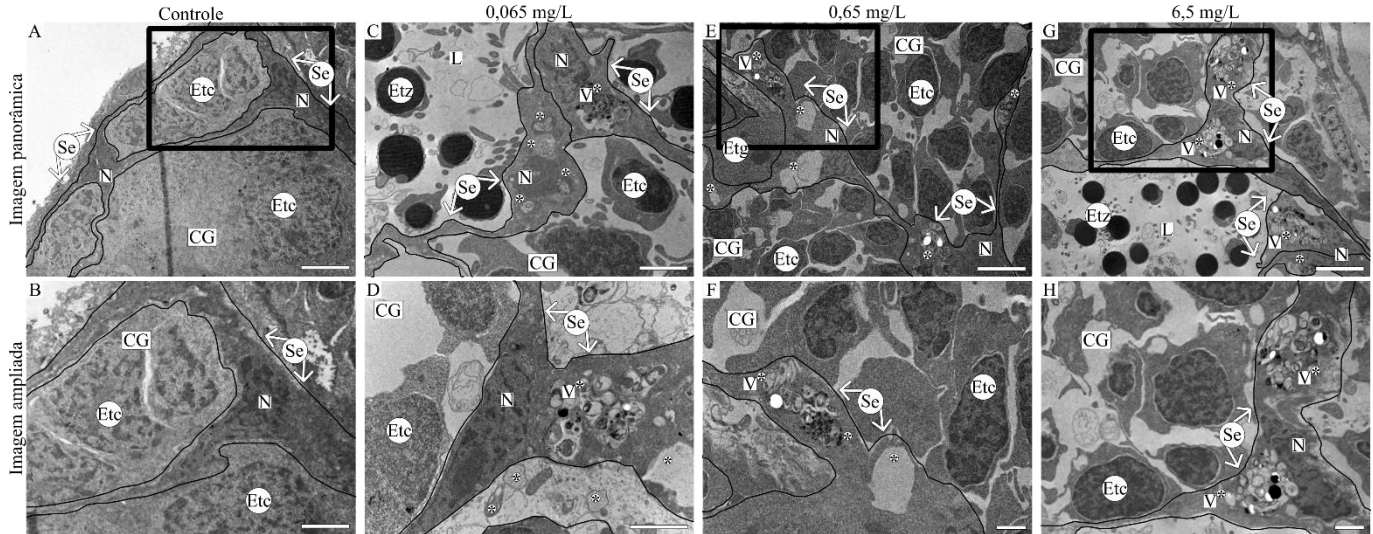
Microscopias de testículo de *D. rerio* não-exposto (A) e expostos ao herbicida Roundup WG em três concentrações (B-D), delimitando a estrutura dos cistos germinativos (CG) em linhas pretas. Nos testículos de *D. rerio* expostos ao Roundup WG destaque para a presença de espaços entre os espermatócitos, indicado com setas pretas. Lúmen (L); Células de Sertoli (Se). Barras de escala = 200 μ m. Coloração de azul de toluidina. (n = 3 pares de testículo/concentração/triplicatas independentes).

4.4 EFEITO DO HERBICIDA ROUNDUP WG SOBRE OS COMPARTIMENTOS DAS CÉLULAS SOMÁTICAS E GERMINATIVAS DO TESTÍCULO DE *D. rerio* APÓS A EXPOSIÇÃO POR 15 DIAS

A partir da análise da ultraestrutura (Figuras 8 a 14 e Tabela 2) foi possível caracterizar alterações nos compartimentos celulares das células de Sertoli, bem como das espermatogônias, espermatócitos e espermatozoides.

As células de Sertoli foram identificadas pela presença de núcleo característico em formato triangular ou pavimentoso. Após a exposição dos machos de *D. rerio* às três concentrações testadas, observou-se que as células de Sertoli apresentaram alterações na estrutura celular, relacionadas com a perda da eletrondensidade do citoplasma e mitocôndrias com alteração de cristas, com uma frequência média (50%) nas concentrações testadas de 0,065 e 0,65 mg/L, e frequência moderada (75%) na concentração de 6,5 mg/L (Tabela 2), bem como a presença evidente de vesículas com resíduos de membranas e acumulações eletrodensas próximas ao núcleo, conforme mostrado na Figura 8.

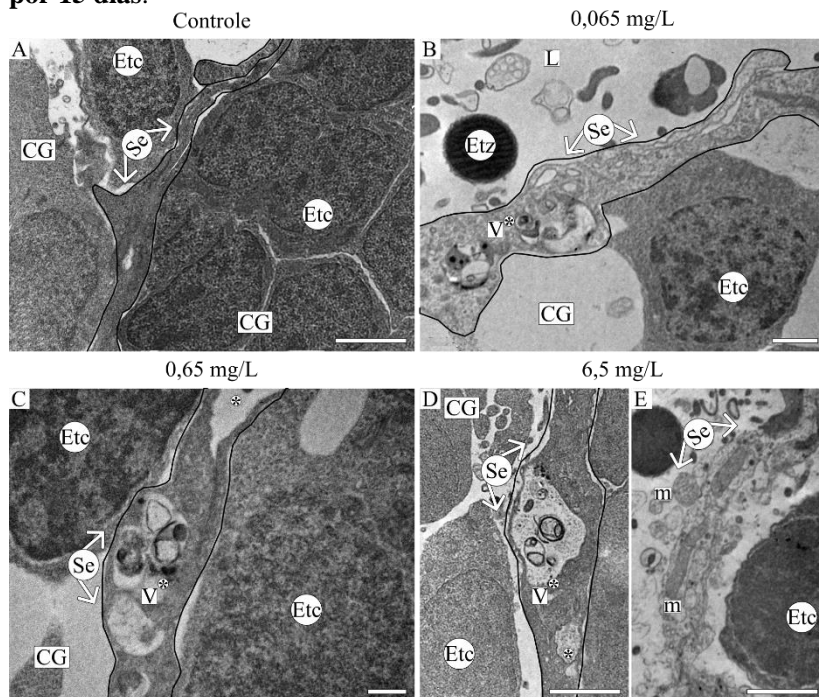
Figura 8: Eletromicrografias das células de Sertoli no testículo de *Danio rerio* exposto ao Roundup WG por 15 dias.



Eletromicrografias de testículo de *D. rerio* não-exposto (A-B) e expostos ao herbicida Roundup WG em três concentrações (C-H), destacando a estrutura das células de Sertoli (Se) em linhas pretas. Nos testículos de *D. rerio* expostos ao Roundup WG destaque para a presença de vesículas com material eletrodense (V*). Quadros pretos representam ampliações das células de Sertoli. Cisto germinativo (CG); Espermatócito (Etc); Espermatozóide (Etz); Lúmen (L); Núcleo (N); Prolongamento citoplasmático (Cabeça de seta). Barras de escala em A-E e G-H = 2 μ m; em F = 1 μ m. (n = 2 pares de testículo/concentração/triplicatas independentes).

A Figura 9 evidencia as alterações nos prolongamentos citoplasmáticos das células de Sertoli, descritas anteriormente, nos grupos exposto ao Roundup WG nas concentrações de 0,065 mg/L e 0,65 mg/L. Na concentração de 6,5 mg/L, observou-se também a perda da integridade da membrana plasmática da célula de Sertoli, na região dos prolongamentos citoplasmáticos.

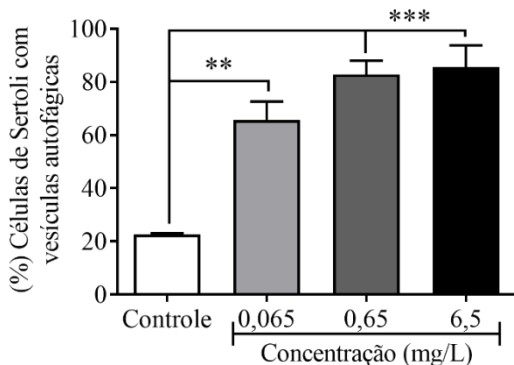
Figura 9: Eletromicrografias dos prolongamentos citoplasmáticos de células de Sertoli no testículo de *Danio rerio* exposto ao Roundup WG por 15 dias.



Eletromicrografias de testículo de *D. rerio* não-exposto (A) e expostos ao herbicida Roundup WG em três concentrações (B-E), delimitando a estrutura dos prolongamentos citoplasmáticos (cabeça de seta) das células de Sertoli (Se) em linhas pretas. Nos testículos de *D. rerio* expostos ao Roundup WG destaque para a presença de vesículas com material eletrodense (V*) e ruptura da membrana plasmática em (E). Cisto germinativo (CG); Espermatócitos (Etc); Espermatozoide (Etz); Lúmen (L); Mitocôndrias (m); Barras de escalas em A, D-E = 2 μ m; em B = 1 μ m; em C = 0,5 μ m. (n = 2 pares de testículo/concentração/triplicatas independentes).

Além das alterações já descritas nas células de Sertoli, verificou-se também a presença de vesículas nas células analisadas nas três concentrações testadas. Ao contrário, das alterações, a presença de vesículas pode ser quantificada e a sua frequência está apresentada na Figura 10. Observou-se que 65,67% das células de Sertoli dos peixes expostos a concentração de 0,065 mg/L apresentavam vesículas, 82,81% na concentração de 0,65 mg/L e 85,74% na concentração de 6,5 mg/L, as quais diferiram significativamente do grupo controle, que apresentou 22,53% das células de Sertoli com presença de vesículas em seu citoplasma.

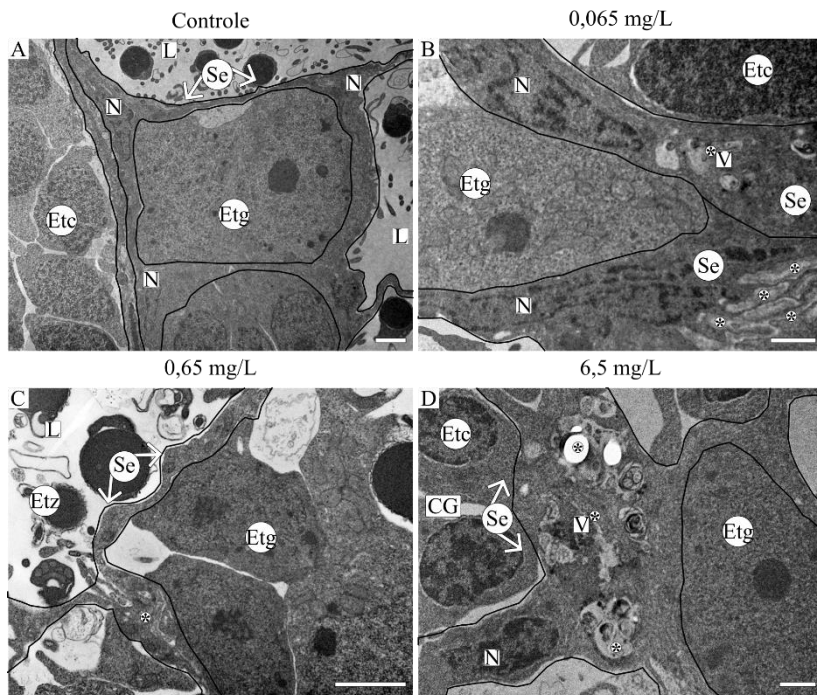
Figura 10: Frequência de vesículas nas células de Sertoli no testículo de *Danio rerio* exposto ao Roundup WG por 15 dias.



As barras representam a média \pm erro padrão. ** $p < 0,001$; *** $p < 0,0001$.

Com relação às células germinativas, as espermatogônias não apresentaram alterações após a exposição ao Roundup WG, nas três concentrações testadas. Essas células apresentaram grande volume de citoplasma, mitocôndrias com cristas distintas, membranas nuclear e plasmática intactas (Figura 11).

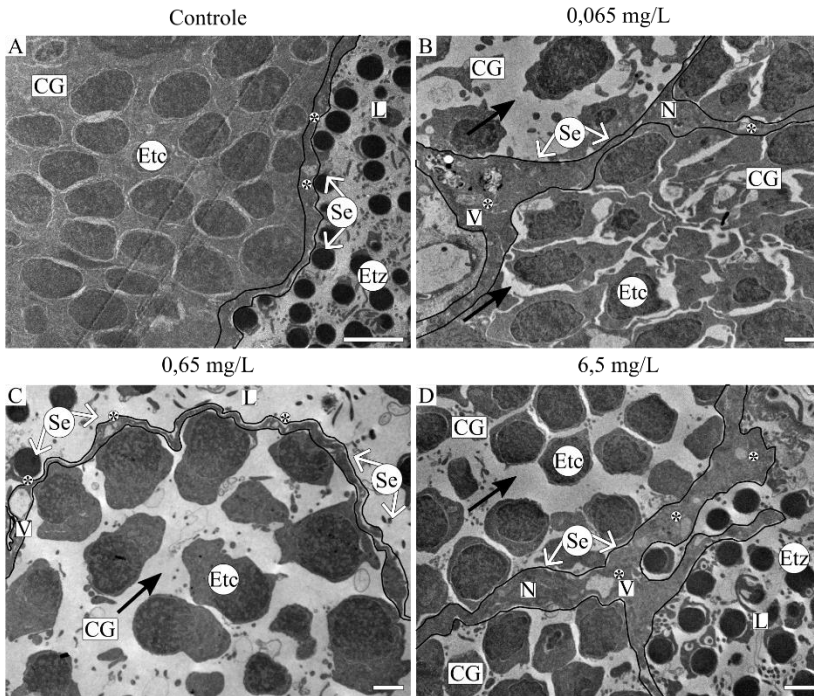
Figura 11: Eletromicrografias de espermatogônias no testículo de *Danio rerio* exposto ao Roundup WG por 15 dias.



Eletromicrografias de testículo de *D. rerio* não-exposto (A) e expostos ao herbicida Roundup WG em três concentrações (B-D), destacando as espermatogônias ao centro do cisto germinativo (CG) delimitado pela estrutura das células de Sertoli (Se) em linhas pretas. Nos testículos de *D. rerio* expostos ao Roundup WG destaque para a presença de vesículas com material eletrodense (V*). Espermatócito (Etc); Espermatogônia (Etg); Espermatozoide (Etz); Lúmen (L); Núcleo (N); Prolongamento citoplasmático (Cabeça de seta). Barra de escalas em A-B = 2 μ m; em C-D = 1 μ m. (n = 2 pares de testículo/concentração/triplicatas independentes).

A análise dos espermatócitos após a exposição dos machos ao Roundup WG confirmou a presença de espaços entre os espermatócitos nas concentrações de 0,065 mg/L, 0,65 mg/L e 6,5 mg/L, já visualizada na Figura 7. Tal espaçamento entre os espermatócitos, revela que as células estavam completamente individualizadas, ao contrário do grupo controle, no qual estas células se encontram mais justapostas (Figura 12).

