

**LUCIANE NEZZI**

**EFEITO DO HERBICIDA GLIFOSATO SOBRE AS CÉLULAS  
SOMÁTICAS E GERMINATIVAS DE TESTÍCULO DE PEIXE  
*Danio rerio* (Hamilton, 1822)**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento, do Centro de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular e do Desenvolvimento.

Orientadora: Profa Dra. Evelise Maria Nazari

Florianópolis  
2015

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

Nezzi, Luciane

EFEITO DO HERBICIDA GLIFOSATO SOBRE AS  
CÉLULAS SOMÁTICAS E GERMINATIVAS DE TESTÍCULO DE  
PEIXE *Danio rerio* (Hamilton, 1822) / Luciane  
Nezzi ; orientador, Evelise Maria Nazari -  
Florianópolis, SC, 2015.

xxii + 59 p p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal  
de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas.  
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e  
do Desenvolvimento.

Inclui referências

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

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



## AGRADECIMENTOS

Em especial à minha orientadora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Evelise Maria Nazari pela oportunidade, confiança, inesgotável paciência para ensinar, generosidade, amizade, presença constante e colaboração na realização deste trabalho.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Yara Maria Rauh Müller, pela acolhida em seu laboratório e pelo exemplo, aprendizado e apoio durante o mestrado.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento, por ter oportunizado a realização deste trabalho.

A todos os colegas do Laboratório de Reprodução e Desenvolvimento Animal pela amizade e momentos de agradável convivência.

Em especial aos amigos Gilian e Neide, pelo incentivo, pela ajuda e também pelos divertidos encontros e passeios.

Aos meus pais Jaci e Lourdes, a minha irmã Luciana, ao meu irmão Jaciel e minha cunhada Luana, que apesar da distância física sempre se fizeram presentes através do estímulo, carinho e apoio incondicional em todos os momentos.

As pesquisadoras Cátia Silve Klein e Jalusa Deon Kich, que me abriram as portas de um laboratório, pela oportunidade de conhecer e me encantar com a pesquisa, pelos ensinamentos que fazem parte da minha formação, pela beleza de responder uma pergunta hoje e criar três novas, pela convivência, pela amizade.

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

À CAPES pela bolsa concedida.

Muito 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

O glifosato é um herbicida utilizado para inibir o crescimento de plantas daninhas. Este herbicida é solúvel em água e, quando aplicado em sistemas terrestres, infiltra no solo atingindo os ecossistemas aquáticos e conseqüentemente, afetando organismos não-alvo. O objetivo deste estudo foi caracterizar os efeitos de 65 µg/L glifosato sobre a organização estrutural e ultraestrutural das células somáticas e germinativas durante a espermatogênese de *Danio rerio*. A concentração de glifosato utilizada corresponde ao limite máximo estabelecido pelo CONAMA para águas de abastecimento par consumo humano. Os resultados mostram aumento significativo de micronúcleos, além de aumento significativo no índice gonadossomático (IGS) nos machos expostos por 360 h. A análise estrutural permitiu o reconhecimento em todos grupos de três estágios de cistos germinativos organizados próximos a parede dos testículos, que correspondem aqueles compostos por: (i) espermatogônias, (ii) espermatócitos, (iii) espermátides (iniciais e tardias); além da presença de espermatozoides no lúmen do túbulo seminífero. Na análise ultraestrutural observou-se alterações nas células de Sertoli, com perda da densidade do citoplasma e das organelas, bem como o aparecimento de estruturas com aspecto vesicular. Além dessas, foram observadas alterações das interações entre células de Sertoli e células germinativas e perda das pontes citoplasmáticas entre as células germinativas. Na análise de expressão da proteína envolvida no estresse celular foi observado no grupo exposto por 144 h, aumento significativo de HSP70 induzível, a qual não foi mais observado em 360 h. Na quantificação de FASL, envolvida na indução à apoptose, observou-se aumento significativo nos machos expostos por 360 h. Embora neste estudo, tenha sido reconhecido uma aumento de FASL, não foram observadas modificações na expressão nenhuma das proteínas de ativação à apoptose investigadas (BCL2, BAK e caspase 3). Os efeitos adversos do glifosato sobre os testículos, principalmente sobre células de Sertoli, são um importante indicativo sobre as conseqüências na reprodução de peixes, que podem abranger desde o nível celular, sistêmico e populacional. Por fim, este estudo demonstrou a importância de se investigar a toxicidade do glifosato sobre a reprodução masculina, utilizando testículos de peixe como modelo experimental.

**Palavras-chave:** agrotóxicos, *zebrafish*, espermatogênese, células de Sertoli, ultraestrutura.



## ABSTRACT

Glyphosate is herbicide used to inhibit the growth of weeds. This herbicide is soluble in water, and when applied in terrestrial systems, glyphosate infiltrates into the soil, reaching aquatic ecosystems and consequently affecting nontarget organisms. The aim of this study was to characterize the effect of 65  $\mu\text{g/L}$  glyphosate on the structural and ultrastructural organization of somatic and germ cells during *Danio rerio* spermatogenesis. Glyphosate concentration used corresponds to the maximum level stated by CONAMA for waters for human consumption. Our results showed significant increase of the micronuclei, as well as, significant increase in GSI on males exposed to glyphosate for 360 h. Structural analysis allowed the recognition in all groups of three germ cysts stages, organized near to the testes wall, that correspond to those that contains: (i) spermatogonia, (ii) spermatocytes (iii) spermatids (early and late), and the presence of sperm in the lumen of the seminiferous tubule. On the ultrastructural analysis, alterations were observed in Sertoli cells, with density loss of the cytoplasm and organelles, as well as, the appearance of structures with vesicular aspect. Moreover, alterations on interactions between Sertoli and germ cells and loss of cytoplasmic bridges between the germ cells. On the analysis of protein expression involved in cell stress, was observed after 144 h a significant increase in the inducible HSP70 protein, which is no observed at 360 h. In the quantification of FASL, involved in apoptosis induction, there was a significant increase in males exposed for 360 h. Although in this study has been recognized a FASL increasing, there was no observed modifications on expression of the investigated proteins that activate apoptosis (BCL2, BAK and Caspase 3). The adverse effects of glyphosate on the testicles, mainly on Sertoli cells, are an important indicative of the consequences on fish reproduction, which may include from the cellular, systemic and population levels. Finally, this study demonstrated the importance of investigating the glyphosate toxicity on male reproduction, using fish testicles as experimental model.

**Keywords:** pesticides, zebrafish, spermatogenesis, Sertoli cells, ultrastructure.



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Fórmula estrutural do glifosato .....	25
<b>Figura 2:</b> Representação esquemática das respostas dentro de um sistema biológico .....	27
<b>Figura 3:</b> Exemplar de macho adulto de <i>D. rerio</i> .....	30
<b>Figura 4:</b> Organização básica do testículo de <i>D. rerio</i> .....	32
<b>Figura 5:</b> Formação de micronúcleos em hemácias de <i>D. rerio</i> .....	45
<b>Figura 6:</b> Índice gonadossomático dos machos de <i>D. rerio</i> .....	47
<b>Figura 7:</b> Análise morfométrica dos túbulos seminíferos e cistos germinativos de <i>D. rerio</i> .....	48
<b>Figura 8:</b> Análise ultraestrutural de secções ultrafinas de testículo de <i>D. rerio</i> não exposto ao glifosato .....	50
<b>Figura 9:</b> Análise ultraestrutural de secções ultrafinas de testículo de <i>D. rerio</i> não exposto ao glifosato .....	51
<b>Figura 10:</b> Análise ultraestrutural de secções ultrafinas de testículo de <i>D. rerio</i> não exposto ao glifosato.....	52
<b>Figura 11:</b> Análise ultraestrutural de secções ultrafinas de testículo de <i>D. rerio</i> .....	53
<b>Figura 12:</b> Análise ultraestrutural de testículo de <i>D. rerio</i> expostos a 65 µg/L de glifosato por 360 h.....	54
<b>Figura 13:</b> Imunolocalização das proteínas envolvidas na toxicidade celular em testículo de <i>D. rerio</i> .....	56
<b>Figura 14:</b> Quantificação da proteína de estresse celular HSP 70 induzível, por citometria de fluxo.....	58
<b>Figura 15:</b> Quantificação da proteína de indução a apoptose pela via extrínseca FASL, por citometria de fluxo.....	59
<b>Figura 16:</b> Quantificação da proteína anti-apoptótica BCL2, por citometria de fluxo .....	60
<b>Figura 17:</b> Quantificação da proteína pró-apoptótica BAK, por citometria de fluxo .....	61
<b>Figura 18:</b> Quantificação da proteína efetora da apoptose Caspase 3, por citometria de fluxo .....	62



## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1:</b> Descrição dos lotes experimentais propostos para o estudo da toxicidade do glifosato em machos adultos de <i>D. rerio</i> .....	38
<b>Quadro 2:</b> Detalhamento dos anticorpos primários utilizados nas técnicas de citometria de fluxo e imunofluorescência.....	41
<b>Quadro 3:</b> Detalhamento dos anticorpos secundários utilizados nas técnicas de citometria de fluxo e imunofluorescência.....	41

## LISTA DE TABELA

<b>Tabela 1:</b> Medidas de peso corporal e peso dos testículos de <i>D. rerio</i> submetidos aos dois lotes experimentais para estudo do efeito do glifosato.....	46
--	----



**LISTA DE ABREVIATURAS**

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BAK	Proteína pró-apoptótica, do inglês <i>Bcl2-antagonist killer</i>
BCL2	Proteína anti-apoptótica, do inglês <i>B celllymphoma 2</i>
Ca <sup>+2</sup>	Íon Cálcio
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais/UFSC
CG	Cisto germinativo
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
DAPI	Sonda nuclear, do inglês <i>4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride</i>
Ec	Espermatócito
Eg	Espermatogônia
EPSPs	Enzima 5-enolpiruvil-chiquimato-3-fosfato-sintase
Et	Espermátide
Ez	Espermatozoide
FASL	Receptor de morte, do inglês <i>FAS Ligand</i>
G	Corpos de Golgi
HSP70	Proteína de choque térmico 70 k Da induzível, do inglês <i>Heat Shock Protein 70</i>
I	Interstício
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IGS	Índice gonadossomático
L	Lúmen
Le	Células de Leydig
M	Mitocôndria
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
Mg <sup>+2</sup>	Íon de Magnésio

MMA	Ministério do Meio Ambiente
MN	Micronúcleo
N	Núcleo
Nu	Nucléolo
PBS	Tampão fosfato salino, do inglês <i>phosphate buffered saline</i>
PC	Pontes citoplasmáticas
R	Retículo plasmático
Se	Células de Sertoli
SFB	Soro fetal bovino
USEPA	Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos da América, do inglês <i>United States Environmental Protection Agency</i>

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	23
1.1	O herbicida glifosato e seu potencial toxicológico .....	24
1.2	<i>Danio rerio</i> como modelo experimental .....	29
1.3	Estrutura testicular de <i>Danio rerio</i> .....	30
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	35
2.1	Geral .....	35
2.2	Específicos.....	35
<b>3</b>	<b>METODOLOGIA</b> .....	37
3.1	Animais .....	37
3.2	Delineamento experimental.....	37
3.3	Biometria corporal e determinação do índice gonadossomático (IGS) .....	39
3.4	Identificação de micronúcleos .....	39
3.5	Preparo dos testículos para análises microscópicas .....	40
3.6	Marcações celulares por imunofluorescência .....	40
3.7	Análises ultraestruturais.....	41
3.8	Análises morfológicas e morfométricas dos cistos germinativos .....	42
3.9	Citometria de fluxo .....	42
3.10	Análise estatística.....	43
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	45
4.1	Identificação de micronúcleos.....	45
4.2	Biometria corporal e determinação do índice gonadossomático (IGS).....	45
4.3	Análises morfológicas e morfométricas dos túbulos seminíferos de <i>D. rerio</i> .....	47
4.4	Análises ultraestruturais de testículo de <i>D. rerio</i> .....	48
4.5	Efeitos do glifosato sobre a ultraestrutura de testículo de <i>D. rerio</i> .....	49
4.6	Toxicidade celular do glifosato .....	55
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	63
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	69
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	71



## 1 INTRODUÇÃO

Os ecossistemas aquáticos são considerados os mais relevantes ambientes receptores de contaminantes, os quais incluem compostos orgânicos, metais pesados e agrotóxicos (Bogoni et al., 2014). Tais contaminantes podem atingir os ecossistemas aquáticos por descargas diretas ou através das chuvas, lavagem do solo e infiltrações, gerando consequências a curto (efeito agudo), médio (subcrônico) e longo prazo (crônico) em sua biodiversidade (van der Oost et al., 2003, Rebelo et al., 2010).

Dentre os agrotóxicos que potencialmente contaminam os ambientes aquáticos, estão herbicidas, fungicidas e inseticidas, intensamente utilizados nas produções agrícolas (Guilherme et al., 2012). Dados mostram que durante o período de 1975 a 2009, o Brasil esteve entre os seis maiores consumidores de agrotóxicos do mundo (Rebelo et al., 2010). Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA/Brasil) as vendas de agrotóxicos no Brasil aumentaram mais de 72% entre 2006 e 2012, assumindo em 2008 o posto de maior mercado consumidor de agrotóxicos do mundo (ANVISA, 2012; IBGE, 2012).

Dentre os agrotóxicos comercializados, os herbicidas representam 45% do total utilizado, sendo os herbicidas à base de glifosato e seus sais, os que lideram o *ranking* no mercado, correspondendo à 38,5% e 60% do consumo brasileiro e mundial, respectivamente (Amarante Júnior et al., 2002; ANVISA, 2012, IBGE, 2012). As propriedades do herbicida glifosato foram descobertas por cientistas da Monsanto Company em 1970 nos Estados Unidos, sendo introduzido no mercado americano pela primeira vez em 1974, para controle de plantas daninhas (Williams et al., 2000; Vereecken, 2005). No Brasil suas vendas foram iniciadas em 1978, e sua fabricação no país em 1984 (IBGE, 2012).

Desde 2009, a ANVISA iniciou processo de reavaliação dos herbicidas a base de glifosato e seus sais, considerando a sua grande utilização, a ocorrência de casos de intoxicação, a solicitação da revisão da ingestão diária aceitável, a necessidade de controle de limite máximo de impurezas presentes no produto e os possíveis efeitos toxicológicos. Entretanto o processo de reavaliação desses herbicidas ainda não foi concluído (ANVISA, 2012; IBGE, 2012).

Estudos voltados para o reconhecimento do mecanismo de ação dos herbicidas a base de glifosato e seus sais, principalmente para a caracterização de seus efeitos agudos, subcrônicos e crônicos, utilizando

diversos modelos animais, são fundamentais para avaliação de risco do uso de herbicidas (van der Oost et al., 2003). De fato, a literatura atual é bastante divergente quanto aos efeitos induzidos pelo uso de herbicidas a base de glifosato, bem como, quanto a dose, tempo de exposição e parâmetros analisados. Além disso, não há consenso quanto aos limites máximos aceitáveis de glifosato dissolvido na água.

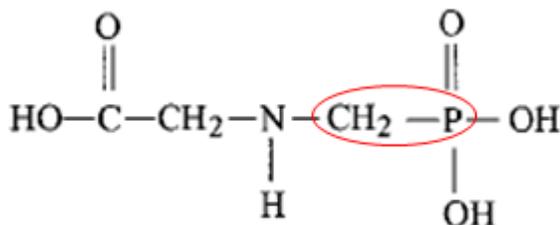
### 1.1 O herbicida glifosato e seu potencial toxicológico

A legislação brasileira para agrotóxicos, Lei nº 7.802/1989, considera, de forma geral, como substâncias agrotóxicas e afins, os produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos destinados ao uso nos setores de produção, armazenamento e beneficiamento, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos, sendo classificados de acordo com os seus organismos-alvo (BRASIL, 1989).

O Decreto nº 4.074, estabelece que cabe ao Ministério do Meio Ambiente (MMA) a missão de realizar a avaliação ambiental dos agrotóxicos, estabelecendo suas classificações quanto ao potencial de periculosidade ambiental (Brasil, 2002). Por sua vez, o MMA delega ao Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) as atividades de análise, registro e controle de substâncias químicas e agrotóxicas (Brasil, 2007). Tais análises se baseiam nas características do produto, a exemplo de como as propriedades físico-químicas e sua toxicidade para os variados organismos; quanto o produto se acumula em tecidos vivos; se persiste por muito tempo no ambiente; e sua capacidade de deslocamento no ar, solo e água; sua capacidade de induzir mutações, câncer; seu efeito na reprodução animal; sua capacidade de induzir anomalias congênitas em embriões ou fetos. De acordo com estes critérios, no Brasil o glifosato está classificado toxicologicamente na Classe IV, que o define como "pouco perigoso", conforme classificação baseada na dose letal 50 (DL50) (ANVISA, 2014).