Figura 12: Eletromicrografias de espermatócitos no testículo de *Danio rerio* exposto ao Roundup WG por 15 dias.

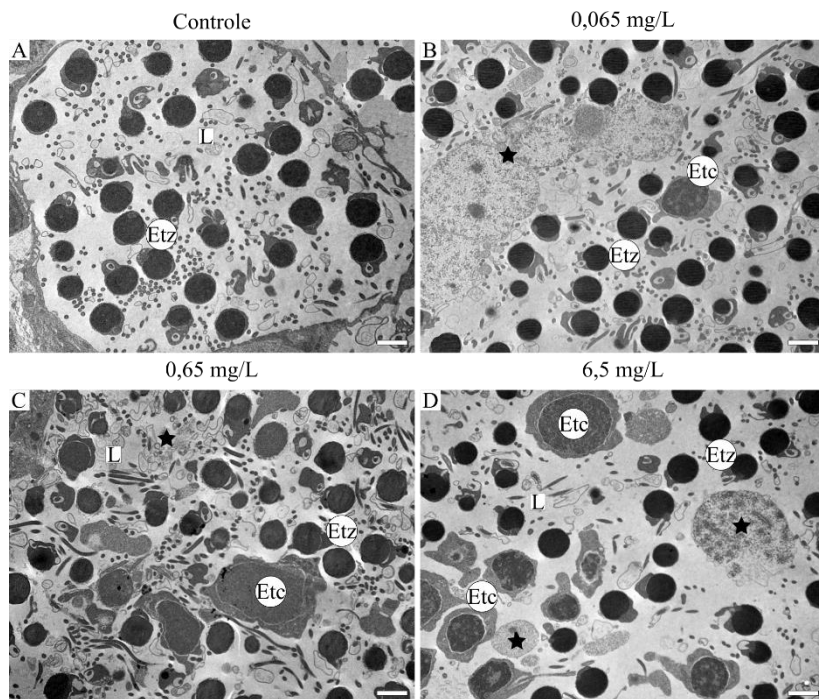


Eletromicrografias de testículo de *D. rerio* não-exposto (A) e expostos ao herbicida Roundup WG em três concentrações (B-D), delimitando a estrutura dos cistos germinativos (CG) pelas células de Sertoli (Se) em linhas pretas. Nos testículos de *D. rerio* expostos ao Roundup WG destaque para a presença de espaços entre os espermatócitos, identificados com setas pretas. Espermatócitos (Etc); Espermatozoide (Etz); Lúmen (L); Núcleo (N); Vesículas (V*); Prolongamento citoplasmático (Cabeça de seta). Barra de escalas em A = 5 μm ; em B-D = 2 μm . (n = 2 pares de testículo/concentração/triplicatas independentes).

A análise dos espermatozoides após a exposição dos machos às concentrações de 0,065 mg/L, 0,65 mg/L e 6,5 mg/L, demonstrou a presença destas células sempre no lúmen dos túbulos seminíferos (Figura 13). No entanto, observou-se no lúmen, juntamente com os espermatozoides a presença atípica de espermatogônias e espermatócitos, bem como a presença de resíduos de membranas e organelas. Nos machos expostos as três concentrações, verificou-se a presença de

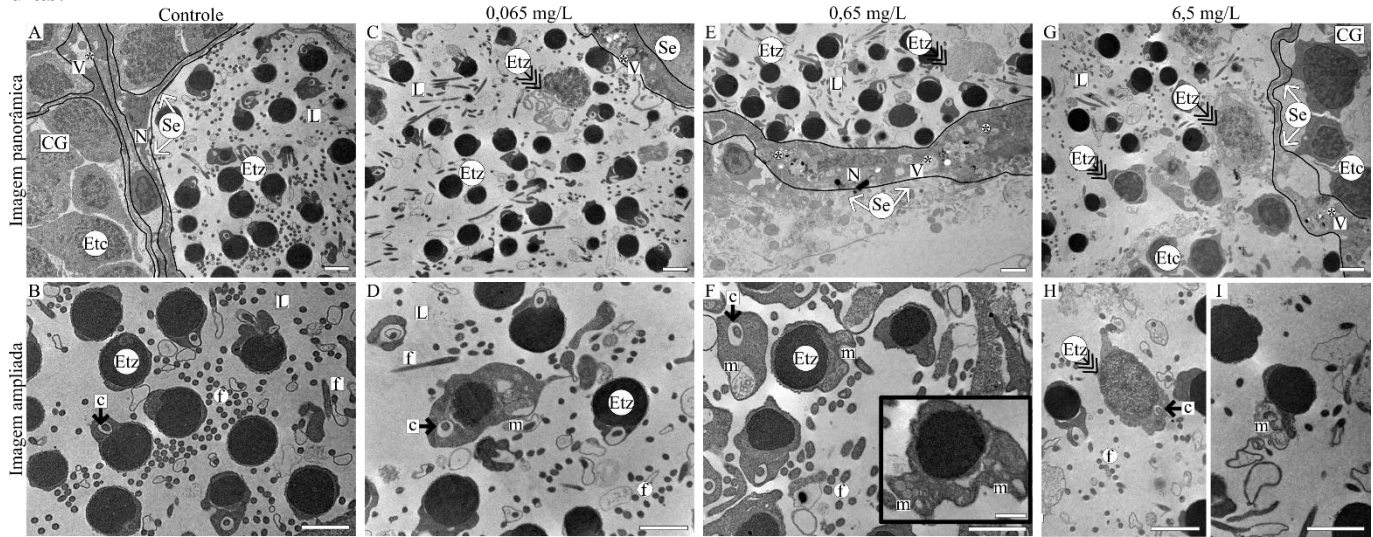
espermatozoides com material nuclear não condensado, excesso de citoplasma e mitocôndrias dilatadas (Figura 14). Tais características são distintas daquelas do grupo controle, onde os espermatozoides apresentavam núcleo esférico com cromatina condensada.

Figura 13: Eletromicrografias dos espermatozoides no lúmen do testículo de *Danio rerio* exposto ao Roundup WG por 15 dias.



Eletromicrografias de testículo de *D. rerio* não-exposto (A) e expostos ao herbicida Roundup WG em três concentrações (B-D), evidenciando a estrutura do lúmen (L) com espermatozoides, presença de células atípicas e com acúmulo de material não degradado (estrela) Espermatócitos (Etc); Espermatozoide (Etz). Barras de escalas = 2 μ m. (n = 2 pares de testículo/concentração/triplicatas independentes).

Figura 14: Eletromicrografias de espermatozoides no testículo de *Danio rerio* exposto ao Roundup WG por 15 dias.



Eletromicrografias de testículo de *D. rerio* não-exposto (A-B) e expostos ao herbicida Roundup WG em três concentrações (C-I), evidenciando a estrutura do espermatozoide (Etz). Nos testículos de *D. rerio* expostos ao Roundup WG destaque para a presença de espermatozoides com material nuclear não condensado (seta tripla), com excesso de citoplasma e mitocôndrias dilatadas (D, F e I). Inserto em (F) mostra espermatozoide com excesso de citoplasma. Células de Sertoli (Se); Centríolo (c); Cisto germinativo (CG); Espermatócito (Etc); Flagelo (f); Lúmen (L); Prolongamentos citoplasmáticos (Cabeça de seta); Mitocôndria (m); Vesículas (V*). Barras de escalas em A-G e I = 2 μ m; em H = 1 μ m; no inserto em (F) = 0,5 μ m. (n = 2 pares de testículo/concentração/triplicatas independentes).

A Tabela 2 apresenta um resumo das alterações observadas na ultraestrutura das células germinativas (espermatócitos e espermatozoides) e célula de Sertoli de testículos de machos de *D. rerio* expostos às concentrações de 0,065 mg/L, 0,65 mg/L e 6,5 mg/L de Roundup WG por 15 dias.

Tabela 2: Análise comparativa das alterações ultraestruturais observadas nos tipos celulares nos testículos de *Danio rerio* após exposição ao Roundup WG em diferentes concentrações.

Tipo celular	Alterações observadas	Concentração (mg/L)			
		Controle	0,065	0,65	6,5
Células de Sertoli	Citoplasma menos eletrodensso	-	++	++	+++
	Presença de vesículas	+	++	++	+++
	Mitocôndrias dilatadas e perda de cristas mitocondriais	-	++	++	+++
	Ruptura de membrana plasmática nos prolongamentos celulares	-	+	+	++
Espermatócito	Mitocôndrias dilatadas e perda de cristas mitocondriais	-	++	++	++
	Ruptura de membrana plasmática	-	+	+	++
Espermatozoide	Material genético não-condensado e excesso de citoplasma	-	++	++	+++
	Ruptura de membrana plasmática	-	++	++	+++
	Presença no lúmen de espermatogônias e espermatócitos, juntamente com os espermatozoides	-	+++	+++	+++ +

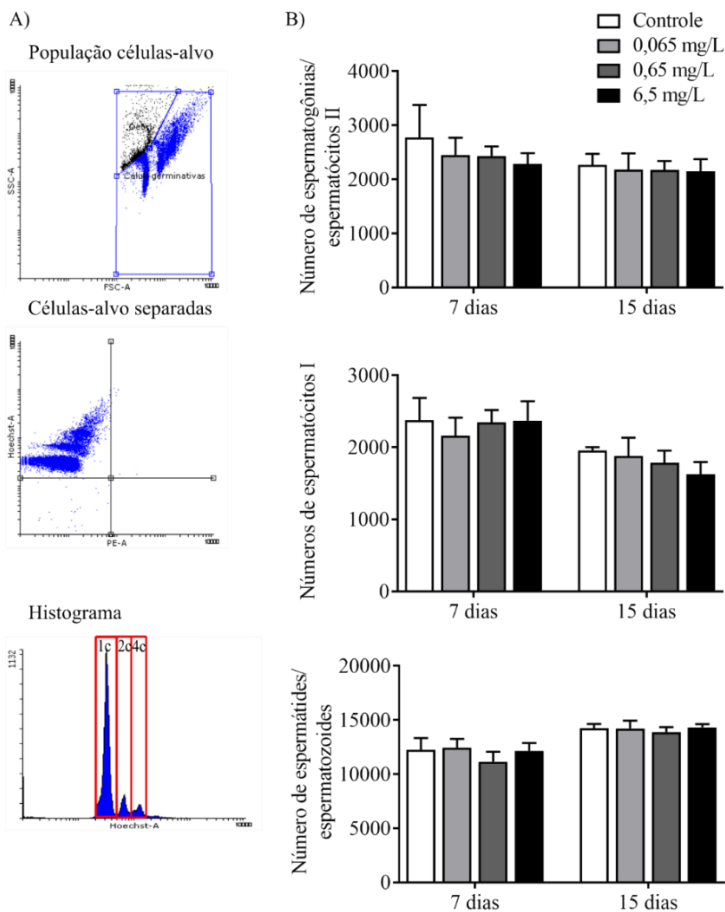
(-) ausência (0%); (+) baixa frequência (25%); (++) média frequência (50%); (+++) moderada frequência (75%); (++++) alta frequência (100%).

4.5 EFEITO DA EXPOSIÇÃO POR 7 E 15 DIAS AO ROUNDUP WG SOBRE PARAMÊTROS DE QUALIDADE DA LINHAGEM DE CÉLULAS GERMINATIVAS NOS TESTÍCULOS DE *D. rerio*

4.5.1 Efeito do Roundup WG sobre o número de células germinativas

A análise realizada por citometria de fluxo, pela marcação com o corante fluorescente de DNA - Hoechst, para quantificação dos tipos de células germinativas pelo número de cópias do material genômico não evidenciou diferença entre o número de espermatogônias/espermatócitos II (2C), espermatócitos I (4C) e espermátides/espermatozoides (1C) nos grupos expostos às três concentrações de Roundup WG. Do mesmo modo, quando comparados os números das células germinativas na mesma concentração testada, não houve diferença entre os dois períodos de exposição de 7 e 15 dias (Figura 15 B)

Figura 15: Análise por citometria de fluxo dos diferentes tipos de células germinativas de *Danio rerio* exposto ao Roundup por 7 e 15 dias.

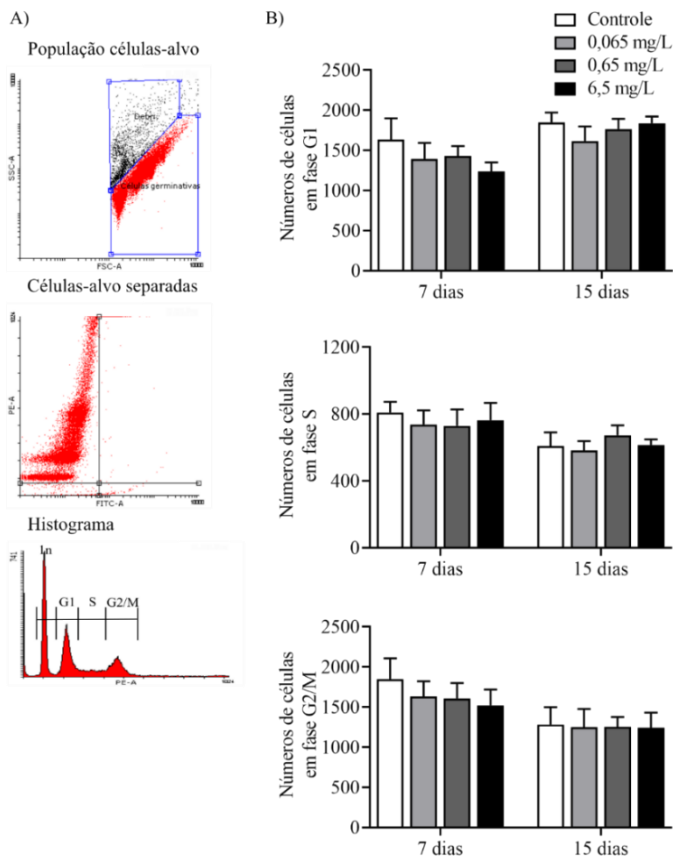


A ligação de Hoechst ao DNA resulta em diferentes padrões celulares de tamanho e complexidade dependendo da compactação e quantidade da cromatina, representação de fluorescência de Hoechst (A). Gráficos de barras (B) para representar número de espermatogônias/espermatócitos II (2C), número de espermatócitos I (4C) e o número de espermátides/espermatozoides (1C). (n = 3 pares de testículo/concentração/tempo de exposição/triplicatas independentes).

4.5.2 Efeito do Roundup WG sobre as fases do ciclo celular

A análise por citometria de fluxo para avaliação das fases do ciclo celular após a exposição ao herbicida demonstrou que não houve diferenças entre os grupos expostos em relação ao grupo controle nas diferentes concentrações testadas e nos dois períodos de exposição Figura 16.