O glifosato é um herbicida organofosforado pertencente ao grupo químico das glicinas substituídas, cuja formulação comercial recebe o nome químico de [N-(fosfonometil)glicina], sendo a fórmula molecular  $C_3H_8NO_5P$ . Devido a sua ligação estável entre carbono e fosfato (C-P) (Figura 1) apresenta boa estabilidade enzimática e térmica, solubilidade em água de  $12\text{g L}^{-1}$  a  $25^\circ\text{C}$ , boa estabilidade na presença da luz, além da

capacidade anfótera, atuando como ácido fraco e base fraca ao mesmo tempo (Amarante Júnior et al., 2002; Cavalli et al., 2012).



**Figura 1:** Fórmula estrutural do glifosato, destacando a ligação C-P Adaptado de Willians et al. (2000).

O glifosato é classificado como um herbicida pós emergente, não seletivo e de ação sistêmica, apresentando um amplo espectro de ação, sendo que seu uso possibilita um excelente controle de plantas daninhas anuais ou perenes. No Brasil o uso de glifosato está registrado para 26 culturas, como café, cana-de-açúcar, arroz, soja, maçã, citrus, entre outras (Giesy et al., 2000; Amarante Júnior et al., 2002; Çaglar e Kolankaya, 2008; Rebelo et al., 2010; Webster et al., 2014).

A principal função do glifosato é inibir o crescimento de plantas, pela interferência na produção de aminoácidos aromáticos essenciais, através da via da enzima 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase (EPSPs), responsável pela biossíntese de corismato, um intermediário na síntese de fenilalanina, tirosina e triptofano. Estas vias são as responsáveis por proteínas de defesa exclusivas das plantas contra organismos patogênicos e por compostos fenólicos e alcalóides (Willians et al., 2000; Toni et al., 2006; Webster et al., 2014).

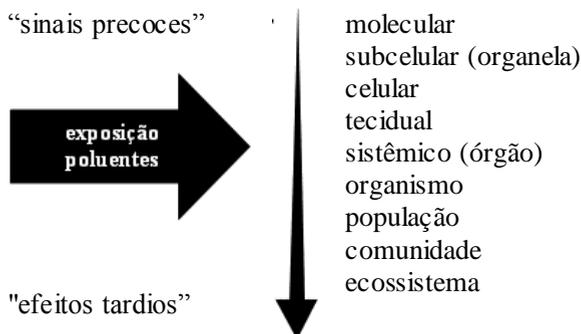
De modo geral, a aplicação do glifosato nas plantações se dá por pulverização, sendo que grande parte do herbicida pulverizado chega ao solo, onde apresenta rápida e alta taxa de adsorção pelos sedimentos e partículas. Esta rápida adsorção se dá devido a sua característica anfótera e à capacidade de formar complexos com íons metálicos de maneira semelhante à solução aquosa. Assim, essa formação de complexos com íons é a responsável, pela sua baixa taxa de degradação, permitindo que o glifosato permaneça estável no solo e chegue em sua forma livre aos ambientes aquáticos (Willians et al., 2000; Pessagno et al., 2008).

Dependendo do tipo de solo, o glifosato (Prata et al. 2005) pode apresentar tempo de meia-vida de 45-60 dias, podendo chegar de 141-197 dias (Giesy et al., 2000; Prata et al., 2005; Toni et al., 2006), o tempo de permanência no solo se dá em função da retenção, que é influenciada pela composição do mesmo. Em áreas agrícolas, os sedimentos do solo carregam o glifosato até o ambiente aquático, através de lixiviação do solo pela chuva e erosão, onde passa a apresentar meia-vida de 7 a 21 dias (Amarante Júnior et al., 2002; Martínez e Cólus, 2002; Toni et al., 2006). Em solução, o glifosato se torna aderido ao material orgânico em suspensão, depositando-se no sedimento, passando a ser absorvido e acumulado pelos organismos não-alvo, como peixes e invertebrados (Peruzzo et al., 2008).

Sendo assim, considerando a não-seletividade do glifosato, as atividades agrícolas que o utilizam e o potencial para oferecer riscos à qualidade do solo e da água superficial e subterrânea, tem-se procurado estabelecer critérios para a sua concentração máxima em águas destinadas ao consumo, a Comunidade Econômica Européia (EEC) estabelece a concentração admissível de 0,1 µg/L (de qualquer agrotóxico) em águas destinadas ao consumo humano (Mallat e Barceló, 1998), já a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (US EPA) estabelece o nível máximo de glifosato em água potável de 700 µg/L (USEPA, 2014).

No Brasil, é responsabilidade do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), vinculado ao MMA, estabelecer normas, critérios e padrões relativos ao controle e à manutenção da qualidade do meio ambiente, sendo assim, a Resolução nº 357/05 classifica os corpos d'água, regulamenta uma variedade de substâncias, estabelecendo a concentração máxima permitida das mesmas, de acordo com as diferentes classes de água. Nas águas das classes 1 e 2, destinadas ao abastecimento para o consumo humano e à proteção das comunidades aquáticas, a concentração máxima permitida de glifosato é de 65 µg/L (Brasil, 2005).

Embora cada país tenha sua concentração máxima permitida de glifosato nos ambientes aquáticos, estudos têm demonstrado a necessidade de se focar as concentrações não letais deste herbicida, cujos efeitos silenciosos, podem afetar os organismos em vários níveis, deste o molecular até o populacional, a exemplo de outros poluentes (Figura 2) (van der Oost et al., 2003; Begum, 2004)



**Figura 2:** Representação esquemática da ordem sequencial das respostas dentro de um sistema biológico ao estresse ocasionado por exposição à poluentes (adaptado de van der Oost et al., 2003).

Em razão desta problemática, e para caracterizar o nível de toxicidade do glifosato foram realizados estudos utilizando diferentes modelos animais, visando identificar as principais respostas biológicas e os potenciais danos causados pelo uso deste herbicida. Um estudo com a aranha *Alpaida veniliae* submetida a tratamento com soluções de 192mg/L de Glifoglex 48, demonstrou a ocorrência de ovários anormais, com reduzido número e diâmetro dos oócitos, bem como a presença de grânulos de gordura no citoplasma destas células (Benamu et al., 2010). Em girinos de rã touro *Lithobates catesbeiana* avaliados após 48 h de exposição a uma concentração subletal de 1 mg/L de glifosato, as atividades da superóxido dismutase e catalase, enzimas antioxidantes, foram alteradas no fígado e no músculo, enquanto que o dano oxidativo aumentou acima dos valores de controle em ambos os tecidos (Costa et al., 2008). Em peixes *Oreochromis niloticus* (tilápas do Nilo) expostos durante 3 meses a concentrações subcrônicas de 5 e 15 mg/L de glifosato, os órgãos apresentaram vários graus de alteração histopatológica, com vacuolização de hepatócitos e picnose nuclear, lesões renais e acumulação de gotículas de hialina nas células epiteliais tubulares (Jiraungkoorskul et al., 2003). Já o peixe *Prochilodus lineatus* (curimatá) exposto de forma aguda a 10 mg/L de glifosato, nos intervalos de 6, 24 e 96 h, apresentou interferência nas defesas antioxidantes, levando a ocorrência de peroxidação lipídica (Modesto e Martinez, 2010). A toxicidade do glifosato em células testiculares de ratos adultos (70 dias), foi observada através de sinais de apoptose, pela ativação da expressão das Caspases 7/3, em um período de 24-48 h de

exposição a 1000 ppm de glifosato, bem como necrose de células de Leydig, células de Sertoli e das células germinativas (Clair et al., 2012).

De fato, destaca-se como um efeito comum de substâncias tóxicas, a indução ao processo de morte celular programada por apoptose (Yamashita, 2003; McClusky et al., 2008; Franco et al., 2009; Clair et al., 2012;). Esse tipo de morte celular é mediado por cascatas de proteínas ativadas por três diferentes vias, duas conhecidas como intrínsecas e uma extrínseca. Dentre as vias intrínsecas, uma delas é ativada em decorrência a existências de danos ao DNA, que por sua vez desencadeia a ativação de proteínas da família da BCL2, as quais são reguladoras da apoptose (Wei et al., 2001). Nessa família de proteínas, a chamada anti-apoptótica é a BCL2 e as pró-apoptóticas são BAK, BAD e BAX, que alteram a permeabilidade da membrana mitocondrial (Wei et al., 2001; Susnow et al., 2009; Chi et al., 2014). A outra via intrínseca é ativada pela geração de espécies reativas de oxigênio, promovendo a peroxidação de lipídios, proteínas, carboidratos e ácidos nucleicos, e consequente alteração na permeabilidade da membrana mitocondrial. Em ambas as vias, a alteração do potencial de membrana mitocondrial promove a liberação de citocromo *c* e ativação da cascata de proteínas apoptóticas, finalizando com a ativação da Caspase 3 (Sevgiler et al., 2004; Parvez e Raisuddin, 2005, Franco et al., 2009). A via apoptótica extrínseca é desencadeada pela ligação de ligantes específicos a um grupo de receptores transmembrana na superfície celular. Esses receptores possuem um subdomínio extracelular, permitindo que eles reconheçam seus ligantes, como as proteína FAS e FAS-L, que sinalizam receptores citoplasmáticos, como a FADD. Essas moléculas têm a capacidade de recrutarem e ativarem a cascata de Caspases 8/3 (Yamashita, 2003, Grivicich et al., 2007).

Dentre os sistemas orgânicos que podem sofrer algum tipo de alteração, o endócrino é considerado um alvo principal da manifestação tóxica do glifosato, que atua como disruptor endócrino, principalmente nas funções de hormônio esteróide-dependente, que por sua vez, podem ser responsáveis por alterações relacionadas ao sistema reprodutivo, tanto de machos como de fêmeas (USEPA 1998; Gasnier et al., 2009). A produção de esteróides é importante para diferenciação sexual, o desenvolvimento das características sexuais secundárias, o comportamento sexual e para a regulação da gametogênese (Weltzien et al., 2004).

Nos ambientes naturais, tem-se proposto a utilização de peixes como biomarcadores de contaminação aquática, 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 (Fernandes et al., 2007; Weisbrod et al., 2007). De modo geral, os organismos bioindicadores oferecem respostas biológicas geradas em um ecossistema sujeito a contaminantes, essas respostas são medidas através de alterações biológicas nos fluidos corporais, células ou tecidos. Além disso, os organismos bioindicadores fornecem respostas quanto à exposição a concentrações subletais de substâncias tóxicas, que desencadeiam distúrbios morfológicos e fisiológicos. Sendo assim, espécies de peixes são frequentemente utilizadas em estudos ambientais, pois são relativamente sensíveis a mudanças no ambiente, e seu uso em estudos toxicológicos tem se mostrado bastante apropriado (van der Oost et al., 2003; Weisbrod et al., 2007).

## **1.2 *Danio rerio* como modelo experimental**

Estudos toxicológicos utilizando peixes, especificamente da espécie *Danio rerio*, têm sido conduzidos desde a década de 1980, para investigar fármacos e também poluentes ambientais, especialmente os disruptores endócrinos que afetam a ligação de receptores de estrógenos (Law, 2001; Parnig et al., 2002; Grosell e Wood, 2002).

*Danio rerio* é uma espécie de peixe teleósteo originário da Índia, conhecida popularmente no mundo, como *zebrafish*, e no Brasil como paulistinha (Grunwald e Eisen, 2002). Apresenta comprimento total entre 3 a 4 cm, possui vida média em torno de três anos, atinge a maturidade sexual com 3 meses de vida e se reproduz em temperatura média de 26-28°C (Dammski et al., 2011) (Figura 3 A).

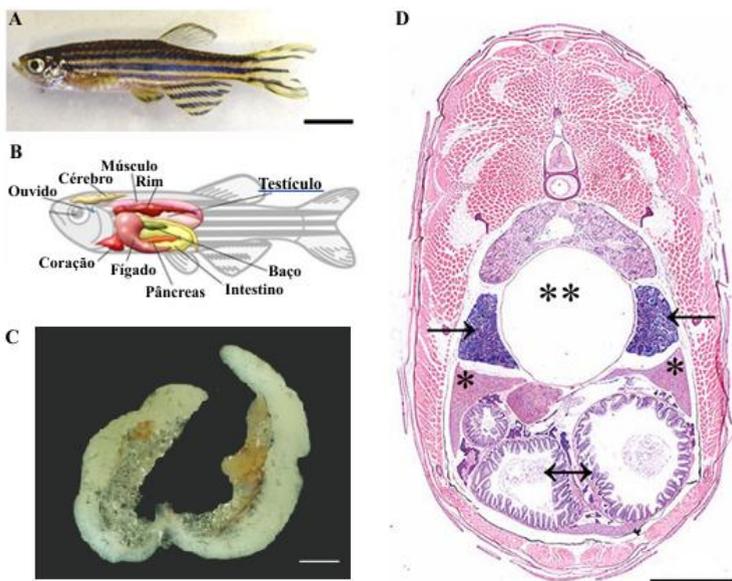
Diversas são as características que tornaram *D. rerio* um excelente modelo de estudo em toxicologia e reprodução, como: (i) as condições simples de manuseio, (ii) a forma cíclica de reprodução ocorre de forma cíclica, ajustada aos fatores ambientais, (iii) as gônadas apresentam uma série de modificações morfológicas e fisiológicas ao longo da estação reprodutiva, (iv) a capacidade de se reproduzir a cada 9-10 semanas, neste período a fêmea pode desovar cerca de 200-300 ovos, (v) sua fertilização é externa e prole numerosa, (Grunwald e Eisen, 2002; Akingbemi et al., 2004; Dammski et al., 2011; Huszno e Klag, 2012). Em conjunto com essas observações, o *D. rerio*, apresenta grande sensibilidade quando exposto a produtos químicos, por ser capaz de absorver de forma rápida os compostos que são diretamente

adicionados na água e acumulá-los em diferentes tecidos (Carvan et al., 2005).

No contexto acima, destacamos os estudos realizados no Laboratório de Reprodução e Desenvolvimento Animal/CCB/UFSC, que demonstram os efeitos do glifosato sobre os ovários de *D. rerio*, em particular, alterações ultraestruturais e bioquímicas (Armiliato et al., 2014). De modo geral, a toxicidade reprodutiva do glifosato, utilizando organismos não alvo, como os peixes, tem sido pouco explorada, sendo a reprodução dos machos ainda menos explorada.

### 1.3 Estrutura testicular de *Danio rerio*

*Danio rerio* é uma espécie dióica, cujos testículos são órgãos pares, alongados, de cor cinza claro a branco, localizados em ambos os lados da bexiga natatória ( Figura 3) (van der Ven e Wester, 2012).



**Figura 3:** Exemplar de macho adulto de *D. rerio* (A); Esquema de *D. rerio* mostrando posição interna dos órgãos (adaptado de <http://www.medicina.ufmg.br>) (B); Testículo dissecado (C); Secção transversal de macho adulto, demonstrando a posição dos testículos (seta preta), da bexiga natatória (duplo asterisco), do fígado (asterisco) e das alças intestinais (seta dupla), corado com HE (adaptado de van der Ven e Wester, 2012) (D). Barra de escalas em A = 0,5 cm; em C e D = 1 mm.

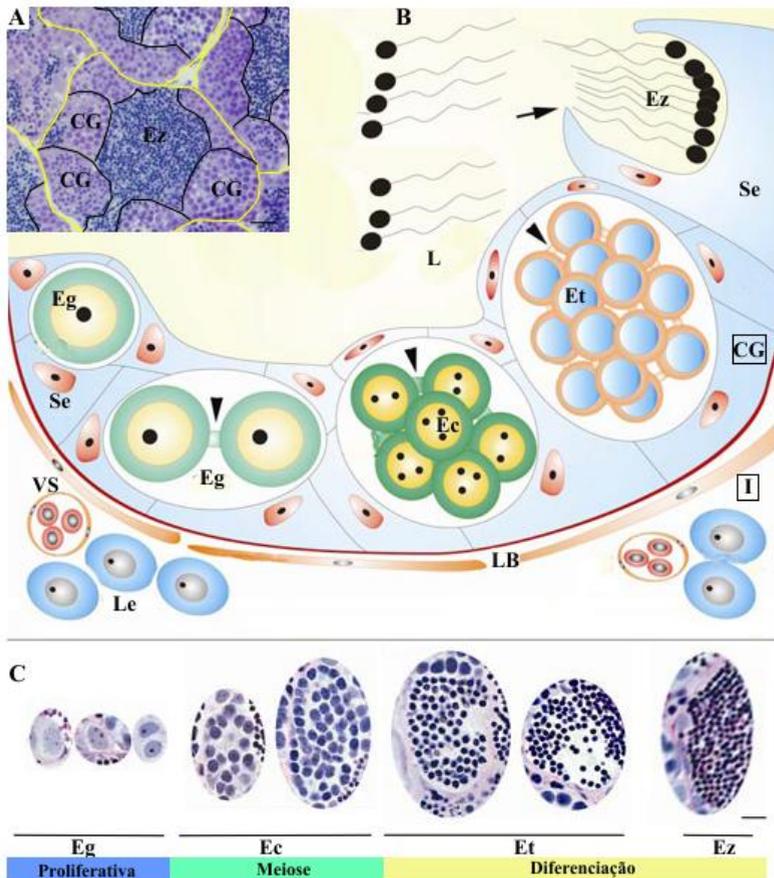
O testículo é revestido externamente por uma fina cápsula fibrosa de tecido conjuntivo que se estende para o interior, delimitando os túbulos seminíferos. Por sua vez, os túbulos são compostos por epitélio seminífero e o lúmen tubular. O epitélio seminífero corresponde às células germinativas, que são espermatogônias, espermátocitos I e II e espermátides. Os espermatozoides são igualmente células germinativas, porém não fazem parte do epitélio seminífero, pois estão localizados no lúmen tubular. Internamente, os túbulos seminíferos são organizados em cistos delimitados por células de Sertoli. Entre os túbulos seminíferos, está o tecido intersticial constituído por tecido conjuntivo frouxo de preenchimento, além das células de Leydig (também denominadas células intersticiais) e de vasos sanguíneos. O conjunto formado pelas células de Sertoli, Leydig e demais células da região intersticial corresponde às células somáticas que compõe o testículo (Figura 4 A) (Schulz et al., 2010; Rupik et al., 2011; Huszno e Klag, 2012).