Figura 16: Análise por citometria de fluxo das fases do ciclo celular de células germinativas de *Danio rerio* ao exposto ao Roundup por 7 e 15 dias.



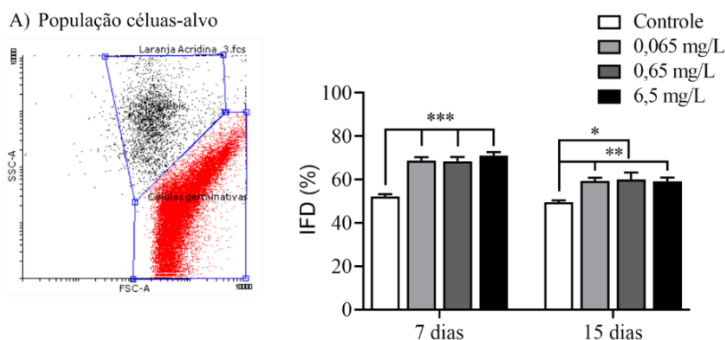
A marcação com iodeto de propídeo resulta em diferentes padrões de tamanho e complexidade, representação de fluorescência de iodeto de propídeo (A). Gráficos de barras (B) para representar o número de células em

fase G1, S e G2/M. (n = 3 pares de testículo/concentração/tempo de exposição/triplicatas independentes).

4.5.3 Efeito do Roundup WG sobre a integridade de DNA genômico

A integridade do DNA genômico foi avaliada através do índice de fragmentação do DNA. Em todas as concentrações testadas foi observado um aumento significativo no índice de fragmentação de DNA, após a exposição nos períodos de 7 e 15 dias. Além disso, quando comparadas as concentrações nos dois tempos de exposição, verificou-se que os dados das concentrações de 0,065 mg/L e 6,5 mg/L diferiram significativamente entre 7 e 15 dias ($p < 0,01$; $p < 0,001$) (Figura 17).

Figura 17: Índice de fragmentação de DNA (IFD) das células germinativas de *Danio rerio* exposto ao Roundup WG por período de 7 e 15 dias.



Representação do Dotplot com população de células alvo para teste de IFD (A). As barras (B) representam a média \pm erro padrão. * $p < 0,01$; ** $p < 0,001$; *** $p < 0,0001$. (n = 3 pares de testículo/concentração/tempo de exposição/triplicatas independentes).

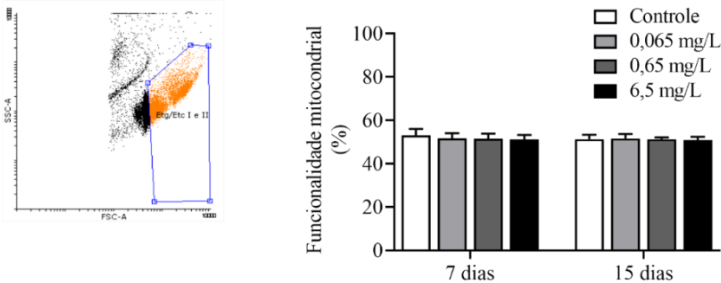
4.5.4 Efeito do Roundup WG sobre a funcionalidade mitocondrial

A análise por citometria de fluxo permitiu o reconhecimento de duas populações distintas de células germinativas. Foram reconhecidos os espermatozoides/espermátides (Figura 18 A) e espermatogônia/espermátocitos I/espermátocitos II (Figura 18 B). Não foi observada alteração da funcionalidade mitocondrial das células

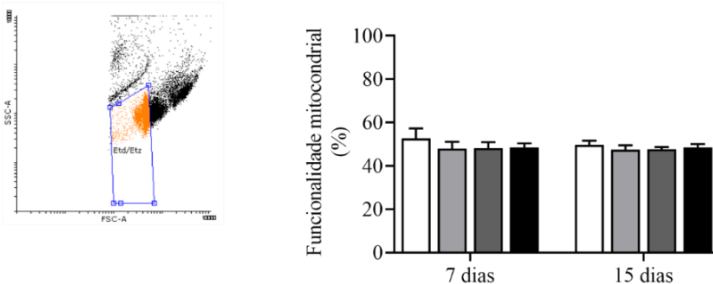
germinativas em machos de *D. rerio* nas três concentrações e nos dois tempos de exposição.

Figura 18: Avaliação da funcionalidade mitocondrial das células germinativas de *Danio rerio* exposto ao Roundup WG pelo período de 7 e 15 dias.

A) População células-alvo - espermatogônias/espermatócitos I e II



B) População células-alvo - espermátides/espermatozoides



Representação do Dotplot e gráficos de barras da população de espermatogônias/espermatócitos I/espermatócitos II (A). Representação de Dotplot e gráficos de barras da população de espermátides/espermatozoides (B). As barras representam a média \pm erro padrão. (n = 3 pares de testículo/concentração/tempo de exposição/triplicatas independentes).

4.5.5 Efeito do Roundup WG sobre a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO)

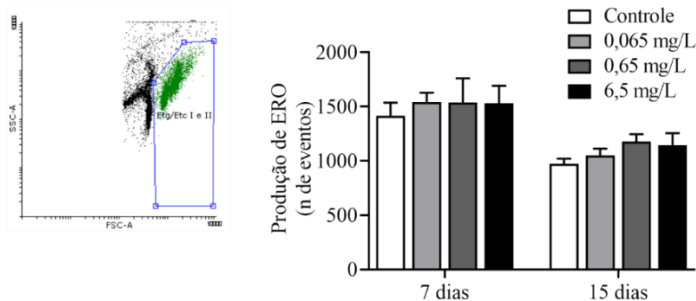
Na análise por citometria de fluxo foi possível reconhecer as mesmas duas populações distintas de células germinativas, a exemplo da análise da funcionalidade mitocondrial (Figura 19). A produção de ERO foi maior na população de espermátides/espermatozoides em todas as

concentrações testadas, comparadas com o controle no período de exposição de 7 dias. Já a produção de ERO nos espermatogônia/espermatócitos I/espermatócitos II não diferiu do controle no período de 7 dias.

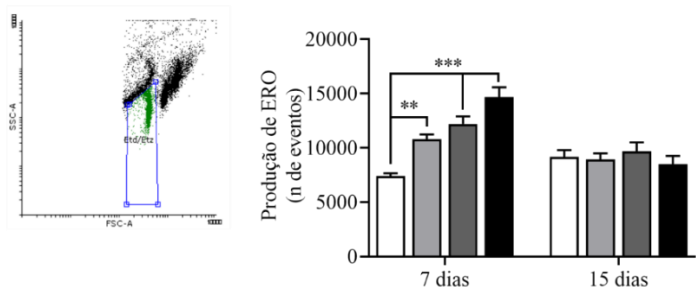
Após 15 dias de exposição, não foi observada alteração no conteúdo de ERO nas populações de espermátides/espermatozoides e de espermatogônia/espermatócitos I/espermatócitos II, quando comparadas com o controle (Figura 19). Quando analisadas as mesmas concentrações entre os períodos de 7 com 15 dias, verifica-se que os grupos controle e exposto a 0,65 mg/L e 0,065 mg/L não diferiram entre si, mas o grupo 6,5 mg/L ($p < 0,0001$) diferiram significativamente entre 7 e 15 dias para a população de espermátides/espermatozoides.

Figura 19: Efeito da exposição ao Roundup sobre a formação de ERO nas células germinativas de *Danio rerio* exposto ao Roundup WG pelo período de 7 e 15 dias.

A) População células-alvo - espermatogônia/espermatócitos I e II



B) População células-alvo - espermátides/espermatozoides



Representação de Dotplot e gráficos de barras da população de espermatogônias/espermatócitos I/espermatócitos II (A). Representação de Dotplot e gráficos de barras da população de espermátides/espermatozoides

(B). As barras representam a média \pm erro padrão. ** $p < 0,001$; *** $p < 0,0001$. (n = 3 pares de testículo/concentração/tempo de exposição/triplicatas independentes).

4.6 EFEITO DA EXPOSIÇÃO AO ROUNDUP WG POR 7 DIAS SOBRE OS NÍVEIS DE TRANSCRITO DOS GENES ENVOLVIDOS COM PROCESSO DE AUTOFAGIA E ESTEREOIDOGENESE

4.6.1 Avaliação da estabilidade da expressão dos genes de referência no testículo de *D. rerio* ao Roundup WG por 7 dias

Previamente, foi avaliada a estabilidade de expressão de 6 genes de referência (*β -act*, *gapdh*, *ef1a*, *b2m*, *rpl8*, *hpst1*) e 1 elemento repetitivo (*hatn10*) nas amostras de testículo de *D. rerio* após a exposição às três concentrações do herbicida Roundup WG (0,065 mg/L, 0,65 mg/L e 6,5 mg/L). Foi determinado o gene *ef1a*, como o melhor gene de referência para análises de RT-qPCR de testículo de *D. rerio* expostos ao Roundup WG (Quadro 3), descritas a seguir.

Quadro 4: Classificação final da estabilidade dos genes de referência e elemento repetitivo para análises por RT-qPCR de testículo de *Danio rerio* exposto ao Roundup WG

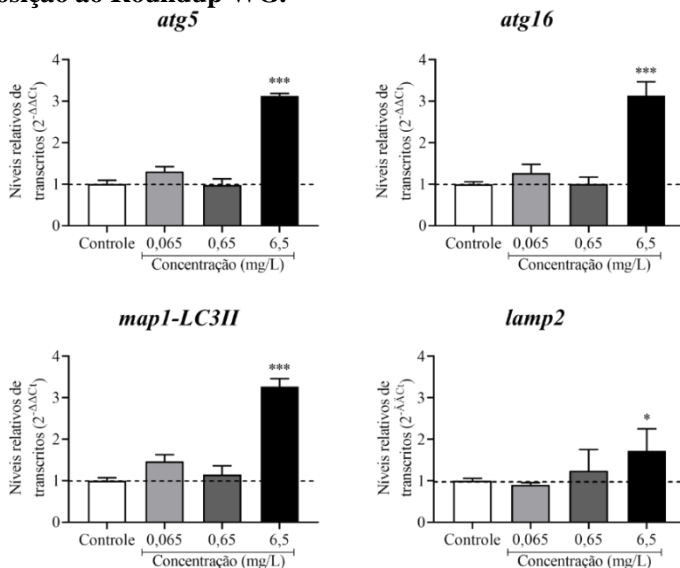
Classificação	Programas utilizados na análise				Classificação final
	BestKeeper	NormFinder	geNorm	Delta Ct	
1	<i>ef1a</i>	<i>ef1a</i>	<i>ef1a / rpl8</i>	<i>ef1a</i>	<i>ef1a</i>
2	<i>gapdh</i>	<i>gapdh</i>		<i>gapdh</i>	<i>gapdh</i>
3	<i>β-act</i>	<i>rpl8</i>	<i>β-act</i>	<i>rpl8</i>	<i>rpl8</i>
4	<i>hatn10</i>	<i>hatn10</i>	<i>b2m</i>	<i>hatn10</i>	<i>β-act</i>
5	<i>b2m</i>	<i>b2m</i>	<i>gapdh</i>	<i>β-act</i>	<i>hatn10</i>
6	<i>hpst1</i>	<i>β-act</i>	<i>hatn10</i>	<i>b2m</i>	<i>b2m</i>
7	<i>rpl8</i>	<i>hpst1</i>	<i>hpst1</i>	<i>hpst1</i>	<i>hpst1</i>

(n = 3 amostras contendo pool de 2 pares de testículo /concentração/triplicatas independentes). (JARAMILLO *et al.*, 2018).

4.6.2 Análise dos níveis de transcritos dos genes envolvidos no processo de autofagia nos testículos de *D. rerio* após exposição ao Roundup WG por 7 dias

A partir das alterações observadas na ultraestrutura das células de Sertoli, principalmente a ocorrência de vesículas com conteúdo interno de membranas e material eletrodense, foram analisados os conteúdos de transcritos dos genes que codificam para as proteínas envolvidas no processo formação de vesículas autofágicas, como *atg5*, *atg16*, *map1-lc3II* e *lamp2* (Figura 20). A análise do nível de transcritos para os estes genes, indicou que apenas na concentração de 6,5 mg/L de Roundup WG, os níveis foram 3,10x, 3,12x, 3,25x e 1,71x maiores, os quais diferiram significativamente do controle (*atg5*: $F_{(3,12)} = 96,07$, $p < 0,0001$; *atg16*: $F_{(3,12)} = 22,61$, $p < 0,0001$; *map1-lc3II* $F_{(3,12)} = 37,91$; $p < 0,0001$; *lamp2*: $F_{(3,12)} = 6,06$, $p < 0,01$).

Figura 20: Níveis relativos de transcrito dos genes *atg5*, *atg16*, *map1-LC3II* e *lamp2* nos testículo de *Danio rerio* analisados após 7 dias de exposição ao Roundup WG.



Os resultados foram normalizados pela quantificação da expressão do gene de referência *e1f1α*. Os níveis de expressão relativa foram indicados em média \pm erro padrão ($n = 3$ amostras contendo pool de 2 pares de testículo /concentração/triplicatas independentes). * $p < 0,01$; *** $p < 0,0001$.

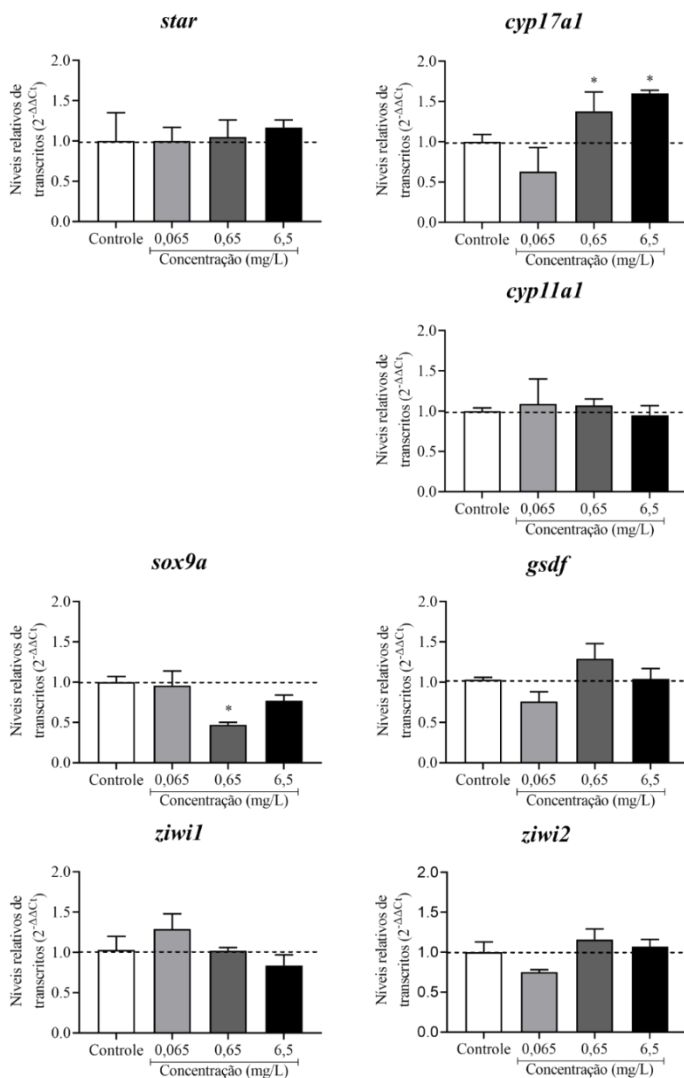
4.6.3 Análise dos níveis de transcrito para as proteínas envolvidas no processo de manutenção da espermatogênese nos testículos de *D. rerio* após exposição ao Roundup WG por 7 dias

Considerando as alterações ultraestruturais encontradas nas células de Sertoli, que podem comprometer seu papel essencial para a espermatogênese de *D. rerio*, foram analisados os níveis de transcritos dos genes que codificam para as proteínas envolvidas no processo de esteroidogênese (*star*, *cyp11a1*, *cyp17a1*), na manutenção da espermatogênese, os genes envolvidos no crescimento das células germinativas, expressos nas células de Sertoli (*sox9a* e *gsdf*) e os marcadores de células germinativas (*ziwi1* e *ziwi2*).