A espermatogênese dos peixes, similarmente aos vertebrados, pode ser dividida em três etapas principais: a etapa proliferativa, caracterizada por rápidas divisões mitóticas sucessivas das espermatogônias; a etapa de divisões meióticas responsáveis pela formação dos espermátocitos e espermátides; e a etapa de diferenciação das espermátides em espermatozoides (Figura 4 C) (Nóbrega et al., 2009).

Estas células germinativas estão organizadas de forma cística, onde cada cisto, delimitado por extensões citoplasmáticas de células de Sertoli, é formado por um único tipo de célula germinativa. Os cistos de espermatogônias são inicialmente formados por uma única espermatogônia que prolifera por divisão mitótica, sendo que as células filhas permanecem ligadas entre si por pontes citoplasmáticas responsáveis pela forma sincrônica do desenvolvimento destas células germinativas (Figura 4 A e B) (Almeida et al., 2008; Nóbrega et al., 2009; Schulz et al., 2010).

As espermatogônias são classificadas em espermatogônias do tipo A, as maiores células da linhagem germinativa, com um grande núcleo, de contorno irregular cercado por grande volume de citoplasma. Esta espermatogônias se dividem formando novas espermatogônias, sendo consideradas como células-fonte do testículo. As espermatogônias do tipo B, são menores, com núcleos mais esféricos, sendo estas as espermatogônias que darão origem aos espermátocitos e por fim, aos

espermatozoides (Figura 4 C). (Leal et al., 2009; Nóbrega et al., 2009; Schulz et al., 2010, Rupik et al., 2011).



**Figura 4:** Organização básica do testículo de *D. rerio*. Secção transversal semifina de testículo evidenciando túbulos seminíferos (delimitados em amarelo) compostos por cistos germinativos (CG) (delimitados em preto), corado com azul de toluidina (A). Representação esquemática de um túbulo seminífero composto por cistos germinativos em diferentes estágios da espermatogênese (adaptado de Nóbrega et al., 2009) (B). Esquema com secções de testículo representando as três diferentes fases da espermatogênese em peixes (C). Ec, espermatócitos; Eg, espermatogônia; Et, espermátide; Ez, espermatozoides; I, interstício; L, lúmen; LB, lâmina basal, Le, células de Leydig; Se, células de Sertoli, VS, vasos sanguíneos. Barras de escala em B = 100 µm; C = 10 µm.

As células germinativas dependem da interação contínua com as células de Sertoli, pois estas, além de outras funções, são as responsáveis pela manutenção estrutural cística e pela regulação fisiológica de repasse hormonal para as células germinativas. Além disso, as células de Sertoli, são responsáveis pela remoção de resíduos citoplasmáticos oriundos da etapa de diferenciação das espermátides (Almeida et al., 2008; Schulz et al., 2010). Por sua vez, as células de Leydig, tem como principal função a produção do hormônio 11-cetotestosterona (11-KT) em *zebrafish*, que é transportado para as células de Sertoli, para que estas regulem a espermatogênese (Nóbrega et al, 2009; Schulz et al., 2010). A espermatogênese é extremamente conservada entre as diferentes espécies de peixe, sobretudo nos aspectos estruturais e funcionais deste processo biológico, os quais de assemelham á outros vertebrados (Schulz e Miura, 2002; Weisbrod et al., 2007; Nóbrega et al., 2009), reforçando o seu caráter conservativo.

Assim, considerando (i) a estrutura celular do testículo, composta por células das linhagens somáticas e germinativas, (ii) o caráter conservativo do processo de espermatogênese, (iii) a ação de disruptor endócrino do glifosato, (iv) a ação do glifosato em organismos não-alvos, onde certamente os peixes estão incluídos e (v) o amplo uso do glifosato na agricultura mundial, é fundamental investigar o mecanismo de ação deste herbicida sobre a organização estrutural e ultraestrutural do testículo de *D. rerio*. Sendo assim, o presente estudo teve como foco investigar se a concentração de 65 µg/L, considerada pelas normas brasileiras como segura nos ambientes aquáticos, compromete a organização e maturação das gônadas de machos de *D. rerio*. Para tal, a hipótese proposta é a de que o glifosato altera a estrutura das células somáticas e germinativas, promovendo a perda da viabilidade celular, em decorrência do aumento da expressão de proteínas envolvidas na indução do processo apoptótico.



## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Geral

O presente estudo tem por objetivo caracterizar os efeitos do herbicida glifosato sobre a organização estrutural e ultraestrutural das células somáticas e germinativas durante a espermatogênese em *D. rerio*.

### 2.2 Específicos

- Analisar a morfometria e morfologia de testículos de *D. rerio* expostos e não expostos ao glifosato;
- Caracterizar e quantificar os cistos germinativos e as células germinativas dos peixes expostos e não expostos ao glifosato;
- Investigar o efeito do glifosato sobre a integridade de células somáticas e germinativas;
- Identificar as potenciais organelas-alvo do glifosato nas células somáticas e germinativas;
- Avaliar a toxicidade celular do glifosato através da análise da expressão de proteínas do choque térmico e de proteínas envolvidas nos processos de morte celular.



### 3 Metodologia

#### 3.1 Animais

Neste trabalho foram utilizados peixes adultos da espécie *D. rerio* com comprimento médio de 3,3 cm ( $\pm 0,01$ ) obtidos em lojas especializadas na comercialização de animais aquáticos. Os peixes foram 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 evitar o estresse fisiológico. No Laboratório foram selecionados os peixes machos, cujo corpo apresenta formato delgado sem proeminência abdominal, sendo esta a principal característica sexual secundária para esta espécie (Dammski et al., 2011). Os peixes foram mantidos na densidade de 2 peixes/L em aquários de 20 L contendo água corrente de clorada pH 7,6 (Westerfield, 2000).

Durante o período de aclimação de 7 dias, os peixes foram mantidos em condições de aeração constante, temperatura de 28°C ( $\pm 0,1$ ), em condições de fotoperíodo de 12 horas claro:12 horas escuro, sendo o período claro criado com lâmpada fluorescente com irradiação de luz visível de 96 mW/cm<sup>2</sup> (Philips TLT 40 W/ 75 RS). Os peixes foram alimentados diariamente com ração comercial Alcon Botton Fish, contendo 36% de proteína bruta. Os parâmetros de qualidade da água dos aquários, como temperatura e pH foram monitorados diariamente e semanalmente, respectivamente.

Todos os experimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFSC), projeto número 0746/CEUA/UFSC. As análises propostas nesta metodologia foram realizadas no LRDA, Laboratório Central de Microscopia - LCME/UFSC, e nos Laboratórios Multiusuários de Estudos em Biologia - LAMEBs I (Biologia Celular e Molecular) e II (Microscopia e Técnicas Histológicas).

#### 3.2 Delineamento experimental

Os peixes machos adultos de *D. rerio* foram divididos em dois lotes de experimentos independentes, conforme descrito no Quatro 1 e mantidos nas mesmas condições de temperatura, pH, fotoperíodo e alimentação, descritas no item 3.1. A concentração de glifosato utilizada neste trabalho foi determinada com base na Resolução N° 357/2005 do CONAMA, que dispõe sobre a classificação dos corpos de água doce e que regulamenta a concentração de 65 µg/L de glifosato de água, como

a máxima permitida em rios no Brasil (Brasil, 2005). Os tratamentos foram realizados utilizando uma formulação comercial Scout - Monsanto, do herbicida a base de glifosato [N-(fosfometil)glicina].

**Quadro 1:** Descrição dos lotes experimentais propostos para o estudo da toxicidade do glifosato em machos adultos de *D. rerio*

Lote experimental	Período de exposição	Análises realizadas	Justificativa
I (65 µg/L de glifosato)	360 h	IGS; Microscopia de luz; Imunofluorescência; Citometria de fluxo; Microscopia eletrônica de transmissão.	Período de exposição baseado nos valores de meia-vida do glifosato na água (1 a 14 dias) (Amarante Júnior et al., 2002, Giesy et al., 2000) e conforme protocolo da USEPA (1998), que determina o período mínimo de 14 dias de exposição para testes de substâncias com potencial de desregulador endócrino
II (65 µg/L de glifosato)	48 h, 96 h, 144 h	IGS; Citometria de fluxo.	Períodos de exposição baseados em estudos com as espécies de peixe <i>Rhamdia quelen</i> (Gluszczak et al., 2007), <i>Carassius auratus</i> (Çavas e Könen, 2007) e <i>D. rerio</i> (Lopes et al., 2014), para análises de proteínas envolvidas na toxicidade celular e de indução à apoptose, e efeitos genotóxicos.

Os grupos controles dos lotes experimentais I e II foram realizados com peixes machos adultos e não expostos ao glifosato. Em cada lote experimental, bem como nos controles foram utilizados cerca de 15 peixes por grupo, sendo que cada experimento foi realizado em triplicata.

Após o período de exposição, a água dos aquários que continha glifosato diluído, foi armazenada em recipiente plástico, apropriado para descarte, e encaminhada para o Sistema de Gestão de Resíduos Líquidos da UFSC.

### **3.3 Biometria corporal e determinação do índice gonadossomático (IGS)**

Os peixes submetidos aos lotes experimentais I e II foram eutanasiados por imersão em água a 4°C por 5 min (Wilson et al., 2009). Foram obtidas as medidas de peso (g) e comprimento total (cm), esta última definida como a distância entre as extremidades anterior e posterior do corpo dos peixes. Em seguida, foi realizada a dissecação dos testículos (Figura 3 C), que foram pesados (mg) para o cálculo do IGS, utilizando a fórmula:  $((\text{peso do testículo}/\text{peso do macho}) \times 100)$  (Leal et al., 2009).

### **3.4 Identificação de micronúcleos**

Para avaliar se o glifosato foi absorvido pelo organismo, foi realizada a identificação de micronúcleos (MN) em hemácias. Os MNs são fragmentos de cromossomo, que podem ocorrer espontaneamente, porém de frequência baixa, mas são principalmente decorrentes da exposição a fatores ambientais durante a mitose. Foi realizado o teste de MN desenvolvido por Schmid (1975) e adaptado para peixes por Hoofman e Raat (1982). Para tal, o sangue dos peixes do lote experimental I, foi coletado dos vasos branquiais e em seguida, realizados esfregaços deste sangue em lâminas de vidro. Após secar por 12 h à temperatura ambiente, as lâminas foram fixadas em metanol por 10 min e em seguida coradas com Giemsa 5%, por 25 min. As lâminas foram lavadas em água destilada e secas à temperatura ambiente. A observação da frequência de MN nas hemácias foi realizada ao microscópio de luz Olympus CBA (100X), sendo analisadas 1.500 células por animal.

### 3.5 Preparo dos testículos para análises microscópicas

Os testículos dissecados dos peixes provenientes do lote experimental I foram fixados em solução de formaldeído a 4% por 24 h e posteriormente conservados em solução de etanol a 70% à temperatura ambiente. Em seguida, os testículos foram desidratados em série etanólica crescente (70% - 100%), diafanizados em xilol, incluídos em parafina e seccionadas em micrótomo rotativo a 5  $\mu$ m. As secções foram montadas seriadamente em lâminas histológicas, as quais foram utilizadas para as técnicas de coloração e marcações por imunofluorescência.

### 3.6 Marcações celulares por imunofluorescência

Para as marcações, as secções foram desparafinizadas em xilol e Reidratadas em série etanólica decrescente 100% - 70%. As peroxidases endógenas foram inativadas com solução de peróxido de hidrogênio:metanol (1:2) por 10 min, sendo em seguida as membranas celulares permeabilizadas com quatro banhos de 5 min cada em tampão fosfato salino (PBS do inglês *phosphate buffered saline*, composto por 500mM de cloreto de sódio (NaCl) + 3mM de cloreto de potássio (KCl) + 1mM de fosfato de potássio monobásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) e 12mM de fosfato de sódio monobásico ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ )/L pH 7,4 + de Triton X-100 a 0,3%. Em seguida, as secções foram banhadas em solução de PBS + de Triton X-100 a 0,3% + 5% de soro fetal bovino (FBS, do inglês *fetal bovine serum*) por 30 min para inativação dos sítios inespecíficos. Após, procedeu-se a incubação com anticorpos primários (Quadro 2) por 24 h a 4°C para a identificação de proteínas envolvidas no estresse celular e na indução à apoptose. Após as secções foram lavadas por cinco vezes de 5 min cada em PBS + de Triton X-100 a 0,3%, e posterior incubação com anticorpo secundário (Quadro 3) por 24 h a 4°C. As lâminas foram lavadas por três vezes de 5 min cada com PBS e montadas com Gelmount® acrescido do marcador nuclear fluorescente DAPI (4'-6-Diamidino-2-fenilindol).

**Quadro 2:** Detalhamento dos anticorpos primários utilizados nas técnicas de imunofluorescência e citometria de fluxo

ANTICORPO	ISOTIPO	DILUIÇÃO		Referências
		Imuno	Citometria	
Anti-Hsp70 induzível	IgG	1:50	1:1000	(Gluszczak et al., 2007)
Anti-FAS Ligante	IgG	1:50	1:1000	(Jee et al., 2011)
Anti-BCL2	IgG 1	1:50	1:1000	(Clair et al., 2012)
Anti-Bak	IgG	1:50	1:1000	
Anti-Caspase3	IgG	1:50	1:1000	

**Quadro 3:** Detalhamento dos anticorpos secundários utilizados nas técnicas de imunofluorescência e citometria de fluxo

ANTICORPO	ISOTIPO
Anti-coelho Alexa-fluor 488	IgG
Anti-camundongo Alexa-fluor 633	IgG
Anti-camundongo Alexa-fluor 633	IgG1

### 3.7 Análises ultraestruturais

Para a realização das análises por microscopia eletrônica de transmissão (MET), os testículos dos peixes provenientes do lote experimental I foram fixados em glutaraldeído a 2,5% + paraformaldeído a 4% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M (pH 7,2) durante 24 h a 4°C. Posteriormente, foram lavados por 3 vezes de 10 min cada com tampão cacodilato de sódio 0,1M (pH 7,2). Os testículos foram pós-fixados em tetróxido de ósmio (OsO<sub>4</sub>) a 1% em tampão cacodilato 0,1 M (pH 7,2) (Bouzon et al., 2000) por 1 h à temperatura ambiente e, após, foram realizadas 3 lavagens de 10 min cada com tampão cacodilado de sódio 0,1 M (pH 7,2). Em seguida, as amostras foram desidratadas em uma série acetônica crescente (30%, 50%, 70%, 90% e 100%) por 30 min cada, sendo que a última série de acetona 100% foi trocada duas vezes (Schmidt et al., 2009). As amostras foram infiltradas com resina Spurr (Spurr, 1969), em série gradual de acetona-resina (2:1; 1:1 e 1:2, respectivamente) por 24 h cada, seguida de duas infiltrações em resina pura por 12 h e 4 h à temperatura ambiente.

Posteriormente foram colocadas em moldes na estufa a 70°C por 24 h para polimerização da resina.

Foram obtidas secções semifinas, com navalha de vidro em ultramicrótomo, de 1 µm, as quais foram coradas com solução de azul de toluidina a 1% e observadas ao microscópio de luz para controle da orientação e qualidade do tecido. As secções ultrafinas (60 - 70 nm) foram realizadas com navalha de diamante em ultramicrótomo, coletadas em grades *mesh*, contrastadas com acetato de uranila a 5% por 20 min e citrato de chumbo a 1% por 20 min (Reynolds, 1963). A secções foram analisadas e fotografadas no microscópio eletrônico de transmissão Jeol JEM 1011 (LCME/UFSC).