O nível de transcrito de *cyp17a1*, nas concentrações de 0,65 mg/L e 6,5 mg/L de Roundup WG, foram 1,51x e 1,75x maiores, respectivamente, os quais diferiram significativamente do controle ($F_{(3,8)} = 4,96$; $p = 0,03$). Os níveis de transcrito do gene *sox9a* na concentração de 0,65 mg/L de Roundup WG, foi 1,91x menor, o qual diferiu significativamente do controle ($F_{(3,12)} = 5,43$; $p = 0,01$).

Em relação ao conteúdo de transcrito dos genes *cyp11a1*, *star*, *gsdf*, *ziwi1* e *ziwi2* não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos expostos ao herbicida Roundup WG nas três concentrações testadas e controle (*cyp11a1*: $F_{(3,8)} = 0,14$, $p = 0,93$; *star*: $F_{(3,8)} = 0,15$, $p = 0,92$; *gsdf*: $F_{(3,8)} = 2,78$, $p = 0,11$; *ziwi1*: $F_{(3,8)} = 0,72$, $p = 0,56$; *ziwi2*: $F_{(3,8)} = 2,83$; $P = 0,10$).

Figura 21: Níveis relativos de transcrito dos genes *star*, *cyp17a1*, *cyp11a1*, *sox9a*, *gsdf*, *ziwi1* e *ziwi2* em testículo de *Danio rerio* analisados após 7 dias de exposição ao Roundup WG.



Os resultados foram normalizados pela quantificação da expressão do gene de referência *ef1 α* . Os níveis de expressão relativa foram indicados em média \pm erro padrão (n = 3 amostras contendo pool de 2 pares de testículo /concentração/triplicatas independentes). * p < 0,05.

5 DISCUSSÃO

A poluição das águas é um dos problemas mais sérios para conservação e manutenção dos ecossistemas aquáticos. Esses ecossistemas recebem grande aporte de contaminantes, o que gera preocupação e motiva a realização de muitos estudos com foco nos efeitos de compostos orgânicos, genotoxinas, metais pesados e agrotóxicos, a curto, médio e longo prazos (JIRAUNGKOORSKUL *et al.*, 2003; SOSO *et al.*, 2007; MODESTO E MARTINEZ, 2010; SALBEGO *et al.*, 2010; MENÉNDEZ-HELMAN *et al.*, 2015; PEREIRA *et al.*, 2018).

O Brasil assumiu em 2008 o posto de maior mercado consumidor de agrotóxicos do mundo, e o 1º país no *ranking* mundial de consumo de glifosato, 62,4 % dos agrotóxicos consumidos no país são a base de glifosato, isso devido as grandes áreas com cultura de soja, principalmente as geneticamente modificadas (IBGE, 2012; 2015). O uso extensivo de herbicidas a base de glifosato induz efeitos adversos em organismos não-alvo, contudo este panorama ainda apresenta muito a ser explorado (EDWARDS *et al.*, 1980; GIESY *et al.*, 2000; PERUZZO *et al.*, 2008). Neste contexto, este trabalho vem avaliar a toxicidade celular do herbicida a base de glifosato, Roundup WG, utilizando machos da espécie *D. rerio* como modelo experimental para exposição em peixes.

Em estudos toxicológicos, a determinação da CL₅₀ é a primeira abordagem para avaliar o grau de toxicidade e a segurança ambiental de substâncias químicas. Neste sentido, foi determinada a CL₅₀ do herbicida Roundup WG, para *D. rerio* nas condições experimentais deste estudo, antes de proceder a análise dos efeitos do herbicida nas concentrações testadas. A CL₅₀ obtida de 42,6 mg/L de glifosato para adultos de *D. rerio* expostos ao Roundup WG é considerada leve, de acordo com os parâmetros propostos por Giesy *et al.* (2000) (concentração leve entre 10 e 100 mg/L).

Estudos descrevem uma grande variação da CL₅₀ de herbicidas a base de glifosato, sendo registrados concentrações de 13 a 55 mg/L. Neste panorama, utilizando diferentes espécies de peixes e formulações de herbicida a base de glifosato, a CL₅₀ obtida para *P. lineatus* expostos ao Roundup® (contendo 360 g/L) foi de 13,69 mg/L (LANGIANO E MARTINEZ, 2008) e para *Leporinus macrocephalus* expostos ao Roundup® (contendo 360g/L) foi de 15,8 mg/L (ALBINATI *et al.*, 2007); para *Channa punctatus* expostos ao Roundup® (contendo 410 g/L) foi de 32,54 mg/L (NWANI *et al.*, 2010), semelhante a obtida para *Oreochromis niloticus* expostos ao Roundup® (contendo 480 g/L) que foi de 36,8 mg/L

(JIRAUNGKOORSKUL *et al.*, 2002); para *D. rerio* adulto expostos ao herbicida a base de glifosato Scout® (contendo 720 g/Kg) foi de 53,75 mg/L (PEREIRA *et al.*, 2018), valores semelhantes foram encontrados para truta *Salmo gairdneri* em condições de laboratório e ambientais (54,8 mg/L e 52,0 mg/L) para o herbicida Roundup® (HILDEBRAND *et al.*, 1982). Esses estudos mostram que os diferentes valores obtidos refletem as diferentes condições experimentais empregadas, onde devem ser consideradas as concentrações testadas, as formulações utilizadas, as espécies de peixes e os estágios de vida adotados nos ensaios.

Embora considerada como uma toxicidade leve, a segunda abordagem para investigar o potencial tóxico do Roundup WG evidenciou o caráter dose-dependente deste herbicida, observado na curva de sobrevivência. No presente trabalho, a CL₅₀, a curva de sobrevivência e a concentração máxima permitida para glifosato pela Resolução nº 357/CONAMA/2005, em águas de classe 1-2 destinadas à diretrizes ambientais (como, à proteção de comunidades aquáticas), nortearam a escolha das concentrações subletais, que foram testadas para avaliar os efeitos do Roundup WG nos testículos de *D. rerio*.

Além da definição das concentrações, a escolha do organismo a ser utilizado é também uma etapa importante do estudo, pois se reconhece que os organismos apresentam sensibilidades diferenciada nos testes de toxicidade. Estudos com ratos tratados com Roundup demonstrou alteração na estrutura dos testículos, na produção de espermatozoides e esteroides sexuais (ROMANO *et al.*, 2010; ROMANO *et al.*, 2012); em células testiculares de rato o Roundup diminuiu a produção de testosterona (CLAIR *et al.*, 2012); em células de fígado humano expostos ao Roundup houve diminuição da atividade da aromatase (GASNIER *et al.*, 2009); em células de Leydig de camundongos foi observada a alteração da atividade de *star* (WALSH *et al.*, 2000).

Em estudos com peixes, foram observadas alterações ultrastruturais nas mitocôndrias de hepatócitos de *C. carpio* (SZAREK *et al.*, 2000); aumento da glicose no sangue, estresse oxidativo e alterações morfológicas em fígado de *P. lineatus* (LANGIANO E MARTINEZ, 2008); aumento no fator esteroideogênico 1 em fêmeas de *D. rerio* (ARMILIATO *et al.*, 2014); alterações no perfil de hormônios sexuais em fêmeas de *D. rerio* expostas ao herbicida glifosato (SOSO *et al.*, 2007), diminuição da produção de ovócitos em fêmeas de *D. rerio* expostas ao herbicida glifosato (WEBSTER *et al.*, 2014), aumento na atividade antioxidante nas brânquias e fígado de *zebrafish* (VELASQUES *et al.*, 2016), aumento no índice hepatossomático e peroxidação lipídica no fígado de *Jenynsia multidentata* (SÁNCHEZ *et al.*, 2017).

A maior parte dos estudos dos efeitos causados por herbicidas a base de glifosato em peixes tem focado na avaliação do estresse oxidativo através da geração de ERO, danos de DNA, funcionalidade mitocondrial, neurotoxicidade e imunotoxicidade, em exposição de curto prazo de até 7 dias, como mostram os trabalhos de Çavas e Könen (2007), Lushchak *et al.* (2009), Ferreira *et al.*, (2010), Modesto e Martinez (2010), Guilherme *et al.* (2012); Lopes *et al.* (2014); Velasques *et al.* (2016), Cavalcante *et al.* (2018), Pereira *et al.* (2018) e Silveira *et al.* (2019). Contudo, os efeitos da exposição a herbicidas a base de glifosato em períodos de exposição maiores de 15 dias, sobre a morfologia, estrutura e ultraestrutura das gônadas têm sido pouco investigados e por isso foram considerados no desenho experimental da presente tese.

Após a exposição dos machos às concentrações de 0,065 mg/L, 0,65 mg/L e 6,5 mg/L do herbicida Roundup WG (720 g de glifosato/Kg) por 15 dias, não foi encontrada diferença significativa nas análises de biometria corporal, massa do testículo e do IGS dos animais expostos, quando comparados com o grupo controle nos dois tempos de exposição. Webster *et al.* (2014) demonstraram resultados semelhantes em estudo realizado com machos de *D. rerio* expostos ao Roundup GC (120g de glifosato/ L) nas concentrações de 0,01 mg/L, 0,5 mg/L e 10,0 mg/L. Embora, utilizadas formulações contendo diferentes concentrações de glifosato, esses dois estudos demonstram que o glifosato não interferiu nos parâmetros de biometrias corporais.

O IGS é um parâmetro reprodutivo importante para estimar a condição reprodutiva a partir das variações no crescimento das gônadas durante os ciclos reprodutivos. No caso dos machos, é esperada uma variação menor na massa dos testículos durante o período reprodutivo. Assim, a similaridade nos valores de IGS obtidos tanto dos peixes controle e expostos indicam que os machos utilizados para este estudo se encontravam em condições semelhantes de maturação dos testículos, e que os resultados obtidos nas demais análises não foram possivelmente influenciados por este parâmetro. No caso das fêmeas durante a maturação, há um aumento significativo na massa dos ovários, devido ao aporte de vitelo, requerido para maturação dos ovócitos. Armiliato *et al.* (2014) demonstraram que a exposição ao glifosato induziu um aumento significativo no valor de IGS de fêmeas expostas a 0,065 mg/L de glifosato, enquanto que Webster *et al.* (2014) (o mesmo já citado no parágrafo anterior) demonstraram a diminuição do valor de IGS em fêmeas expostas a 10 mg/L de glifosato.

A partir das análises histológicas dos testículos de *D. rerio* expostos ao herbicida Roundup WG foi possível evidenciar as estruturas

típicas do testículo desta espécie, como apresentado por Schulz et al. (2010) e Rupik et al. (2011). Na análise da morfologia dos testículos vários autores utilizam inúmeras fases e classificação das células germinativas, desde as células germinativas primordiais até espermatozoides, podendo ser encontrada mais de 10 classificações para estas células durante a espermatogênese (LEAL *et al.*, 2009a; NÓBREGA *et al.*, 2009; SCHULZ *et al.*, 2010). Neste trabalho adotamos a descrição de estágios distintos, que correspondem aos quatro tipos de células germinativas: (i) espermatogônias, (ii) espermatócitos (iii) espermátides e (iv) espermatozoides. Tais estágios, foram evidenciados, tanto no grupo controle, como grupos expostos ao herbicida.

Nos machos expostos ao herbicida Roundup WG foram verificadas alterações na organização das células germinativas que compõem os cistos germinativos. Dentre as alterações, destaca-se a presença de espaços entre as células germinativas dentro dos cistos, de maneira dose dependente. O espaçamento entre as células germinativas de um mesmo cisto, observado nos grupos expostos ao Roundup WG indica a perda das pontes citoplasmáticas, importantes na manutenção do processo de espermatogênese sincrônica. Outra importante alteração observada foi a presença no lúmen de células com características atípicas para este local. Considerando que a espermatogênese de *D. rerio*, é do tipo cística, ou seja, ocorre dentro de um cisto delimitado por células de Sertoli, a presença de células no lúmen, que não os espermatozoides, é uma evidência de que a exposição ao Roundup WG afetou a organização estrutural dos testículos.

Embora as análises realizadas por microscopia de luz tenham evidenciado alterações morfológicas, não foi possível identificar quais componentes celulares foram afetados. Assim, uma análise mais detalhada da estrutura dos cistos germinativos foi realizada através da microscopia eletrônica de transmissão (MET), empregada em outros estudos de toxicidade (SZAREK *et al.*, 2000; ZHANG *et al.*, 2014; HASSAN *et al.*, 2016; YANG *et al.*, 2016; KOTIL *et al.*, 2017). Através da MET foi possível visualizar de forma detalhada as interações estreitas entre células de Sertoli/Sertoli, células de Sertoli/células germinativas e células germinativas/células germinativas.

A ruptura dos prolongamentos citoplasmáticos das células de Sertoli, libera prematuramente no lúmen do testículo as células germinativas que deveriam estar contidas no interior do cisto germinativo. Como demonstrado nos resultados, as células de Sertoli apresentavam também material citoplasmático não degradado, com mitocôndrias e vesículas. Assim a ruptura das membranas das células de Sertoli, faz com

que esse material citoplasmático não degrade e as células germinativas sejam liberadas no lúmen dos testículos. A ruptura das células de Sertoli comprometem, portanto, o ambiente morfológico e bioquímico essencial para a espermatogênese, pois é função das células de Sertoli fornecer os nutrientes e hormônios necessários às células germinativas (MONSEES *et al.*, 2000; NÓBREGA *et al.*, 2009; SCHULZ *et al.*, 2010). Vários agentes tóxicos podem alterar a função testicular, principalmente os que alteram a função das células de Sertoli, através da interrupção da interligação com as células germinativas, alterando o transporte de nutrientes e hormônios (MONSEES *et al.*, 2000; DUAN *et al.*, 2016; HORIBE *et al.*, 2017).

Os resultados mostraram alterações na estrutura do cisto germinativo, evidenciando que o espaço entre as células germinativas é resultante da perda das pontes citoplasmáticas entre as células germinativas, nas três concentrações testadas, explicando desta forma o resultado da análise na microscopia de luz.

Além das alterações já discutidas, foram observadas alterações nos componentes subcelulares das células de Sertoli após exposição às três concentrações testadas, as quais permitem aceitar a hipótese inicial de que o Roundup WG causa alterações na estrutura e ultraestrutura celular dos tecidos. A observação das células de Sertoli por MET permitiu descrever qualitativamente alterações da composição de seu citoplasma, com a presença de mitocôndrias dilatadas e perda de cristas mitocondriais, a ruptura da membrana plasmática na altura dos prolongamentos citoplasmáticos. A integridade das células de Sertoli é essencial para a manutenção do processo espermatogênico em peixes (SCHULZ *et al.*, 2010), portanto, danos a essas células somáticas causam impactos negativos diretamente nas células germinativas. Por exemplo, o espaçamento observado entre as células germinativas, anteriormente descrito, pode ser resultante de danos a estas células somáticas, como apontado por Schulz *et al.* (2010) e França *et al.* (2016).

As alterações encontradas nas células de Sertoli, como mitocôndrias dilatadas, mitocôndrias com perda de cristas e ruptura da membrana plasmática, também foram observadas nos espermatócitos e espermatozoides. Além dessas alterações, foram visualizadas perda das pontes citoplasmáticas entre os espermatócitos, material nuclear não condensado, excesso de citoplasma nos espermatozoides. Essas alterações parecem ser respostas comuns à exposição a herbicidas a base de glifosato, como observado em hepatócitos do peixe *C. carpio* (SZAREK *et al.*, 2000), em ovócitos e células foliculares nos ovários de *D. rerio* (ARMILIATO *et al.*, 2014; DAVICO, 2017) e no hepatopâncreas do camarão de água doce *Macrobrachium potiuna* (MELO *et al.*, 2019).

A presença de uma grande quantidade de vesículas com acúmulo de membranas e material eletrodense no citoplasma das células de Sertoli foi observada nos animais expostos ao herbicida nas três concentrações testadas. Cabe destacar, que nas células de Sertoli dos peixes do grupo controle, também foram observadas vesículas em menor número, menor dimensão e sem acúmulo de membranas e material eletrodense. A presença dessas vesículas nas células dos peixes do grupo controle pode ser explicada, de acordo com Schulz *et al.* (2010), uma vez que são compatíveis com as funções fisiológicas da célula de Sertoli, pois estas são responsáveis pela remoção, por fagocitose, de corpos residuais provenientes da espermiogênese.

Embora a fagocitose seja um evento celular inerente ao metabolismo da célula de Sertoli, as características apresentadas pelas vesículas no citoplasma das células de Sertoli dos peixes expostos, despertaram o interesse por investigar o processo autofágico. A análise do perfil transcricional de genes, evidenciou que as vesículas eram de fato, relacionados ao processo de autofagia. O processo de autofagia é requerido sob condições fisiológicas decorrentes de danos patológicos e/ou toxicológicos, os quais podem levar a estresse celular, estresse oxidativo, danos ao DNA, agregados de proteínas e danos mitocondriais (YANG E KLIONSKY, 2010; HANSEN E JOHANSEN, 2011; YOULE E NARENDRA, 2011; DUAN *et al.*, 2016). Diferentes trabalhos destacam o papel da autofagia nas células de Sertoli após exposição a agentes patológicos, tóxicos ou estresse físico (EID *et al.*, 2012; MA *et al.*, 2015; DUAN *et al.*, 2016; BAO *et al.*, 2017; HORIBE *et al.*, 2019). Esses trabalhos descrevem o processo de autofagia nas células de Sertoli de roedores, como via de sobrevivência celular ou cooperação com a degradação de substratos derivados de células germinativas apoptóticas. Contudo, a função do processo autofágico em células de Sertoli são em grande parte desconhecidos, sobretudo em peixes.

Como consequência das alterações nas células de Sertoli e nos cistos germinativos, era esperado como prejuízos na espermatogênese, a redução no número de células germinativas. Contudo, resultados obtidos nos ensaios de quantificação das células germinativas, tanto através de suas características nucleares como pela identificação do ciclo celular através da citometria de fluxo, não demonstraram alterações na quantidade das espermatogônias, espermatócitos, espermátides e espermatozoides durante os períodos de exposição de 7 e 15 dias, nas três concentrações testadas de Roundup WG. Essa constatação nos leva a rejeitar a hipótese de que o Roundup WG causa uma diminuição do processo de espermatogênese em *D. rerio*. O efeito de herbicidas a base

de glifosato, bem como do glifosato puro tem sido avaliado em diferentes espécies de peixes após 24 h e 96 h de exposição. Sanchez *et al.* (2017) demonstraram que o peixe *J. multidentata* exposto a concentração de 0,5 mg/L de Roundup WG, embora apresentando uma diminuição na quantidade de espermatozoides nas primeiras 24 h de exposição, essa quantidade foi recuperada após 96 h de exposição. Silveira *et al.* (2019) demonstraram após o período de 24 h de exposição a 10 mg/L Roundup WG diminuição da concentração de espermatozoides de *O. humensis*. Lopes *et al.* (2014) demonstraram que após a exposição de *D. rerio* ao glifosato puro nas concentrações de 5 mg/L e 10 mg/L por 24 h e 96 h que não houve alteração na concentração de espermatozoides. A partir da análise conjunta dos dados apresentados não é possível estabelecer uma relação entre concentração/tempo de exposição/formulação ou glifosato puro e a quantidade de espermatozoides.

Como o número de células germinativas não foi alterado durante os períodos de exposição, foi investigado o perfil transcricional de genes presentes em células de Sertoli, espermatogônias e espermatócitos envolvidos na regulação de algumas das fases da espermatogênese. Contudo, a expressão desses genes não foi alterada durante o período de exposição. Investigamos ainda o perfil transcricional de genes que codificam as proteínas envolvidas no processo de esteroidogênese. Neste último caso, foi observada uma regulação positiva do gene esteroidogênico *cyp17a1*. A duração da espermatogênese em *D. rerio* é de aproximadamente 6 dias, um dos períodos mais curtos entre os peixes teleósteos (LEAL *et al.*, 2009a). Assim, o desenho experimental adotado nesta tese contemplou a exposição das células germinativas por até dois ciclos (da espermatogônia ao espermatozoide) de modo que as alterações importantes na estrutura do cisto germinativo e perda das pontes citoplasmáticas entre as células germinativas possam ainda não ter reflexos na quantidade de espermatozoides em 15 dias de exposição. Trabalhos adicionais com períodos de exposição maiores de 15 dias devem ser considerados.

Embora a exposição ao Roundup WG nas concentrações testadas não tenha provocado redução no número dos diferentes tipos de células germinativas, as alterações descritas na ultraestrutura das células germinativas podem indicar perda da qualidade nestas células. Neste sentido, foram avaliados parâmetros de estresse oxidativo (ERO), funcionalidade mitocondrial e integridade do DNA. Os resultados obtidos mostraram que o Roundup WG promoveu produção de ERO nas espermátides e espermatozoides nas três concentrações testadas, no período de 7 dias, o que não foi mais observado após 15 dias de exposição.

A produção de ERO é um parâmetro bastante utilizado em ensaios toxicológicos, por apresentar uma resposta rápida do organismo quando exposto a contaminantes. No entanto como esperado em exposições mais prolongadas, esse parâmetro passa a não refletir mais a toxicidade induzida por contaminantes. Isso porque, quando eficiente o sistema antioxidante da célula neutraliza a formação de ERO, prevenindo o estresse oxidativo (BIRBEN *et al.*, 2012).

O aumento de ERO nestas células pode se refletir em danos na estrutura celular e mitocondrial, qualidade das células germinativas e capacidade reprodutiva (SHIVA *et al.*, 2011). Segundo Aitken *et al.* (2012; 2016) a formação de ERO é um dos principais mecanismos responsáveis pela fragmentação de DNA em células germinativas, assim o resultado de ERO observado em 7 dias de exposição, está refletido no dano significativo na integridade do DNA genômico, observado em 7 e 15 dias de exposição, nas três concentrações testadas. A fragmentação de DNA também foi observada em *P. vivípara* exposta por 96 h a 0,7 mg/L (HARAYASHIKI *et al.*, 2013); em espermatozoides de *D. rerio* exposto a 10 mg/L de glifosato puro em 24 h e 96 h de exposição (LOPES *et al.*, 2014). No entanto no peixe *J. multidentada* exposto a 0,5 mg/L de Roundup WG não causou tal alteração após 96 h de exposição (SÁNCHEZ *et al.*, 2017). Avaliação da integridade de DNA dos espermatozoides é um importante parâmetro de avaliação de danos causados por exposição a contaminantes ambientais, vários autores descrevem que espermatozoides com fragmentação de DNA apresentam menor taxa de fertilidade, problemas com clivagem embrionária, baixa taxa de eclosão, e desenvolvimento anormal da prole (AGARWAL E ALLAMANENI, 2004; BUNGUM *et al.*, 2011; GOSÁLVEZ *et al.*, 2014).

O dano mitocondrial observado nos espermátocitos e espermatozoides, sugere que a fertilidade pode ser afetada negativamente. Os resultados obtidos não mostraram alteração no parâmetro de funcionalidade mitocondrial após a exposição ao Roundup WG nos períodos de exposição de 7 e 15 dias e três concentrações testadas. Do mesmo modo, Sánchez *et al.* (2017) não observaram alteração na funcionalidade mitocondrial para *J. multidentada*, exposto a 0,5 mg/L de três diferentes formulações comerciais de Roundp (Original, Trasorb e WG). Diferentes resultados foram encontrados para outras espécies de peixes quando expostos ao mesmo herbicida em exposições agudas, com uma diminuição significativa na funcionalidade mitocondrial, como por exemplo, para *P. vivípara* exposta por 96 h a 0,7 mg/L (HARAYASHIKI *et al.*, 2013); para *O. humensis* exposto por 24 h a 10 mg/L (SILVEIRA *et al.*, 2019); e para *D. rerio* exposto ao glifosato puro na concentração de 10

mg/L por 24 e 96 h (LOPES *et al.*, 2014). A função mitocondrial é um dos principais parâmetros da qualidade espermática, espermatozoides com alta função mitocondrial são mais viáveis, pois proporcionam uma motilidade maior dos espermatozoides (GILLAN *et al.*, 2005; CABRITA *et al.*, 2014).

A exposição ao Roundup WG induziu como resposta rápida frente ao estressor, a produção de ERO após 7 dias e a fragmentação do DNA após 7 e 15 dias, que juntos levam à redução da qualidade dos espermatozoides. As importantes alterações observadas na estrutura e ultraestrutura dos testículos de *D. rerio* após exposição ao Roundup WG por 15 dias, vistas principalmente em células de Sertoli com aumento do processo de autofagia, desorganização da estrutura do cisto germinativo e perda das pontes citoplasmáticas entre as células germinativas, certamente afetam o processo de espermatogênese.

O diferencial dos resultados dessa tese reside nas análises morfológicas dos compartimentos subcelulares das células de Sertoli e células germinativas, que demonstram o impacto da exposição ao Roundup WG no testículo de *D. rerio*. Classicamente os estudos em toxicologia empregam análises que se baseiam em respostas celulares rápidas frente as condições adversas. Essas respostas, de um modo geral, refletem um distúrbio momentâneo, que pode ou não, ser precursor de alterações sistêmicas. As análises morfológicas baseadas em períodos prolongados de exposição refletem como os sistemas celulares alteram sua estrutura e funcionalidade em resposta a estressores externos.

6 CONCLUSÕES

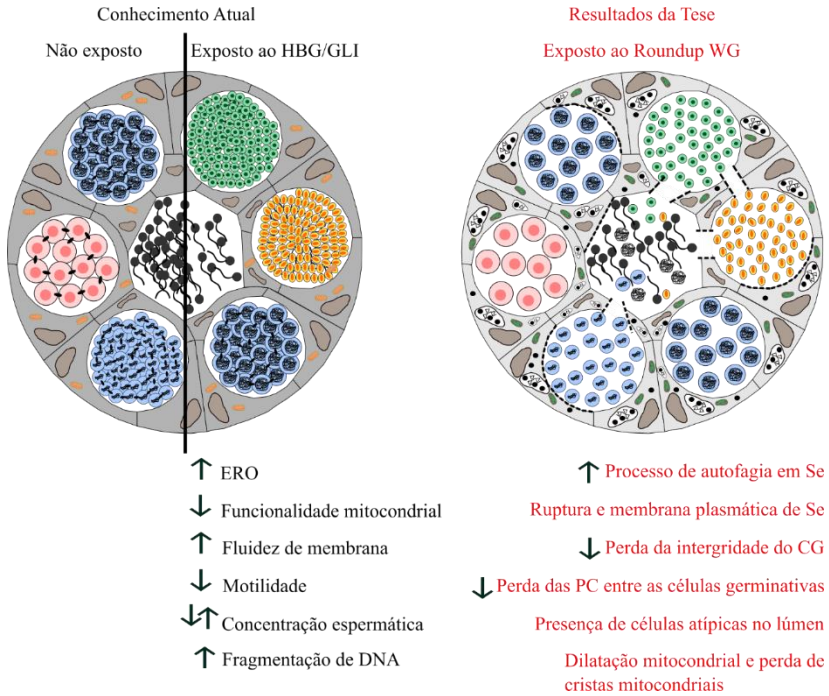
Os resultados apresentados neste trabalho permitiram a compreensão das alterações induzidas pelo Roundup WG na morfofuncionalidade dos testículos de *D. rerio*, em períodos de exposição em que este herbicida ainda pode ser encontrado em ambientes aquáticos. Esses efeitos comprometeram os compartimentos subcelulares, principalmente, das células de Sertoli. O aumento do processo autofágico nessas células ocorreu em resposta à toxicidade induzida pelo Roundup WG no sistema reprodutor de machos.