### 3.8 Análises morfológicas e morfométricas dos cistos germinativos

Para realizar a morfologia e a morfometria dos túbulos seminíferos de *D. rerio* expostos a concentração de 65 µg/L de glifosato por 360 h, foram realizadas secções semifinas de testículo, incluídos em resina Spurr, de animais controle não expostos e animais expostos ao glifosato. Foram montadas seriadamente 10 lâminas histológicas contendo 28 secções de 1 µm, totalizando 280 secções por animal. As lâminas foram coradas por 45 seg a 60°C com azul de toluidina a 1% + 1% de borato de sódio (pH 4,5), em seguida lavadas em água destilada, deixadas secar à temperatura ambiente e finalizadas com Entellan. As secções foram analisadas ao microscópio de luz Nikon Eclipse 80i para o reconhecimento das fases de maturação dos cistos germinativos, de acordo com as descrições de Leal et al. (2009).

Para realizar as medidas dos cistos germinativos foram selecionadas 20 secções de cada animal, dos grupos controle e exposto, em cortes transversais, nos quais foi possível identificar o lúmen ao centro e os cistos germinativos em sua volta. As imagens foram analisadas utilizando o software Image J (NIH Image), sendo primeiramente realizada a calibração da escala de 100 µm.

### 3.9 Citometria de fluxo

Essa técnica foi utilizada para quantificar o número de células imunomarcadas para as proteínas específicas relacionadas a toxicidade celular (HSP70 induzível) e aos mecanismos de indução à apoptose (proteína FAS ligante (FASL), BCL2, BAK e caspase 3). Para esta técnica, os testículos provenientes dos lotes experimentais I e II foram dissecados, fragmentados e submetidos a duas lavagens de 5 min cada com tampão PBS (sem adição de Ca<sup>+2</sup> e Mg<sup>+2</sup>) (PBS composto por 140

mM de cloreto de sódio (NaCl) + 3 mM de cloreto de potássio (KCl) + 1 mM de fosfato de potássio monobásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) e 10 mM de fosfato de sódio dibásico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )/L pH 7,4 com agitação a 4°C. Em seguida, as células foram dissociadas com tripsina a 0,25 % + PBS por 30 min a 37°C em banho-maria. Posteriormente, foram adicionados 5% de FBS ao volume das amostras, que permaneceram em agitação a 4°C por 45 min. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 640 X g por 5 min, sendo coletado o sobrenadante, o qual foi dividido em alíquotas de 200 µL, mantidas por 45 min a 4°C. Após este período, as alíquotas foram incubadas com o anticorpo primário (Quadro 2) por 1 h em agitação a 4° C, seguidas de incubação com anticorpo secundário (Quadro 3) durante 40 min em agitação a 4° C. As alíquotas foram então analisadas no citômetro de fluxo FACSCanto II (LAMEB I), as análises dos dados foram realizadas no programa Flowing Software 2, os valores são apresentados na contagem absoluta

### **3.10 Análise estatística**

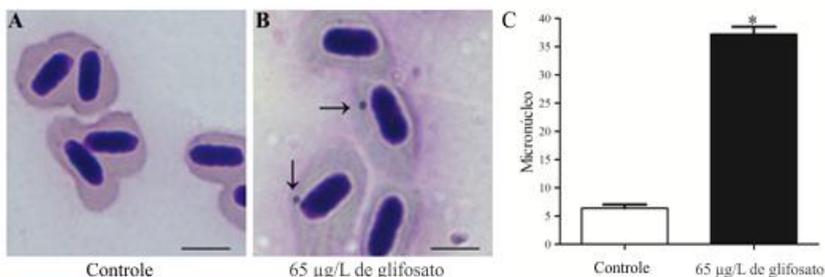
Os resultados quantitativos foram analisados no programa estatístico Statistica® versão 10 para Windows. As diferenças significativas entre os grupos foram analisadas através do teste de análise de variância de uma via (One-Way ANOVA), seguido de teste *post hoc* de Tukey com a significância de  $p \leq 0,05$ .



## 4 RESULTADOS

### 4.1 Identificação de micronúcleos

Nos machos de *D. rerio* expostos a 65 µg/L de glifosato por 360 h foi observada a formação de micronúcleos no sangue coletado das brânquias (Figura 5 B). A análise das frequências dessas alterações demonstra que os machos expostos apresentam 2,48% de micronúcleos, diferindo significativamente da porcentagem de 0,43 observada nos machos não expostos ao glifosato (Figura 5).



**Figura 5:** Formação de micronúcleos (setas) em hemácias de *D. rerio* observada em microscopia de luz. Animais controle (A) e expostos a 65µg/L de glifosato por 360 h (B). Distribuição de frequência de micronúcleos (C). Dados expressos em média ± erro padrão. Asterisco indica diferença significativa com relação ao grupo controle ( $p < 0,0001$ ).  $n = 1.500$  células, em 5 peixes/grupo. Barras de escala = 20 µm.

### 4.2 Biometria corporal e determinação do índice gonadosomático (IGS)

Para o estudo dos efeitos do glifosato foram avaliados machos de *D. rerio* dos dois lotes experimentais. Quando foi comparado o peso corporal entre os machos controle e os machos expostos a 65 µg/L de glifosato, não foi observado diferença significativa entre estes grupos dos dois lotes experimentais, demonstrando a homogeneidade dos animais dos grupos tratado e controle estudados. Já quando comparado o peso dos testículos, observa-se um aumento significativo do peso do testículo dos machos expostos a 65 µg/L de glifosato em comparação com o grupo controle do lote experimental I. No lote experimental II não foi observada diferença significativa no peso dos testículos entre os

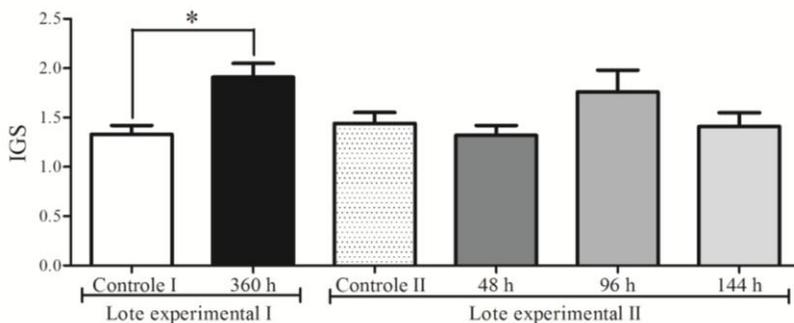
machos controles e expostos a 65 µg/L de glifosato durante os períodos avaliados, conforme Tabela 1.

Foram calculados os valores de IGS para ambos os lotes experimentais, este valor é utilizado para caracterizar a fase de maturação das gônadas. Observou-se que houve aumento significativo do IGS dos machos expostos a 65 µg/L de glifosato ( $1,91 \pm 0,14$ ); quando comparados aos machos do grupo controle ( $1,35 \pm 0,09$ ) do lote experimental I. No lote experimental II não foram observadas diferenças significativas no IGS entre os machos não expostos ( $1,43 \pm 0,12$ ) e os expostos ao glifosato, durante 48 h ( $1,32 \pm 0,11$ ); 96 h ( $1,76 \pm 0,22$ ) e 144 h ( $1,41 \pm 0,14$ ), conforme demonstrado na Figura 6.

**Tabela 1:** Medidas de peso corporal e peso dos testículos de *D. rerio* submetidos aos dois lotes experimentais para estudo do efeito do glifosato.

Lote experimental	Grupo experimental	Peso corporal (mg)	Peso testículo (mg)
<b>I</b> <b>65 µg/L de glifosato</b>	Controle I	313,49 (± 10,74)	4,39 (± 0,22)
	360 h	302,22 (± 12,67)	5,76 (± 0,50)*
<b>II</b> <b>65 µg/L de glifosato</b>	Controle II	380,00 (± 21,39)	5,26 (± 0,01)
	48 h	428,46 (± 14,19)	5,61 (± 0,01)
	96 h	399,66 (± 20,46)	6,61 (± 0,70)
	144 h	449,23 (± 26,75)	6,37 (± 0,70)

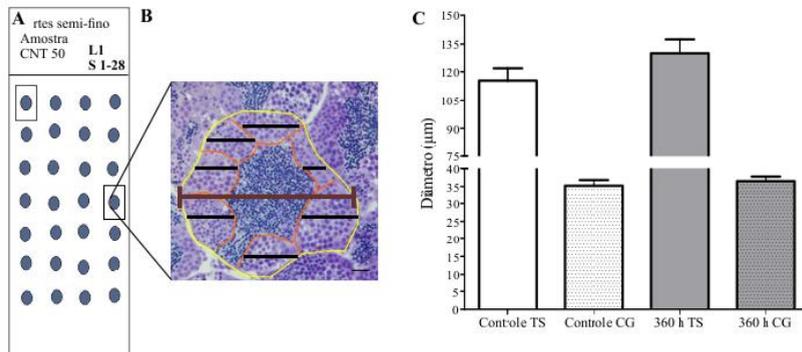
Valores expressos em média (± erro padrão). \* indica diferença significativa com relação ao grupo controle  $p \leq 0,001$ . n = 63 animais/grupo do lote I e n = 26 animais/grupo do lote II.



**Figura 6:** Índice gonadosomático dos machos de *D. rerio* controle e expostos a 65 µg/L de glifosato nos lotes experimentais I e II. Dados expressos em média ± erro padrão. \* indica diferença significativa com relação ao grupo controle ( $p \leq 0,0001$ ).  $n = 63$  animais/grupo do lote I e  $n = 26$  animais/grupo do lote II.

#### 4.3 Análises morfológicas e morfométricas dos túbulos seminíferos de *D. rerio*

Não foram observadas diferenças na organização e no diâmetro dos túbulos seminíferos entre os grupos controle ( $115,433 \mu\text{m} \pm 6,445$ ) e exposto a 65 µg/L de glifosato por 360h ( $130,254 \mu\text{m} \pm 7,263$ ). Igualmente, não foram observadas diferenças significativas em relação ao diâmetro dos cistos germinativos dos machos controle ( $35,225 \mu\text{m} \pm 1,569$ ) e o grupo exposto a 65 µg/L de glifosato por 360h ( $36,509 \mu\text{m} \pm 1,282$ ) (Figura 7).



**Figura 7:** Análise morfométrica dos túbulos seminíferos e cistos germinativos de *D. rerio*. Esquema de lâmina histológica demonstrando a distribuição das secções de testículo utilizadas para as medições (A). Detalhe de secção transversal representando as medidas realizadas nos túbulos seminíferos (linha marrom) e cistos germinativos (linhas pretas) (B). Diâmetros dos túbulos seminíferos e cistos germinativos, representados em média  $\pm$  erro padrão (C). TS, túbulo seminífero; CG, cisto germinativo.  $n = 20$  secções em 2 peixes/grupo. Barra de escala = 100  $\mu\text{m}$ .

#### 4.4 Análises ultraestruturais de testículo de *D. rerio*

Na análise ultraestrutural dos testículos de *D. rerio* foi possível observar os estágios celulares característicos das três etapas da espermatogênese já descritas na Figura 4 C. As espermatogônias são arredondadas com grande volume de citoplasma e apresentam núcleo volumoso com eucromatina bem evidente, com um ou dois nucléolos (Figura 8 A). Os espermatócitos apresentam formato oval, com grande núcleo central eletrondenso (Figura 8 B). As espermátides, que são observadas em diferentes estágios, sendo que no estágio inicial ocorre uma mudança gradual da morfologia destas células, onde o núcleo com cromatina homogênea desloca-se e as mitocôndrias esféricas movem-se para uma posição oposto ao núcleo (Figura 8 C). As espermátides em estágio tardio são menores, o núcleo com cromatina condensada é regularmente esférico, observando próximo ao núcleo, o futuro centríolo (Figura 8 D). Os espermatozoides apresentam núcleo esférico, com cromatina muito condensada, pouco citoplasma e presença do flagelo (Figura 8 E e F).

A análise da organização ultraestrutural dos testículos em sua forma cística (Figura 9 A) revela a estreita interação entre as células somáticas e germinativas. Observa-se nas células de Sertoli os processos citoplasmáticos que envolvem as células germinativas nos diferentes estágios da espermatogênese (Figura 9 B-D). O núcleo das células de Sertoli tem forma triangular ou oval e no citoplasma encontram-se numerosas mitocôndrias e estruturas vesiculares, indicando sua atividade estereiodogênica e fagocitária (Figura 10 A e B).

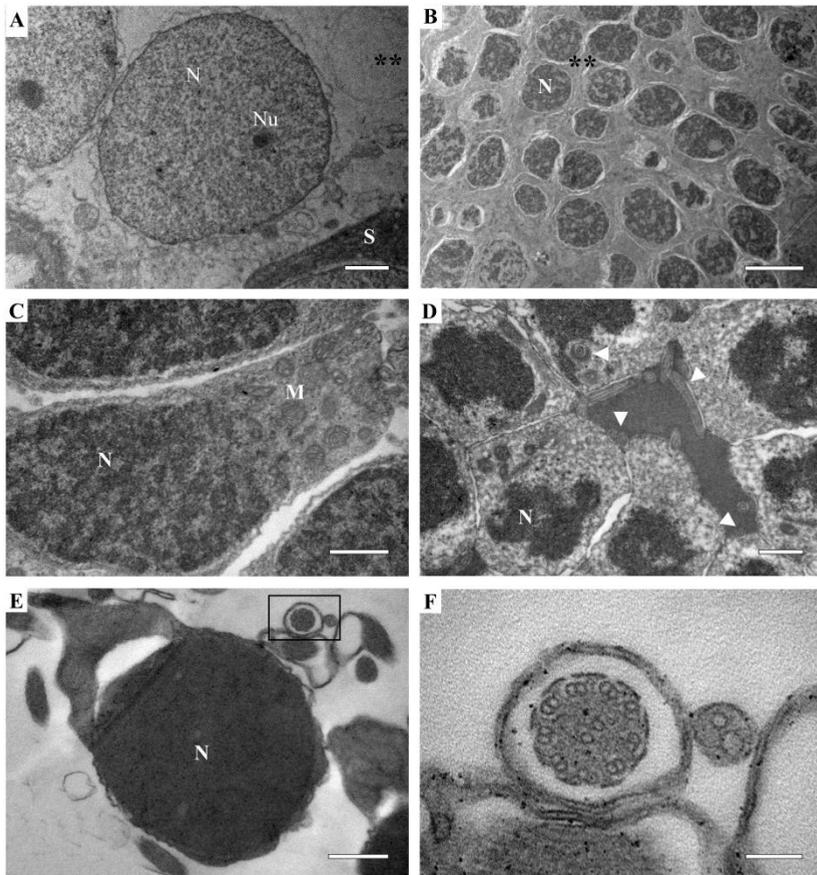
As células de Leydig são encontradas em aglomerados no compartimento intersticial próximas às paredes externas do túbulo seminífero. Essas células possuem formato irregular e no citoplasma encontram-se numerosas mitocôndrias e retículo endoplasmático, sendo reconhecidas no núcleo a eucromatina e a heterocromatina (Figura 10 C e D).

#### **4.5 Efeitos do glifosato sobre a ultraestrutura de testículo de *D. rerio***

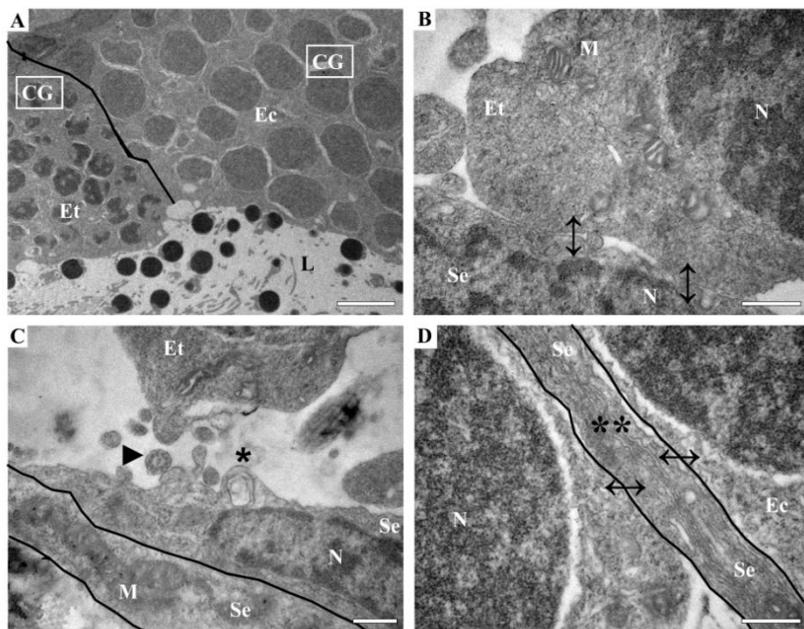
Os machos expostos a 65 µg/L de glifosato por 360 h apresentaram alterações ultraestruturais em comparação aos machos não expostos, relacionadas com a organização dos cistos germinativos e estrutura das células de Sertoli.