A exposição ao Roundup WG provocou danos morfológicos na organização dos cistos germinativos, decorrente das alterações nas células de Sertoli. Essas alterações morfológicas foram induzidas pelas três concentrações testadas, isso inclui, a concentração permitida como segura pelo órgão que regulamente as condições para proteção das comunidades aquáticas (0,065 mg/L).

Após a exposição ao Roundup WG não foi observada alteração no número das células germinativas, mas foi verificado aumento no nível de transcrito do gene *cyp17a1*, envolvido na regulação esteroidogênica. Adicionalmente, foram observadas alterações na qualidade das células germinativas, após exposição ao Roundup WG verificado pelo aumento na produção de ERO, e pela fragmentação do DNA.

Os resultados obtidos demonstram a toxicidade de herbicidas a base de glifosato, e fornecem novos conhecimentos para melhor compreender as alterações na morfofuncionalidade das células somáticas e germinativas induzidas pelo Roundup WG nos testículos de *D. rerio* (Figura 22).

Figura 22: Resumo gráfico dos efeitos da exposição de machos de *Danio rerio* ao Roundup WG.



Representação esquemática de túbulo seminífero de *D. rerio*. Célula de Sertoli (Se); Cisto germinativo (CG); Espécies reativas de oxigênio (ERO); Glifosato (GLI); Herbicida a base de glifosato (HBG); Pontes citoplasmáticas (PC).

7. REFERÊNCIAS

- ACOSTA I.B., VARELA A.S.J., SILVA E.F.E., CARDOSO T.F., CALDAS J.S., JARDIM R.D., CORCINI C.D. (2016). Effects of exposure to cadmium in sperm cells of zebrafish, *Danio rerio*. *Toxicology Reports* 3:696-700.
- ADOLFI M.C., CARREIRA A.C., JESUS L.W., BOGERD J., FUNES R.M., SCHARTL M., SOGAYAR M.C., BORELLA M.I. (2015). Molecular cloning and expression analysis of *dmrt1* and *sox9* during gonad development and male reproductive cycle in the lambari fish, *Astyanax altiparanae*. *Reproductive Biology and Endocrinology* 13(2):1-15.
- AGARWAL A., ALLAMANENI S.S.R. (2004). The effect of sperm DNA damage on assisted reproduction outcomes. *Minerva Ginecol* 56(3):235-245.
- AITKEN R.J., JONES K.T., ROBERTSON S.A. (2012). Reactive Oxygen Species and Sperm Function—In Sickness and In Health. 33(6):1096-1106.
- AITKEN R.J., GIBB Z., BAKER M.A., DREVET J., GHARAGOZLOO P. (2016). Causes and consequences of oxidative stress in spermatozoa. *Reproduction, fertility, and development* 28(1-2):1-10.
- AKINGBEMI B.T., GE R., KLINEFELTER G.R., ZIRKIN B.R., HARDY M.P. (2004). Phthalate-induced Leydig cell hyperplasia is associated with multiple endocrine disturbances. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(3):775-780.
- ALBINATI A.C.L., MOREIRA E.L.T., ALBINATI R.C.B., CARVALHO J.V.D., SANTOS G.B., LIRA A.D.D. (2007). Toxicidade aguda do herbicida Roundup® para piauçu (*Leporinus macrocephalus*). *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal* 8(3):184-192.

- ALMEIDA F.F.L., SCHULZ R.W., KRISTOFFERSEN C., TARANGER G.L. (2008). Spermatogenesis in Atlantic Cod (*Gadus morhua*): A Novel Model of Cystic Germ Cell Development. *Biology of Reproduction* 78:27-34.
- AMARANTE JUNIOR O.P.D., DOS SANTOS T.C.R., BRITO N.M., RIBEIRO M.L. (2002). Glifosato: propriedades, toxicidade, usos e legislação. *Química Nova* 25(4):589-593.
- ANKLEY G., FRANCIS E., GRAY E., KAVLOCK R., MCMASTER S., REESE D., SAYLES G., SERGEANT A., VALLERO D. (1998). Research plan for endocrine disruptors. Office of research and development. USEPA v. EPA/600/R-98/087:1-55.
- ANNETT R., HABIBI H.R., HONTELA A. (2014). Impact of glyphosate and glyphosate-based herbicides on the freshwater environment. *Journal of Applied Toxicology* 34:458-479.
- ANVISA (2012). Seminário volta a discutir mercado de agrotóxicos em 2012. Disponível em: < <http://portal.anvisa.gov.br> >. Acesso em: 03/05/2016.
- ANVISA (2015). Anvisa irá reavaliar glifosato e outros quatro agrotóxicos utilizados no país. Disponível em: < <http://portal.anvisa.gov.br> >. Acesso em: 28/02/2016.
- ANVISA (2017). Glifosato prossegue sob análise na Anvisa. Disponível em: < <http://portal.anvisa.gov.br> >. Acesso em: 10/08/2017.
- ANVISA (2019). Nota Técnica Nº 23/2018 - Apresenta a Nota Técnica Preliminar sobre as conclusões da reavaliação do Glifosato com as respectivas recomendações e proposta de minuta de RDC a ser submetida à consulta pública, pp. 1-10.
- ARMILIATO N., AMMAR D., NEZZI L., STRALIOTTO M., MULLER Y.M., NAZARI E.M. (2014). Changes in ultrastructure and expression of steroidogenic factor-1 in ovaries of zebrafish *Danio rerio* exposed to glyphosate. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A* 77(7):405-414.

- BAO Z.-Q., LIAO T.-T., YANG W.-R., WANG Y., LUO H.-Y., WANG X.-Z. (2017). Heat stress-induced autophagy promotes lactate secretion in cultured immature boar Sertoli cells by inhibiting apoptosis and driving SLC2A3, LDHA, and SLC16A1 expression. *Theriogenology* 87:339-348.
- BARRETO J.D.S., TAROUCO F.D.M., GODOI F.G.A.D., GEIHS M.A., ABREU F.E.L., FILLMANN G., SANDRINI J.Z., DA ROSA C.E. (2018). Induction of oxidative stress by chlorothalonil in the estuarine polychaete *Laonereis acuta*. *Aquatic Toxicology* 196:1-8.
- BENAMÚ M.A., SCHNEIDER M.I., SÁNCHEZ N.E. (2010). Effects of the herbicide glyphosate on biological attributes of *Alpaida veniliae* (Araneae, Araneidae), in laboratory. *Chemosphere* 78(7):871-876.
- BENBROOK C.M. (2016). Trends in glyphosate herbicide use in the United States and globally. *Environmental Sciences Europe* 28(3):1-15.
- BIRBEN E., SAHINER U.M., SACKESSEN C., ERZURUM S., KALAYCI O. (2012). Oxidative stress and antioxidant defense. *The World Allergy Organization journal* 5(1):9-19.
- BRASIL (1989). Lei Nº 7.802, de 11 de julho de 1989: Dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências. *Diário Oficial da União*:1415-1437.
- BRASIL (2005). Resolução No 357, de 17 de março de 2005: Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. *Diário Oficial da União* 18:1-9.
- BRASIL (2008). Resolução No 396, de 3 de abril de 2008: Dispõe sobre a classificação e diretrizes ambientais para o enquadramento das águas subterrâneas e dá outras providências. *Diário Oficial da União* 66:66-68.

- BRASIL (2011). Portaria Nº 2.914, de 12 de dezembro de 2011: Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. Diário Oficial da União:1-16.
- BRAZ-MOTA S., SADAUSKAS-HENRIQUE H., DUARTE R.M., VAL A.L., ALMEIDA-VAL V.M.F. (2015). Roundup® exposure promotes gills and liver impairments, DNA damage and inhibition of brain cholinergic activity in the Amazon teleost fish *Colossoma macropomum*. *Chemosphere* 135:53-60.
- BRIDI D., ALTENHOFEN S., GONZALEZ J.B., REOLON G.K., BONAN C.D. (2017). Glyphosate and Roundup® alter morphology and behavior in zebrafish. *Toxicology* 392:32-39.
- BUNGUM M., BUNGUM L., GIWERCMAN A. (2011). Sperm chromatin structure assay (SCSA): a tool in diagnosis and treatment of infertility. *Asian journal of andrology* 13(1):69-75.
- BURELLA P.M., SIMONIELLO M.F., POLETTA G.L. (2017). Evaluation of Stage-Dependent Genotoxic Effect of Roundup® (Glyphosate) on *Caiman latirostris* Embryos. *Archives of Environmental Contamination Toxicology in Vitro* 72(1):50-57.
- CABRITA E., MARTÍNEZ-PÁRAMO S., GAVAIA P.J., RIESCO M.F., VALCARCE D.G., SARASQUETE C., HERRÁEZ M.P., ROBLES V. (2014). Factors enhancing fish sperm quality and emerging tools for sperm analysis. *Aquaculture* 432:389-401.
- CASTRO A.J.G., BAPTISTA I.E., DE MOURA K.R.S., PADILHA F., TONIETTO J., DE SOUZA A.Z.P., SOARES C.H.L., SILVA F., VAN DER KRAAK G. (2018). Exposure to a Brazilian pulp mill effluent impacts the testis and liver in the zebrafish. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 206-207:41-47.
- CATTANEO R., CLASEN B., LORO V.L., DE MENEZES C.C., PRETTO A., BALDISSEROTTO B., SANTI A., DE AVILA L.A. (2011). Toxicological Responses of *Cyprinus carpio* Exposed to a Commercial Formulation Containing Glyphosate. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 87(6):597-602.

- ÇAVAŞ T., KÖNEN S. (2007). Detection of cytogenetic and DNA damage in peripheral erythrocytes of goldfish (*Carassius auratus*) exposed to a glyphosate formulation using the micronucleus test and the comet assay. *Mutagenesis* 22(4):263-268.
- CLAIR É., MESNAGE R., TRAVERT C., SÉRALINI G.-É. (2012). A glyphosate-based herbicide induces necrosis and apoptosis in mature rat testicular cells *in vitro*, and testosterone decrease at lower levels. *Toxicology in Vitro* 26(2):269-279.
- CONCEA (2013). Conselho nacional de controle de experimentação animal. Diretrizes da pratica de eutanasia do CONCEA. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação:1-49.
- CONNOLLY A., JONES K., BASINAS I., GALEA K.S., KENNY L., MCGOWAN P., COGGINS M.A. (2019). Exploring the half-life of glyphosate in human urine samples. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 222(2):205-210.
- CONRAD A., SCHRÖTER-KERMANI C., HOPPE H.-W., RÜTHER M., PIEPER S., KOLOSSA-GEHRING M. (2017). Glyphosate in German adults – Time trend (2001 to 2015) of human exposure to a widely used herbicide. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 220(1):8-16.
- DAMMSKI A.P., MÜLLER B.R., GAYA C., REGONATO D. (2011). Zebrafish - Manual de Criação em Biotério. 1 ed. Curitiba.
- DAVICO C.E. (2017). Toxicidade celular do herbicida à base de glifosato, Roundup® WG: impactos sobre a organização morfofuncional dos ovários do peixe-zebra *Danio rerio*, como modelo experimental., Universidade Federal de Santa Catarina.
- DE MARÍA N., BECERRIL J.M., GARCÍA-PLAZAOLA J.I., HERNÁNDEZ A., DE FELIPE M.R., FERNÁNDEZ-PASCUAL M. (2006). New Insights on Glyphosate Mode of Action in Nodular Metabolism: Role of Shikimate Accumulation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54(7):2621-2628.

- DEEPANANDA A.K.H.M., GAJAMANGE D., SILVA W.A.J.P.D., WEGIRIYA H.C.E. (2011). Acute toxicity of a glyphosate herbicide, Roundup®, to two freshwater crustaceans. *Journal of the National Science Foundation of Sri Lanka* 39(2):169-173.
- DEFARGE N., TAKÁCS E., LOZANO V.L., MESNAGE R., SPIROUX DE VENDÔMOIS J., SÉRALINI G.-E., SZÉKÁCS A. (2016). Co-Formulants in Glyphosate-Based Herbicides Disrupt Aromatase Activity in Human Cells below Toxic Levels. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 13(264):1-17.
- DUAN P., HU C., QUAN C., YU T., ZHOU W., YUAN M., SHI Y., YANG K. (2016). 4-Nonylphenol induces apoptosis, autophagy and necrosis in Sertoli cells: Involvement of ROS-mediated AMPK/AKT-mTOR and JNK pathways. *Toxicology* 341-343:28-40.
- DUKE S.O., POWLES S.B. (2008). Glyphosate: a once-in-a-century herbicide. *Pest Management Science* 64(4):319-325.
- EDWARDS W.M., TRIPLETT G.B., KRAMER R.M. (1980). A Watershed Study of Glyphosate Transport in Runoff1. *Journal of environmental quality* 9(4):661-665.
- EID N., ITO Y., OTSUKI Y. (2012). Enhanced mitophagy in Sertoli cells of ethanol-treated rats: morphological evidence and clinical relevance. *Journal of Molecular Histology* 43(1):71-80.
- ENGESZER R.E., PATTERSON L.B., RAO A.A., PARICHY D.M. (2007). Zebrafish in the wild: a review of natural history and new notes from the field. *Zebrafish* 4(1):21-40.
- EVENSON D.P., THOMPSON L., JOST L. (1994). Flow cytometric evaluation of boar semen by the sperm chromatin structure assay as related to cryopreservation and fertility. *Theriogenology* 41(3):637-651.
- EVENSON D.P. (2016). The Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA®) and other sperm DNA fragmentation tests for evaluation of sperm nuclear DNA integrity as related to fertility. *Animal Reproduction Science* 169:56-75.

- FERNANDES C., FONTAÍNHAS-FERNANDES A., PEIXOTO F., SALGADO M.A. (2007). Bioaccumulation of heavy metals in *Liza saliens* from the Esmoriz-Paramos coastal lagoon, Portugal. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 66(3):426-431.
- FIGUEROA E., MERINO O., RISOPATRÓN J., ISACHENKO V., SÁNCHEZ R., EFFER B., ISACHENKO E., FARIAS J.G., VALDEBENITO I. (2015). Effect of seminal plasma on Atlantic salmon (*Salmo salar*) sperm vitrification. *Theriogenology* 83(2):238-245.
- FRANÇA L.R., HESS R.A., DUFOUR J.M., HOFMANN M.C., GRISWOLD M.D. (2016). The Sertoli cell: one hundred fifty years of beauty and plasticity. *Andrology* 4(2):189-212.
- GASNIER C., DUMONT C., BENACHOUR N., CLAIR E., CHAGNON M.-C., SÉRALINI G.-E. (2009). Glyphosate-based herbicides are toxic and endocrine disruptors in human cell lines. *Toxicology* 262(3):184-191.
- GAUPP-BERGHAUSEN M., HOFER M., REWALD B., ZALLER J.G. (2015). Glyphosate-based herbicides reduce the activity and reproduction of earthworms and lead to increased soil nutrient concentrations. *Scientific reports* 5:1-9.
- GAUTIER A., SOHM F., JOLY J.-S., LE GAC F., LAREYRE J.-J. (2011). The Proximal Promoter Region of the Zebrafish *gsdf* Gene Is Sufficient to Mimic the Spatio-Temporal Expression Pattern of the Endogenous Gene in Sertoli and Granulosa Cells1. *Biology of Reproduction* 85(6):1240-1251.
- GHOLAMI-SEYEDKOLAEI S.J., MIRVAGHEFI A., FARAHMAND H., KOSARI A.A., GHOLAMI-SEYEDKOLAEI S.J., GHOLAMI-SEYEDKOLAEI S.J. (2013). Optimization of recovery patterns in common carp exposed to roundup using response surface methodology: Evaluation of neurotoxicity and genotoxicity effects and biochemical parameters. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 98:152-161.
- GIESY J.P., DOBSON S., SOLOMON K.R. (2000). Ecotoxicological Risk Assessment for Roundup® Herbicide. In: *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology: Continuation of Residue Reviews*. GW Ware editor. New York, NY: Springer New York, pp. 35-120.