Alterações ultraestruturais mais evidentes são observadas nas células de Sertoli, responsáveis por proporcionar um microambiente específico para os estágios da espermatogênese e consequente produção de espermatozoides. Na Figura 11 demonstramos algumas das alterações encontradas na ultraestrutura das células de Sertoli de machos expostos a 65 µg/L de glifosato por 360 h.

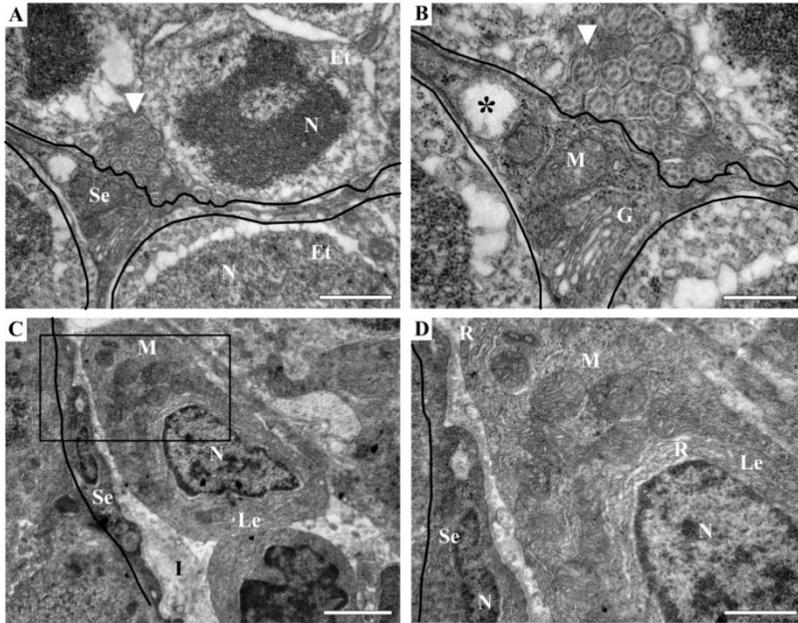
Nos machos controle, os cistos germinativos com espermatozoides estão bem preenchidos por estas células, que apresentam sua estrutura característica (Figuras 11 e 12). Quando observado esta mesma estrutura em machos expostos a 65 µg/L de glifosato por 360 h, verifica-se uma acentuada perda da ligação das pontes citoplasmáticas entre os espermatozoides e perda da sua forma característica. Os processos citoplasmáticos das células de Sertoli apresentam grande número de estruturas com aspecto vesicular, sendo observada a presença de poucas organelas e citoplasma menos eletrondenso. Observa-se, no entanto, entre as células de Sertoli dos machos expostos, a manutenção das junções (Figuras 11 e 12).



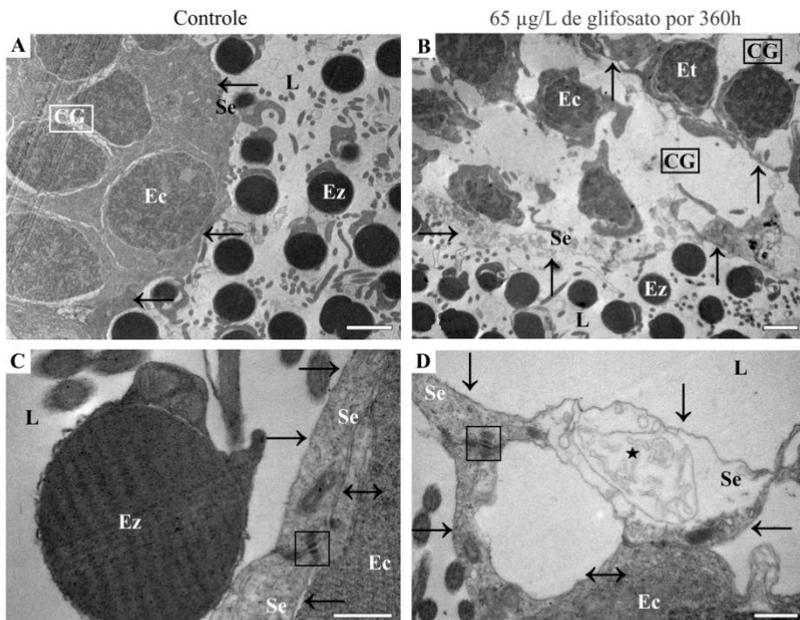
**Figura 8:** Análise ultraestrutural de seções ultrafinas de testículo de *D. rerio* não exposto ao glifosato, durante a espermatogênese. Espermatogônias, evidenciando o núcleo (N) e o nucléolo (Nu) (A). Cisto de Espermatócitos, com núcleo condensado (B). Estágio inicial da diferenciação das espermatídes, evidenciando a movimentação do núcleo para uma das extremidades e mitocôndrias se localizando na parte posterior ao núcleo (C). Estágio tardio da diferenciação das espermatídes, com o aparecimentos dos centríolos (cabeça de seta branca) (D). Espermatozoide maduro, evidenciando o núcleo em sua forma redonda com núcleo bem condensado (E). Detalhe em maior aumento do flagelo (F) destacado no retângulo em E. M, mitocôndria; Se, célula de Sertoli.; duplo asterisco, citoplasma. Barras de escala em A, C e D = 1  $\mu$ m; B = 5  $\mu$ m, E = 0,5  $\mu$ m; F = 100 nm.



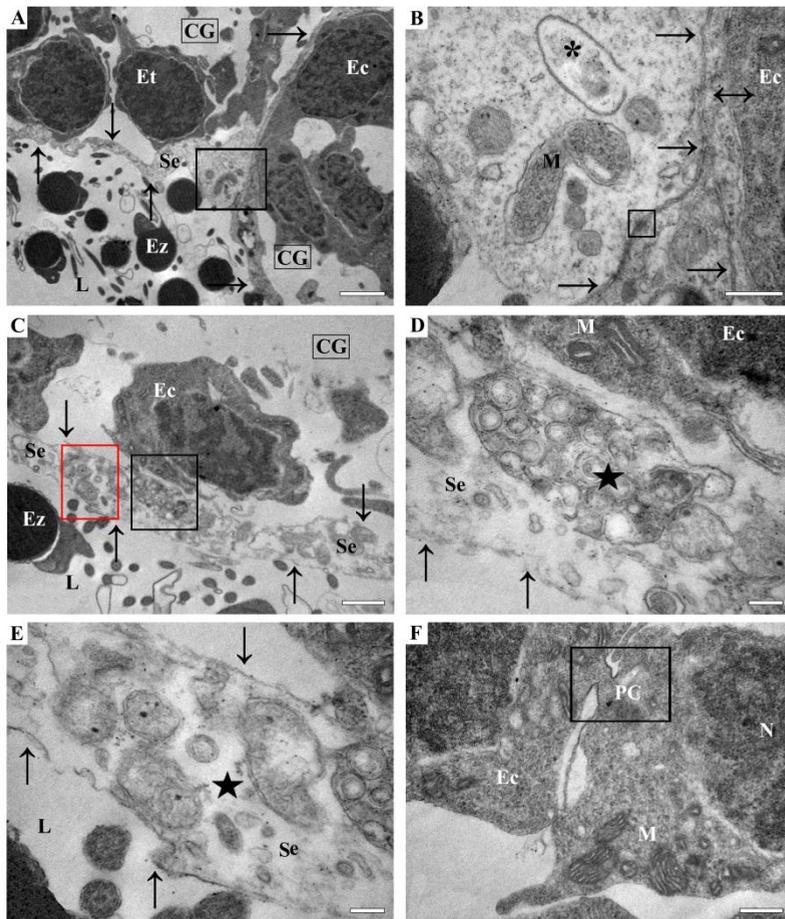
**Figura 9:** Análise ultraestrutural de secções ultrafinas de testículo de *D. rerio* não exposto ao glifosato. Cistos germinativos (CG) em torno do lúmen (L), onde encontram-se os espermatozoides maduros (A). Em linha pretas destaque para as células de Sertoli (Se) e sua estreita interação com as células germinativas em diferentes estágios da espermatogênese (B-D). Ec, espermatócitos; Et, espermátides; M, mitocôndria; N, núcleo. Asterisco, vesículas; asterisco duplo, citoplasma células de Sertoli; cabeça de seta preta, flagelo; seta dupla, interação célula Sertoli e célula germinativa. Barras de escala em A = 5  $\mu$ m; em B, C e D = 0,5  $\mu$ m.



**Figura 10:** Análise ultraestrutural de secções ultrafinas de testículo de *D. rerio*, não exposto ao glifosato, destacando a organização das células de Sertoli (Se) e células de Leydig (Le). Forma triangular das células de Sertoli e seus processos citoplasmáticos delimitados em linhas pretas (A), ampliação da estrutura citoplasmática da célula de Sertoli (B). Células de Leydig no compartimento intersticial (I) (C), ampliação da estrutura citoplasmática da célula de Leydig (D). Ec, espermatócito, Et, espermátide; G, corpos de Golgi; M, mitocôndria, N, núcleo; R, retículo endoplasmático. Asterisco, vesícula; cabeça de seta branca, flagelos. Barras de escala em A e D = 1  $\mu$ m; B = 0,5  $\mu$ m; C = 2  $\mu$ m.



**Figura 11:** Análise ultraestrutural de seções ultrafinas de testículo de *D. rerio*. Ultraestrutura dos cistos germinativos de testículo de *D. rerio*. Organização de cisto germinativo (CG) de macho controle não exposto, com grande número de espermatócitos (Ec) (A). Organização de cisto germinativo de macho exposto a 65 µg/L de glifosato por 360 h com perda das ligações das pontes citoplasmáticas e interação com células de Sertoli (Se) (B). Processos citoplasmáticos de células de Sertoli e interação com espermatócitos em machos controle não expostos (C). Processos citoplasmáticos de células de Sertoli em machos expostos a 65 µg/L de glifosato por 360 h apresentando grandes vesículas e citoplasma menos eletrondenso (D). Et, espermatídes; L, lúmen; Ez, espermatozoides. Estrela, estruturas com aspecto vesicular; seta, processos citoplasmáticos; seta dupla, interação célula Sertoli e célula germinativa; quadro, destaque para as junções das células de Sertoli. Barras de escala em A e B = 2 µm; em C e D = 0,5 µm.



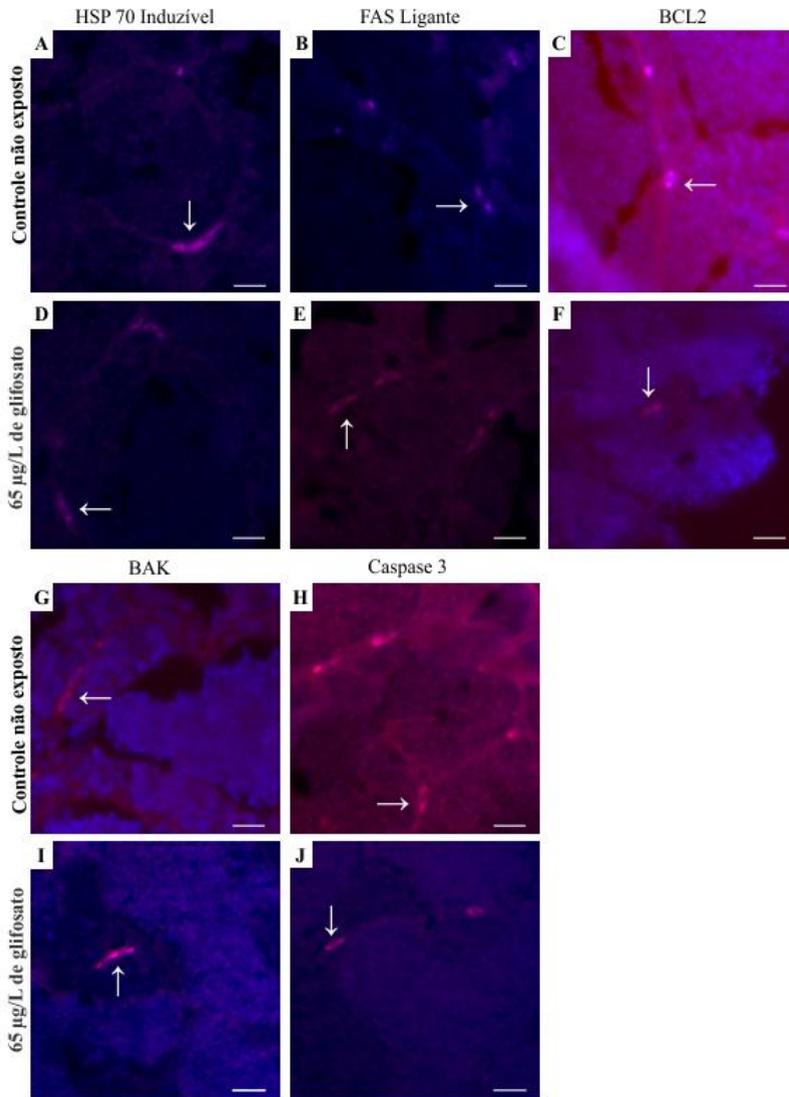
**Figura 12:** Análise ultraestrutural de testículo de *D. rerio* expostos a 65 µg/L de glifosato por 360 h. Túbulo seminífero mostrando cistos germinativos (CG) com espermatócitos (Ec) e espermatídes (Et), separados por célula de Sertoli (Se) (A). Aumento da região delimitada no retângulo em A, evidenciando citoplasma da célula de Sertoli menos eletrondenso (B). Célula de Sertoli delimitando um cisto germinativo com espermatócitos e o lúmen (L) (C). Aumento das regiões delimitadas nos retângulos em C, onde observa-se o citoplasma das células de Sertoli com citoplasma menos eletrondenso, perda da membrana celular e perda da interação entre células de Sertoli e células germinativas (retângulo preto D; retângulo vermelho E). Pontes citoplasmáticas evidentes (PC) entre as células germinativas (F). M, mitocôndria; N, núcleo; Ez, espermatozoide. Estrela, estruturas com aspecto vesicular; seta, processos citoplasmáticos; seta dupla, interação célula Sertoli e célula germinativa; quadro, destaque para as junções das células de Sertoli. Barras de escala em A = 2 µm; B e F = 0,5 µm; C = 1 µm; D e E = 0,2 µm.

#### **4.6 Toxicidade celular do glifosato**

A partir das observações obtidas na análise ultraestrutural dos testículos de *D. rerio*, procedeu-se às marcações por imunofluorescência e citometria de fluxo para reconhecer a proteína HSP70 induzível, bem como proteínas envolvidas nos mecanismos de indução à apoptose, como FAS Ligante, BCL2, BAK e caspase 3.

Nas análises por imunofluorescência foi possível observar marcação positiva para as proteínas de interesse apenas nas células de Sertoli. Essas células foram reconhecidas por sua morfologia característica e localização no túbulo seminífero. Contudo, não foi possível reconhecer diferenças na intensidade de marcação entre os machos do controle e os expostos a 65 µg/L de glifosato por 360 h (Figura 13).

Para quantificar estas proteínas e reconhecer o possível efeito do glifosato sobre as mesmas, foram realizadas análises dos testículos de *D. rerio* dos dois lotes experimentais por citometria de fluxo.



**Figura 13:** Imunolocalização das proteínas envolvidas na toxicidade celular em testículo de *D. rerio* expostos a 65 µg/L de glifosato por 360 h. HSP 70 (A e D). FAS Ligante (B e E). BCL2 (C e F). BAK (G e I). Caspase 3 (H e J). Seta branca, células de Sertoli imunorreativas. Barras de escala = 50 µm.

As marcações para proteína HSP 70 induzível nas células somáticas e germinativas não revelaram diferença significativa das porcentagens médias entre os grupos de machos controles ( $4,0 \pm 0,7$ ) e machos expostos à concentração de  $65 \mu\text{g/L}$  de glifosato por 360 h ( $5,0 \pm 1,0$ ). Nas quantificações para o segundo lote experimental, também não houve diferença significativa entre os grupos controle ( $5576,0 \pm 2138,0$ ) e grupos expostos a concentração de  $65 \mu\text{g/L}$  de glifosato por 48 h ( $4995,0 \pm 1205,0$ ) e 96 h ( $10324,0 \pm 972,0$ ). Já quando comparado com o grupo exposto por 144 h verificou-se um aumento significativo ( $11879,0 \pm 1159,0$ ;  $p \leq 0,01$ ) na marcação para proteína HSP 70 induzível. (Figura 14).

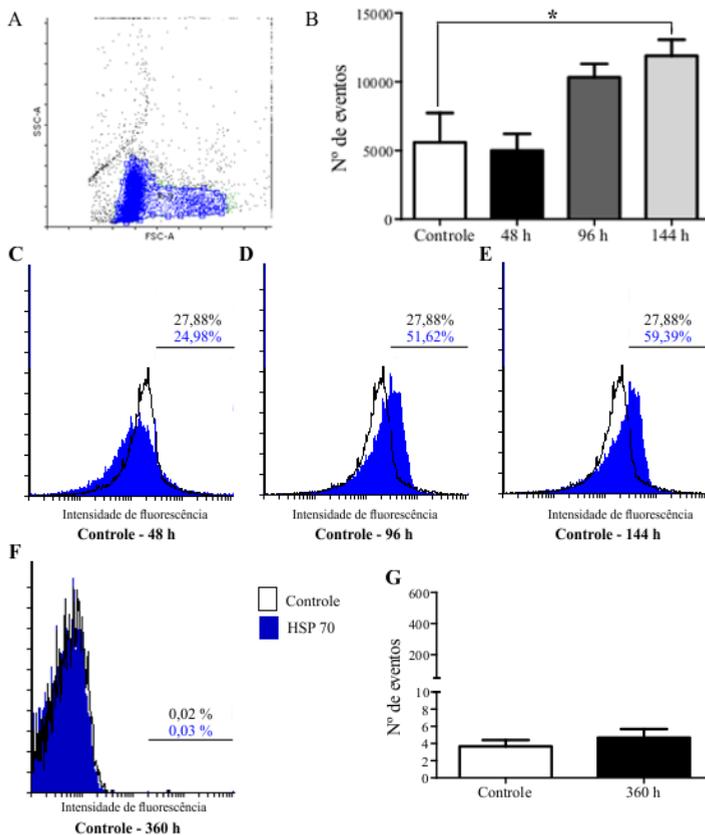
Para verificar se o glifosato ativa proteínas transmembrana que atuam como receptores de morte nas células somáticas e germinativas, procedeu-se a quantificação da proteína de FASL. verificou-se um aumento significativo ( $425,0 \pm 90,0$ ;  $p \leq 0,001$ ) dessa proteína no grupo exposto a  $65 \mu\text{g/L}$  de glifosato por 360 h, quando comparada ao grupo controle pelo mesmo período ( $106,0 \pm 22,0$ ). As marcações para o lote experimental II não revelaram diferença significativa entre os grupos controle ( $9669,0 \pm 1352,0$ ) e expostos a concentração de  $65 \mu\text{g/L}$  de glifosato/L por 48 h ( $10510,0 \pm 1012,0$ ), 96 h ( $7610,0 \pm 1105,0$ ) e 144 h ( $9787,0 \pm 1166,0$ ) (Figura 15).

As quantificações da proteína anti-apoptótica BCL2 para o lote experimental II não revelaram diferenças significativas entre o grupo controle ( $7117,0 \pm 2139,0$ ) e os grupos expostos a concentração de  $65 \mu\text{g/L}$  de glifosato por 48 h ( $3354,0 \pm 1258,0$ ), por 96 h ( $9862,0 \pm 880,0$ ) e por 144 h ( $11442,0 \pm 987,0$ ) (Figura 16).

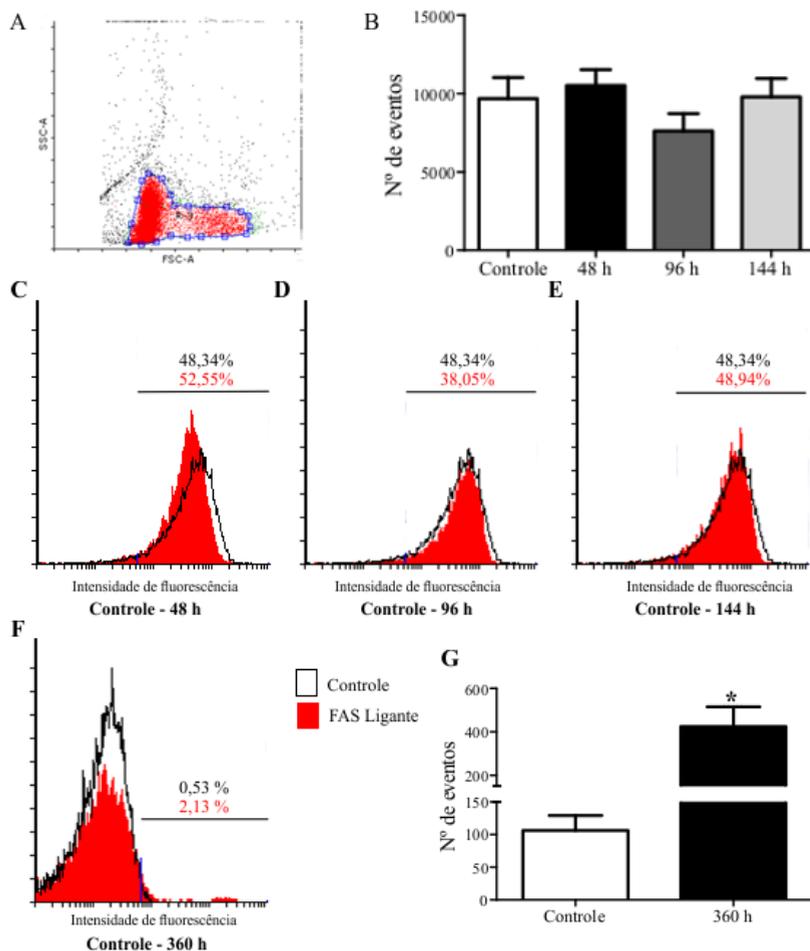
As quantificações da proteína pró-apoptótica BAK do lote experimental I não revelaram diferenças significativas entre o controle ( $23,0 \pm 5,0$ ) e grupo exposto a  $65 \mu\text{g/L}$  de glifosato ( $37,0 \pm 6,0$ ). Do mesmo modo, no lote experimental II não foram observadas diferenças significativas entre o grupo controle ( $12465,0 \pm 738,0$ ) e os grupos expostos a  $65 \mu\text{g/L}$  de glifosato por 48 h ( $8445,0 \pm 1282,0$ ), por 96 h ( $9815,0 \pm 870,0$ ) e por 144 h ( $12007,0 \pm 1161,0$ ) (Figura 17).

As marcações para a proteína efetora de apoptose Caspase 3 no lote experimental I não diferiram significativamente entre o grupo controle ( $85,0 \pm 9,0$ ) e o grupo exposto a  $65 \mu\text{g/L}$  de glifosato por 360h ( $111 \pm 25$ ). Para o lote experimental II também não foram observadas diferenças significativas entre grupo controle ( $9030,0 \pm 1819,0$ ) e os

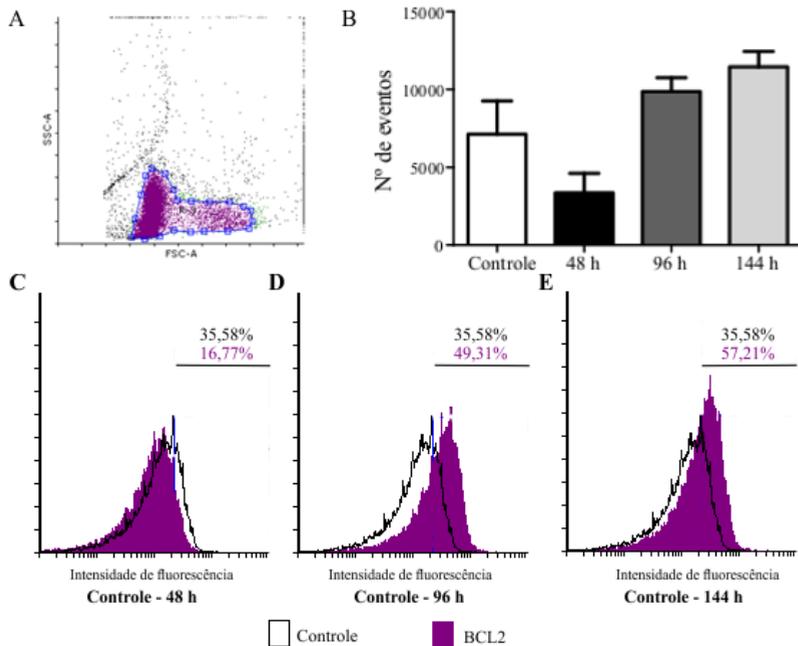
grupos expostos por 48h ( $9127,0 \pm 1380,0$ ) por 96 h ( $9078,0 \pm 786,0$ ) e por 144 h ( $12585,0 \pm 826,0$ ) (Figura 18).



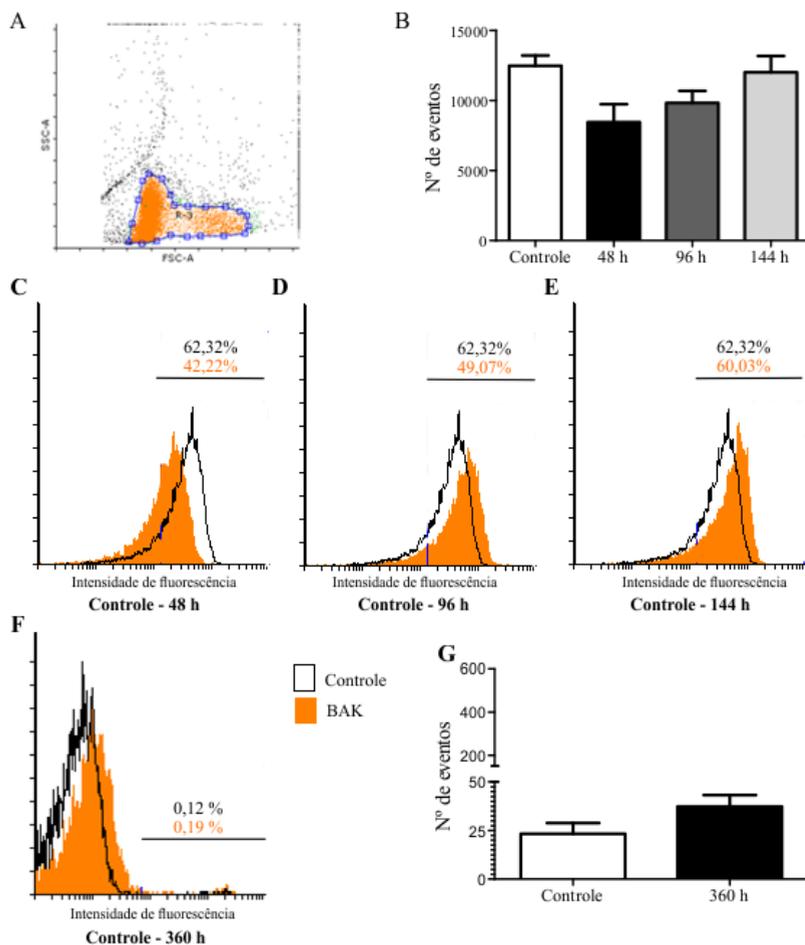
**Figura 14:** Quantificação da proteína de estresse celular HSP 70 induzível, por citometria de fluxo. Dot Plot demonstrando a população de células totais (preto) e a população de células somáticas e germinativas analisadas (azul) (A). Histogramas de intensidade de fluorescência indicando a porcentagem de células imunomarcadas (C-F). Gráfico de barras representando a média  $\pm$  erro padrão do número de células marcadas. \* indica diferença significativa com relação ao grupo controle  $p \leq 0,05$  (B e G).  $n = 3$  testículos/análise/grupo, em três experimentos independentes.



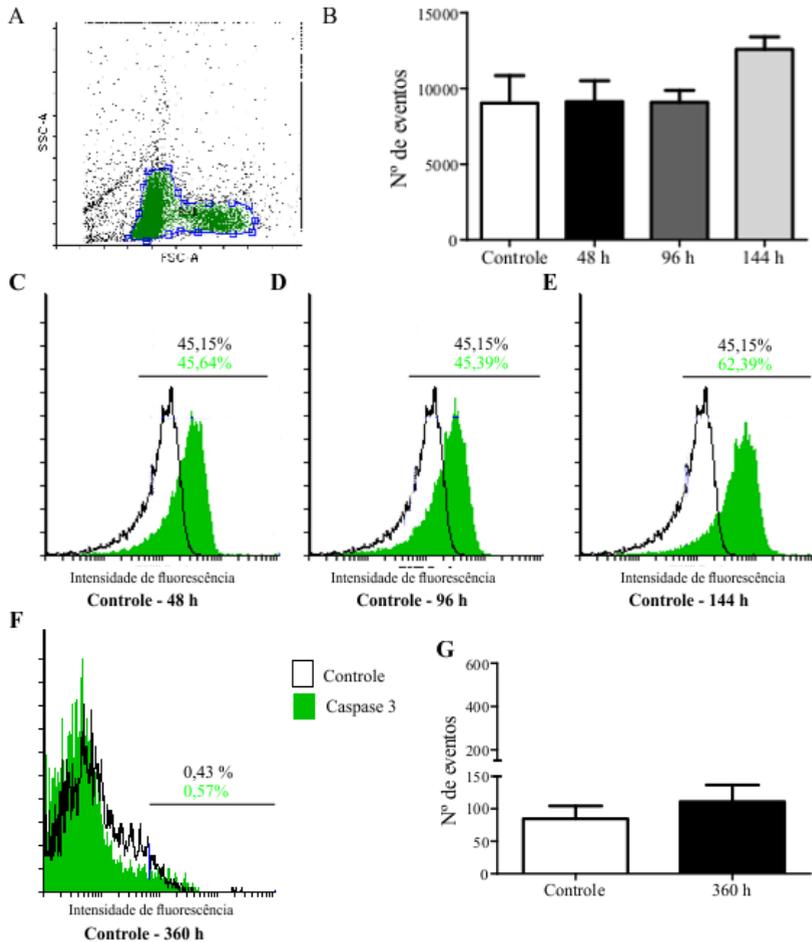
**Figura 15:** Quantificação da proteína de indução a apoptose pela via extrínseca FASL, por citometria de fluxo. Dot Plot demonstrando a população de células totais (preto) e a população de células somáticas e germinativas analisadas (vermelho) (A). Histogramas de intensidade de fluorescência indicando a porcentagem de células imunomarcadas (barras) (C-F). Gráfico de barras representando a média  $\pm$  erro padrão do número de células marcadas. \* indica diferença significativa com relação ao grupo controle  $p \leq 0,001$  (B e G).  $n = 3$  testículos/análise/grupo, em três experimentos independentes.



**Figura 16:** Quantificação da proteína anti-apoptótica BCL2, por citometria de fluxo. Dot Plot demonstrando a população de células totais (preto) e a população de células somáticas e germinativas analisadas (roxo) (A). Histogramas de intensidade de fluorescência indicando a porcentagem de células imunomarcadas (barras) (C-F). Gráfico de barras representando a média  $\pm$  erro padrão do número de células marcadas (B e G).  $n = 3$  testículos/análise/grupo, em três experimentos independentes.



**Figura 17:** Quantificação da proteína pró-apoptótica BAK, por citometria de fluxo. Dot Plot demonstrando a população de células totais (preto) e a população de células somáticas e germinativas analisadas (laranja) (A). Histogramas de intensidade de fluorescência indicando a porcentagem de células imunomarcadas (barras) (C-F). Gráfico de barras representando a média  $\pm$  erro padrão do número de células marcadas (B e G).  $n = 3$  testículos/análise/grupo, em três experimentos independentes.



**Figura 18:** Quantificação da proteína efetora da apoptose Caspase 3, por citometria de fluxo. Dot Plot demonstrando a população de células totais (preto) e a população de células somáticas e germinativas analisadas (verde) (A). Histogramas de intensidade de fluorescência indicando a porcentagem de células imunomarcadas (barras) (C-F). Gráfico de barras representando a média  $\pm$  erro padrão do número de células marcadas (B e G). n = 3 testículos/análise/grupo, em três experimentos independentes.

## 5 DISCUSSÃO

Os ecossistemas aquáticos por serem considerados ambientes que recebem grande aporte de contaminantes merecem ser amplamente estudados (Guilherme et al., 2012; Bogoni et al., 2014). De fato, muitos trabalhos têm direcionado o seu foco para elucidar os efeitos de compostos orgânicos, genotoxinas, metais pesados e agrotóxicos a curto, médio e longo prazos na biota aquática, utilizando biomarcadores *in vivo* e *in vitro*, como por exemplo o ensaio de micronúcleo e ensaio cometa (Dores e De-Lamonica-Freire, 2001; Silva et al., 2003; van der Oost et al., 2003; Çavas e Könen, 2007; Guilherme et al., 2012, Bogoni et al., 2014).