- GILLAN L., EVANS G., MAXWELL W.M.C. (2005). Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential. *Theriogenology* 63(2):445-457.
- GLUSZCZAK L., MIRON D.D.S., MORAES B.S., SIMÕES R.R., SCHETINGER M.R.C., MORSCH V.M., LORO V.L. (2007). Acute effects of glyphosate herbicide on metabolic and enzymatic parameters of silver catfish (*Rhamdia quelen*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 146(4):519-524.
- GOSÁLVEZ J., LÓPEZ-FERNÁNDEZ C., HERMOSO A., FERNÁNDEZ J.L., KJELLAND M.E. (2014). Sperm DNA fragmentation in zebrafish (*Danio rerio*) and its impact on fertility and embryo viability — Implications for fisheries and aquaculture. *Aquaculture* 433:173-182.
- GRUNWALD D.J., EISEN J.S. (2002). Headwaters of the zebrafish — emergence of a new model vertebrate. *Nature Reviews Genetics* 3(9):717-724.
- GUILHERME S., GAIVÃO I., SANTOS M.A., PACHECO M. (2012). 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* 743(1):1-9.
- HANKE I., WITTMER I., BISCHOFBERGER S., STAMM C., SINGER H. (2010). Relevance of urban glyphosate use for surface water quality. *Chemosphere* 81(3):422-429.
- HANSEN T.E., JOHANSEN T. (2011). Following autophagy step by step. *BMC biology* 9:39-39.
- HARAYASHIKI C.A.Y., JUNIOR A.S.V., MACHADO A.A.D.S., CABRERA L.D.C., PRIMEL E.G., BIANCHINI A., CORCINI C.D. (2013). Toxic effects of the herbicide Roundup in the guppy *Poecilia vivipara* acclimated to fresh water. *Aquatic Toxicology* 142-143:176-184.
- HASSAN S.A., FAROUK S.M., ABBOTT L.C. (2016). Transmission electron microscopic evaluation of neuronal changes in methylmercury-exposed zebrafish embryos (*Danio rerio*). *Ultrastructural Pathology* 40(6):333-341.

- HE J.-H., GAO J.-M., HUANG C.-J., LI C.-Q. (2014). Zebrafish models for assessing developmental and reproductive toxicity. *Neurotoxicology and Teratology* 42:35-42.
- HILDEBRAND L.D., SULLIVAN D.S., SULLIVAN T.P. (1982). Experimental studies of rainbow trout populations exposed to field applications of Roundup® herbicide. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 11(1):93-98.
- HOFMANN M.-C. (2008). Gdnf signaling pathways within the mammalian spermatogonial stem cell niche. *Molecular and cellular endocrinology* 288(1):95-103.
- HORIBE A., EID N., ITO Y., HAMAOKA H., TANAKA Y., KONDO Y. (2017). Upregulated Autophagy in Sertoli Cells of Ethanol-Treated Rats Is Associated with Induction of Inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS), Androgen Receptor Suppression and Germ Cell Apoptosis. *International journal of molecular sciences* 18(1061):1-17.
- HORIBE A., EID N., ITO Y., OTSUKI Y., KONDO Y. (2019). Ethanol-Induced Autophagy in Sertoli Cells Is Specifically Marked at Androgen-Dependent Stages of the Spermatogenic Cycle: Potential Mechanisms and Implications. *International journal of molecular sciences* 20(1):184-196.
- HUSZNO J., KLAG J. (2012). The reproductive cycle in the male gonads of *Danio rerio* (Teleostei, Cyprinidae). *Stereological analysis. Micron* 43(5):666-672.
- IBGE (2012). *Indicadores de Desenvolvimento Sustentável - Brasil 2012* Rio de Janeiro.
- IBGE (2015). *Indicadores de Desenvolvimento Sustentável - Brasil 2015* Rio de Janeiro.
- JARAMILLO M.L., PEREIRA A.G., DAVICO C.E., NEZZI L., AMMAR D., MULLER Y.M.R., NAZARI E.M. (2018). Evaluation of reference genes for reverse transcription-quantitative PCR assays in organs of zebrafish exposed to glyphosate-based herbicide, Roundup. *Animal : an international journal of animal bioscience* 12(7):1424-1434.

- JIRAUNGKOORSKUL W., UPATHAM E.S., KRUATRACHUE M., SAHAPHONG S., VICHASRI-GRAMS S., POKETHITIYOOK P. (2002). Histopathological effects of Roundup, a glyphosate herbicide, on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Science Asia* 28:121-127.
- JIRAUNGKOORSKUL W., UPATHAM E.S., KRUATRACHUE M., SAHAPHONG S., VICHASRI-GRAMS S., POKETHITIYOOK P. (2003). Biochemical and histopathological effects of glyphosate herbicide on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Environmental Toxicology* 18(4):260-267.
- KOMIVES T., SCHRÖDER P. (2016). On glyphosate. *Ecocycles* 2(2):1-8.
- KOTIL T., AKBULUT C., YON N.D. (2017). The effects of titanium dioxide nanoparticles on ultrastructure of zebrafish testis (*Danio rerio*). *Micron* 100:38-44.
- LAJMANOVICH R.C., ATTADEMO A.M., PELTZER P.M., JUNGES C.M., CABAGNA M.C. (2011). Toxicity of Four Herbicide Formulations with Glyphosate on *Rhinella arenarum* (Anura: Bufonidae) Tadpoles: B-esterases and Glutathione S-transferase Inhibitors. *Archives of Environmental Contamination Toxicology* 60(4):681-689.
- LANG X., WANG L., ZHANG Z. (2016). Stability evaluation of reference genes for real-time PCR in zebrafish (*Danio rerio*) exposed to cadmium chloride and subsequently infected by bacteria *Aeromonas hydrophila*. *Aquatic Toxicology* 170:240-250.
- LANGIANO V.D.C., MARTINEZ C. (2008). Toxicity and effects of a glyphosate-based herbicide on the Neotropical fish *Prochilodus lineatus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 147(2):222-231.
- LEAL M.C., CARDOSO E.R., BATLOUNI S.R., FRANÇA L.R., NÓBREGA R.H., BOGERD J., SCHULZ R.W. (2009a). Histological and Stereological Evaluation of Zebrafish (*Danio rerio*) Spermatogenesis with an Emphasis on Spermatogonial Generations. *Biology of Reproduction* 81(1):177-187.

- LEAL M.C., DE WAAL P.P., GARCÍA-LÓPEZ Á., CHEN S.X., BOGERD J., SCHULZ R.W. (2009b). Zebrafish primary testis tissue culture: An approach to study testis function *ex vivo*. *General and Comparative Endocrinology* 162(2):134-138.
- LIM S.L., TSEND-AYUSH E., KORTSCHAK R.D., JACOB R., GRÜTZNER F., RICCIARDELLI C., OEHLER M.K. (2013). Conservation and Expression of PIWI-Interacting RNA Pathway Genes in Male and Female Adult Gonad of Amniotes. *Biology of Reproduction* 89(6):1-13.
- LIMA A.C., JUNG M., RUSCH J., USMANI A., LOPES A., CONRAD D.F. (2016). Multispecies Purification of Testicular Germ Cells. *Biology of reproduction* 95(4):85-85.
- LIU C., WANG H., SHANG Y., LIU W., SONG Z., ZHAO H., WANG L., JIA P., GAO F., XU Z. *et al.* (2016a). Autophagy is required for ectoplasmic specialization assembly in sertoli cells. *Autophagy* 12(5):814-832.
- LIU S., WANG Z., MIAO J. (2016b). Potential roles of annexin A7 GTPase in autophagy, senescence and apoptosis. *RSC Advances* 6(115):114587-114592.
- LIVAK K.J., SCHMITTGEN T.D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods* 25(4):402-408.
- LOPES F.M., VARELA JUNIOR A.S., CORCINI C.D., DA SILVA A.C., GUAZZELLI V.G., TAVARES G., DA ROSA C.E. (2014). Effect of glyphosate on the sperm quality of zebrafish *Danio rerio*. *Aquatic Toxicology* 155:322-326.
- LOPES F.M., SANDRINI J.Z., SOUZA M.M. (2018). Toxicity induced by glyphosate and glyphosate-based herbicides in the zebrafish hepatocyte cell line (ZF-L). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 162:201-207.
- LUSHCHAK O.V., KUBRAK O.I., STOREY J.M., STOREY K.B., LUSHCHAK V.I. (2009). Low toxic herbicide Roundup induces mild oxidative stress in goldfish tissues. *Chemosphere* 76(7):932-937.

- MA Y., YANG H.Z., XU L.M., HUANG Y.R., DAI H.L., KANG X.N. (2015). Testosterone regulates the autophagic clearance of androgen binding protein in rat Sertoli cells. *Scientific Reports* 5(8894):1-8.
- MALLAT E., BARCELÓ D. (1998). Analysis and degradation study of glyphosate and of aminomethylphosphonic acid in natural waters by means of polymeric and ion-exchange solid-phase extraction columns followed by ion chromatography–post-column derivatization with fluorescence detection. *Journal of Chromatography A* 823(1):129-136.
- MARQUES A., GUILHERME S., GAIVÃO I., SANTOS M.A., PACHECO M. (2014). Progression of DNA damage induced by a glyphosate-based herbicide in fish (*Anguilla anguilla*) upon exposure and post-exposure periods — Insights into the mechanisms of genotoxicity and DNA repair. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 166:126-133.
- MATHAI B.J., MEIJER A.H., SIMONSEN A. (2017). Studying Autophagy in Zebrafish. *Cells* 6(3):1-26.
- MATTA S.R.L.P., VILELA D.A.R., FRANÇA L.R., GODINHO H.P. (2002). The Goitrogen 6-n-Propyl-2-Thiouracil (PTU) Given during Testis Development Increases Sertoli and Germ Cell Numbers per Cyst in Fish: The Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Model. *Endocrinology* 143(3):970-978.
- MELO M.S.D., SANTOS T.P.G.D., JARAMILLO M., NEZZI L., RAUH MULLER Y.M., NAZARI E.M. (2019). Histopathological and ultrastructural indices for the assessment of glyphosate-based herbicide cytotoxicity in decapod crustacean hepatopancreas. *Aquatic Toxicology* 210:207-214.
- MENÉNDEZ-HELMAN R.J., MIRANDA L.A., DOS SANTOS AFONSO M., SALIBIÁN A. (2015). Subcellular energy balance of *Odontesthes bonariensis* exposed to a glyphosate-based herbicide. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 114:157-163.

- MENSAH P.K., PALMER C.G., ODUME O.N. (2015). Ecotoxicology of Glyphosate and Glyphosate-Based Herbicides—Toxicity to Wildlife and Humans. In: Toxicity and Hazard of Agrochemicals: InTech, pp. 21.
- MODESTO K.A., MARTINEZ C.B.R. (2010). Roundup® causes oxidative stress in liver and inhibits acetylcholinesterase in muscle and brain of the fish *Prochilodus lineatus*. Chemosphere 78(3):294-299.
- MOHAMED A.H. (2011). Sublethal toxicity of Roundup to immunological and molecular aspects of *Biomphalaria alexandrina* to *Schistosoma mansoni* infection. Ecotoxicology and Environmental Safety 74(4):754-760.
- MONSEES T.K., FRANZ M., GEBHARDT S., WINTERSTEIN U., SCHILL W.-B., HAYATPOUR J. (2000). Sertoli cells as a target for reproductive hazards. Andrologia 32(4-5):239-246.
- MORENO N.C., SOFIA S.H., MARTINEZ C.B.R. (2014). Genotoxic effects of the herbicide Roundup Transorb® and its active ingredient glyphosate on the fish *Prochilodus lineatus*. Environmental Toxicology and Pharmacology 37(1):448-454.
- MOTTIER A., SÉGUIN A., DEVOS A., PABIC C.L., VOISEUX C., LEBEL J.M., SERPENTINI A., FIEVET B., COSTIL K. (2015). Effects of subchronic exposure to glyphosate in juvenile oysters (*Crassostrea gigas*): From molecular to individual levels. Marine Pollution Bulletin 95(2):665-677.
- MOURA F.R.D., BRENTGANI K.R., GEMELLI A., SINHORIN A.P., SINHORIN V.D.G. (2017). Oxidative stress in the hybrid fish jundiara (*Leiarius marmoratus* × *Pseudoplatystoma reticulatum*) exposed to Roundup Original®. Chemosphere 185:445-451.
- MYERS J.P., ANTONIOU M.N., BLUMBERG B., CARROLL L., COLBORN T., EVERETT L.G., HANSEN M., LANDRIGAN P.J., LANPHEAR B.P., MESNAGE R. *et al.* (2016). Concerns over use of glyphosate-based herbicides and risks associated with exposures: a consensus statement. Environmental Health 15(19):1-13.