Os resultados encontrados neste estudo mostram que o glifosato na concentração indicada como segura pelo CONAMA, de 65 µg/L por um tempo de exposição de 360 h induziu aumento significativo na frequência de micronúcleos em células sanguíneas das brânquias de machos de *D. rerio*. As brânquias foram escolhidas para este ensaio por serem as estruturas de contato direto do ambiente externo como o organismo. Os resultados evidenciam que os machos expostos absorveram o glifosato e apresentaram uma resposta biológica na forma de micronúcleo. Estudos realizados por Çavas e Könen (2007), com três diferentes concentrações de uma formulação comercial a base glifosato (5, 10 e 15 ppm), amostrados em intervalos de 48, 96 e 144 h, obtiveram aumentos significativos de modo dose-dependente nas frequências de micronúcleo nos peixes *Carassius auratus* (da família *Cyprinidae*). Do mesmo modo, Ventura et al. (2008) demonstraram um aumento significativo em micronúcleos e danos ao DNA em *Oreochromis niloticus* (tilápia do nilo) expostos ao herbicida atrazina em três diferentes concentrações (6,25; 12,5 e 25 µg/L) por 72 h. Tais resultados, demonstram que os peixes podem ser considerados organismos não alvo de herbicidas, pois absorvem estes compostos químicos, e passam a apresentar consequências desta exposição.

O teste de micronúcleo, para detectar a atividade genotóxica de diversos estressores, têm sido utilizado por muitos autores em ensaios de toxicidade em organismos aquáticos, tais como, o efeito de sulfato de cobre em girinos *Lithobates casteianus* (Rocha et al., 2012), de agentes químicos e físicos em peixes *Oreochromis mossambica* (tilápia) e *Cyprinus carpio* (carpa) (Al-Sabti e Metcalfe, 1995), o efeito do Roundup em jacaré-papo-amarelo (*Caiman latirostris*) (Poletta et al., 2009), mostra-se prático, de fácil aplicação e resposta a curto prazo,

devido à sua sensibilidade para detecção de danos citogenéticos (Grisolia, 2002; Çavas e Könen, 2007).

Os organismos aquáticos, quando expostos a poluentes, apresentam com frequência respostas que se traduzem em alterações nos níveis bioquímicos e celulares, ocasionando alterações na estrutura e fisiologia das células e tecidos, que podem comprometer o comportamento de organismos, a integridade da população e dos ecossistemas (van der Oost et al, 2003; Parvez e Raisuddin, 2005).

Estudos sobre o potencial tóxico do glifosato testam uma grande variedade de formulações, doses, métodos de avaliação, organismos modelo e sistemas orgânicos estudados. Por estes motivos, muitos dos resultados apresentados são conflitantes, no que diz respeito aos efeitos deste herbicida (Cavalcante et al., 2008).

Relyea (2005) demonstrou que o herbicida Roundup na concentração de 6,4 mL/m<sup>2</sup> reduziu em 22% a diversidade biológica em ambientes aquáticos, que continham algas e 25 espécies de animais, sendo que o glifosato eliminou duas espécies de girinos de rãs leopardo (*Rana pipiens*) e pererecas cinza (*Hyla versicolor*), e promoveu um declínio de 70% de uma terceira espécie de girino de sapo-madeira (*Rana sylvatica*). Estudo com peixes, *Cyprinus carpio* realizado por Szarek et al. (2000) testou as concentrações de glifosato de 205 mg/L e 410 mg/L, resultaram na morte dos peixes após 60 min e 30 min de exposição, respectivamente. Além disso, foram observadas alterações ultraestruturais nos hepatócitos, como desaparecimento das membranas internas das mitocôndrias e surgimento de estruturas de mielina-like. Em outra espécie de peixe, *Prochilodus lineatus* exposta a 7,5 mg/L e 10 mg/L em 6 h, 24 h e 96 h, foi observado por Langiano e Martinez (2008) um aumento significativo da glicose no sangue, indicando estresse oxidativo, e atividade da catalase no fígado sugerindo ativação das defesas antioxidantes, além de alterações morfológicas. Em fêmeas de *D. rerio* expostas a concentração de 65 µg/L de glifosato por 360 h foi observado um aumento significativo do fator esteroideogênico 1 (SF-1) (Armiliato et al., 2014). Em contraste com esses resultados, Quassinti et al. (2009) em seus estudos *in vitro* com gônadas de *Rana esculenta* expostas ao glifosato na concentração de 100mM, e posteriormente diluída nas concentrações de 10<sup>-3</sup>, 10<sup>-4</sup>, 10<sup>-5</sup> e 10<sup>-6</sup> M, demonstraram não haver efeito adverso sobre a esteroideogênese gonadal.

Dentre os sistemas orgânicos que apresentam alterações quando expostos ao glifosato, o sistema endócrino é considerado um alvo biológico importante da toxicidade do glifosato, pois este atua como

disruptor endócrino, nas funções de hormônio esteróides-dependente. Essas funções podem ser responsáveis por alterações no sistema reprodutivo de machos e fêmeas, afetando o desenvolvimento de características sexuais secundárias, o comportamento sexual e a regulação da gametogênese (Weltzien et al., 2004, Dallegrave et al., 2007; Gasnier et al., 2009; Romano et al., 2012).

A espermatogênese de *D. rerio*, como de outros vertebrados, pode ser dividida em três etapas principais, a etapa de proliferação, a etapa de meiose, e a etapa de diferenciação. Nestas etapas são descritas, por vários autores, inúmeras fases de classificação para a transformação das células germinativas primordiais, durante o processo de espermatogênese, podendo ter mais de 10 etapas descrições para este processo (Leal et al., 2009, Nóbrega et al., 2009, Schulz et al., 2010; Rupik et al., 2011). Neste trabalho, investigamos a toxicidade do herbicida glifosato sobre a estrutura testicular e a espermatogênese de *D. rerio*. Para a descrição da espermatogênese, reconhecemos três estágios distintos, que correspondem aos tipos de cistos germinativos contendo: (i) espermatogônias, (ii) os espermátócitos, (iii) as espermátides (iniciais e tardias) e a presença de espermatozoides no lúmen do túbulo seminífero, semelhante ao descrito anteriormente por Rupik e colaboradores (2011).

Nas análises de biometria corporal e estrutura dos testículos de machos controle e expostos a 65 µg/L de glifosato por 360 h, não foram reconhecidas diferenças em relação ao controle. Por outro lado, houve um aumento significativo no peso dos testículos de machos expostos a 65 µg/L de glifosato por 360 h, que se refletiu no aumento significativos do IGS. A determinação do IGS permite avaliar a maturação das células germinativas e por consequência o momento do ciclo reprodutivo. Desde 1995, o IGS tem sido utilizado com maior frequência para verificar alterações nas gônadas de peixes expostos a poluentes, fornecendo informações úteis da espermatogênese (Kime, 1995).

Alterações no IGS de fêmeas de *D. rerio* expostas a esta mesma concentração de tratamento de glifosato e tempo, foram determinadas anteriormente pelo Laboratório de Reprodução e Desenvolvimento Animal (Armiliato et al., 2014). Diferenças como estas também foram encontradas em trabalhos realizados com ratos Wistar machos recém desmamados, e administrado diariamente a concentração de 250 mg/kg de herbicida Roundup (Romano et al., 2010), igualmente Romano et al. (2012) encontraram tais resultados para machos de ratos Wistar, onde as

mães foram tratadas durante a gestação com igual concentração de herbicida Roundup.

Voltando às alterações do IGS de machos expostos por a 65 µg/L de glifosato por um período maior que 144 horas observadas neste estudo, pode-se supor que elas sejam decorrentes de um aumento de volume citoplasmático das células e/ou no número de células germinativas. Para elucidar estas suposições, foram determinadas as medidas do testículo, e as medidas dos túbulos seminíferos e dos cistos germinativos, que não apresentaram diferenças entre os grupos controle e exposto a 65 µg/L de glifosato por 360 h. Isto demonstra não haver comprometimento do padrão morfológico de organização dos testículos. A determinação do número de células germinativas poderia ajudar a elucidar o efeito do glifosato sobre o parâmetro IGS, contribuindo também para a compreensão da atuação do glifosato como disruptor endócrino em linhagens celulares de peixes. O efeito de disruptor endócrino do glifosato tem sido avaliado em ratos e camundongos, sendo demonstrado alteração no perfil dos hormônios esteroides, que estão diretamente relacionados à maturação gonadal, sendo este um processo complexo e influenciado por fatores de crescimento e hormonais. Um exemplo de proteína importante neste processo é a proteína regulatória esteroidogênica aguda (StAR), pois é uma das principais proteínas envolvidas na diferenciação e maturação gonadal, sendo um marcador de grande interesse na avaliação da função endócrina (Astiz et al., 2009, Romano et al., 2010; Clair et al., 2012).

Nossos resultados mostraram importantes alterações por meio da análise ultraestrutural dos testículos de *D. rerio* expostos a 65 µg/L de glifosato por 360 h. A principal alteração foi a presença de grande quantidade de estruturas com aspecto vesicular e perda da densidade citoplasmática de células de Sertoli. O número de células de Sertoli determina a capacidade espermatogênica e a sobrevivência das células germinativas. Portanto, segundo Nóbrega et al., (2009) as alterações observadas em células de Sertoli podem ter como consequência a perda da sua funcionalidade e conduzir alterações em células germinativas (Schulz et al., 2005; Leal et al., 2009; Schulz et al., 2010). Isto porque, as células de Sertoli são o primeiro ponto de contato de qualquer substância com as células germinativas, de modo que, danos nestas células acarretam danos no aparelho reprodutor, interferindo na reprodução e manutenção das espécies (Clair et al., 2012; Cavalli et al., 2013). É importante lembrar, que a manutenção da comunicação entre as células de Sertoli com as células germinativas e das células

germinativas entre si, é a responsável pelo desenvolvimento sincrônico dos cistos germinativos, típico dos peixes teleósteos, perda da sincronia durante a espermatogênese pode acarretar na não maturação completa dos testículos e interferir na disponibilidade e qualidade dos espermatozoides (Nóbrega et al., 2009).

Os danos causados no aparelho reprodutor são considerados subletais, pois não são capazes de induzir a morte dos organismos, mas sim, alterar significativamente processos bioquímicos e fisiológicos celulares. Partindo das observações ultraestruturais, foram investigadas proteínas de estresse celular (HSP70 induzível) e indução à apoptose (FASL, Bak, BCL2, caspase 3).

Nossos resultados apontam para um aumento na expressão da proteína HSP70 em testículos expostos a concentração de 65 µg/L de glifosato em 144 h de exposição, não sendo mais observado no grupo de 360 h de tratamento. Resultados semelhantes foram encontrados em tecido muscular, fígado e ovários de peixes (Gluszczak et al., 2007; Menezes et al., 2011; Armiliato, 2014). Reconhecemos que a proteína HSP70 induzível apresenta uma resposta relativamente rápida quando da exposição ao glifosato, contudo, esta não é uma resposta duradoura, pois após 15 dias não são reconhecidos níveis de HSP70 induzível.

Em contraste com os resultados de HSP70, observamos neste trabalho a proteína FASL aumentada significativamente no grupo exposto por 360 h. Segundo estudos de Jee et al. (2010) o aumento da expressão desta proteína ocorre de forma tempo dependente. FASL é um receptor transmembrana ativador da apoptose pela via extrínseca (Xu et al., 1999; Koji et al., 2001), cujo aumento está associado ao estresse oxidativo, em ratos (Jee et al., 2010), e já está elucidado que poluentes químicos, aqui incluído os herbicidas, podem provocar estresse oxidativo em organismos aquáticos (Ahmad et al., 2000; Li et al., 2003; Sevgiler et al., 2004; Gluszczak et al., 2007; Menezes et al., 2011; Webster et al., 2014).

Em contrapartida, o testículo é reconhecido por expressar FASL e FAS em altos níveis, sendo a expressão de FASL predominante em células de Sertoli, enquanto que a proteína Fas é reconhecida principalmente em células germinativas (Lee et al., 1999). A via da apoptose FASL/FAS atua como um importante mecanismo fisiológico na eliminação do número de células germinativas excedentes ou anômalas. Estudo realizado por Lee et al. (1999) em ratos expostos à di(2-etilexil)ftalato (produzido a partir do policloreto de vinila - PVC) e 2,5-hexanidiona (hidrocarboneto) e por Jee et al. (2010) com ratos

expostos a zearalenona (micotoxina estrogênica) demonstraram que estes compostos ativaram a via FASL/FAS, e que células de Sertoli "lesionadas" regulam positivamente FASL, para eliminar células germinativas FAS positivas, a quais não podem ser por ela mantidas de forma adequada. São necessários estudos adicionais para caracterizar os mecanismos celulares envolvidos da expressão de FASL/FAS em células somáticas e germinativas de peixes.

Embora neste estudo, tenha sido reconhecido uma aumento de FASL, nenhuma das proteínas de ativação à apoptose investigadas apresentou modificações na sua expressão. Isso sugere que na toxicidade de 65 µg/L glifosato, o sistema FASL aparentemente não ativa a apoptose no testículo de *D. rerio*. Contudo, se relembrarmos as alterações ultraestruturais observadas após 360 h de exposição ao glifosato, principalmente nas células de Sertoli, é muito provável que estas células percam a sua funcionalidade e sejam eliminadas por algum outro tipo de morte celular que não por apoptose. Pode-se supor que o glifosato esteja então induzindo a morte por processos de necrose ou autofagia, por exemplo. A utilização de marcadores para estes processos de morte podem elucidar melhor o tipo de morte para células de Sertoli.

Por fim, este estudo demonstrou a importância de se investigar a toxicidade do glifosato sobre a reprodução masculina, utilizando testículos de peixe. Esta linha de investigação tem sido conduzida principalmente no modelo com ratos, e pouco se sabe dos efeitos deste herbicida em organismos aquáticos e as suas consequências, que podem abranger desde o nível celular, até o sistêmico e populacional.

## 6 CONCLUSÕES

A partir do desenho experimental, que proporcionou a investigação dos efeitos de 65 µg/L de glifosato nos testículos de *D. rerio* expostos a 48 h, 96 h, 144 h e 360 h, podemos concluir que:

- O glifosato dissolvido na água foi incorporado pelos machos, induzindo a formação de micronúcleos;

- Não houve comprometimento da biometria corporal dos peixes, porém, o glifosato induziu após 360 h de exposição um aumento no peso do testículo, o que se refletiu no aumento do IGS;

- Embora tenha afetado o IGS, a exposição ao glifosato por 360 h, não alterou a morfologia e organização dos túbulos seminíferos e dos cistos germinativos;

- Alterações na ultraestrutura das células de Sertoli foram encontradas nos machos expostos ao glifosato por 360 h, com perda da densidade do citoplasma, de organelas e aparecimento de estruturas com aspecto vesicular em grande número;

- Desestruturação dos cistos germinativos, reconhecida pela perda da interação entre células de Sertoli com as células germinativas, e a perda das interações de pontes citoplasmáticas entre as células germinativas, poderia ocasionar a perda do desenvolvimento síncrono dos testículos, típicos de peixe teleósteos;

- O aumento nas primeiras horas de exposição ao glifosato (144 h) de níveis de HSP70 induzível, demonstra que o sistema reprodutivo responde de forma aguda ao estresse provocado pela exposição a este agente tóxico, não havendo caracterização de estresse em 360 horas de exposição;

- Houve aumento na expressão de FASL nas células de Sertoli em 360 h, proveniente da exposição ao glifosato, induzida pelo estresse e temporalmente dependente;

- A toxicidade do glifosato não induziu ativação da via apoptótica, pela expressão das proteínas BAK, BCL2 e caspase 3.



## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahmad, I.; Hamid, T.; Fatima, M.; Chand, H.S.; Jain, S.K.; Athar, M.; Raisuddin, S., 2000. Induction of hepatic antioxidants in freshwater catfish (*Channa punctatus Bloch*) is a biomarker of paper mill effluent exposure. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* 1523, 37-48.
- 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, 775-780.
- Al-Sabti, K.; Metcalfe, C.D., 1995. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. *Mutation Research/Genetic Toxicology* 343, 121-135.
- Almeida, F.F.; Kristoffersen, C.; Taranger, G.L.; Schulz, R.W., 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. *Químiuca Nova* 25, 589-593.
- ANVISA, 2012. 2º Seminário Mercado de Agrotóxicos e Regulação. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Agrotoxicos+e+Toxicologia>. Acesso: em 10/11/2014.
- ANVISA, 2014. Monografia do glifosato. Disponível em: <http://s.anvisa.gov.br/wps/s/t/i>. Acesso: em 10/11/2014.
- Armiliato, N.; Ammar, D.; Nezzi, L.; Stralio, 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, 405-414.
- Armiliato, N. 2014. Toxicidade celular e bioquímica do glifosato sobre os ovários do peixe *Danio rerio*. Tese de Doutorado em Biologia Celular e do Desenvolvimento. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. p 96.

- Astiz, M.; de Alaniz, M.J.; Marra, C.A., 2009. Effect of pesticides on cell survival in liver and brain rat tissues. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72, 2025-2032.
- Begum, G., 2004. Carbofuran insecticide induced biochemical alterations in liver and muscle tissues of the fish *Clarias batrachus* (linn) and recovery response. *Aquatic Toxicology* 66, 83-92.
- Benamú, M.; Schneider, M.; Sánchez, N., 2010. Effects of the herbicide glyphosate on biological attributes of *Alpaida veniliae* (Araneae, Araneidae), in laboratory. *Chemosphere* 78, 871-876.
- Bogoni, J.A.; Armiliato, N.; Araldi-Favassa, C.T.; Techio, V.H., 2014. Genotoxicity in *Astyanax bimaculatus* (Twospot Astyanax) Exposed to the Waters of Engano River (Brazil) as Determined by Micronucleus Tests in Erythrocytes. *Arch Environ Contam Toxicol* 66, 441-449.
- Bouzon, Z.L.; Miguens, F.; Oliveira, E.C., 2000. Male gametogenesis in the red algae *Gracilaria* and *Gracilariopsis* (Rhodophyta, Gracilariales). *Cryptogamie Algologie* 21, 33-47.
- BRASIL, 1989. Divisão Nacional de Vigilância Sanitária de Alimentos DINAL. Portaria nº 685 de 27 de agosto de 1998: "Princípios Gerais para o Estabelecimento de Níveis Máximos de Contaminantes Químicos em Alimentos" e seu Anexo: "Limites máximos de tolerância para contaminantes inorgânicos". *Diário Oficial da União*, 1, 1415-1437.
- BRASIL, 2002. Decreto nº 4074, de 04 de janeiro de 2002: Regulamenta a Lei no 7.802, de 11 de julho de 1989, que 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. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em <[http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/decreto/2002/d4074.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto/2002/d4074.htm)>. Acesso em: 01/12/2014.

- BRASIL, 2005. Resolução Conama, 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, 2007. Decreto Nº 6.099, 26 de abril de 2007. Aprova a Estrutura Regimental e o Quadro Demonstrativo dos Cargos em Comissão do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA, e dá outras providências. Disponível em: <[http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/\\_Ato2007-2010/2007/Decreto/D6099.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2007-2010/2007/Decreto/D6099.htm)>. Acesso em: 10/12/2014.
- Carvan, M.J.; Heiden, T.K.; Tomasiewicz, H., 2005. The utility of zebrafish as a model for toxicological research. *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes* 6, 3-41.
- Cavalcante, D.G.S.M.; Martinez, C.B.R.; Sofia, S.H., 2008. Genotoxic effects of Roundup® on the fish *Prochilodus lineatus*. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 655, 41-46.
- Cavalli, V.L.d.L.O.; Cattani, D.; Rieg, C.E.H.; Pierozan, P.; Zanatta, L.; Parisotto, E.B.; Wilhelm Filho, D.; Silva, F.R.M.B.; Pessoa-Pureur, R.; Zamoner, A., 2013. Roundup disrupts male reproductive functions by triggering calcium-mediated cell death in rat testis and Sertoli cells. *Free Radical Biology and Medicine* 65, 335-346.
- Çağlar, S.; Kolankaya, D., 2008. The effect of sub-acute and sub-chronic exposure of rats to the glyphosate-based herbicide Roundup. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 25, 57-62.
- 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, 263-268.
- Chi, X.; Kale, J.; Leber, B.; Andrews, D.W., 2014. Regulating cell death at, on, and in membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1843, 2100-2113.
- 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, 269-279.

- Costa, M.J.; Monteiro, D.A.; Oliveira-Neto, A.L.; Rantin, F.T.; Kalinin, A.L., 2008. Oxidative stress biomarkers and heart function in bullfrog tadpoles exposed to Roundup Original®. *Ecotoxicology* 17, 153-163.
- Dallegrave, E.; Mantese, F.; Oliveira, R.; Andrade, A.M.; Dalsenter, P.; Langeloh, A., 2007. Pre- and postnatal toxicity of the commercial glyphosate formulation in Wistar rats. *Arch Toxicol* 81, 665-673.
- Dammski, A.P.; Müller, B.R.; Gaya, C., ebrafish - Manual de Criação em Biotério, 1 ed. *Universidade Federal do Paraná*, Curitiba.
- Dores, E.F.G.d.C.; De-Lamonica-Freire, E.M., 2001. Contaminação do ambiente aquático por pesticidas. Estudo de caso: águas usadas para consumo humano em Primavera do Leste, Mato Grosso-análise preliminar. *Quim. Nova* 24, 27-36.
- Fernandes, C.; Fontainhas-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, 426-431.
- Franco, R.; Sánchez-Olea, R.; Reyes-Reyes, E.M.; Panayiotidis, M.I., 2009. Environmental toxicity, oxidative stress and apoptosis: Ménage à Trois. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 674, 3-22.
- 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, 184-191.
- Giesy, J.P.; Dobson, S.; Solomon, K.R., 2000. Ecotoxicological Risk Assessment for Roundup® Herbicide. In: WARE, G. (Ed.). *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*: Springer New York, v.167, .cap. 2, p.35-120.
- Gluszczak, L.; dos Santos Miron, D.; 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, 519-524.
- Grisolia, C.K., 2002. A comparison between mouse and fish micronucleus test using cyclophosphamide, mitomycin C and various pesticides. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 518, 145-150.

- Grivicich, I.; Regner, A.; Rocha, A.B.d., 2007. Apoptosis: programmed cell death. *Revista Brasileira de Cancerologia* 53, 335-343.
- Grosell, M.; Wood, C.M., 2002. Copper uptake across rainbow trout gills mechanisms of apical entry. *Journal of Experimental Biology* 205, 1179-1188.
- Grunwald, D.J.; Eisen, J.S., 2002. Headwaters of the zebrafish—emergence of a new model vertebrate. *Nature Reviews Genetics* 3, 717-724.
- Guilherme, S.; Santos, M.; Barroso, C.; Gaivão, I.; Pacheco, M., 2012. Differential genotoxicity of Roundup® formulation and its constituents in blood cells of fish (*Anguilla anguilla*): considerations on chemical interactions and DNA damaging mechanisms. *Ecotoxicology* 21, 1381-1390.
- Hooftman, R.N.; De Raat, W., 1982. Induction of nuclear anomalies (micronuclei) in the peripheral blood erythrocytes of the eastern mudminnow *Umbra pygmaea* by ethyl methanesulphonate. *Mutation Research Letters* 104, 147-152.
- Huszno, J.; Klag, J., 2012. The reproductive cycle in the male gonads of *Danio rerio* (Teleostei, Cyprinidae). Stereological analysis. *Micron* 43, 666-672.
- IBGE, 2012. Indicadores de desenvolvimento Sustentável - Brasil 2012. Estudos e Pesquisas - Informações Geográficas. 9, p. 350.
- Jee, Y.; Noh, E.-M.; Cho, E.-S.; Son, H.-Y., 2010. Involvement of the Fas and Fas ligand in testicular germ cell apoptosis by zearalenone in rat. *Journal of Veterinary Science* 11, 115-119.
- Jiraungkoorskul, W.; Upatham, E.; 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, 260-267.
- Kime, D.E., 1995. The effects of pollution on reproduction in fish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 5, 52-95.
- Koji, T.; Hishikawa, Y.; Ando, H.; Nakanishi, Y.; Kobayashi, N., 2001. Expression of Fas and Fas ligand in normal and ischemia-reperfusion testes: involvement of the Fas system in the induction of germ cell apoptosis in the damaged mouse testis. *Biology of Reproduction* 64, 946-954.

- Langiano, V.d.C.; Martinez, C.B.R., 2008. Toxicity and effects of a glyphosate-based herbicide on the Neotropical fish *Prochilodus lineatus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 147, 222-231.
- Law, J.M., 2001. Mechanistic considerations in small fish carcinogenicity testing. *ILAR Journal* 42, 274-284.
- Leal, M.C.; Cardoso, E.R.; Nóbrega, R.H.; Batlouni, S.R.; Bogerd, J.; França, L.R.; Schulz, R.W., 2009. Histological and stereological evaluation of zebrafish (*Danio rerio*) spermatogenesis with an emphasis on spermatogonial generations. *Biology of Reproduction* 81, 177-187.
- Lee, J.; Richburg, J.H.; Shipp, E.B.; Meistrich, M.L.; Boekelheide, K., 1999. The FAS system, a regulator of testicular germ cell apoptosis, is differentially up-regulated in sertoli cell versus germ cell injury of the testis 1. *Endocrinology* 140, 852-858.
- Li, W.-m.; Yin, D.-q.; Zhou, Y.; Hu, S.-q.; Wang, L.-s., 2003. 3, 4-Dichloroaniline-induced oxidative stress in liver of crucian carp (*Carassius auratus*). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 56, 251-255.
- Lopes, F.M.; Junior, A.S.V.; 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.
- 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, 129-136.
- Martinez, C.; Cólus, I., 2002. Biomarcadores em peixes neotropicais para o monitoramento da poluição aquática na bacia do rio Tibagi. *A bacia do Rio Tibagi. Editora dos Editores, Londrina, PR, Brazil*, 551-577.
- McClusky, L.M.; Barnhoorn, I.E.J.; van Dyk, J.C.; Bornman, M.S., 2008. Testicular apoptosis in feral *Clarias gariepinus* using TUNEL and cleaved caspase-3 immunohistochemistry. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 71, 41-46.

- Menezes, C.C. de; da Fonseca, M.B.; Loro, V.L.; Santi, A.; Cattaneo, R.; Clasen, B.; Preto, A.; Morsch, V.M., 2011. Roundup effects on oxidative stress parameters and recovery pattern of *Rhamdia quelen*. *Arch Environ Contam Toxicol* 60, 665-671.
- Modesto, K.A.; Martinez, C.B., 2010. Roundup® causes oxidative stress in liver and inhibits acetylcholinesterase in muscle and brain of the fish *Prochilodus lineatus*. *Chemosphere* 78, 294-299.
- Nóbrega, R.; Batlouni, S.; França, L., 2009. An overview of functional and stereological evaluation of spermatogenesis and germ cell transplantation in fish. *Fish Physiology and Biochemistry* 35, 197-206.
- Parg, C.; Seng, W.L.; Semino, C.; McGrath, P., 2002. Zebrafish: a preclinical model for drug screening. *Assay and Drug Development Technologies* 1, 41-48.
- Parvez, S.; Raisuddin, S., 2005. Protein carbonyls: novel biomarkers of exposure to oxidative stress-inducing pesticides in freshwater fish *Channa punctata* (Bloch). *Environmental Toxicology and Pharmacology* 20, 112-117.
- 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, 61-66.
- Pessagno, R.C.; Sánchez, R.M.T.; dos Santos Afonso, M., 2008. Glyphosate behavior at soil and mineral-water interfaces. *Environmental Pollution* 153, 53-59.
- Poletta, G.L.; Larriera, A.; Kleinsorge, E.; Mudry, M.D., 2009. Genotoxicity of the herbicide formulation Roundup® (glyphosate) in broad-snouted caiman (*Caiman latirostris*) evidenced by the Comet assay and the Micronucleus test. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 672, 95-102.
- 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, 61-69.
- Quassinti, L.; Maccari, E.; Murri, O.; Bramucci, M., 2009. Effects of paraquat and glyphosate on steroidogenesis in gonads of the frog *Rana esculenta* in vitro. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 93, 91-95.

- Rebello, R.; Vasconcelos, R.; Buys, B.; Rezende, J.; Moraes, K.; Oliveira, R., 2010. Produtos agrotóxicos e afins comercializados em 2009 no Brasil: uma abordagem ambiental. *Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), Brasília, Brazil*.
- Relyea, R.A., 2005. The impact of insecticides and herbicides on the biodiversity and productivity of aquatic communities. *Ecological Applications* 15, 618-627.
- Reynolds, E.S., 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *The Journal of Cell Biology* 17, 208-212.
- Rocha, C.A.M. da; da Consolação Almeida, V.H.; da Silva Costa, A.; Sagica-Júnior, J.C.; Monteiro, J.A.N.; de Souza, Y.S.R.; da Cunha, L.A.; da Silva Pinheiro, R.H., 2012. Induction of micronuclei and other nuclear abnormalities in bullfrog tadpoles (*Lithobates catesbeianus*) treated with copper sulphate. *International Journal of Genetics* 2, 06-11.
- Romano, M.; Romano, R.; Santos, L.; Wisniewski, P.; Campos, D.; de Souza, P.; Viau, P.; Bernardi, M.; Nunes, M.; de Oliveira, C., 2012. Glyphosate impairs male offspring reproductive development by disrupting gonadotropin expression. *Arch Toxicol* 86, 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. *Arch Toxicol* 84, 309-317.
- 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, 833-839.
- Schmid, W., 1975. The micronucleus test. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects* 31, 9-15.
- Schmidt, É.C.; Scariot, L.A.; Rover, T.; Bouzon, Z.L., 2009. Changes in ultrastructure and histochemistry of two red macroalgae strains of *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Gigartinales), as a consequence of ultraviolet B radiation exposure. *Micron* 40, 860-869.

- 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, 390-411.
- Schulz, R.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, 891-898.
- Schulz, R.W.; Miura, T., 2002. Spermatogenesis and its endocrine regulation. *Fish Physiology and Biochemistry* 26, 43-56.
- Sevgiler, Y.; Oruç, E.Ö.; Üner, N., 2004. Evaluation of etoxazole toxicity in the liver of *Oreochromis niloticus*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 78, 1-8.
- Silva, M.D.d.; Peralba, M.d.C.R.; Mattos, L.T., 2003. Determinação de glifosato e ácido aminometilfosfônico em águas superficiais do Arroio Passo do Pilão.
- Spurr, A.R., 1969. A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *Journal of Ultrastructure Research* 26, 31-43.
- Susnow, N.; Zeng, L.; Margineantu, D.; Hockenbery, D.M., 2009. Bcl-2 family proteins as regulators of oxidative stress. *Seminars in Cancer Biology* 19, 42-49.
- Szarek, J.; Siwicki, A.; Andrzejewska, A.; Terech-Majewska, E.; Banaszkiwicz, T., 2000. Effects of the herbicide Roundup™ on the ultrastructural pattern of hepatocytes in carp (*Cyprinus carpio*). *Marine Environmental Research* 50, 263-266.
- Toni, L.R.; de Santana, H.; Zaia, D.A., 2006. Adsorção de glifosato sobre solos e minerais. *Química Nova* 29, 829.
- USEPA. Research Plan for Endocrine Disruptors. AGENCY, U. S. E. P. Washington 1998.
- USEPA. Basic Information about Glyphosate in Drinking Water. Disponível em <http://water.epa.gov/drink/contaminants/basicinformation/glyphosate.cfm/>. Acesso em: 01/12/2014.
- van der Oost, R.; Beyer, J.; Vermeulen, N.P., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental toxicology and pharmacology* 13, 57-149.

- van der Ven, L.; Wester, P. Histology and histopathology atlas of the zebrafish 2003. Disponível em: < <http://zfishtoxpat.comoj.com/> >. Acesso em: 02/11/2014.
- Ventura, B.d.C.; de Angelis, D.d.F.; Marin-Morales, M.A., 2008. Mutagenic and genotoxic effects of the Atrazine herbicide in *Oreochromis niloticus* (Perciformes, Cichlidae) detected by the micronuclei test and the comet assay. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 90, 42-51.
- Vereecken, H., 2005. Mobility and leaching of glyphosate: a review. *Pest Management Science* 61, 1139-1151.
- 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, 1271-1279.
- Wei, M.C.; Zong, W.-X.; Cheng, E.H.-Y.; Lindsten, T.; Panoutsakopoulou, V.; Ross, A.J.; Roth, K.A.; MacGregor, G.R.; Thompson, C.B.; Korsmeyer, S.J., 2001. Proapoptotic BAX and BAK: A Requisite Gateway to Mitochondrial Dysfunction and Death. *Science* 292, 727-730.
- Weisbrod, A.V.; Burkhard, L.P.; Arnot, J.; Mekenyan, O.; Howard, P.H.; Russom, C.; Boethling, R.; Sakuratani, Y.; Traas, T.; Bridges, T., 2007. Workgroup report: review of fish bioaccumulation databases used to identify persistent, bioaccumulative, toxic substances. *Environmental Health Perspectives*, 255-261.
- Weltzien, F.-A.; Andersson, E.; Andersen, Ø.; Shalchian-Tabrizi, K.; Norberg, B., 2004. The brain–pituitary–gonad axis in male teleosts, with special emphasis on flatfish (Pleuronectiformes). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 137, 447-477.
- Westerfield, M., 2000. The zebrafish book: a guide for the laboratory use of zebrafish (*Danio rerio*). *University of Oregon Press*.
- 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, 117-165.

- Wilson, J.M.; Bunte, R.M.; Carty, A.J., 2009. Evaluation of rapid cooling and tricaine methanesulfonate (MS222) as methods of euthanasia in zebrafish (*Danio rerio*). *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science: JAALAS* 48, 785.
- Xu, J.P.; Li, X.; Mori, E.; Guo, M.W.; Matsuda, I.; Takaichi, H.; Amano, T.; Mori, T., 1999. Expression of Fas-Fas Ligand in Murine Testis. *American Journal of Reproductive Immunology* 42, 381-388.
- Yamashita, M., 2003. Apoptosis in zebrafish development. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 136, 731-742.