- NAKATOGAWA H., SUZUKI K., KAMADA Y., OHSUMI Y. (2009). Dynamics and diversity in autophagy mechanisms: lessons from yeast. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 10:458-467.
- NEZZI L. (2015). Efeito do herbicida glifosato sobre as células somáticas e germinativas de testículo de peixe *Danio rerio* (Hamilton, 1822), Universidade Federal de Santa Catarina.
- NÓBREGA R.H., BATLOUNI S.R., FRANÇA L.R. (2009). An overview of functional and stereological evaluation of spermatogenesis and germ cell transplantation in fish. *Fish Physiology Biochemistry* 35(1):197-206.
- NWANI C.D., NAGPURE N.S., RAVINDRA K., BASDEO K., PAVAN K., LAKRA W.S. (2010). Lethal concentration and toxicity stress of Carbosulfan, Glyphosate and Atrazine to freshwater air breathing fish *Channa punctatus* (Bloch). *International Aquatic Research* 2(2):105-111.
- OECD (1992). Fish, acute toxicity test. Guideline for the testing of chemicals. Organisation for Economic Co-operation and Development:1-9.
- OLIVEIRA A.G., TELLES L.F., HESS R.A., MAHECHA G.A.B., OLIVEIRA C.A. (2007). Effects of the herbicide Roundup on the epididymal region of drakes *Anas platyrhynchos*. *Reproductive Toxicology* 23(2):182-191.
- OROZCO-GARCÍA E., GALLEGO-GÓMEZ J.C. (2016). Autophagy and Lipid Metabolism – A Cellular Platform where Molecular and Metabolic Pathways Converge to Explain Dengue Viral Infection. In: *Cell Biology - New Insights*, pp. 163-185.
- PARNG C., SENG W.L., SEMINO C., MCGRATH P. (2002). Zebrafish: a preclinical model for drug screening. *Assay and Drug Development Technologies* 1(1):41-48.
- PEREIRA A.G., JARAMILLO M.L., REMOR A.P., LATINI A., DAVICO C.E., DA SILVA M.L., MÜLLER Y.M.R., AMMAR D., NAZARI E.M. (2018). Low-concentration exposure to glyphosate-based herbicide modulates the complexes of the mitochondrial respiratory chain and induces

- mitochondrial hyperpolarization in the *Danio rerio* brain. *Chemosphere* 209:353-362.
- PÉREZ G.L., VERA M.S., MIRANDA L. (2011). Effects of herbicide glyphosate and glyphosate-based formulations on aquatic ecosystems. In: *Herbicides and environment*: IntechOpen, pp. 29.
- PERUZZO P.J., PORTA A.A., RONCO A.E. (2008). Levels of glyphosate in surface waters, sediments and soils associated with direct sowing soybean cultivation in north pampasic region of Argentina. *Environmental Pollution* 156(1):61-66.
- PFAFFL M.W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research* 29(9):e45-e45.
- PFAFFL M.W., TICHOPAD A., PRGOMET C., NEUVIANS T.P.J.B.L. (2004). Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper – Excel-based tool using pair-wise correlations. *26(6):509-515*.
- PRATA F., LAVORENTI A., REGITANO J.B., VEREECKEN H., TORNISIELO V.L., PELISSARI A. (2005). Glyphosate behavior in a Rhodic Oxisol under no-till and conventional agricultural systems. *Revista Brasileira de Ciência do Solo* 29(1):61-69.
- PUDNEY J. (1995). Spermatogenesis in nonmammalian vertebrates. *Microscopy Research and Technique* 32(6):459-497.
- RAGHUVVEER K., SENTHILKUMARAN B. (2010). Isolation of *sox9* duplicates in catfish: localization, differential expression pattern during gonadal development and recrudescence, and hCG-induced up-regulation of *sox9* in testicular slices. *Reproduction* 140(3):477-487.
- RASMUSSEN J.J., WIBERG-LARSEN P., BAATTRUP-PEDERSEN A., CEDERGREEN N., MCKNIGHT U.S., KREUGER J., JACOBSEN D., KRISTENSEN E.A., FRIBERG N. (2015). The legacy of pesticide pollution: An overlooked factor in current risk assessments of freshwater systems. *Water Research* 84:25-32.

- REBELO R.M., VASCONCELOS R.A., BUYS B.D.M.C., REZENDE J.A., MORAES K.O.C., OLIVEIRA R.P. (2010). Produtos agrotóxicos e afins comercializados em 2009 no Brasil: uma abordagem ambiental.
- RELYEA R.A. (2005). The impact of insecticides and herbicides on the biodiversity and productivity of aquatic communities. *Ecological Applications* 15(2):618-627.
- RENO U., DOYLE S.R., MOMO F.R., REGALDO L., GAGNETEN A.M. (2018). Effects of glyphosate formulations on the population dynamics of two freshwater cladoceran species. *Ecotoxicology* 27(7):784-793.
- ROCHA T.L., SANTOS A.P.R.D., YAMADA Á.T., SOARES C.M.D.A., BORGES C.L., BAILÃO A.M., SABÓIA-MORAIS S.M.T. (2015). Proteomic and histopathological response in the gills of *Poecilia reticulata* exposed to glyphosate-based herbicide. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 40(1):175-186.
- RODRÍGUEZ-MARÍ A., YAN Y.-L., BREMILLER R.A., WILSON C., CAÑESTRO C., POSTLETHWAIT J.H. (2005). Characterization and expression pattern of zebrafish *anti-Müllerian hormone* (*amh*) relative to *sox9a*, *sox9b*, and *cyp19a1a*, during gonad development. *Gene Expression Patterns* 5(5):655-667.
- ROMANO M.A., ROMANO R.M., SANTOS L.D., WISNIEWSKI P., CAMPOS D.A., DE SOUZA P.B., VIAU P., BERNARDI M.M., NUNES M.T., DE OLIVEIRA C.A. (2012). Glyphosate impairs male offspring reproductive development by disrupting gonadotropin expression. *Archives of Toxicology* 86(4):663-673.
- ROMANO R.M., ROMANO M.A., BERNARDI M.M., FURTADO P.V., OLIVEIRA C.A. (2010). Prepubertal exposure to commercial formulation of the herbicide glyphosate alters testosterone levels and testicular morphology. *Archives of Toxicology* 84(4):309-317.
- ROY N.M., OCHS J., ZAMBRZYCKA E., ANDERSON A. (2016). Glyphosate induces cardiovascular toxicity in *Danio rerio*. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 46:292-300.

- RUPIK W., HUSZNO J., KLAG J. (2011). Cellular organisation of the mature testes and stages of spermiogenesis in *Danio rerio* (Cyprinidae; Teleostei)—Structural and ultrastructural studies. *Micron* 42(8):833-839.
- SAALFELD G.Q., VARELA JUNIOR A.S., CASTRO T., PEREIRA F.A., GHELLER S.M.M., DA SILVA A.C., CORCINI C.D., DA ROSA C.E., COLARES E.P. (2018). Low atrazine dosages reduce sperm quality of *Calomys laucha* mice. *Environmental Science Pollution Research* 25(3):2924-2931.
- SAKUMA M. (1998). Probit analysis of preference data. *Applied Entomology and Zoology* 33(3):339-347.
- SALBEGO J., PRETTO A., GIODA C.R., DE MENEZES C.C., LAZZARI R., RADÜNZ NETO J., BALDISSEROTTO B., LORO V.L. (2010). Herbicide formulation with glyphosate affects growth, acetylcholinesterase activity, and metabolic and hematological parameters in piava (*Leporinus obtusidens*). *Archives of Environmental Contamination Toxicology* 58(3):740-745.
- SÁNCHEZ J.A.A., VARELA A.S., CORCINI C.D., DA SILVA J.C., PRIMEL E.G., CALDAS S., KLEIN R.D., MARTINS C.D.M.G. (2017). Effects of Roundup formulations on biochemical biomarkers and male sperm quality of the livebearing *Jenynsia multidentata*. *Chemosphere* 177:200-210.
- SANTANA M.S., YAMAMOTO F.Y., SANDRINI-NETO L., FILIPAK NETO F., ORTOLANI-MACHADO C.F., OLIVEIRA RIBEIRO C.A., PRODOCIMO M.M. (2018). Diffuse sources of contamination in freshwater fish: Detecting effects through active biomonitoring and multi-biomarker approaches. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 149:173-181.
- SCHULZ R.D.W., MENTING S., BOGERD J., FRANÇA L.R., VILELA D.A., GODINHO H.P. (2005). Sertoli cell proliferation in the adult testis—evidence from two fish species belonging to different orders. *Biology of Reproduction* 73(5):891-898.
- SCHULZ R.W., MIURA T. (2002). Spermatogenesis and its endocrine regulation. *Fish Physiology and Biochemistry* 26(1):43-56.

- SCHULZ R.W., DE FRANÇA L.R., LAREYRE J.-J., LEGAC F., CHIARINI-GARCIA H., NOBREGA R.H., MIURA T. (2010). Spermatogenesis in fish. *General and Comparative Endocrinology* 165(3):390-411.
- SEGNER H. (2009). Zebrafish (*Danio rerio*) as a model organism for investigating endocrine disruption. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 149(2):187-195.
- SHIVA M., GAUTAM A.K., VERMA Y., SHIVGOTRA V., DOSHI H., KUMAR S. (2011). Association between sperm quality, oxidative stress, and seminal antioxidant activity. *Clinical Biochemistry* 44(4):319-324.
- SILVEIRA T., VARELA JUNIOR A.S., CORCINI C.D., DOMINGUES W.B., REMIÃO M., SANTOS L., BARRETO B., LESSA I., MARTINS D., BOYLE R.T. *et al.* (2019). Roundup® Herbicide Decreases Quality Parameters of Spermatozoa of Silversides *Odontesthes Humensis*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 102(1):1-6.
- SINHORIN V.D.G., SINHORIN A.P., TEIXEIRA J.M.D.S., MILÉSKI K.M.L., HANSEN P.C., MOREIRA P.S.A., KAWASHITA N.H., BAVIERA A.M., LORO V.L. (2014). Effects of the acute exposition to glyphosate-based herbicide on oxidative stress parameters and antioxidant responses in a hybrid Amazon fish surubim (*Pseudoplatystoma sp.*). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 106:181-187.
- SOSO A.B., BARCELLOS L.J.G., RANZANI-PAIVA M.J., KREUTZ L.C., QUEVEDO R.M., ANZILIERO D., LIMA M., SILVA L.B.D., RITTER F., BEDIN A.C. *et al.* (2007). Chronic exposure to sub-lethal concentration of a glyphosate-based herbicide alters hormone profiles and affects reproduction of female Jundiá (*Rhamdia quelen*). *Environmental Toxicology and Pharmacology* 23(3):308-313.
- SPENCE R., FATEMA M.K., REICHARD M., HUQ K.A., WAHAB M.A., AHMED Z.F., SMITH C. (2006). The distribution and habitat preferences of the zebrafish in Bangladesh. *Journal of Fish Biology* 69(5):1435-1448.
- SPENCE R., GERLACH G., LAWRENCE C., SMITH C. (2008). The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. *Biological Reviews* 83(1):13-34.

- STREISINGER G., WALKER C., DOWER N., KNAUBER D., SINGER F. (1981). Production of clones of homozygous diploid zebra fish (*Brachydanio rerio*). *Nature* 291(5813):293-296.
- SZAREK J., SIWICKI A., ANDRZEJEWSKA A., TERECH-MAJEWSKA E., BANASZKIEWICZ T. (2000). Effects of the herbicide Roundup™ on the ultrastructural pattern of hepatocytes in carp (*Cyprinus carpio*). *Marine Environmental Research* 50(1):263-266.
- TAROUCO F.D.M., GODOI F.G.A.D., VELASQUES R.R., GUERREIRO A.D.S., GEIHS M.A., ROSA C.E.D. (2017). Effects of the herbicide Roundup on the polychaeta *Laeonereis acuta*: Cholinesterases and oxidative stress. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 135:259-266.
- TONI L.R.M., SANTANA H.D., ZAIA D.A.M. (2006). Adsorção de glifosato sobre solos e minerais. *Química Nova* 29(4):829-833.
- URIBE M.C., GRIER H.J., MEJÍA-ROA V. (2015). Comparative testicular structure and spermatogenesis in bony fishes. *Spermatogenesis* 4(3):e983400-983401-e983400-983413.
- USEPA (2016). National Primary Drinking Water Regulations. Disponível em: < <https://www.epa.gov/ground-water-and-drinking-water/national-primary-drinking-water-regulations#Organic> >. Acesso em: 10/02/2016.
- VAN DER OOST R., BEYER J., VERMEULEN N.P.E. (2003). Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 13(2):57-149.
- VAN DER VEN L., WESTER P. (2003). Histology and histopathology atlas of the zebrafish. Disponível em: < <http://zfishtoxpat.comoj.com> >. Acesso em: 03/03/2015.
- VANHOUWAERT S., VAN PEER G., RIHANI A., JANSSENS E., RONDOU P., LEFEVER S., DE PAEPE A., COUCKE P.J., SPELEMAN F., VANDESOMPELE J. *et al.* (2014). Expressed repeat elements improve RT-qPCR normalization across a wide range of zebrafish gene expression studies. *PloS one* 9(10):e109091-e109091.

- VELASQUES R.R., SANDRINI J.Z., DA ROSA C.E. (2016). Roundup® in zebrafish: Effects on oxidative status and gene expression. *Zebrafish* 13(5):432-441.
- VEREECKEN H. (2005). Mobility and leaching of glyphosate: a review. *Pest Management Science* 61(12):1139-1151.
- WALSH L.P., MCCORMICK C., MARTIN C., STOCCO D.M. (2000). Roundup inhibits steroidogenesis by disrupting steroidogenic acute regulatory (StAR) protein expression. *Environmental Health Perspectives* 108(8):769-776.
- WEBSTER T.M.U., LAING L.V., FLORANCE H., SANTOS E.M. (2014). Effects of glyphosate and its formulation, roundup, on reproduction in zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental science & technology* 48(2):1271-1279.
- WEISBROD A.V., BURKHARD L.P., ARNOT J., MEKENYAN O., HOWARD P.H., RUSSOM C., BOETHLING R., SAKURATANI Y., TRAAS T., BRIDGES T. *et al.* (2007). Workgroup report: review of fish bioaccumulation databases used to identify persistent, bioaccumulative, toxic substances. *Environmental Health Perspectives* 115(2):255-261.
- WILLIAMS G.M., KROES R., MUNRO I.C. (2000). Safety Evaluation and Risk Assessment of the Herbicide Roundup and Its Active Ingredient, Glyphosate, for Humans. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 31(2):117-165.
- YANG Y., QI S., WANG D., WANG K., ZHU L., CHAI T., WANG C. (2016). Toxic effects of thifluzamide on zebrafish (*Danio rerio*). *Journal of Hazardous Materials* 307:127-136.
- YANG Z., KLIONSKY D.J. (2010). Eaten alive: a history of macroautophagy. *Nature Cell Biology* 12(9):814-822.
- YOSHIDA S. (2016). From cyst to tubule: innovations in vertebrate spermatogenesis. *Developmental Biology* 5(1):119-131.
- YOULE R.J., NARENDRA D.P. (2011). Mechanisms of mitophagy. *Nature reviews Molecular cell biology* 12(1):9-14.

ZHANG D.L., ZHANG J., HU C.X., WANG G.H., LI D.H., LIU Y.D. (2014). Morphological alterations and acetylcholinesterase and monoamine oxidase inhibition in liver of zebrafish exposed to *Aphanizomenon flos-aquae* DC-1 aphantoxins. *Aquatic Toxicology* 157:215-224.